



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Ана Ђековић

**ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА НУКЛЕОФИЛНИХ
СУПСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА ЗЛАТА(III)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013

Аутор

Име и презиме: Ана Ђековић

Датум и место рођења: 26.03.1984. год. Краљево

Садашње запослење: Научно-истраживачки центар, Државни Универзитет у Новом Пазару

Докторска дисертација

Наслов: Испитивање механизма нуклеофилних супституционих реакција комплекса злата(III)

Број страница: 114 (+50)

Број слика: 79

Број библиографских јединица: 162

Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Крагујевац

Научна област(УКД): Хемија(54)-Неорганска хемија(546)

Ментор: др Живадин Д. Бугарчић

Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 13.03.2012. год.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. Др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област*: Неорганска хемија
2. Др Милош Ђуран, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област*: Неорганска хемија
3. Др Биљана Петровић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област*: Неорганска хемија
4. Др Тања Солдатовић, доцент, Универзитет у Новом Пазару, Нови Пазар *Научна област*: Неорганска хемија

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. Др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област*: Неорганска хемија
2. Др Милош Ђуран, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област*: Неорганска хемија
3. Др Живослав Тешић, редовни професор, Хемијски факултет, Београд, *научна област*: Аналитичка хемија
4. Др Биљана Петровић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област*: Неорганска хемија
5. Др Тања Солдатовић, доцент, Универзитет у Новом Пазару, Нови Пазар *Научна област*: Неорганска хемија

Датум одбране докторске дисертације:

ПОРОДИЦИ

Ова докторска дисертација је рађена на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, под менторским руководством проф. др Живадина Д. Бугарчића.

Професору др Живадину Д. Бугарчићу захваљујем се на указаном поверењу, стрпљењу, сугестијама, саветима и подрици током израде, писања и прегледа ове докторске дисертације.

Искрено се захваљујем професорима др Милошу И. Ђурану, др Живославу Тешићу и доц. др Тањи Солдатовић на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе.

Др Биљани Петровић такође се захваљујем на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе. Посебно се захваљујем др Петровић на квалитетним саветима и искреној помоћи током израде и писања докторске дисертације.

Најискреније се захваљујем др Јовани Богојески, на великој и несебичној помоћи и саветима у експерименталном раду, као и на огромној помоћи током израде тезе.

Сарадницима из групе проф. Бугарчића такође захваљујем на подрици и квалитетном тимском раду.

Захвалност дугујем ректорату, професорима и колегама са Државног универзитета у Новом Пазару на указаном поверењу и разумевању током израде ове докторске дисертације.

Највећу и најтоплију захвалност дугујем сестри Маји и веренику Миодрагу на несебичној подрици и стрпљењу, као и својим родитељима, који су ми увек били велики ослонац у животу, безусловно и безрезервно ме волели, веровали и увек чврсто стајали уз мене.

СПИСАК РАДОВА

Радови објављени у међународним научним часописима

1. M. Milovanović, **A. Djeković**, V. Volarević, B. Petrović, N. Arsenijević, Ž. D. Bugarčić;
Ligand substitution reactions and cytotoxic properties of $[Au(L)Cl_2]^+$ and $[AuCl_2(DMSO)_2]^+$ complexes (L = ethylenediamine and S-methyl-L-cysteine);
Journal of Inorganic Biochemistry, 2010, vol. 104, br. 9, str 944-949.
ISSN: 0162-0134 DOI: 10.1016 **M21**
2. V. Volarević, M. Milovanović, **A. Djeković**, B. Petrović, N. Arsenijević, Ž. D. Bugarčić;
The cytotoxic effect of some selected gold(III) complexes on 4T1 cells and their role in prevention of breast tumor growth in BALB/c mice;
Journal of the Balcan Oncology, 2010, vol.15, br.4, str 768-773.
ISSN: 1107-0625 DOI: IDS Number: 710TL; **M23**
3. **A. Djeković**, B. Petrović, R. Puchta, Ž. D. Bugarčić, R. Van Eldik;
Kinetics and mechanism of the reactions of Au(III) complexes with some biologically relevant molecules;
Dalton Transaction, 2012, vol. 41, str 3633-3641.
ISSN: 1477-9226 DOI:10.1039/C2DT11843B **M21**
4. M. Arsenijević, M. Milovanović, V. Volarević, **A. Djeković**, T. Kanjevac, N. Arsenijević, S. Đukić, Ž. D. Bugarčić;
Cytotoxicity of gold(III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line,
Medicinal Chemistry, 2012, vol. 8, str 2-8.
ISSN: 1573-4064 DOI: 10.2174/157340612799278469 **M23**

5. S. M. Janković, **A. Đeković**, Ž. D. Bugarčić, S. V. Janković, G. Lukić, M. Folić, D. Čanović;

Effects of aurothiomalate and gold(III) complexes on spontaneous motility of isolated human oviduct,

Biometals, 2012, vol. 25, str 919–925.

ISSN:0966-0844

DOI 10.1007/s10534-012-9558-2

M23

Саопштења на научним скуповима у иностранству

1. J. Rosić, **A. Đeković**, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić

The interactions between Pt(II) complexes and some sulphur and nitrogen donor biomolecules

6th Internacional Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, 2008, Sofia, Bulgaria, September 10-14th, 3-P33.

2. **A. Đeković**, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić

Kinetics and mechanism of the substitution reactions between some Au(III) complexes and biologically relevant ligands

The 5th International Conference on Gold Science, Technology and Its Applications, 2009., Heidelberg, Germany. July 26 – 29th, 2-P349.

3. M. Milovanović, V. Volarević, **A. Djeković**, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić, N. Arsenijević

Effects of Au(III) complexes on human lymphocyte leukemia (HLL) cells

The 5th International Conference on Gold Science, Technology and Its Applications, 2009., Heidelberg, Germany. July 26 – 29th, 2-P357.

4. **A. Đeković**, B. Petrović, R. van Eldik, Ž. D. Bugarčić

Kinetics and mechanism of the substitution reactions between some bifunctional Au(III) complexes and biologically relevant N-donor ligands

First EuCheMS Inorganic Chemistry Conference, 2011, Manchester, UK, April 11-14th, RM P13.

Саопштења на научним скуповима у земљи

1. **A. Đeković**, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić

Kinetics and mechanism of the substitution reactions between some Au(III) complexes and biologically relevant ligands

47th Meeting of the Serbian Chemical Society, 2009, Belgrade, Serbia, March 21st, NH 02.

2. **A. Đeković**, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić

Ispitivanje interakcija nekih monofunkcionalnih Au(III) kompleksa sa S-donorskim ligandima

49th Meeting of the Serbian Chemical Society, Kragujevac, 13-14 May, 2011, NH06-O.

ИЗВОД

Лекови на бази платине имају важну улогу у лечењу тумора. Клинички успех платинских једињења изазвао је велико интересовање за испитивање других платинских и неплатинских лекова који би испољавали боља цитотоксична својства, добре антитуморске карактеристике и повољнији фармаколошки профил. Различита једињења јона метала (нпр. рутенијума, калаја, паладијума, титана, злата, бакра) су интензивно испитивана током последње три деценије као потенцијални медикаменти у борби против тумора. Током последњих 10 година велико интересовање је усмерено на Au(III) једињења. То је за резултат дало велики број новосинтетисаних једињења Au(III) са већом стабилношћу при физиолошким условима и добром цитотоксичношћу *in vitro* на ћелијама тумора. Први Au(III) комплекси нове генерације синтетисани су 1990 године. Прихватљива стабилност ових једињења злата омогућава широку фармаколошку примену *in vivo* и *in vitro*. Након тога, нова једињења Au(III) су синтетисана у неколико светских лабораторија, и показала су значајну биолошку активност.

Цитотоксични ефекти нових једињења Au(III) испитивани су на различитим линијама ћелија тумора. Недавно објављени резултати су показали да Au(III) комплекс са дитиокарбаматом има боља цитотоксична својства *in vitro* од цисплатине на линијама ћелија тумора. Такође, Au(III) комплекси су показали слабу интеракцију са молекулом ДНК што доводи до малих модификација двоструког хеликса. Стабилност Au(III) комплекса може се повећати, чак и на неутралном рН, уз адекватан избор инертних лиганда, при чему остаје очувана биолошка активност. То се може постићи присуством инертног лиганда са најмање два азот-донорска атома директно координована за Au(III) јон, што доводи до значајног смањења редокс потенцијала комплекса.

У покушају да дефинишемо однос између структуре и функције нове групе цитотоксичних и потенцијално антитуморских једињења, у оквиру ове докторске тезе проучавана је интеракција између неких Au(III) комплекса и ДНК фрагмената, који

представљају класичну мету за везивање Pt(II) комплекса. Добијени резултати су приказани следећим редоследом:

- Испитивана је кинетика супституционих реакција између монофункционалних Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$, и биолошки релевантних лиганата L-хистидина (L-His), инозина (Ino), инозин-5'-монофосфата (5'-IMP) и гуанозин-5'-монофосфата (5'-GMP). Сва испитивања су вршена у 25 mM HEPES пуферу (pH = 7,2) у присуству NaCl да би се спречила спонтана хидролиза комплекса. Реакције су праћене као реакције *псеудо*-првог реда у функцији концентрације лиганата и температуре на stopped-flow спектрофотометру. Комплекс $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ је реактивнији од $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ комплекса, што је потврђено ДФТ прорачунима. Утврђена је 50% нижа енергија активације за *terpy* у односу на *dien* комплекс.

- Такође, испитивана је кинетика супституционих реакција бифункционалних Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$, са азот-везивним лигандима L-хистидином (L-His), инозином (Ino), инозин-5'-монофосфатом (5'-IMP) и гуанозин-5'-монофосфатом (5'-GMP) у 25 mM HEPES пуферу (pH = 7,2) у присуству NaCl. Реакције су изичаване као реакције *псеудо*-првог реда у функцији концентрације лиганата и температуре помоћу stopped-flow спектрофотометрије. Комплекс $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ је реактивнији од $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ комплекса. Реактивност испитиваних нуклеофила следи исти редослед за оба испитивана комплекса и опада у низу L-His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino. На основу вредности активационих параметара доказано је да се све испитиване реакције дешавају по асоцијативном механизму супституције. ДФТ израчунавања су показала да се супституција лиганата код $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ комплекса помоћу имидазола одиграва по механизму измене са значајним степеном асоцијативног карактера.

- Изучавана је кинетика реакције комплексирања $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ и фрагмената ДНК. Комплекс $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ је реактивнији од $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса, што се може објаснити присуством *trans*-ефекта координованог атома сумпора из S-метил-L-цистеина. У реакцији са $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, L-His реагује брже од ДНК фрагмената, али у реакцији са $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ 5'-GMP се показао као најбољи нулеофил. Активациони параметри указују да се све реакције одвијају по асоцијативном механизму.

- Цитотоксичност комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ испитивана је *in vitro* на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL). Сви комплекси су показали добре

цитотоксичне ефекте, а $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекс је показао цитотоксичност сличну цисплатини.

- Изучавана је цитотоксичност комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ на 4T1 ћелијској линији тумора дојке миша *in vitro* и *in vivo* и упоређене су њихове антитуморске карактеристике са цисплатином. Међу испитиваним $\text{Au}(\text{III})$ комплексима $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ је показао најбоље цитотоксичне ефекте у *in vitro* условима. Цитотоксичност $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и цисплатине је слична при свим испитиваним концентрацијама. Подаци на основу *in vivo* експеримента показују да од испитиваних $\text{Au}(\text{III})$ комплекса само $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ може да спречи раст примарног тумора дојке. Комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ је показао знатно боље карактеристике од $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ и цисплатине. Поред тога, мишеви који су примили $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекс дуже су живели у поређењу са мишевима који су примили цисплатину и добијали на тежини. Ова испитивања су показала да комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ може да буде добар кандидат за будућа фармаколошка испитивања рака дојке.

- Цитотоксичност комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ испитивана је на A549 ћелијској линији епитела карцинома плућа, а рађени су и тестови цитотоксичности (MTT и LDH тест) и тест апоптозе. Резултати су показали да су сви тестирани $\text{Au}(\text{III})$ комплекси показали цитотоксично дејство на A549 ћелијској линији. Највећу цитотоксичност је показао $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ комплекс.

- Такође, испитиван је утицај ауротиомалата, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ комплекса на покретљивост изолованих ћелија јајовода код жена. Резултати су показали да једино са повећањем концентрације комплекса $[\text{Au}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2]^+$ повећавају се спонтане активности изолованих ћелија.

SUMMARY

Presently, platinum drugs are playing a major role within established medical treatments of cancer. The wide clinical success of platinum compounds has prompted a great deal of interest in other platinum and non-platinum metallodrugs that might exhibit comparable cytotoxic properties, hopefully accompanied by a different antitumor specificities and by a more favorable pharmacological profile. Thus, various classes of metal compounds were intensively investigated during the last three decades as potential anticancer agents based on several different metals (e.g., ruthenium, tin, palladium, titanium, gold, copper). In particular, during the last 10 years, much interest has focused on Au(III) compounds because a number of newly synthesized Au(III) metallodrugs turned out to display appreciable stability under physiological conditions. They also show a highly cytotoxic effects *in vitro* toward selected human tumor cell lines. The first Au(III) complexes of the new generation were described in the 1990s. The acceptable solution stability of these gold compounds facilitated extensive pharmacological testing, both *in vitro* and *in vivo*, with encouraging results. Subsequently, several other classes of cytotoxic gold(III) compounds were developed in a few laboratories worldwide and were found to exhibit very attractive biological profiles.

Cytotoxic effects of novel Au(III) compounds were measured on different tumour cell lines. Recently reported results have shown that several new Au(III) dithiocarbamate complexes *in vitro* have even better cytotoxic properties than cisplatin toward a series of human tumour cell lines. Also, some Au(III) complexes show a very weak interaction with DNA and slight modifications of the double helix. Some Au(III) complexes could be significantly stabilized, even at neutral pH, with the appropriate choice of the inert ligands, preserving its peculiar biological properties. Thus, the presence of at least two nitrogen donors directly coordinated to the Au(III) centre leads to a significant decrease in the reduction potential of the complex.

In an attempt to define preliminary structure-function relationships within the new class of cytotoxic and potentially antitumor compounds, in this theses is presented the interactions

between some Au(III) complexes with representative DNA fragments, the classic target of Pt(II) complexes. The obtained results are presented in this order:

- The kinetics of the substitution reactions between monofunctional Au(III) complexes, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$, and biologically relevant ligands such as L-histidine (L-His), inosine (Ino), inosine-5'-monophosphate (5'-IMP) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) were studied in detail. All kinetic studies were performed in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of NaCl to prevent the spontaneous hydrolysis of the complexes. 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 is more reactive than the $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ complex, which was confirmed by quantum chemical DFT calculations. A more than 50 % lower activation energy for the *terpy* than for the *dien* based complex was found.

- The kinetics of the substitution reactions between bifunctional Au(III) complexes, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$, and biologically relevant ligands such as L-histidine (L-His), inosine (Ino), inosine-5'-monophosphate (5'-IMP) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) were studied in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of NaCl. The reactions were followed under *pseudo*-first order conditions as a function of ligand concentration and temperature using stopped-flow spectrophotometry. The bifunctional $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex is more reactive than the $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ complex. The reactivity of the studied nucleophiles follows the same order for both complexes, *viz.* L-His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino. According to the measured activation parameters all studied reactions follow an associative substitution mechanism. Quantum chemical calculations DFT calculations suggest that ligand substitution in $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ by imidazole follows an interchange mechanism with a significant degree of associative character.

- The kinetics of the complex formation of $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ complexes with fragments of DNA were also studied. The $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ complex is more reactive than $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ what could be explained by *trans*-effect of coordinated sulphur atom from S-methyl-L-cysteine. L-Histidine reacts faster than DNA constituents in the reaction with $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, but in the reaction with $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ 5'-GMP is the best nucleophile. The activation parameters for all studied reactions suggest an associative substitution mechanism.

- The cytotoxicity of $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ was evaluated *in vitro* against chronic lymphocytic leukemia cells (CLL). All complexes showed significant cytotoxic effects, but $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ showing a potency comparable to cisplatin.

- The cytotoxic activity of $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ complexes on 4T1 mouse breast cancer cell line were investigated *in vitro* and *in vivo* and compared the results with cisplatin. Among the tested complexes $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ showed the best cytotoxic effects *in vitro*. The cytotoxic effects of $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ and cisplatin were similar at all concentrations. The data from the *in vivo* experiments showed that only $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ can prevent the primary breast tumor growth. $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ was tolerated well and much better than $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ and cisplatin. In addition, mice that received $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ showed better survival time in comparison with mice that received cisplatin. Complex $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ seems to be good candidate for future pharmacological evaluation in breast cancer research.

- The cytotoxicity of $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ was tested on A549 human lung carcinoma epithelial cell line and was evaluated by cytotoxic (MTT and LDH test) and apoptotic assays. The results showed that all tested gold(III) complexes displayed cytotoxic effect on A549 cells. Among the tested Au(III) complexes, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ showed the best cytotoxic effects.

- The influence of the aurothiomalate, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ on spontaneous contractions of isolated women Fallopian tube ampulla and isthmus were investigated. The results showed that just the increase of $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ concentration increases the spontaneous activity of the isolated Fallopian tube isthmus without effect on the isolated ampulla.

СПИСАКОЗНАКА:

UV-VIS	спектроскопија у ултраљубичастом и видљивом делу спектра
Stopped-flow	метода заустављеног тока
^1H NMR	протонска нуклеарно магнетна резонантна спектроскопија
^{13}C NMR	угљеник-13 нуклеарно магнетна резонантна спектроскопија
IR	инфрацрвена спектроскопија
S_E	електрофилна супституција
S_N	нуклеофилна супституција
D	дисоцијативни механизам
A	асоцијативни механизам
I	механизам измене
E_a	енергија активирања
R	гасна константа ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{M}^{-1}$)
T	температура (K)
ΔH^\ddagger	промена енталпије активирања
ΔS^\ddagger	промена ентропије активирања
ΔG^\ddagger	промена слободне (Гибсове) енергије
ΔV^\ddagger	промена запремине активирања
N	Авогадров број ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
h	Планкова константа ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$)
P	притисак
k_1	константа брзине хемијске реакције која се одиграва по солволитичком путу
k_2	константа брзине реакције директне нуклеофилне супституције
k	константа брзине хемијске реакције
k_o	фактор учесталости
py	пиридин
n_{Pt}	нуклеофилна реактивност
Me_2S	диметилсулфид
dien	диетилентриамин (1,5-диамино-3-азапентан)
en	етилендиамин

<i>цисплатина</i>	<i>cis</i> -диаминдихлоридоплатина(II)
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
L-мет	L-метионин
L-Cis	L-цистеин
5'-GMP	гуанозин-5'-монофосфат
INO	инозин
5'-IMP	инозин-5'-монофосфат
L-His	L-хистидин
AMP	аденозин-5'-монофосфат
ADP	аденозин-5'-дифосфат
ATP	аденозин-5'-трифосфат
dach	1,2-диаминциклохексан
SMC	S-метил-L-цистеин
bipy	2,2'-бипиридин
dmsо	диметилсулфоксид
bpma	<i>bis</i> -(2-пиридилметил)амин
terpy	терпиридин (2,2':6',2''-терпиридин)
t	време (s)
M	моларитет
k _{obsd}	константа брзине реакције <i>pseudo</i> -првог реда
CLL	ћелије хроничне лимфоцитне леукемије
4T1	ћелијска линија тумора дојке миша
A549	ћелијска линија епитела карцинома плућа
A2780	ћелијска линија карцинома јајника
LDH	лактат дехидрогеназа
FBS	серум говеђег фетуса
RPMI 1640	хранљиви медијум
MTT	(3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид
PBS	фосфатни пуфер
TrxR	тиоредоксин-редуктаза
Naphth	нафталимид
dppе	(дифенилфосфино)етан
DAMP	2-(диметиламинометил)фенил
ppy	фенилпиридин
phen	1,10-фенантролин
Guo	гуанозин
Cyclam	1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан
Nu	нуклеофил
<i>Bpma</i>	N-бензил- <i>bis</i> (2-пиридилметил)амин

<i>pbH</i>	2-(2'-пиридил)бензимидазол
Нерес	N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфидна киселина
NADH	никотинадениндинуклеодид

САДРЖАЈ

УВОД.....	1
1. ОПШТИ ДЕО	3
1.1 ЗЛАТО	3
1.2 ЗЛАТО (I) КОМПЛЕКСИ	6
1.3 АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА Au(III) ЈОНА.....	10
1.3.1 Механизам антитуморског дејства комплекса Au(III) јона.....	17
1.4 ИНТЕРАКЦИЈЕ РАЗЛИЧИТИХ КОМПЛЕКСА Au(III) ЈОНА СА БИОЛОШКИ АКТИВНИМ НУКЛЕОФИЛИМА	19
1.5 Au(III) КОМПЛЕКСИ – ПРЕСПЕКТИВА.....	26
1.6 СУПСТИТУЦИОНЕ РЕАКЦИЈЕ КОМПЛЕКСНИХ ЈЕДИЊЕЊА.....	30
1.7 АКТИВАЦИОНИ ПАРАМЕТРИ	32
1.8 ОДРЕЂИВАЊЕ МЕХАНИЗАМА НУКЛЕОФИЛНИХ СУПСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА	35
1.9 СУПСТИТУЦИОНЕ РЕАКЦИЈЕ КВАДРАТНО – ПЛАНАРНИХ КОМПЛЕКСА	36
ЗАДАТАК РАДА	41
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	43
2.1 РЕАГЕНСИ И РАСТВОРИ	43
2.1.1 Синтеза комплексних једињења	43
2.2 ИНСТРУМЕНТИ	44
2.3 КИНЕТИЧКА МЕРЕЊА	47
2.3.1 Реакције супституције монофункционалних комплекса Au(III) и азот-везивних биомолекула.....	47
2.3.2 Реакције супституције бифункционалних [Au(bipy)Cl ₂] ⁺ и [Au(dach)Cl ₂] ⁺ комплекса и азот-везивних биомолекула	50
2.3.3 Реакције супституције бифункционалних [Au(en)Cl ₂] ⁺ и [Au(SMC)Cl ₂] комплекса и азот-везивних биомолекула.....	51

2.4 КВАНТНО-ХЕМИЈСКА МЕТОДА	51
2.5 ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ	51
2.5.1 Испитивање цитотоксичности Au(III) комплекса.....	51
2.5.2 Испитивање цитотоксичности изабраних комплекса Au(III) јона на 4T1 ћелији и спречавању раста тумора дојке код BALB/c миша	52
2.5.3 Испитивање цитотоксичности комплекса Au(III) јона на A549 епителу ћелијске линије карцинома плућа.....	54
2.5.4 Испитивање ефеката ауротиомалата и комплекса Au(III) јона на покретљивост изолованих јајовода жена.....	57
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА.....	59
3.1 РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА РЕАКЦИЈА СУПСТИТУЦИЈЕ НЕКИХ МОНОФУНКЦИОНАЛНИХ КОМПЛЕКСА Au(III) СА АЗОТ-ДОНОРСКИМ БИОМОЛЕКУЛИМА	59
3.2 РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА РЕАКЦИЈА СУПСТИТУЦИЈЕ БИФУНКЦИОНАЛНИХ [Au(dach)Cl ₂] ⁺ И [Au(bipy)Cl ₂] ⁺ КОМПЛЕКСА СА АЗОТ-ДОНОРСКИМ БИОМОЛЕКУЛИМА	66
3.3 РЕЗУЛТАТИ ИСПИТИВАЊА РЕАКЦИЈА СУПСТИТУЦИЈЕ БИФУНКЦИОНАЛНИХ [Au(en)Cl ₂] ⁺ И [Au(SMC)Cl ₂] КОМПЛЕКСА СА АЗОТ-ДОНОРСКИМ БИОМОЛЕКУЛИМА	76
3.4 ДФТ ИЗРАЧУНАВАЊА	85
3.5 РЕЗУЛТАТИ ДОБИЈЕНИ ИСПИТИВАЊЕМ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ [Au(en)Cl ₂] ⁺ И [Au(SMC)Cl ₂] КОМПЛЕКСА	86
3.6 РЕЗУЛТАТИ ДОБИЈЕНИ ИСПИТИВАЊЕМ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ИЗАБРАНИХ КОМПЛЕКСА Au(III) НА 4T1 ЋЕЛИЈИ И СПРЕЧАВАЊУ РАСТА ТУМОРА ДОЈКЕ КОД BALB/C МИША	88
3.7 РЕЗУЛТАТИ ДОБИЈЕНИ ИСПИТИВАЊЕМ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСА Au(III) НА A549 ЕПИТЕЛУ ЋЕЛИЈСКЕ ЛИНИЈЕ КАРЦИНОМА ПЛУЋА	94
3.8 РЕЗУЛТАТИ ДОБИЈЕНИ ИСПИТИВАЊЕМ ЕФЕКТА АУРОТИОМАЛАТА И КОМПЛЕКСА Au(III) ЈОНА НА ПОКРЕТЉИВОСТ ИЗОЛОВАНИХ ЈАЈОВОДА ЧОВЕКА	98
ЗАКЉУЧАК.....	100
ЛИТЕРАТУРА.....	103
БИОГРАФИЈА	113
ПРИЛОГ	114

УВОД

Испитивање интеракција између комплекса јона прелазних метала и једињења која имају важну биолошку улогу, укључујући и хелијске структуре, могу допринети бољем увиду у процесе који су значајни за физиолошку и фармаколошку активност јона прелазних метала. Понашање комплекса у биолошким условима, као и проналазак алтернативних третмана, може допринети бољем познавању механизма деловања комплекса који се користе у медицини. Циљ је наћи комплексе који су активнији у поређењу са већ коришћеним, а који поседују мања токсична својства.

Примена комплекса јона метала у лечењу тумора започиње са открићем антитуморских особина цисплатине.¹ Данас се цисплатина рутински користи као цитостатик широм света. Цисплатина проузрокује бројне токсичне ефекте, док је истовремено ограничен број тумора на којима је активна. Из поменутих разлога данашња истраживања су усмерена на синтезу и испитивање комплекса различитих јона метала, као што су Ru(III/II) и Au(III).^{2,3} Међу новим не-платинским антитуморским комплексима, комплекси злата су недавно привукли пажњу као једињења са различитим особинама од цисплатине, али са изразитом способношћу да спречавају раст хелије тумора.^{4,5} Сматра се да комплекси злата спречавају раст хелије на тај начин што инхибирају протеине унутар митохондрије, што ову групу једињења чини посебно интересантним.⁵⁻⁷

Комплекси Au(III) су изоелектронски и изоструктурни са комплексима Pt(II). Поред тога, Au(III) јон гради комплексе са квадратно-планарном геометријом као и Pt(II) јон. Зато комплекси Au(III) представљају добре кандидате за синтезу нових једињења која би могла да покажу боље антитуморске особине од комплекса Pt(II).⁸ Међутим, комплекси Au(III) се одликују изразитом нестабилношћу, а сам јон Au(III) лако подлеже диспропорционисању.

Почетком 90-тих година поново оживљава интерес за синтезу комплекса Au(III), а главни циљ представља добијање стабилног комплекса при физиолошким условима.

Истраживања која су уследила као резултат су дала нове структурно различите квадратно-планарне комплексе Au(III) .^{4,5,9} Новосинтетисани комплекси су дали обећавајуће резултате, јер су показали цитотоксичне особине на већем броју ћелија тумора човека. Механизам по коме Au(III) комплекси показују антитуморско дејство је још увек непознат, али су истраживања показала да Au(III) комплекси имају мали афинитет за везивање са молекулом ДНК.⁵

Тема ове докторске дисертације је испитивање интеракција између Au(III) комплекса и биолошки значајних лиганда $\text{L-хистидина (L-His)}$, инозина (Ino), инозин-5'-монофосфата ($5'\text{-IMP}$) и гуанозин-5'-монофосфата ($5'\text{-GMP}$). У оквиру овог рада испитивана је кинетика и механизам супституционих реакција монофункционалних ($[\text{Au(dien)Cl}]\text{Cl}_2$ и $[\text{Au(terpy)Cl}]\text{Cl}_2$) и бифункционалних ($[\text{Au(dach)Cl}_2]\text{Cl}$, $[\text{Au(bipy)Cl}_2]\text{Cl}$, $[\text{Au(en)Cl}_2]\text{Cl}$ и $[\text{Au(SMC)Cl}_2]$) комплекса Au(III) са нуклеофилима $\text{L-хистидином (L-His)}$, инозином (Ino), инозин-5'-монофосфатом ($5'\text{-IMP}$) и гуанозин-5'-монофосфатом ($5'\text{-GMP}$). Све реакције су испитиване у 25 mM Hepes пуферу ($\text{pH} = 7,2$) уз додатак NaCl , као реакције *псеудо*-првог реда на три различите температуре. ДФТ израчунавања су вршена за реакције $[\text{Au(dien)Cl}]\text{Cl}_2$ и $[\text{Au(terpy)Cl}]\text{Cl}_2$ комплекса, како би се добило више информација о механизму.

Испитивани комплекси су коришћени и у тестовима цитотоксичности на различитим ћелијама тумора као што су: CLL ћелије, 4T1 ћелије, A549 епитела ћелијске линије карцинома плућа и ћелије јајовода. Поред тога, испитивана је и *in vivo* активност горе наведених комплекса Au(III) у спречавању раста тумора дојке код BALB/c миша.

Добијени резултати објављени су у оквиру 5 научних радова у међународним научним часописима.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Злато

Злато, сјајни метал са којим су се сусреле још древне цивилизације, које су га поистовећивале са боговима и владарима и интуитивно увиделе његову вредност, повезујући га са моћи и лепотом. Символ злата је настао од латинске речи *aurum*, која потиче од богиње зоре Ауроре. Данас је злато у употреби широм света, а његова вредност се исказује на исти начин као и у старим цивилизацијама.

Хемија злата је била позната од давнина. Напредком технологије крајем деветнаестог и почетком двадесетог века започињу истраживања у области проналаска, синтезе и примене једињења злата. Данас, злато и једињења злата имају широку примену у многим областима.¹⁰

Шта је то у вези са златом што га чини толико атрактивним и толико корисним? Боја и сјај злата су оно што чини овај метал атрактивним. Злато није много тврдо, нож може лако да га огребе. Карактеристика злата је да је најрастегљивији метал који се кује на нашој планети. Управо растегљивост овог метала и способност да не тамни чине га одличним избором за израду накита. У Земљиној кори је доста распрострањен и увек се налази на местима где има пирита или кварца. Најчешће је злато жуто обојен метал, иако може бити црн, боје рубина, или љубичаст. Злато је добар проводник струје и топлоте. На њега не утиче излагање ваздуху или већини реагенаса. Дobar је рефлектор



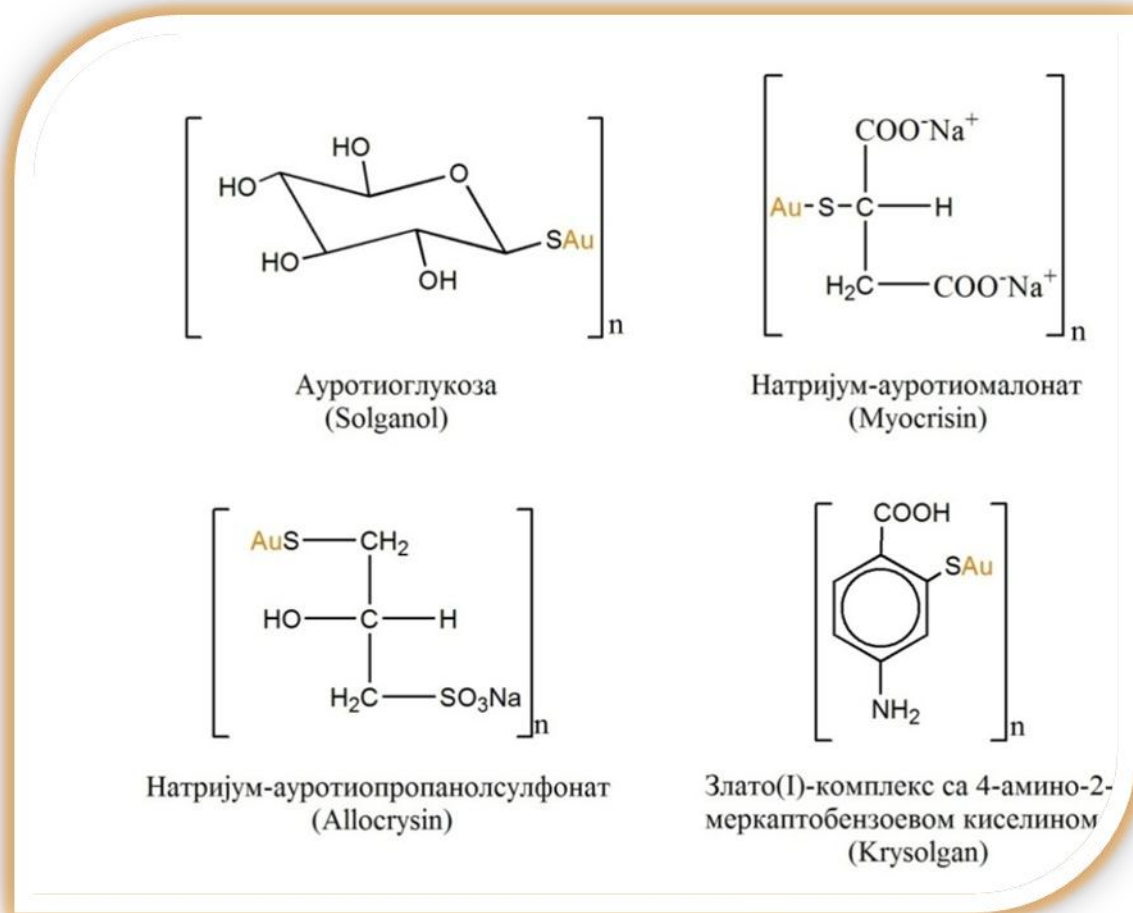
инфрацрвеног зрачења. Злато има електрохемијски потенцијал најмањи од свих метала, а такође је најелектронегативнији, што опет потврђује његов племенити карактер.

Од почетка осамдесетих година хемија злата доживљава сталну експанзију. Злато и његова једињења имају посебне карактеристике, као што су хемијска и термичка стабилност, мекоћа, велика електрична проводљивост и леп изглед, које их чине погодним за употребу у многим областима. На пример, злато је један од главних елемената за израду нано-електронских уређаја, јер је отпорно на оксидацију и механички је постојано. Једињења злата се успешно користе за лечење реуматоидног артритиса.^{4,11,12} Злато је изванредан катализатор при хетерогеној катализи, јер је каталитички активно на собној и на ниској температури (200-350 К) за разлику од платине и паладијума (400-800 К).¹³ У последњих неколико година користи се и у хомогеној катализи.¹⁴

За нормално функционисање већине живих организама неопходно је присуство одређених јона метала, који се називају есенцијалним металима. Међутим, злато не спада у групу есенцијалних метала, иако се налази у првој Б групи периодног система елемената заједно са бакром, металом који је неопходан већини живих организама. Изузетна стабилност овог метала највероватније је допринела да организми нису успели да развију механизам за петварање елементарног злата у растворан облик, који би могли да искористе.

Још у праисторијском добу злато је коришћено у облику амајлије или медаље као заштита од болести и злих духова. Према досадашњим сазнањима елементарно злато није показало медицински значај. У осамнаестом веку нека једињења злата су коришћена као „еликсир младости“. У новије доба прва примена једињења злата у медицини започиње након Коховог (Koch) открића 1890. године да једињење калијум-тетрацијаноаурат(III), $K[Au(CN)_4]$, спречава раст бацила туберкулозе.¹⁵ Упркос токсичности једињења злата су у периоду од 1925-1935. године (златна декада) коришћена за лечење туберкулозе, иако није било довољних доказа да ова једињења заиста утичу на туберкулозу. Форестиер (Forestier) 1960. године открива да једињења $Au(I)$ могу да се користе за лечење реуматоидног артритиса.¹⁶ Од великог броја једињења злата коришћених за лечење реуматоидног артритиса данас се само два користе у САД, а то су: ауротиомалат (Myochrysine) и ауротиоглукоза (Solgonal). У

Европи се активно користе: 4-амино-2-ауротифенол карбонска киселина (Krysolgan) и натријум-тиопропанолсулфонат (Allocrysin) (Слика 1.1.).⁴ Астму, аутоимуне болести коже, као и артритис могуће је лечити једињењима злата. Новија истраживања су показала да се злато може користити у терапији канцера, ХИВ-а и маларије.⁴

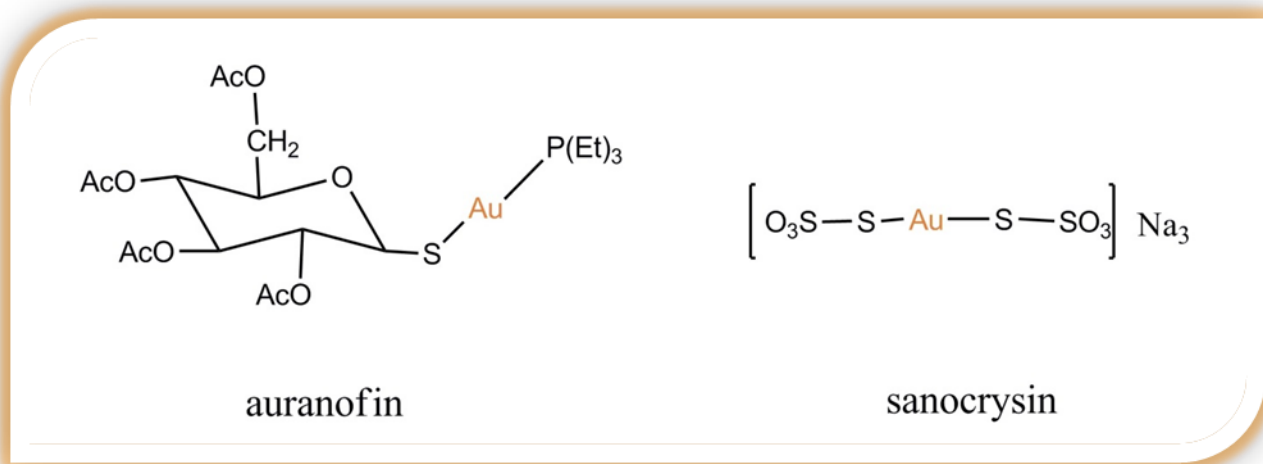


Слика 1.1. Структурне формуле неких тиолато комплекса злата(I)

У комплексним једињењима злато је најчешће заступљено у оксидационом стању +1 и +3, док су ретки комплекси злата са оксидационим стањем +2 и +5.

1.2. Злато(I) комплекси

Комплексна једињења Au(I) јона имају највећу примену у медицини за лечење реуматоидног артритиса (Слика 1.1 и 1.2). Употреба Au(I) комплекса у медицини се назива хризотерапијом и има за циљ смањење упале и напредовања болести код болесника са реуматоидним артритисом. Од поменутих комплекса ауранофин, 1,2,3,5-тетра-О-ацетил-1-тио-β-гликопирано-S-(триетилфосфин)злато(I), (Слика 1.2) је од посебног значаја, јер може орално да се употребљава.^{4,17}

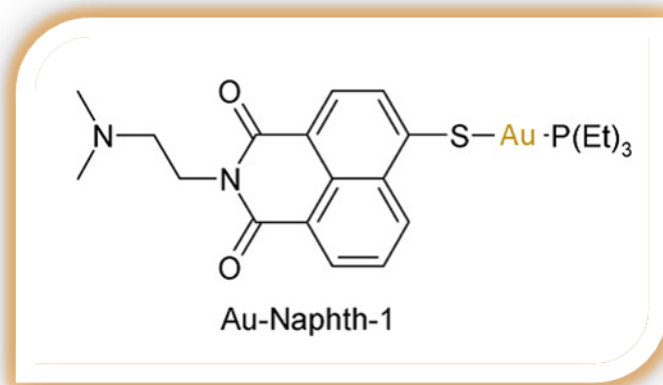


Слика 1.2. Au(I) комплекси који се користе у хризотерапији.

Иако се дуго времена Au(I) комплекси користе у лечењу реуматоидног артритиса, механизам дејства ових комплекса још увек је остао неразјашњен. Данас се сматра да Au(I) комплекс и када уђу у организам инхибирају неколико ензима и на тај начин испољавају активност.^{18,19} Ауранофин и други Au(I) комплекси у највећем степену инхибирају ензим TxR (тиоредоксин-редуктазу) и он највероватније представља биолошку мету за везивање Au(I) комплекса у организму.²⁰ Поред позитивног дејства, Au(I) комплекси испољавају и низ негативних (токсичних)

ефеката, као што су: оштећења коже, бубрега, крви и других органа, тромбоцитопенија, дерматитис и др.^{21,22}

Након успеха Au(I) комплекса у лечењу реуматског артритиса уследила су интезивна истраживања у овој области, која су за резултат дала велики број комплексних једињења са потенцијалном антиреуматском, али и антитуморском активношћу. У почетку су се истраживања заснивала на синтези комплекса структурно сличних ауранофину, као што је триетилфосфински комплекс Au(I) са нафталимидом, Au-Naphth-1, (Слика 1.3.).²³



Слика 1.3. Структура Au-Naphth-1 комплекса.

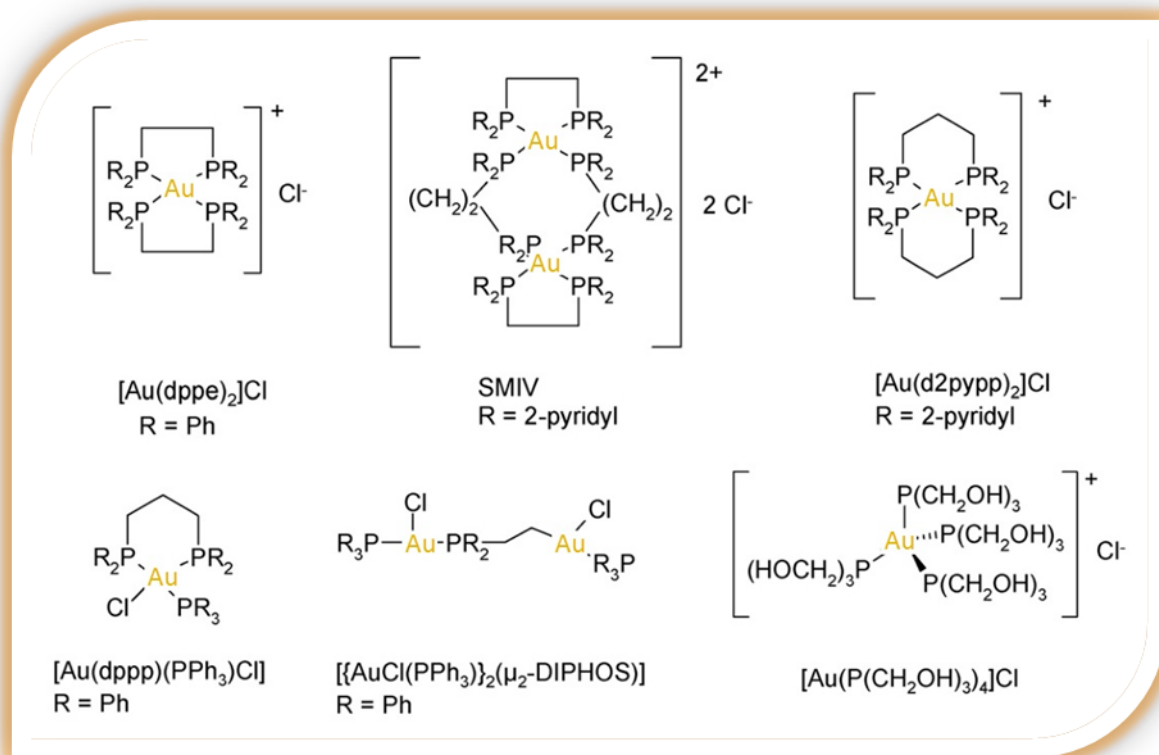
Потом су синтетисани Au(I) компклекси структурно потпуно различити од ауранофина. Наведени комплекси могу се поделити у неколико група: комплекси са фосфоциклопентадиенилним лигандом, комплекси са фосфинским лигандима, карбени и др.⁶

Изузетну биолошку активност показали су Au(I) комплеки са фосфациклопентадиенилним лигандом у координациој сфери. Ови комплекси интезивно спречавају активност ензима TrxR и глутатион-редуктазе.^{24,25} Структура једног комплекса из ове групе приказана је на Слици 1.4.



Слика 1.4. Комплекс Au(I) са фосфациклопентадиенилним лигандом.

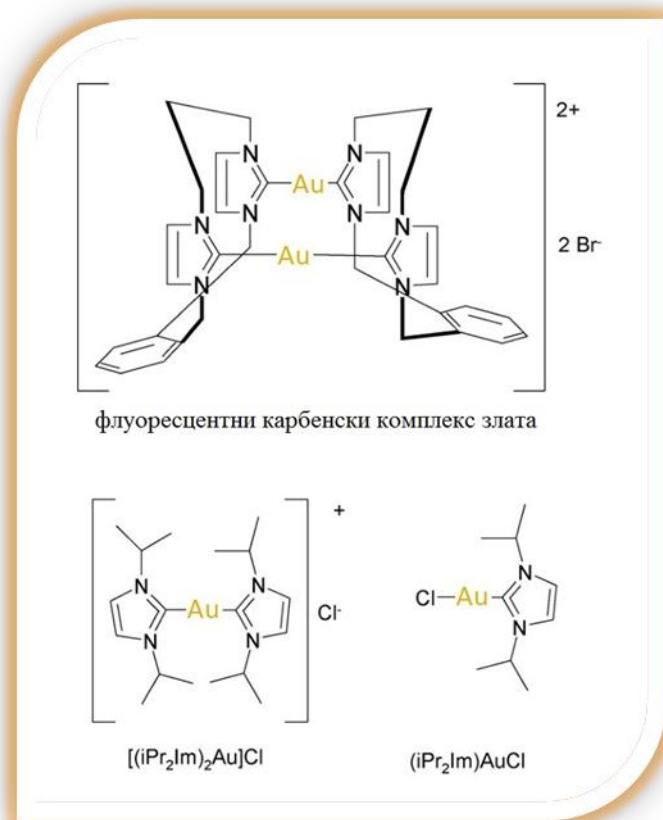
Група комплекса Au(I) са фосфинским лигандима је веома бројна, а најзначајнији представник је $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$ (Слика 1.5.).



Слика 1.5. Комплекси Au(I) са фосфинским лигандима.

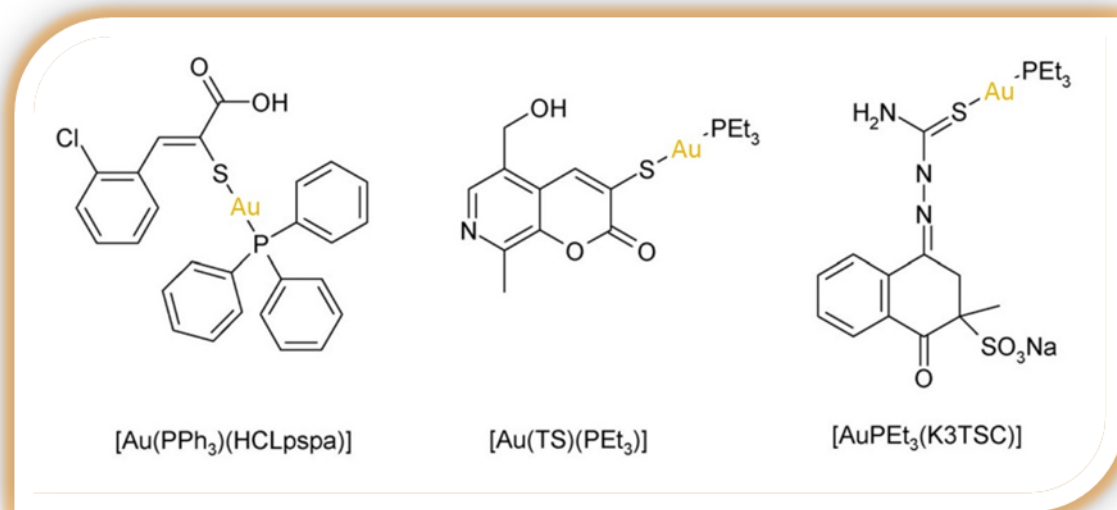
Комплекс $[\text{Au}(\text{dprpe})_2]^+$ (dprpe = (дифенилфосфино)етан) показује антитуморску активност у *in vitro* и *in vivo* условима тако што инхибира функцију ДНК. Комплекс је стабилан у присуству тиола и показује потпуно другачије карактеристике у односу на ауранофин.²⁶ Увођењем различитих група као што су: фенил-, метил-, метокси-, диметиламин- или трифлуорметил- добијени су структурно аналогни комплекси $[\text{Au}(\text{dprpe})_2]^+$ комплексу (Слика 1.5.). Неки од наведених комплекса су активни док други не показују активност.²⁷

N-хетероциклични карбени су група лиганата са изразитим електрон-донорским карактеристикама, сличним фосфинским лигандима. Већином ови лиганди улазе у састав катализатора, али се показало да имају одређену биолошку активност. На Слици 1.6. приказани су $\text{Au}(\text{I})$ комплекси са карбенским лигандима, који испољавају антитуморску активност.^{28,29}



Слика 1.6. Биолошки активни $\text{Au}(\text{I})$ карбенски комплекси

Међутим, постоји велики број Au(I) комплекса који по својим структурним карактеристикама не могу да се сврстају ни у једну од горе наведених група, а који показују значајну антитуморску или антиреуматску активност (Слика 1.7).^{30,31}



Слика 1.7. Биолошки активни комплекси Au(I).

Комплекси Au(I) су у растворима јако нестабилни, јер подлежу процесу познатом као диспропорционисање, једначина 1.1. Управо тај процес доводи до појаве токсичних ефеката приликом примене лекова на бази Au(I) комплекса.



1.3. Антитуморска активност комплекса Au(III) јона

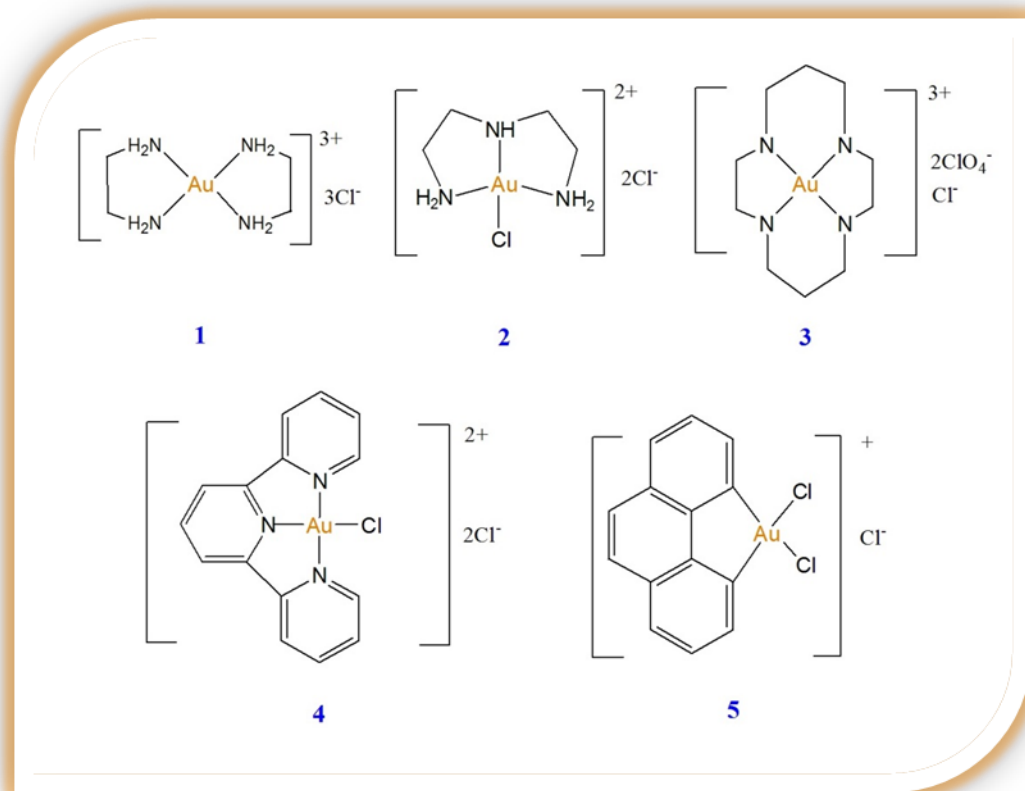
Као што је предходно напоменуто истраживања у области примене комплекса јона метала у медицини почела су са открићем антитуморских особина цисплатине 1965. године.³² Данас се цисплатина рутински користи у лечењу неколико врста карцинома широм света, иако су добро познати токсични ефекти које проузрокује, као и ограничен број тумора на којима је активна. Многобројна истраживања у овој области данас су усмерена на синтезу и испитивање комплекса различитих јона метала који би

поседовали добра антитуморска својства, без нежељених ефеката и појаве резистенције.³³⁻³⁵

Au(III) јон је изоелектронски са Pt(II) јоном и гради комплексе са квадратно-планарном геометријом,³⁶ па представља доброг кандидата за синтезу нових комплекса који би могли да покажу боље антитуморске особине од комплекса Pt(II). Међутим, за разлику од комплекса Pt(II), аналогни комплекси Au(III) показали су се као релативно нестабилни, нарочито на светлости. За комплексна једињења Au(III) карактеристично је да лако подлежу редукцији до елементарног злата при физиолошким условима. Управо из наведених разлога испитивање комплекса Au(III) као антитуморских једињења било је запостављено дужи низ година. Почетком деведесетих година синтетисано је неколико нових Au(III) комплекса који су показивали већу стабилност, као и добре фармаколошке особине. Међу првима нашао се комплекс [Au(DAMP)X₂] (DAMP = 2-(диметиламинометил)фенил) који је показао значајну антитуморску активност.^{37,38}

Како би се повећала стабилност Au(III) комплекса, у координациону сферу уводе се полидентатни лиганди, као што су полиамини, циклами, терпиридин и фенантролин. Комплекси са наведеним лигандима приказани су на Слици 1.8. Ови комплекси имају задовољавајућу стабилност, што је свакако отворило пут за испитивање ових једињења као антитуморских агенаса, како *in vitro*, тако и *in vivo*.⁸ На пример, комплекс са глицилхистидином показао је знатно већу цитотоксичност на A2780 ћелијској линији карцинома јајника у односу на аналогне комплексе Zn(II), Pd(II), Pt(II) и Co(II).^{39,40}

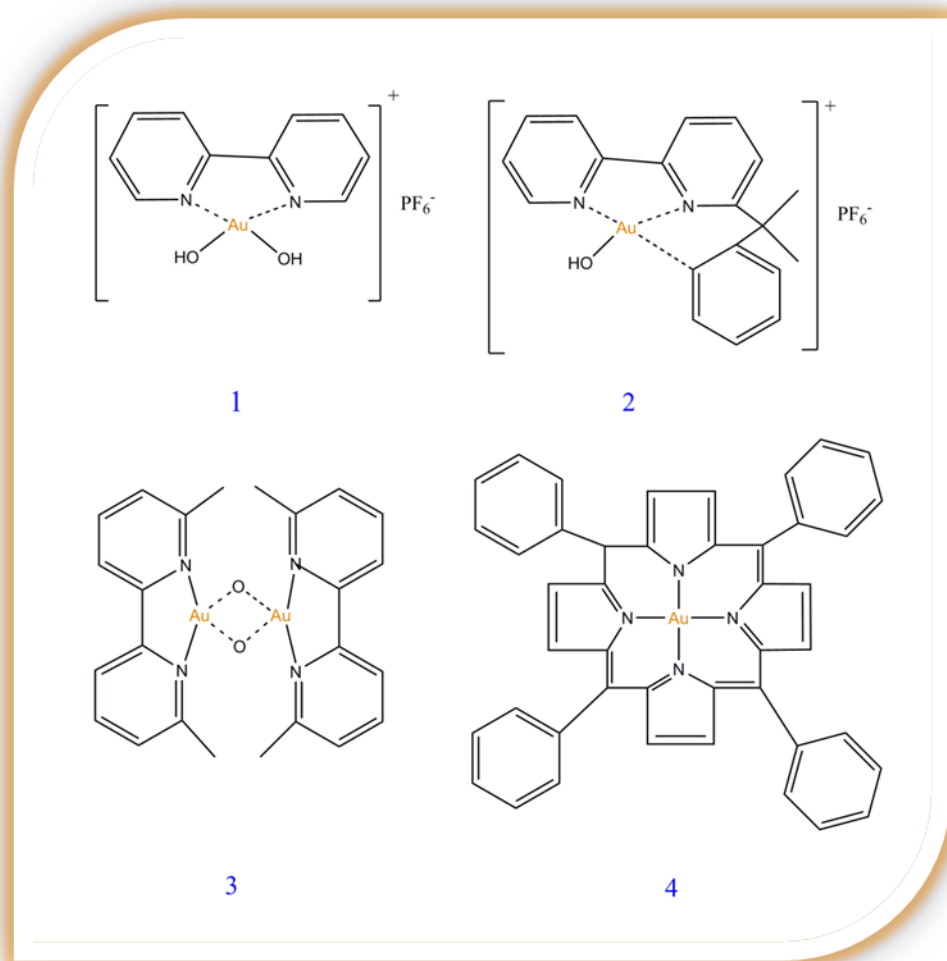
Серија комплекса Au(III) јона са фенилпиридином (*ppy*) синтетисана је почетком 2000. године.⁴¹ Један од комплекса је [Au(*ppy*)Cl₂] који је по структури сличан цисплатини. Овај комплекс има малу растворљивост у води. Инспирисани овим комплексом синтетисани су комплекси са *ppy* лигандом који садрже карбоксилато лиганде уместо хлорида, како би се повећала растворљивост. Добијени комплекси су тестирани *in vitro* на ћелијама леукемије и на туморима мишева, при чему је уочена цитотоксичност слична као код цисплатине.⁴¹



Слика 1.8. Структурне формуле: 1- $[Au(en)_2]Cl_3$, 2- $[Au(dien)Cl]Cl_2$, 3- $[Au(cyclam)](ClO_4)_2Cl$, 4- $[Au(terpy)Cl]Cl_2$ и 5- $[Au(phen)Cl_2]Cl$.

Месори (Messori) са сарадницима је почетком 2002. године синтетисао серију Au(III) комплекса са бипиридином (*bipy*) и дериватима бипиридина (Слика 1.9).⁴² Ови комплекси, изузетно стабилни при физиолошким условима, показали су значајну цитотоксичност на већем броју тумора. У истој години Фрегона (Fregona) са сарадницима синтетише нове Au(III) комплексе са дитиокарбаматом.⁴³ Комплекс са *N,N*-диметилдитиокарбаматом се показао као најбољи из серије. Затим је уследила синтеза и карактеризација комплекса са порфирином (Слика 1.9).⁴⁴ Порфирински лиганди чине Au(III) јон изузетно стабилним, тако да је примећено да глутатион и аскорбинска киселина не редукују наведене Au(III) комплексе.⁷ За ове комплексе је карактеристично да се везују за молекуле ДНК.⁸

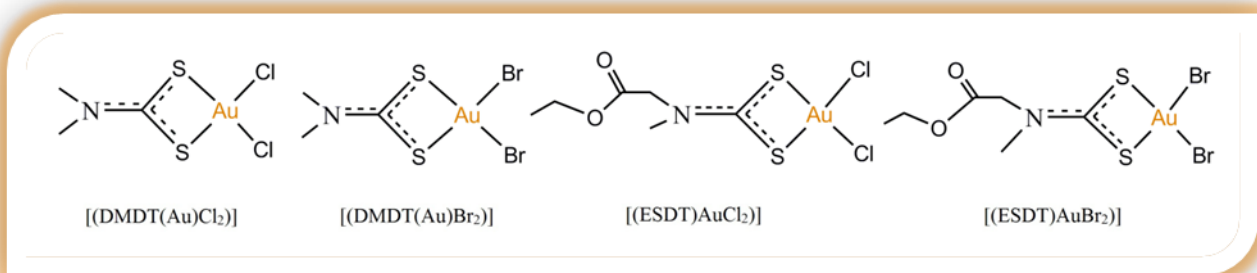
Поред синтезе и испитивања мононуклеарних комплекса Au(III) јона, уследила је синтеза динуклеарних комплекса Au(III) јона, као што су комплекси са “Au₂O₂” јединицом и *bipy* лигандом, који су испољили значајну цитотоксичност на већем броју ћелија тумора (Слика 1.9).⁴⁵



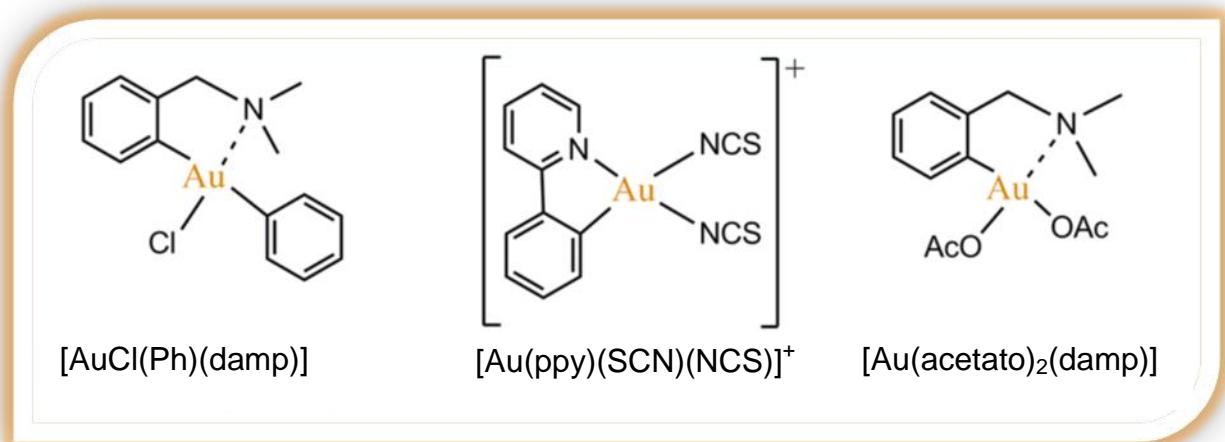
Слика 1.9. Структурне формуле: **1**-[Au(*bipy*)(OH)₂][PF₆], **2**-[Au(*bipy*^c-H)(OH)][PF₆],
3- комплекс Au(III) са порфирином, **4**-Аиохоб.

Велики број комплекса Au(III) јона са различитим типовима лиганата, поред горе наведених, синтетисано је последњих година и испитана је њихова биолошка активност. Већина су комплекси у којима постоје три Au-N везе, док четврто координационо место заузима хлоридни јон (Слика 1.8).⁶ Међутим, синтетисани су и комплекси у којима

постоје Au-S и Au-C везе (Слике 1.10. и 1.11).⁶ Неки од ових комплекса се клинички испитују.



Слика 1.10. Комплекси Au(III) са Au-S везом.



Слика 1.11. Комплекси Au(III) са Au-C везом.

Нова истраживања у синтези и испитивању Au(III) комплекса као потенцијалних антитуморских лекова започела су почетком деведесетих година. Као резултат тога настао је велики број органометалних једињења Au(III) јона. Наведена једињења структурно су веома различита и већина показује добре фармаколошке особине. Већина синтетисаних једињења је испитивана *in vitro* на различитим ћелијама тумора и многи од њих су показала обећавајуће резултате (Табела 1.1).⁸

Табела 1.1. Цитотоксичност (IC50 μM) различитих Au(III) једињења на различитим ћелијама тумора.⁸

Комплекс	A2780/S	A2780/R	CCRF-CEM/S	CCRF-CEM/R	SK-OV-3	MCF7	HT29	A549
Цисплатина	1,2 \pm 0,43	14 \pm 2,72	0,7 \pm 0,1	20,1 \pm 7,2	5,2	5,30 \pm 0,87	6,30 \pm 0,23	-
[Au(en) ₂]Cl ₃	8,36 \pm 0,77	17,0 \pm 4,24	-	-	-	-	-	-
[Au(dien)Cl]Cl ₂	8,2 \pm 0,93	18,7 \pm 2,16	12,6 \pm 2,0	32,7 \pm 6,6	-	-	-	-
[Au(cyclam)](ClO ₄) ₂ Cl	99,0	> 120,0	-	-	-	-	-	-
[Au(terpy)Cl]Cl ₂	0,2	0,37 \pm 0,032	-	-	-	-	-	-
[Au(Phen)Cl ₂]Cl	3,8 \pm 1,1	3,49 \pm 0,91	2,3	6	-	-	-	-
GHAu	5,2 \pm 1,63	8,5 \pm 2,3	-	-	-	-	-	-
[Au(bipy)(OH) ₂][PF ₆]	8,8 \pm 3,9	24,1 \pm 8,7	52,9 \pm 11,6	58,6 \pm 0,9	34,4 \pm 4,7	-	-	-
[Au(bipyс-H)(OH)][PF ₆]	3,3 \pm 1,4	8,2 \pm 1,5	11,9 \pm 2,1	51,2 \pm 5,6	13,3 \pm 1,6	35,30 \pm 8,8	24,60	> 50
Au(bipydmb-H) (2.6-xylidine-H)][PF ₆]	2,50 \pm 0,43	5,7 \pm 0,3	-	-	-	5,20 \pm 0,40	~ 25	~ 35
Au(pydmb-H)(AcO) ₂	2,90 \pm 0,34	6,40 \pm 1,0	-	-	-	17,70 \pm 0,44	8,60	~49
Auoxo1	22,8 \pm 1,53	23,3 \pm 0,35	-	-	-	-	-	-
Auoxo2	12,1 \pm 1,5	13,5 \pm 1,8	-	-	-	-	-	-
Auoxo3	25,4 \pm 2,47	29,8 \pm 3,1	-	-	-	-	-	-
Auoxo4	12,7 \pm 1,06	19,8 \pm 1,8	-	-	-	-	-	-
Auoxo5	11,0 \pm 1,5	13,2 \pm 1,2	-	-	-	-	-	-
Auoxo6	1,79 \pm 0,17	4,81 \pm 0,5	-	-	-	-	-	-

1.3.1. Механизам антитуморског дејства комплекса Au(III) јона

Након открића да комплекси Au(III) показују антитуморску активност уследило је интересовање за испитивање механизма по коме се активност испољава. Такође, испитиване су реакције Au(III) комплекса са специфичним биомолекулима који могу да представљају мету за везивање комплекса у организму, као што су ДНК и протеини. Механизам преко кога поменути комплекси испољавају антитуморски ефекат још увек није познат. На основу информација које су добијене из великог броја истраживања може се извести неколико претпоставки о њиховом механизму деловања.

Пошто је Au(III) јон по хемијским карактеристикама сличан Pt(II) јону,³⁶ прва претпоставка је била да је механизам дејства комплекса злата идентичан са механизмом дејства цисплатине, тј. да ДНК представља мету за везивање комплекса. При томе долази до оштећења молекула ДНК, што онемогућава даљу репликацију и транскрипцију, а самим тим и деобу ћелије.¹ Фармаколошка испитивања су указала да је механизам дејства Au(III) комплекса потпуно другачији у односу на механизам дејства цисплатине.^{25,32,34,36} Наиме, изузев код Au(III) комплекса са порфиринима, где је уочено везивање за молекул ДНК, код других Au(III) комплекса ефекти изазвани везивањем за ДНК готово да нису уочени.²⁵ Код комплекса [Au(phen)Cl₂]Cl (phen = фенантролин) и [Au(dien)Cl]Cl₂ оштећење ДНК је уочено у веома малом проценту. Потпуно идентична ситуација је примећена и код комплекса Au(III) јона са DAMP лигандом.³⁷ У случају комплекса Au(III) јона са порфиринима испитивања су показала да иако долази до везивања за ДНК, начин везивања и ефекти које везивање изазива су потпуно другачији од ефеката изазваних координовањем цисплатине.²⁵

Експерименти указују да своје цитотоксичне ефекте Au(III) комплекси испољавају изазивајући оштећење митохондрије кроз модификацију специфичних протеина.⁵⁻⁸ Месори (Messori) са сарадницима је открио да би инхибиција специфичног селено-ензима TxR Au(III) комплексом била одговорна за испољавање антитуморских ефеката.⁵ Наиме, ови комплекси утичу на значајно смањење функције митохондрије.^{46,47} Ова хипотеза је заснована и на чињеници да комплекси Au(I) јона, који се користе у

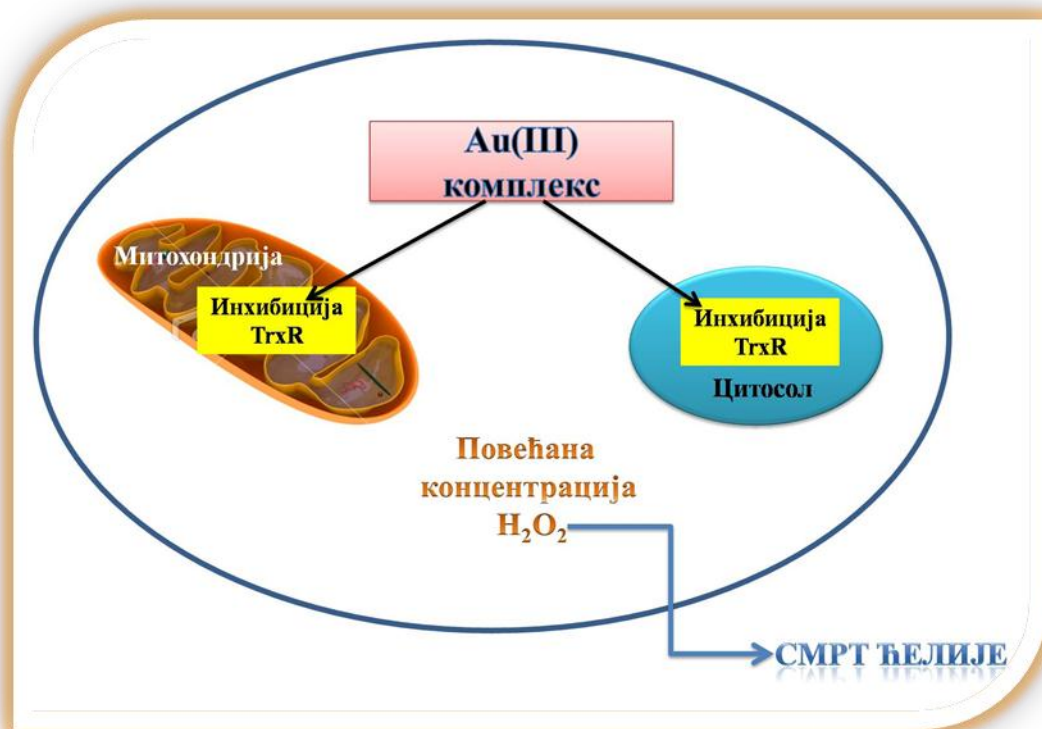
лечењу артритиса, своје дејство испољавају тако што инхибирају дејство TgxR и познати су као антимиохондријални агенси.^{48,49}

Новија истраживања указују да тиоредоксин и тиоредоксин-редуктаза имају важну улогу у настанку и расту ћелија тумора.⁵⁰⁻⁵² Сходно томе, инхибиција тиоредоксин-редуктазе је један од кључних фактора у развоју нових антитуморских реагенаса.⁵³⁻⁵⁵ Ензим TgxR на С-терминалном крају има селеноцистеин који је тако смештен да је лако доступан за везивање са другим једињењима. Постоји велики број једињења која могу да инхибирају TgxR, а то су органска једињења (динитрохалобензени и хинини), јони метала (Ca(II), Mn(II), Zn(II), Cd(II)) и комплекси јона метала (Au(III), Pt(II), Ru(II/III), Pd(II)).⁵

Када комплекс Au(III) јона уђе у ћелију, углавном долази до апоптозе ћелије (смрти ћелије).⁵⁶⁻⁵⁹ Примећено је да до смрти ћелије долази и код ћелија које су развиле резистентност на друге типове антитуморских лекова.^{60,61} У ћелији постоји велики број биомолекула који могу да буду потенцијалне мете за координовање Au(III) комплекса. Највероватније је инхибиција TgxR из митохондрије и из цитосола одговорна за апоптозу.^{5,6,8} Инхибиција TgxR комплексом Au(III) започиње везивањем комплекса за ензим, што доводи до поремећаја у синтези водоник-пероксида у ћелији. Количина водоник-пероксида се знатно повећава и доводи до промена унутар митохондрије, које као крајњи резултат имају потпуну неповратну оксидацију тиоредоксина, што је први корак који води ка смрти ћелије (Слика 1.12.).^{5,61,62}

Важно је напоменути да је за готово све Au(III) комплексе активни метаболит Au(I) комплекс, који настаје редукцијом Au(III) комплекса у организму. Биндоли (Bindoli) и сарадници долазе на идеју да предложи идентичан механизам деловања Au(III) и Au(I) комплекса. Механизам деловања би се заснивао на инхибицији TgxR1 и TgxR2, при чему до апоптозе ћелије долази након сложеног процеса у коме учествује велики број протеина и ензима из митохондрије, нуклеуса и цитоплазме, као што се може видети са Сlike 1.13.⁷ Иако је овај тип механизма атрактиван и прихватљив, треба имати на уму да поред приказаних ензима и протеина за које се верује да учествују у изазивању смрти ћелије након уласка комплекса злата, у ћелији постоји још протеина који могу да садрже места за везивање јона злата. Ови протеини у свом саставу садрже

цистеин или метионин, нарочито ако се узме у обзир претпоставка да се Au(III) редукује у меку киселину Au(I) .

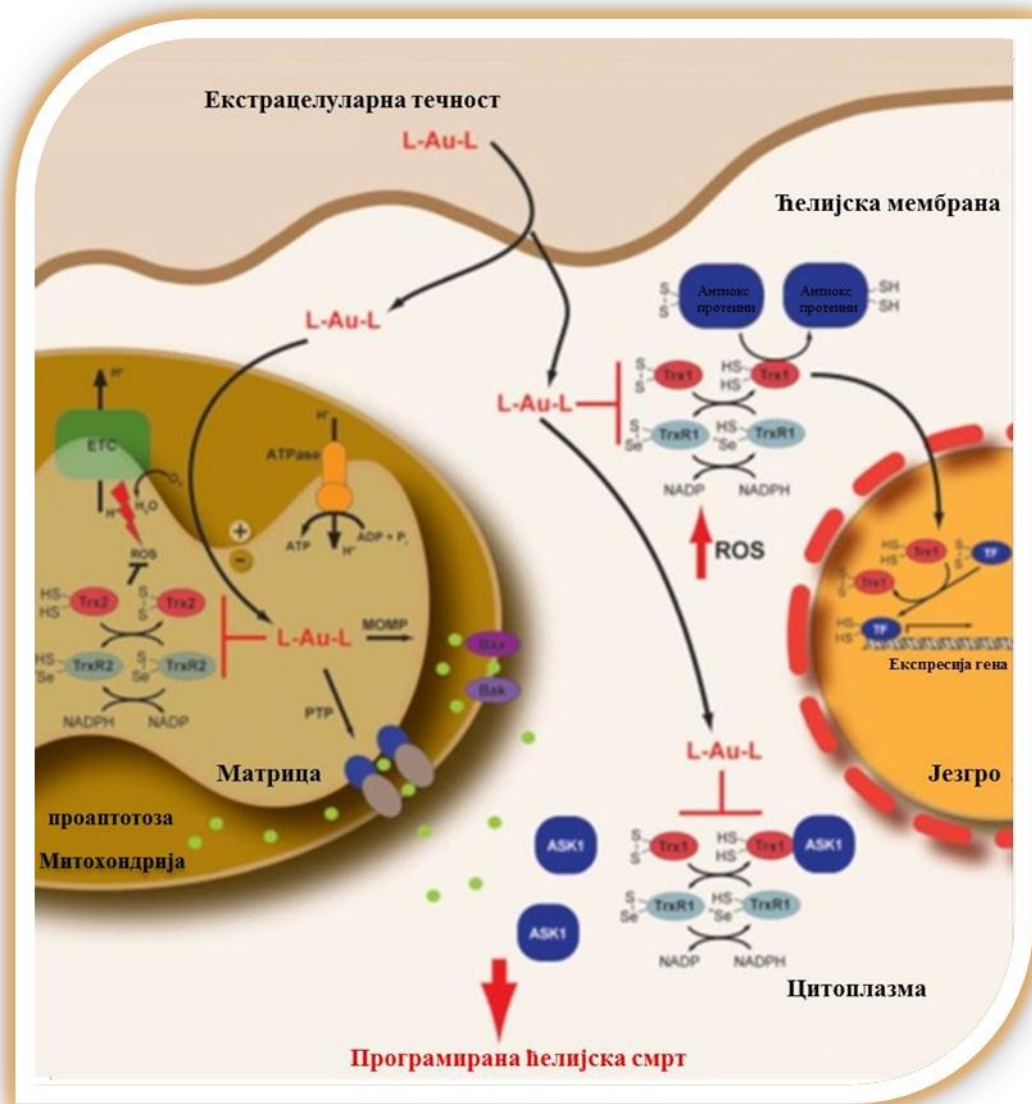


Слика 1.12. Шематски приказ процеса који се одигравају у ћелији након уноса комплекса Au(III) .

1.4. Интеракције различитих комплекса Au(III) јона са биолошки активним нуклеофилима

Интеракције комплекса Pt(II) са различитим биомолекулима пре свега сумпор- и азот-везивним су до детаља испитиване,⁶³⁻⁷² што је омогућило да се са сигурношћу могу предвидети готово сви процеси који настају у организму приликом терапије. Да би се постигла што боља стратегија у процесу дизајнирања антитуморских комплекса злата, а тиме и боља ефикасност ових једињења, неопходно је познавати начин на који поменута једињења реагују са различитим биомолекулима. Значајне информације о поменутим интеракцијама могу се добити на основу испитивања супституционих реакција

комплекса Au(III) јона са различитим биомолекулима при различитим експерименталним условима.



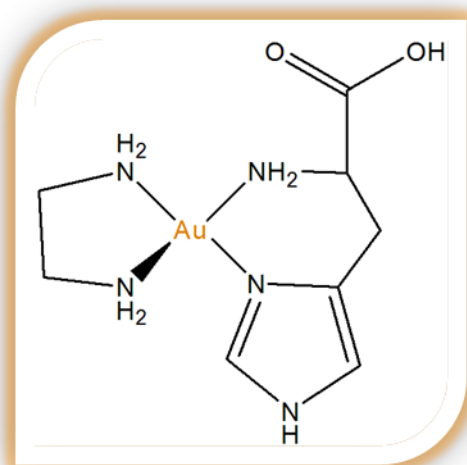
Слика 1.13. Процеси који се одвијају у ћелији након уласка злато комплекса а који доводе до смрти ћелије. (Слика преузета из Реф. 7).

Комплекси злата са етилендиамином су познати још од 1931. године.⁷³ Комплексима $[\text{Au(en)}_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ и $[\text{Au(en)Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ одређена је кристална структура.^{74,75} Кристална структура $[\text{Au(en)Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ указује да наведени комплекс има квадратно-планарну геометрију. У реакцији $[\text{Au(en)Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ комплекса са $5'$ -GMP на pH 2,5

долази до формирања 1 : 1 комплекса, при чему се Au(III) координује преко N7 атома азота из 5'-GMP. Стабилност награђеног производа није велика.⁷⁵ Наведена реакција зависи од рН. Карактеристично је за $[\text{AuCl}_4]^-$, као и за друге Au(III) комплексе да веома лако подлежу хидролизи у воденим растворима на рН вредности изнад 2,5.^{76,77}

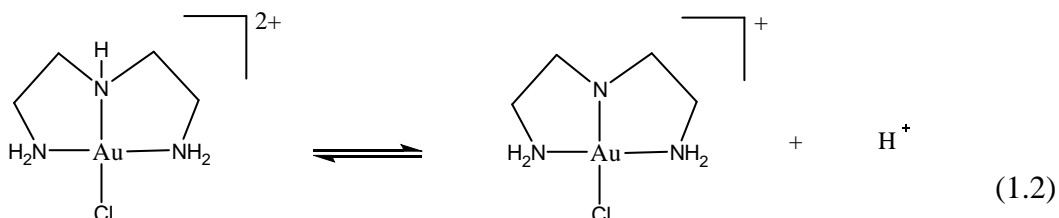
Испитивања интеракција $[\text{AuCl}_4]^-$ са различитим нуклеотидима и нуклеозидима показују да начин координовања зависи од типа испитиваног нуклеотида или нуклеозида. Карактеристично је да у реакцији са гуанозином долази до хелатног везивања гуанозина преко N7-Об атома, док у реакцији са 5'-GMP долази до формирања N7-фосфатних макрохелата.^{76,78} Међутим, могу да се формирају и комплекси као што су $[\text{Au}(\text{L-N,N}')(\text{5'-GMP})_2]^{70}$ и $[(\text{CH}_3)\text{AuCl}(\text{Guo})]^{79}$ код којих нема хелатног везивања 5'-GMP или гуанозина. Примећено је да се и монофункционални и бифункционални комплекси Au(III) координују са 5'-GMP, Ino и 5'-IMP преко N7 атома.⁸⁰⁻⁸³ Код бифункционалних комплекса примећено је да настаје комплекс типа 1 : 2.

Испитивање интеракције комплекса Au(III) са L-His је од великог значаја због биолошке важности L-His. Киселина злата $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ у реакцији са L-His даје производ у коме су два молекула L-His хелатно везана за Au(III) јон преко α -амино групе и преко имидазоловог прстена.⁸⁴ Реакција између $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ и L-His је првог реда. Комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ реагује са L-His, при чему ток реакције и стабилност награђеног производа зависи од рН.⁸⁵ Лиганд L-His се везује хелатно за комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и то преко атома азота из имидазола и амина (Слика 1.14.).⁸⁶ Праћење реакције ^1H NMR спектроскопијом указује да се реакција између $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и L-His дешава тренутно, а након сат времена долази до редукције Au(III) у Au(0) уз истовремену оксидацију L-His.⁸⁶ У реакцији комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ са имидазолом настаје 1 : 2 комплекс, при чему је, као и код реакције са L-His, након супституције уочена редукција злата.⁸⁶

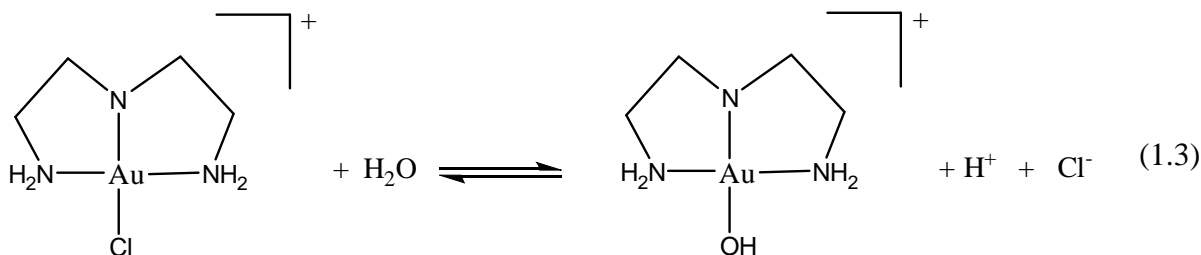


Слика 1.14. Структурна формула $[Au(en)(L-His)]^+$

Комплекс Au(III) са диетилентриамином $[Au(dien)Cl]Cl_2$ (Слика 1.8.) синтетисан је 1963. године,⁸⁷ док му је кристална структура одређена 1986. године.⁸⁸ У чврстом стању овај комплекс има псеудооктаедарску структуру, при чему се у једној равни налазе Au(III) јон и за њега координована три атома азота из диетилентриаминa, док четврто место заузима хлоридо јон. У аксијалном положају налазе се координована још два хлоридо јона, али су ове Au-Cl везе знатно дуже од екваторијалне, тако да се може сматрати да је комплекс квадратно-планарне геометрије.⁸⁹ Карактеристично за овај комплекс је да лако губи протон са азотовог атома *dien*-ског система, као што је приказано једначином 1.2, а рКа вредност износи 4,0 у 0,5 М NaClO₄ или 4,7 у 0,5 MNaCl.⁸⁸



Утврђено је да H^+ јон одлази са средњег азотовог атома диетилентриамина, што је потврђено рендгенско-кристалном структуром депротонованог $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}(\text{ClO}_4)$ и протонског $[\text{Au}(\text{dien-H})\text{Cl}](\text{ClO}_4)$ облика.⁸⁹ У неутралној и базној средини хлорид из координационе сфере комплекса бива супституисан хидроксидом према једначини 1.3.⁸⁸



Комплекс $\text{Au}(\text{III})$ са терпиридином $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ синтетисан је 1983. године,⁹⁰ када му је одређена и кристална структура. Катјон $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ је планаран, при чему је Au-N веза у *trans* положају у односу на хлоридо јон краћа од друге две Au-N везе у *cis* положају. Структура овог комплекса је псеудооктаедарска, односно, у аксијалном положају налазе се везани молекул H_2O и Cl^- јон, али су ове две везе изразито дуге и слабе.⁹⁰

Испитиване су реакције неколико изабраних комплекса $\text{Au}(\text{III})$ јона, као што су: $[\text{Au}(\text{en})_2]\text{Cl}_3$, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}_2$, $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$, $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ и $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (Слика 1.8.) са молекулом ДНК *in vitro*.⁹¹ Примећено је да долази до интеракције молекула ДНК за комплексима злата. Међутим, у питању су електростатичке интеракције, које су слабе и реверзибилне и које доводе највише до конформационих промена у молекулу ДНК. Иако је електростатичко везивање доминантно, уочени су и други типови везивања, као што је грађење ковалентне везе, али у много мањем степену. Током ових реакција не долази до редукције $\text{Au}(\text{III})$.⁹¹ Постоји велики број студија о интеракцијама комплекса $\text{Au}(\text{III})$ јона и нуклеотида. Комплекси типа $[\text{Au}(\text{CH}_3)_2(\text{nucl})\text{Cl}]$, где је *nucl* = аденозин, цитозин или гуанозин, имају квадратно-планарну геометрију са награђеном везом између $\text{Au}(\text{III})$ јона и *N7* атома азота из гуанозина, *N3* из цитозина, док код аденина веза може да настане или преко *N7* атома или преко амино групе.⁹²

Синтетисано је неколико комплекса Au(III) јона типа $[\text{AuCl}_3(\text{nu})]$, где је *nu* петочлани прстен различите базности (*nu* = оксазол, 2,4,5-триметилксазол, тиазол, 5-метилтиазол, 4-метилтиазол, 4,5-диметилтиазол, 2,4-диметилтиазол, 2,4,5-триметилтиазол, имидазол и 2-метилимидазол) и проучавана је кинетика реакције комплекса са хлоридом у метанолау.⁹³ Слична серија комплекса типа $[\text{AuCl}_3(\text{py})]$ (*py* = пиридин или супституисани пиридин) је такође синтетисана и проучаване су њихове реакције супституције са хлоридом. Из добијених резултата уочило се да реактивност комплекса не зависи само од кисело-базних карактеристика, већ и од природе испитиваног лиганда, при чему су комплексни са пиридинима реактивнији од комплекса са петочланим хетероциклима. Присуство једне метил групе у *ortho* положају у молекулу лиганда не утиче на реактивност комплекса, али када су присутне две метил групе у *ortho* положају, реактивност се значајно смањује.⁹³

Лиганд *bipy* је један од лиганда који се користи за координацију са Au(III) јоном како би се добио комплекс довољне стабилности. Неколико деривата *bipy* лиганда као што су: 4,4'-диметил и 4,4'-диамино деривати *bipy* лиганда, употребљени су за синтезу одговарајућих квадратно-планарних комплекса Au(III).⁹⁴ Добијени комплекси испитивани су у реакцији са ДНК из плазме и одабраним моделом протеина. Добијени резултати указују да је у много већем степену изражено везивање комплекса за аминокиселине из протеина, него за нуклеинске киселине. Примећена је редукција Au(III) јона која прати поменуте реакције.⁹⁴

У реакцији између $\text{Na}[\text{AuCl}_4]$ и *bpma* лиганда (*bpma* = *bis*(2-пиридилметил) амин), као и *bbpma* (*bbpma* = N-бензил-*bis*(2-пиридилметил)амин) настају катјонски комплекси $[\text{AuCl}(\text{bpma}-\text{H})]^+$ и $[\text{Au}(\text{bbpma})\text{Cl}]^{2+}$. Амидо комплекс $[\text{Au}(\text{bpma}-\text{H})\text{Cl}]^+$ лако подлеже инверзији на азотовом атому амидо групе, протонује се и даје $[\text{Au}(\text{bpma})\text{Cl}]^{2+}$. Комплекс $[\text{Au}(\text{bbpma})\text{Cl}]^{2+}$ је нестабилан и у воденим растворима се лако разграђује при чему формира $[\text{bbpmaH}_2]\text{Cl}[\text{AuCl}_4]$.⁹⁵

Проучавана је кинетика реакције комплекса $[\text{Au}(\text{N-O})\text{Cl}_2]$ (дихлоридо[пиридин-2-(α -метоксиметанолато)]злато(III)) у којој долази до отварања и супституције хелата. Како је веза Au-O релативно инертна, у присуству LiCl и перхлорне киселине реакција тече тако што прво долази до протоновања атома кисеоника, што доводи до отварања

прстена и везивања хлоридног јона или молекула растварача, да би потом дошло до раскидања Au-N везе и настанка производа $[\text{AuCl}_4]^-$.⁹⁶

Реакције супституције хлоридо лиганда из комплекса $[\text{AuCl}_4]^-$ са лигандима NO_2^- , N_2^- , Br^- , I^- и SCN^- проучаване су у зависности од температуре и концентрације нуклеофила. Добијени резултати су упоређени са резултатима добијеним за аналогне реакције комплекса Pt(II) при чему је добијено да је фактор дискриминације Au(III) јона много већи у поређењу са фактором дискриминације Pt(II) јона.⁹⁷

Праћење супституционе реакције комплекса $[\text{AuCl}_4]^-$ и L-Met указује да у почетку долази до формирања квадратно-планарног комплекса у коме је аминокиселина координована за Au(III) јон хелатно преко атома сумпора и атома азота.⁹⁸ Убрзо након супституције долази до редукције Au(III) у Au(I), која се одиграва споро. На основу IR спектроскопије утврђено је да се L-Met заиста координује хелатно, док је на основу ^1H NMR и ^{13}C NMR спектра утврђено да је крајњи производ реакције метионин-сулфоксид, који настаје оксидацијом метионина.⁹⁸ Комплекс Au(III) јона са пиразолил лигандом $[\text{AuCl}_2(3,5\text{-R}_2\text{bpza})]\text{Cl}$ испитиван је у реакцији са L-Cys. Као и у случају реакција са L-Met, и овде се процес одвија у два корака. Први је брза супституција оба хлоридо јона помоћу два молекула L-Cys. У овом случају не долази до хелатног везивања аминокиселине. Након супституције настаје редукција Au(III) у Au(I), што је знатно спорији процес.⁹⁹

Елдинг (Elding) са сарадницима је интезивно испитивао реакције различитих комплекса Au(III) са неким од сумпор-донорских лиганда. Испитивања су се базирала на комплексима типа $\text{trans-}[\text{Au}(\text{CN})_2\text{X}_2]^-$ ($\text{X} = \text{Cl}^-$ или Br^-) и $\text{trans-}[\text{Au}(\text{NH}_3)_2\text{X}_2]^-$ ($\text{X} = \text{Cl}^-$ или Br^-) са лигандима као што су: диметил-сулфид, тиоцијанат, сулфит, хидрогенсулфит итд.⁹¹⁻⁹⁴ Сви добијени резултати указују да прво долази до реакције супституције која се одиграва веома брзо, након чега следи редукција јона злата, која се као што је већ речено, одиграва знатно спорије. Такође, примећено је да комплекс $\text{trans-}[\text{Au}(\text{CN})_2\text{X}_2]^-$ реагује брже од $\text{trans-}[\text{Au}(\text{NH}_3)_2\text{X}_2]^-$ комплекса, што се може приписати чињеници да увођење цијанида у молекула комплекса повећава електрофилност Au(III) јона.¹⁰⁰⁻¹⁰³

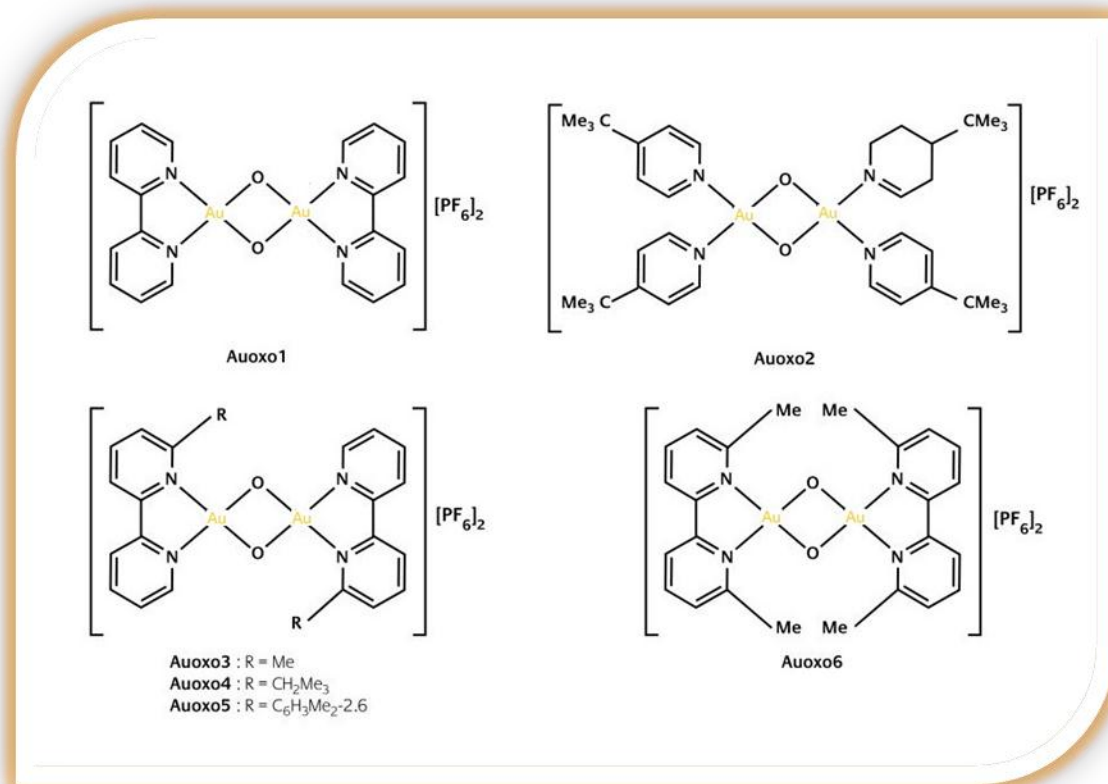
Комплекси Au(III) испитивани су у реакцијама са пептидима и протеинима који садрже L-His, L-Met и L-Cys.¹⁰⁴ Аминокиселина L-His, као и пептиди који садрже L-His,

показали су се као добри лиганди за координацији са Au(III) јоном. У наведеним студијама утврђено је да се L-His координује преко $N3$ атома из имидазоловог прстена. Настали Au(III) комплекси показали су завидну антитуморску активност на различитим ћелијама тумора. У реакцијама Au(III) комплекса са пептидима и протеинима који садрже аминокиселине са сумпором, L-Met и L-Cys, показало се да првенствено долази до редукције Au(III) јона, уз истовремену оксидацију сумпора у ланцу протеина. Процес оксидо-редукције који се у овом случају одиграва условљава нарушавање секундарне и терцијарне структуре пептида или протеина за који се везује, чиме се највероватније онемогућава њихова нормална биолошка функција.¹⁰⁴

1.5. Перспектива примене Au(III) комплекса

На основу досадашњих публикованих резултата може се видети да Au(III) комплекси показују значајну антитуморску активност, што их чини потенцијалним кандидатима за будућа истраживања. Међу приказаним комплексима значајно место заузимају порфирински комплекси Au(III) ,¹⁰⁵ комплекси Au(III) са дитиокарбаматом¹⁰⁶ као и Au(I) комплекси са фосфинским и карбенским лигандима.^{107,108} Након успеха поменутих једињења уследило је интересовање за динуклеарне комплексе злата типа Au(I)-Au(I) , Au(III)-Au(III) , као и Au(III)-Au(I) , који су синтетисани у знатно мањем броју. Они су показали добру антитуморску активност и данас су поље на коме интензивно раде многобројни истраживачи.¹⁰⁹

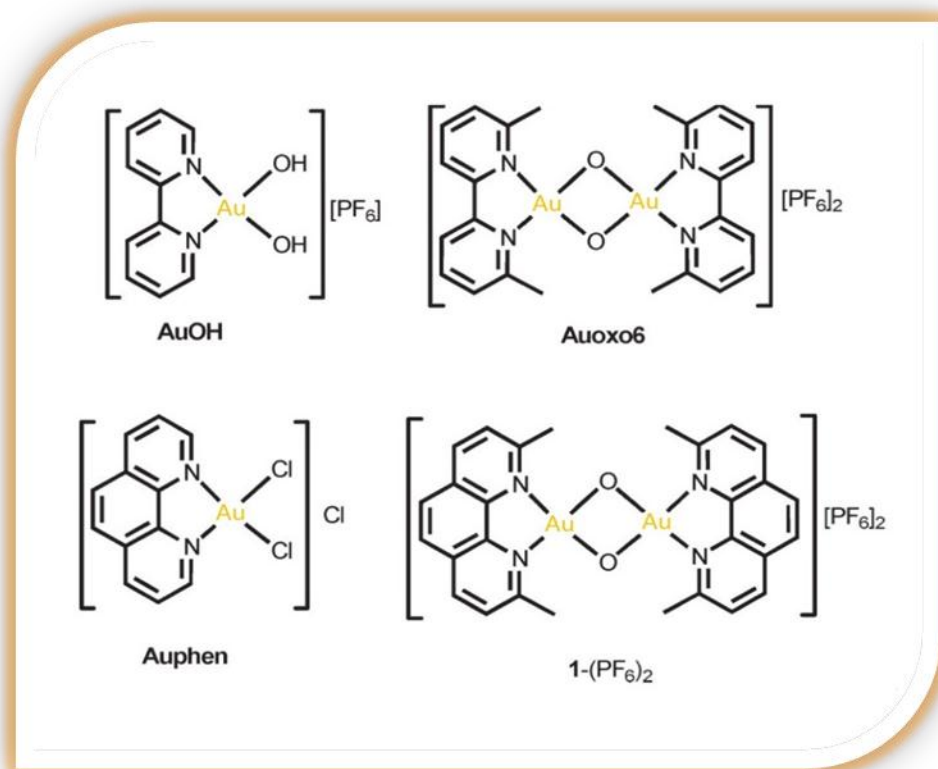
Међу првим динуклеарним комплексима Au(III) су синтетисани полазећи од мононуклеарног Au(III) комплекса са *bipy* лигандом (Слика 1.15).⁸



Слика 1.15. Динуклеарни комплекси Au(III) са *bipy* лигандом.

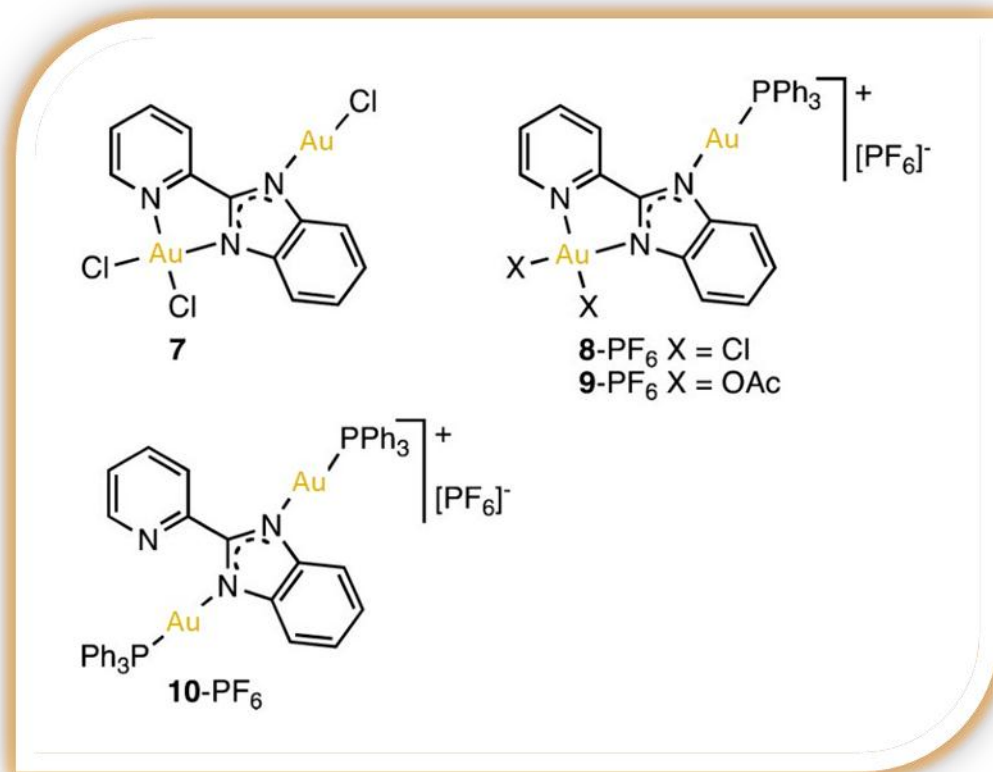
Приказани комплекси показали су *in vitro* активност на A2780 ћелијској линији карцинома јајника (Табела 1.1). Комплекси Ауохо1 до Ауохо5 су показали средње цитотоксичне карактеристике (IC₅₀ ~ 10-30), док је комплекс Ауохо6 показао 5-15 пута већу цитотоксичност (Табела 1.1). На основу података из Табеле 1 може се видети да су динуклеарни комплекси показали већу цитотоксичност у односу на одговарајуће мононуклеарне комплексе.⁸

Затим је уследила синтеза динуклеарних Au(III) комплекса са *phen* лигандом (Слика 1.16). Ови комплекси су показули *in vitro* активност на већем броју тумора, као и повећану селективност у односу на одговарајуће мононуклеарне комплексе.¹¹⁰ Такође, и динуклеарни комплекси типа [(N,N,C)₂Au₂(m-O)][PF₆]₂, (N,N,C = тридентатни лиганд, m-O = мосни кисеоников атом) је показао бољу цитотоксичност од аналогних мононуклеарних комплекса,¹¹¹ што доводи до закључка да полинуклеарност позитивно утиче на повећање биолошке активности.¹¹²



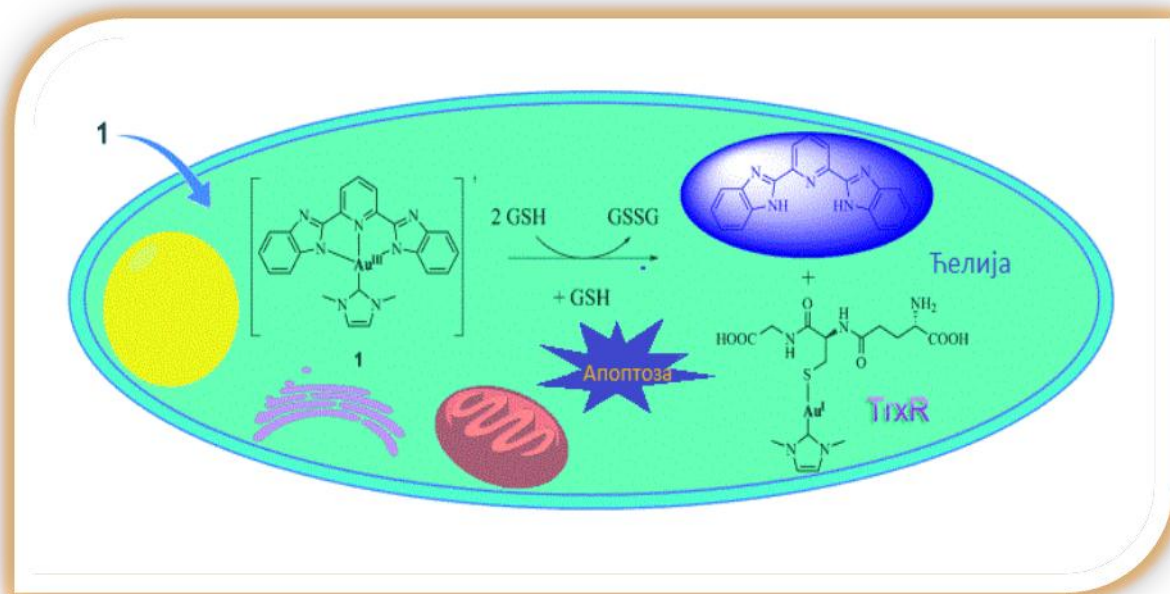
Слика 1.16. Динуклеарни и мононуклеарни комплекси $Au(III)$ са *phen* лигандом.

Поред динуклеарних комплекса $Au(III)$ - $Au(III)$ јона, синтетисани су и динуклеарни комплексни типа $Au(III)$ - $Au(I)$. У овој групи комплекса налази се динуклеарни комплекс $Au(III)$ - $Au(I)$ са *pbiH* лигандом (*pbiH* = 2-(2'-пиридил) бензимидазол) (Слика 1.17). Биолошка активност ових комплекса је обећавајућа, јер су показали задовољавајућу стабилност при физиолошким условима, као и значајану цитотоксичност.¹⁰⁹ Динуклеарни $Au(III)$ - $Au(III)$ и $Au(III)$ - $Au(I)$ комплекси са *N*-хетероцикличним *бис*-карбенским лигандом су се, такође, показали као стабилни и у будућим истраживањима готово сигурно ће показати значајну биолошку активност.¹¹³



Слика 1.17. Динуклеарни комплекси Au(III) - Au(I).

Тренутно се истраживања у области антитуморских карактеристика једињења злата, поред синтезе полинуклеарних комплекса, заснивају и на коришћењу *N*-хетероцикличних карбенских лиганда. Ови лиганди имају изузетне електрон-донорске способности, па сходно томе и могућност да стабилизују јон злата у одређеном оксидационом стању. Познато је да Au(III) комплекси веома лако подлежу редукцији у присуству тиола. Комплекс Au(III) са NNN карбенским лигандима, H₂IPi (изофтална киселина) и H₂BPB (1,2-bis(2-пиридинкарбоксамидо)бензен) у организму подлеже редукцији у присуству GSH и даје одговарајући Au(I)-NHC комплекс који показује антитуморске карактеристике. Овај процес је праћен ослобађањем флуоресцентног лиганда, што га чини погодним за детекцију тиола у ћелији (Слика 1.18).¹¹⁴



Слика 1.18. Редуција $Au(III)$ у $Au(I)$ у присуству GSH (Слика преузета из реф. 114).

БЛЕЂА

На крају треба истаћи да $Au(III)$ комплекси представљају нову генерацију антитуморских агенаса. Ови комплекси испољавају већу цитотоксичност, већу селективност и мању резистентност у односу на комплексе платине и свакако имају потенцијала за фармаколошку употребу. Разумевање механизма по коме ови комплекси испољавају своје дејство је од великог значаја.

Како би се дефинисао однос између структуре и функције нове групе цитотоксичних и потенцијално антитуморских једињења, у оквиру ове докторске дисертације проучавана је интеракција између неких $Au(III)$ комплекса и ДНК фрагмената, као и са аминокиселином L-His.

1.6. Супституционе реакције комплексних једињења

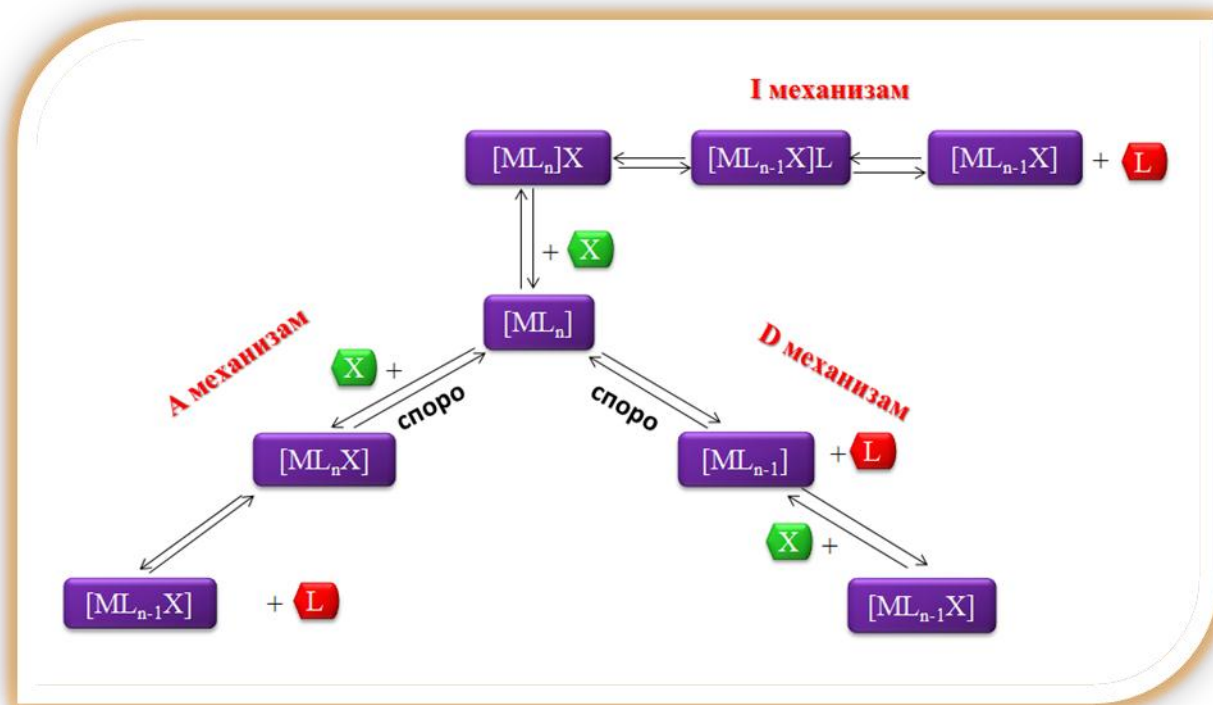
Супституционе реакције комплексних једињења могу бити електрофилне (S_E) или нуклеофилне (S_N) у зависности од тога да ли у процесу супституције долази до замене централног јона метала или лиганата. Уколико се у току реакције супституише јон метала тј. електрофил, у питању је реакција електрофилне супституције, једначина

(1.3), а уколико се врши замена лигананда, комплекс подлеже реакцији нуклеофилне супституције, једначина (1.4).^{115,116}



Нуклеофилне супституционе реакције, према Лангфорду (Langford) и Греју (Gray),¹¹⁵ одвијају се по три различита механизма (Шема 1.1):

- Дисоцијативном механизму (**D**)
- Асоцијативном механизму (**A**)
- Механизму измене (**I**)



Шема 1.1. Механизми нуклеофилне супституције комплексних једињења.

Код дисоцијативног механизма (D) у првом ступњу реакције долази до дисоцијације једног лиганда L из координационе сфере комплекса, при чему настаје интермедијер са смањеним координационим бројем. У следећем ступњу улазни лиганд X се везује за централни јон метала. С обзиром да је први ступањ реакције спорији, он одређује укупну брзину реакције супституције.

Код асоцијативног механизма (A) у првој фази улазни лиганд X се везује за централни јон метала, градећи интермедијер са повећаним координационим бројем, а затим, у другој фази одлазећи лиганд L напушта координациону сферу комплекса. Реакција грађења интермедијера са повећаним координационим бројем је спорија и она одређује брзину овог процеса супституције.

Механизам измене (I) је процес код кога се, у првој фази, улазни лиганд X везује електростатичким силама за спољашњу координациону сферу комплекса. Потом долази до миграције улазног лиганда из спољашње у унутрашњу координациону сферу уз истовремену миграцију одлазећег лиганда L из унутрашње у спољашњу координациону сферу. Крајњи процес је раскидање везе између комплекса и одлазећег лиганда. Овај механизам, за разлику од претходна два, нема интермедијера, али постоји прелазно стање, тј. процес поседује своју енергију активирања. Механизам измене се може поделити на I_a и I_d механизме. Уколико процес раскидања везе између централног јона метала и одлазећег лиганда L има већи утицај на брзину реакције, механизам се обележава са I_d , а уколико процес формирања нове везе између централног јона метала и улазног лиганда X има већи утицај на брзину хемијске реакције, механизам се обележава са I_a .^{115,116}

1.7. Активациони параметри

Одређивање механизма хемијске реакције заснива се на анализи добијених вредности термодинамичких параметара (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔV^\ddagger), који карактеришу одређени процес. Један од битних података је вредност константе брзине хемијске реакције k, за чије одређивање постоји велики број експерименталних метода. Избор одговарајуће методе зависи како од брзине процеса који се проучава, тако и од особина учесника хемијске реакције.^{117,118}

Познавање вредности константе брзине хемијске реакције на различитим температурама омогућава одређивање осталих термодинамичких параметара. Вредност енергије активирања E_a одређује се помоћу Аренијусове (Arrhenius) једначине (1.5).¹¹⁷⁻¹¹⁹

$$k = k_0 \exp(-E_a/RT) \quad (1.5)$$

у којој је k константа брзине хемијске реакције, k_0 фактор учестаности, R гасна константа и T температура на којој је одређена вредност константе брзине. Логаритмовањем једначине (1.5) добија се израз:

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT \quad (1.6)$$

у коме постоји линеарна зависност $\ln k$ од $1/T$. Ова зависност је линеарна у ужем температурном интервалу од 30 – 40 °C. То значи да се познавањем вредности константе брзине хемијске реакције за најмање три температуре, графичким путем може одредити вредност члана $-E_a/R$, односно, вредност енергије активирања за изучавану реакцију.^{117,118}

Промена енталпије активирања ΔH^\ddagger одређује се из једначине (1.7).

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (1.7)$$

Промена ентропије активирања ΔS^\ddagger је величина која представља мерило неуређености система, односно, промену слободне (Gibbs-ове) енергије ΔG^\ddagger са променом температуре T и може се изразити помоћу једначине (1.8).

$$\left(\frac{d(\Delta G^\ddagger)}{dT} \right) = -\Delta S^\ddagger \quad (1.8)$$

Вредност ΔS^\ddagger одређује се на основу Ајрингове (Eyring) једначине (1.9).

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (1.9)$$

С обзиром да се промена слободне енергије ΔG^\ddagger може изразити преко промене енталпије активирања и промене ентропије активирања, једначина (1.10)

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger + T\Delta S^\ddagger \quad (1.10)$$

заменом у изразу (1.9) добија се једначина (1.11).

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \quad (1.11)$$

Логаритмовањем једначине (1.11) добија се једначина:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{R}{Nh}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (1.12)$$

На основу једначине (1.12) видимо да постоји линеарна зависност $\ln(k/T)$ од $1/T$. Из графичког приказа ове једначине, тј. из нагиба добијене праве одређује се вредност промене енталпије активирања, а из одсечка праве израчунава се вредност промене ентропије активирања. Први члан $\ln(R/Nh)$, је константа и на 25°C износи 23,8.^{119,120}

Повезаност константе брзине хемијске реакције и промене запремине активирања ΔV^\ddagger дата је Вант-Хофовом (Van't Hoff) једначином (1.13).

$$\left(\frac{d(\ln k)}{dP}\right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.13)$$

Вредност за ΔV^\ddagger добија се праћењем промене константе брзине хемијске реакције у зависности од притиска, а на основу једначине (1.14)

$$\Delta V^\ddagger = -bRT \quad (1.14)$$

у којој b представља нагиб праве $\ln k = f(P)$. Запремина активирања ΔV^\ddagger састоји се из два члана, једначина (1.15).

$$\Delta V^\ddagger = \Delta V_{\text{int}}^\ddagger + \Delta V_{\text{sol}}^\ddagger \quad (1.15)$$

Први члан $\Delta V_{\text{int}}^\ddagger$ односи се на промене у интернуклеарним растојањима и угловима веза приликом настајања активираниог комплекса, док други члан $\Delta V_{\text{sol}}^\ddagger$ описује промене у наелектрисању, као и диполне интеракције у активираниом комплексу. Зато, уколико реагују наелектрисани јони у процесу супституције допринос другог члана може бити већи од првог, па вредност запремине активирања није поуздан критеријум за одређивање механизма. Међутим, када у току процеса супституције нема промена у наелектрисању, други члан у једначини (1.15) може се занемарити, тј. тада запремина активирања зависи само од $\Delta V_{\text{int}}^\ddagger$. У том случају је вредност ΔV^\ddagger најпоузданији критеријум за одређивање механизма супституције.^{121,122}

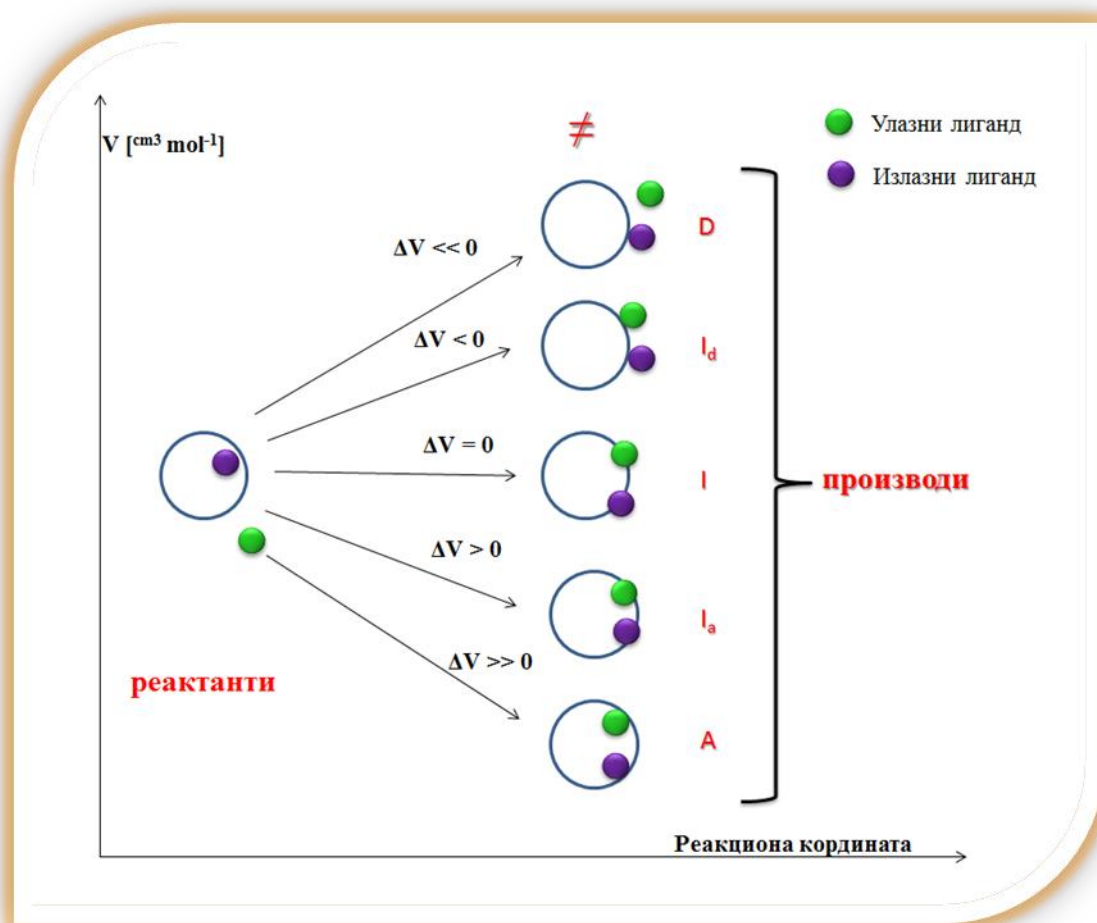
1.8. Одређивање механизма нуклеофилних супституционих реакција

Одређивање механизма нуклеофилне супституционе реакције врши се на основу вредности термодинамичких параметара,¹¹⁸⁻¹²² који карактеришу проучавани процес. Један од параметара помоћу кога се на врло једноставан начин може прелиминарно одредити механизам супституције је константа брзине хемијске реакције. На основу једначина које карактеришу процесе дисоцијативног, асоцијативног и механизма измене (Шема 1.1.) види се да је процес супституције по дисоцијативном механизму реакција првог реда, а по асоцијативном механизму реакција другог реда. С тим у вези, уколико се приликом изучавања неке реакције установи да природа улазног лиганда не утиче на брзину реакције, тада се ради о дисоцијативном или I_d механизму супституције. И обрнуто, уколико брзина хемијске реакције зависи од природе улазног лиганда, реакција се дешава по асоцијативном или I_a механизму супституције.^{115,116}

Поузданији критеријум за одређивање механизма је познавање вредности промене ентропије активирања ΔS^\ddagger . Пошто је ентропија активирања мерило неуређености система, а на основу сазнања да се код различитих механизма формира интермедијер са већом или мањом неуређеношћу, овај параметар омогућава одређивање

механизма супституције. У случају D механизма настаје интермедијер са смањеним координационим бројем, односно, повећава се неуређеност система и ΔS^\ddagger има позитивну вредност. Код асоцијативног механизма настаје интермедијер са повећаним координационим бројем и смањује се неуређеност система, односно ΔS^\ddagger има негативну вредност. У случају I механизма ΔS^\ddagger је приближно једнако нули.

Најпоузданији критеријум за одређивање механизма је вредност промене запремине активирања.^{121,122} Узимајући у обзир врсту интермедијера код различитих механизма, повећање притиска ће убрзавати реакције које се дешавају по A механизму, а успоравати реакције по D механизму. Зато, негативна вредност ΔV^\ddagger указује на A или I_a механизам, а позитивна вредност ΔV^\ddagger указује на D или I_d механизам супституције. У случају механизма измене, притисак не утиче значајније на брзину супституције.

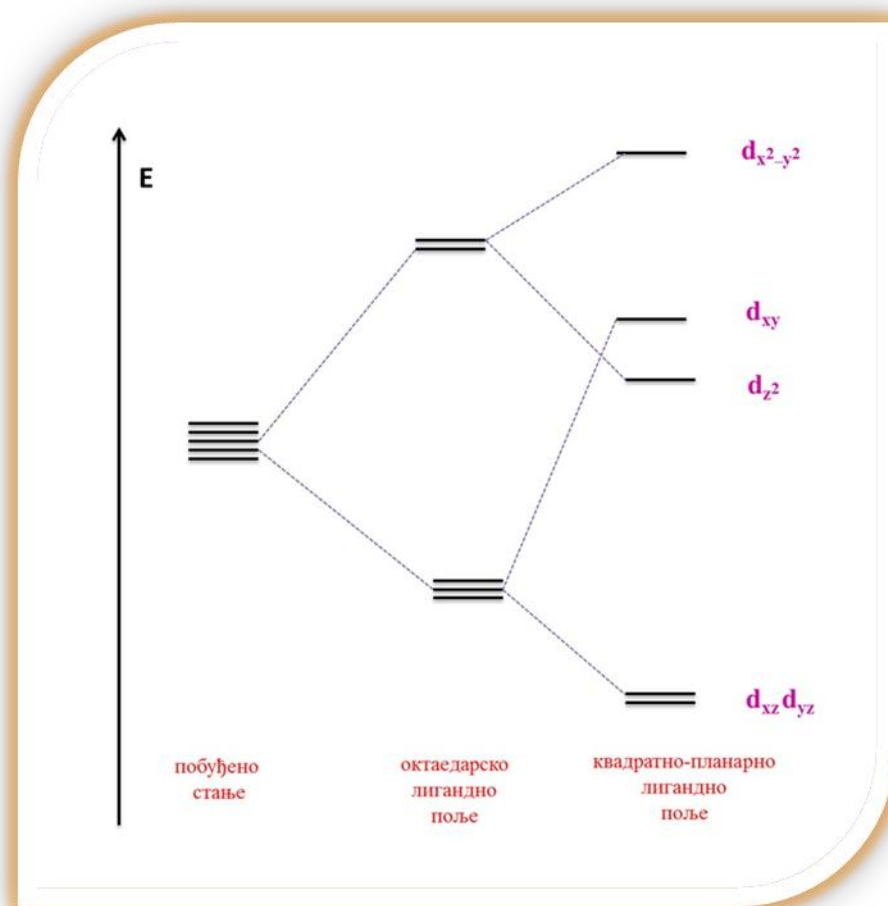


Шема 1.2. Шематски приказ различитих типова механизма супституционих реакција за један замисљен "раван" комплекс.

1.9. Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса

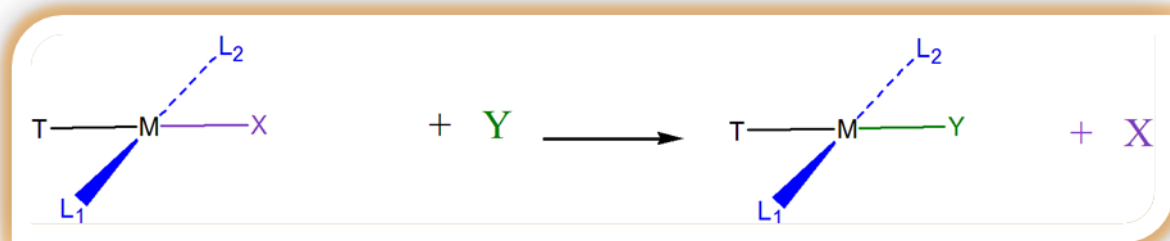
С обзиром да су у овом раду изучаване супституционе реакције комплексних једињења Au(III) јона, која спадају у групу квадратно-планарних комплекса, неопходно је упознати се са основним карактеристикама супституционих реакција ове групе хемијских једињења.

Поред Pt(II) , квадратно-планарне комплексе граде још Pd(II) , Au(III) , Ir(I) и Rh(I) . Општа формула ових комплексних једињења је $[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}]$, односно, они се састоје од централног јона метала и четири лиганда. Ова група комплексних једињења поседује D_{4h} групу симетрије, тако да су везе метал-лиганд усмерене дуж x - и y -осе.³⁶ Цепанье d -орбитала у квадратно-планарном лигандном пољу приказано је на Слици 1.19.



Слика 1.19. Цепанье d -орбитала у квадратно-планарном лигандном пољу.

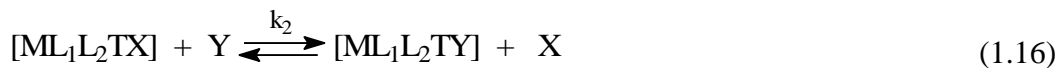
Реакција супституције лиганда код квадратно-планарних комплекса^{115,116} приказана је на Шеми 1.3.



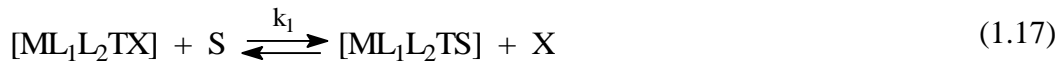
Шема 1.3. Реакција супституције лиганда код квадратно-планарних комплекса.

На основу Шеме 1.3. може се видети да у координационој сфери комплекса долази до супституције лиганда X улазним лигандом Y. Лиганд T се налази у *trans*-положају у односу на одлазећи лиганд X.

Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса одвијају се по два кинетичка пута. Један је *тзв.* директна нуклеофилна супституција окарактерисана константом k_2 , једначина (1.16).



Други је солволитички пут, окарактерисан константом брзине k_1 , по коме се у првој фази врши супституција лиганда X растварачем S, а потом, у другој фази лиганд Y улази у координациону сферу комплекса, замењујући молекул растварача.



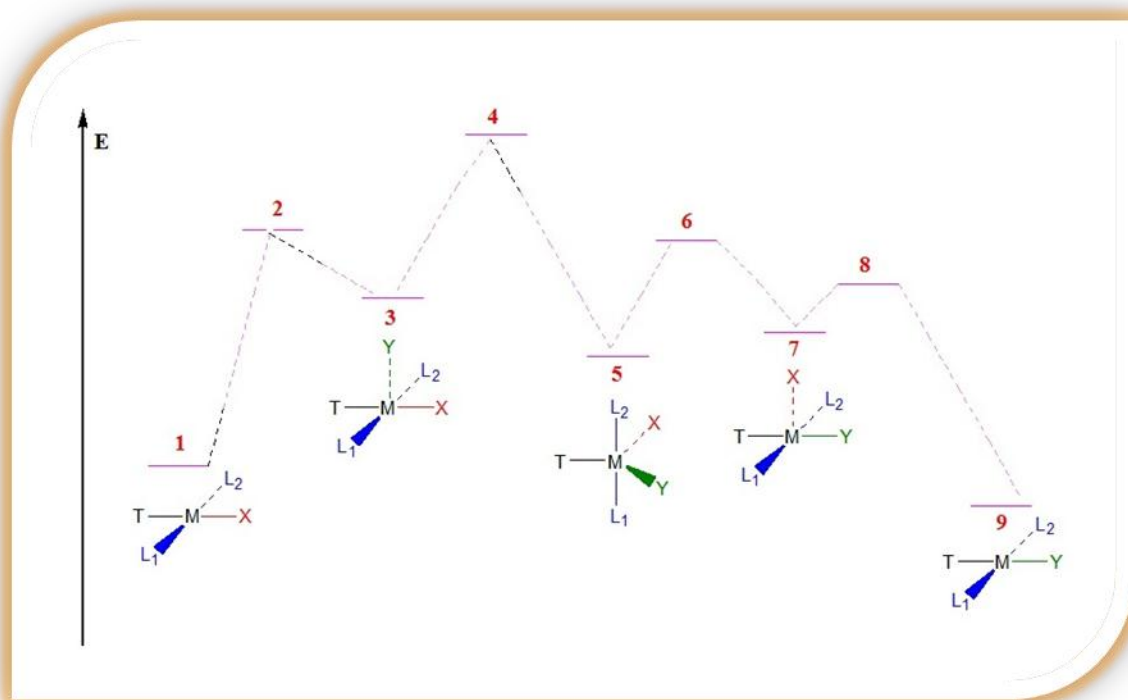
Израз за брзину супституционе реакције обухвата оба кинетичка пута и приказан је једначином (1.19).

$$\text{BRZINA} = k_1[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}] + k_2[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}][\text{Y}] \quad (1.19)$$

односно

$$\text{BRZINA} = (k_1 + k_2[\text{Y}])[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}] \quad (1.20)$$

На Шеми 1.4. приказан је механизам супституције лиганда код квадратно-планарних комплекса. Из Шеме 1.4. може се видети да улазни лиганд Y прилази квадратно-планарном комплексу под нормалним углом, формирајући квадратну пирамиду (3). Настала квадратна пирамида се трансформише у тригоналну бипирамиду (5), а потом поново у квадратну пирамиду (7), али са одлазећим лигандом X на врху пирамиде. На крају процеса супституције, раскидањем везе између метала и лиганда X поново се формира квадратно-планарни комплекс (9). Прелазна стања су окарактерисана положајима 2, 4, 6 и 8.



Шема 1.4. Механизам супституције лиганда и енергетски профил реакције супституције код квадратно-планарних комплекса.

На брзину одвијања супституционих реакција квадратно-планарних комплекса утиче већи број фактора, у које спадају: утицај централног јона метала, ефекат одлазећег лиганда, ефекат улазног лиганда, утицај лиганда који се налази у *trans*-положају у односу на одлазећи лиганд (*trans*-ефекат). Експериментални услови под којима се супституциона реакција одвија (растварач, јонска сила раствора, рН вредност, присуство катализатора или инхибитора) такође утичу на брзину реакције.

ЗАДАТАК РАДА

Тема докторске дисертације је испитивање кинетике и механизма супституционих реакција Au(III) комплекса и биолошки релевантних лиганата L-хистидина (L-His), инозина (Ino), инозин-5'-монофосфата (5'-IMP) и гуанозин-5'-монофосфата (5'-GMP). Комплекси Au(III), коришћени за кинетичка испитивања, тестирани су у *in vitro* условима на различитим ћелијама тумора као што су: CLL ћелије, 4T1 ћелије, A549 епитела ћелијске линије карцинома плућа и ћелије јајовода, ради одређивања њихове цитотоксичности. Поред тога, испитивана је и *in vivo* активност комплекса Au(III) у спречавању раста тумора дојке код BALB/c миша. Наведена испитивања могу се поделити на следећи начин:

1. Испитивање кинетике супституционих реакција монофункционалних Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$, и биолошки релевантних лиганата L-His, Ino, 5'-IMP и 5'-GMP у 25 mM HEPES пуферу (pH = 7,2) у присуству NaCl, у функцији концентрације лиганата и температуре на stopped-flow спектрофотометру.
2. Кинетика супституционих реакција бифункционалних Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$, и азот-везивних лиганата L-His, Ino, 5'-IMP и 5'-GMP испитивана је у 25 mM HEPES пуферу (pH = 7,2) у присуству NaCl, у функцији концентрације лиганата и температуре на stopped-flow спектрофотометру.
3. Изучавање цитотоксичности Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$, *in vitro* на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије добијене из крви болесника са хроничном лимфоцитном леукемијом (CLL). Испитивање цитотоксичности Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, на 4T1 ћелијској линији тумора дојке миша *in vitro* и *in vivo* и упоређивање њихове антитуморске активности са цисплатином, *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$. Такође проучавана

- је цитотоксичност $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ на А549 ћелијској линији епитела карцинома плућа помоћу тестова цитотоксичности (МТТ и LDH) и теста апоптозе. Одређиван је и утицај ауротиомалата, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2]^+$ комплекса на покретљивост ћелија изолованих јајовода код жена.
4. ДФТ израчунавања за супституционе реакције монофункционалних $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ комплекса.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1. Реагенси и раствори

За синтезу изучаваних комплекса злата као полазна једињења коришћени су $K[AuCl_4]$ (ABCR GmbH & Co. KG, Germany) и $H[AuCl_4]$ (ABCR GmbH & Co. KG, Germany).

Нуклеофили Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His набављени су од Fluka и Acros Organics. Лиганди *terpy*, *bipy*, *dach*, *en*, SMC и DMSO, набављени од Fluka, Acros Organics или Sigma Aldrich, коришћени су без предходног пречишћавања.

Комплекси $[Au(dien)Cl]Cl$, $[Au(terpy)Cl]Cl$, $[Au(bipy)Cl_2]Cl$ и $[Au(en)Cl_2]Cl$ су синтетисани по раније публикованим поступцима.¹²³⁻¹²⁶ Чистоћа добијених једињења потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и 1H NMR спектроскопијом.

Цисплатина, *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$, (Aldrich), D_2O (Deutero GmbH 99%), Hepes пуфер {N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфидна киселина} (Aldrich) су, такође, коришћени без предходног пречишћавања.

Супституционе реакције $[Au(dien)Cl]Cl$, $[Au(terpy)Cl]Cl$, $[Au(bipy)Cl_2]Cl$, $[Au(dach)Cl_2]Cl$, $[Au(en)Cl_2]Cl$, $[Au(SMC)Cl_2]$ и $[AuCl_2(DMSO)_2]Cl$ комплекса су изучаване у 25 mM Hepes пуферу. Hepes пуфер је изабран из разлога што је волуминознији молекул у односу на *tris* пуфер, па је везивање Hepes пуфера за јоне метала услед стерних сметњи потпуно искључено.¹²⁷

За испитивање цитотоксичности коришћене су следеће супстанце: серум говеђег фетуса (FBS), хранљиви медијум RPMI 1640, пеницилин G, стрептомицин, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид (МТТ), фосфатни пуфер (PBS), трипан-плаво обојење, набављени од Sigma Chemicals, Немачка. Микротитар са

96 отвора и плоче набављени су од Sarstedt, Немачка, а Наемассел од Theraselect GmbH, Немачка.

Сви водени раствори припремани су у бидестилованој води.

2.1.1. Синтеза комплексних једињења

А) Синтеза $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ комплекса:

Комплексна со злата $\text{K}[\text{AuCl}_4]$ најпре је растворена у малој количини воде (0,2g, 0,5 mmol). Лиганд 1,2-диаминциклохексан (*dach*) (0,2g, 0,5 mmol) растворен је у смеси $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) и додат у капима у раствор $\text{K}[\text{AuCl}_4]$. Реакциона смеша је мешана 5 сати на собној температури. Добијени жути раствор је процеђен и остављен у мраку да упарава. Настали жути кристали су процеђени, испрани хладном водом и осушени на ваздуху. Принос: 0,22 g (82 %).

Израчунато за $\text{AuC}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_3$: Н, 5,34; С, 13,80; N, 2,71. Нађено: Н, 5,29; С, 13,66; N, 2,54%.

Б) Синтеза $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса:

За синтезу комплекса коришћена је киселина злата $\text{H}[\text{AuCl}_4]$. Киселина $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ (0,2g, 0,8 mmol) је најпре растворена у малој количини воде. У добијени раствор додат је лиганд S-метил-L-цистеин (*SMC*) (0,105g, 0,8 mmol). Киселост раствора је подешена између 4 и 5 додатком 0,1M раствора NaOH . Добијени раствор мешан је неколико сати, након чега је остављен да упарава у мраку на собној температури. Настали браон прах је процеђен, испран етанолом и сушен на ваздуху. Принос: 0,21g (76 %).

Израчунато за $\text{AuC}_4\text{SO}_3\text{H}_{11}\text{NCl}_3$: Н, 3,07; С, 10,52; N, 3,07; S, 7,02. Нађено: Н, 3,08; С, 10,73; N, 2,77; S, 7,01%.

В) Синтеза [Au(dien)Cl]Cl₂ комплекса:

Комплекс [Au(dien)Cl]Cl₂ добијен је полазећи од киселине злата H[AuCl₄]·3H₂O. Киселина H[AuCl₄]·3H₂O (0,175g, 0,45 mmol) је најпре растворена у малој количини воде (3 cm³). У добијени раствор додат је лиганд диетилентриамин (*dien*) (0,04g, 0,45 mmol). Након мешања настао је жути талог, који се додатком неколико капи 0,1М раствора NaOH, ради подешавања рН између 4 и 5, потпуно растворио. Добијен бистар жути раствор мешан је неколико сати на температури од око 0°C, након чега је остављен да испарава у мраку на собној температури. Настали жути прах је процеђен, испран етанолом и сушен на ваздуху. Принос: 0,172g (95,13 %). Чистоћа добијеног комплекса потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и ¹H NMR спектроскопијом, а добијени резултати су били у сагласности са публикованим.¹²³

Г) Синтеза [Au(terpy)Cl]Cl₂ комплекса:

Као полазна супстанца у синтези комплекса коришћена је киселина злата H[AuCl₄]·3H₂O. Киселина H[AuCl₄]·3H₂O (0,2g, 0,5 mmol) је најпре растворена у води. У добијени раствор додат је лиганд 2,2':6',2''-терпиридин (*terpy*) (0,12g, 0,5 mmol). рН раствора је током реакције била између 4 и 5. Добијени раствор мешан је неколико сати на 50 °С, након чега је остављен да испарава у мраку на собној температури. Настали жути прах је процеђен, испран етанолом и сушен на ваздуху. Принос: 0,22g (82 %). Чистоћа добијеног комплекса потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и ¹H NMR спектроскопијом, а добијени резултати су били у сагласности са публикованим.¹²⁴

Д) Синтеза [Au(bipy)Cl₂]Cl комплекса:

За синтезу овог комплекса пошло се од соли K[AuCl₄]. Со злата најпре је растворена у малој количини воде (0,2g, 0,5 mmol). Лиганд 2,2'-бипиридин (*bipy*)

(0,08 g, 0,5 mmol) растворен је у води и додат у капима у раствор $K[AuCl_4]$. Реакциона смеша је мешана неколико сати на $50\text{ }^\circ\text{C}$. Добијени жути раствор је остављен у мраку да упарава. Настали жути талог је процеђен, испран етанолом и осушен на ваздуху. Принос: 0,20g (89 %). Чистоћа добијеног комплекса потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и ^1H NMR спектроскопијом, а добијени резултати су у сагласности са публикованим.¹²⁵

Ђ) Синтеза $[Au(en)Cl_2]Cl$ комплекса:

Као полазна супстанца у синтези комплекса коришћена је со $K[AuCl_4]$. Со злата најпре је растворена у етанолу на собној температури (0,2g, 0,5 mmol). Лиганд етилендиамин (*en*) (0,5 mmol) је додат у капима у раствор $K[AuCl_4]$. Наранџасто-браон талог је настао одмах након додатка лиганда, а након 20 минута мешања реакционе смеше талог се потпуно растворио. Реакциона смеша је мешана неколико сати на $50\text{ }^\circ\text{C}$. Добијени жути раствор је процеђен и остављен у мраку да упарава. Настали жути талог је процеђен, испран етанолом и осушен на ваздуху. Принос: 0,13g (90.0 %). Чистоћа добијеног комплекса потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и ^1H NMR спектроскопијом, а добијени резултати су у сагласности са публикованим.¹²⁵

2.2. Инструменти

За мерење рН раствора коришћен је HI 9107 Microprocessor Hanna Instrument рН-метар са комбинованом стакленом електродом стандардизованом помоћу Fischer-стандардних пуфера (рН = 4,00; 7,00; 11,00).

Елементалне анализе (C, H, N, S) урађене су на Varian III CHNOS Elemental, Analyzer Elemental Analysensysteme, GmbH.

Uv-Vis спектри снимани су на Perkin Elmer Lambda 35, Shimadzu UV 250 и Hewlett-Packard 8452A diode-array спектофотометрима са термостатираном 1,00 cm кварцном Suprasil киветом. Stopped-flow мерења вршена су на Applied Photophysics SX.18MV инструменту.

^1H NMR спектри снимани су на Varian Gemini-200 MHz апарату.

2.3. Кинетичка мерења

2.3.1. Реакције супституције монофункционалних комплекса Au(III) и азот-везивних биомолекула

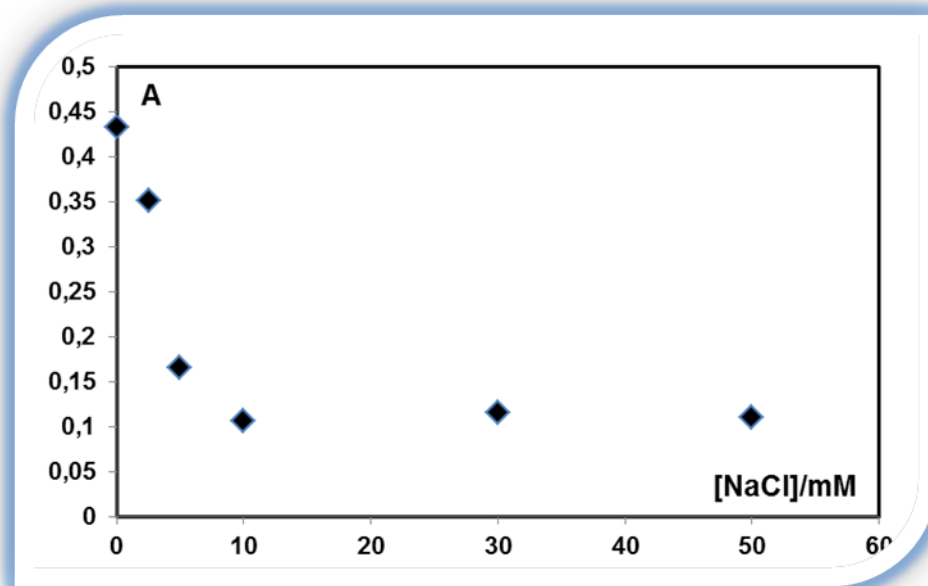
Кинетика реакција супституције комплекса $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ са лигандима Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His изучаване су спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора са временом на радној таласној дужини. Све супституционе реакције су проучаване као реакције *псеудо*-првог реда на три различите температуре (288, 298 и 308 K). Реакције комплекса изучаване су у 25 mM Нерес пуферу (pH = 7,2) у присуству 10 mM NaCl, како би се спречила хидролиза комплекса (Слика 2.1).

Радна таласна дужина одређена је снимањем спектра реакционе смеше у одређеним временским интервалима у опсегу таласних дужина између 220 и 450 nm. Као радна таласна дужина узета је она таласна дужина на којој је највећа промена у апсорбцији са временом. Реакције су отпочињале мешањем еквивалентних запремина раствора комплекса и лиганда директно у stopped-flow инструменту. Концентрација лиганда била је увек у великом вишку (најмање 20 пута) у односу на концентрацију комплекса, како би се обезбедили услови реакције *псеудо*-првог реда. Спектрофотометријско одређивање константе брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , врши се на основу једначине (2.1),¹¹⁶

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obsd}}t \quad (2.1)$$

у којој је зависност $\ln(A_t - A_\infty)$ од времена t линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за k_{obsd} . Величина A_∞ представља апсорбцију раствора након „бесконечно” дуго времена (обично после 8-10 полувремена реакције).¹¹⁷ Добијена вредност за константу брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , преставља средњу вредност 4 до 5 независних кинетичких мерења.

Израчунавања су вршена помоћу компијутерских програма Microsoft Excel и OriginPro8.



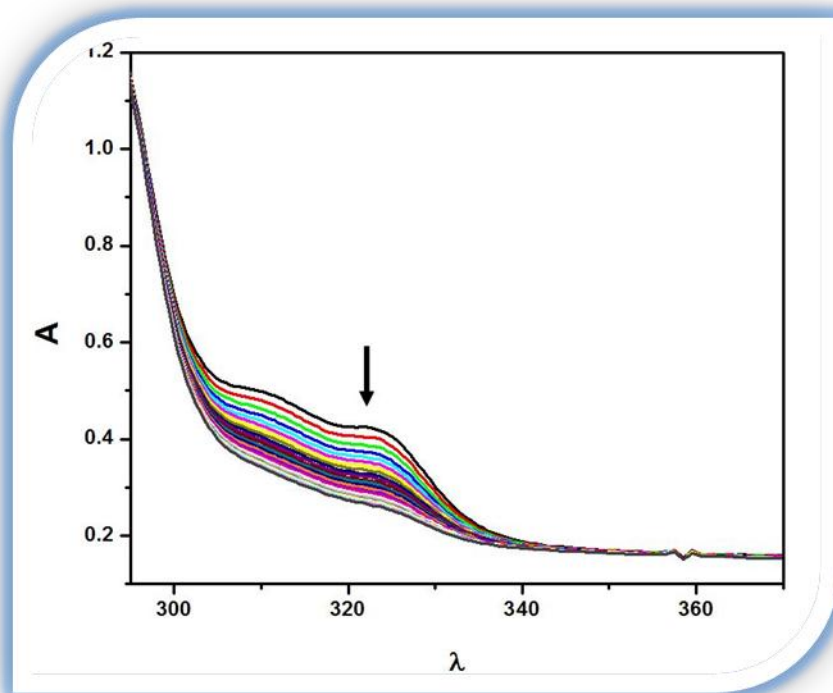
Слика 2.1. Утицај различите концентрације хлоридних јона на промену апсорбанце раствора комплекса $[Au(terpy)Cl]^{2+}$ у 25 mM *Hepes* пуферу ($pH \approx 7,2$) на 280 nm.



Слика 2.2. Stopped-flow и класични UV-Vis спектрофотометри коришћени током истраживања.

2.3.2. Реакције супституције бифункционалних $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ комплекса и азот-везивних биомолекула

Кинетика реакција супституције комплекса $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]^+$ са лигандима Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His изучаване су спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора са временом на радној таласној дужини. Радна таласна дужина одређена је на исти начин као што је описано у делу 2.3.1. На Слици 2.3 приказана је промена апсорбанце у функцији времена за реакцију супституције $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ комплекса и L-His. И ове супституционе реакције су проучаване као реакције *псеудо*-првог реда на три температуре (288, 298 и 308 K), у 25 mM Нерес пуферу (pH \approx 7,2) у присуству 20 mM NaCl.



Слика 2.3. Промена апсорбције са временом ($\Delta t = 1\text{s}$) за реакцију супституције $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ ($1 \cdot 10^{-4}\text{M}$) комплекса и L-His ($4 \cdot 10^{-3}\text{M}$) у 25 mM Нерес пуферу (pH \approx 7,2) у присуству 20 mM NaCl на $T = 298\text{K}$.

2.3.3. Реакције супституције бифункционалних $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекс и азот-везивних биомолекула

Кинетика реакција супституције комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ са лигандима Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His изучаване су спектрофотометријски на идентичан начин и при идентичним условима као што је описано у делу 2.3.2.

2.4. Квантно-хемијска метода

Хибридна теорија функционала густине, B3LYP/LANL2DZp, са псеудо-потенцијалом примењена је на јоне метала.^{128,129} Током оптимизације структура само се симетрија молекула узимала као константа. За израчунавања је коришћен GAUSSIAN компјутерски програм.¹³⁰ Утицај растварача коригован је коришћењем „single-point calculations”, уз помоћ CPCM¹³¹ формализма тј. B3LYP(CPCM)/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp.

2.5. Испитивање цитотоксичности

2.5.1. Испитивање цитотоксичности Au(III) комплекса

Припрема ћелије

CLL ћелије су добијене из крви пацијената који болују од хроничне лимфоцитне леукемије и који нису примали терапију шест месеци. Оне су након раздвајања испране три пута у haemassel-у. За раст и одржавање ћелија коришћен је хранљиви медијум RPMI 1640 (20% FBS, 100 IU/cm³ пеницилина G и 100 µg/cm³ стрептомицина). Број ћелија и њихова одрживост одређена је помоћу трипан-плаво обојења. Испитивања су одобрена од стране Етичког комитета Клиничког центра Крагујевац. Пацијенти су потписали пристанак.

Тест цитотоксичности (МТТ)

Утицај $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и цисплатине на вијабилност (преживљавање) ћелије одређиван је помоћу МТТ колориметријске методе.¹³² Ћелије CLL су помешане са средином и разблажене, тако да густина ћелија буде 1×10^6 ћелија/ cm^3 . Узет је аликвот (5×10^5 ћелија/ $100\mu\text{L}$) и убачен у микротитар са 96 отвора. Поред тога, у сваки отвор је убачено по $100 \mu\text{L}$ неког од испитиваних комплекса, који су серијски разређени средином два пута, како би се постигао опсег концентрације од $250 \mu\text{M}$ до $7,8 \mu\text{M}$. Ћелије су инкубиране на 37°C у 5% CO_2 инкубатору, 24 сата. Након интубације бунарчићи су центрифугирани. Раствор МТТ ($5 \text{ mg}/\text{cm}^3$ у PBS, $10 \mu\text{L}$) је додат у сваки бунарчић и инкубиран још 4 сата. Бунарчићи су центрифугирани, течност одбачена, а DMSO ($150 \mu\text{L}$) додат како би се растворили настали кристали. Након тога плоче су мућкане 10 минута. Оптичка густина сваког бунарчића је одређивана на 595 nm . Процент цитотоксичности је одређен на основу једначине 2.2:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 - ((\text{TS} - \text{BG0}) - \text{E}) / (\text{TS} - \text{BG0}) \times 100 \quad (2.2)$$

Где BG0 одговара средини, TS је укупно преживљавање/спонтана смрт нетретираних циљних ћелија и E је експериментални бунарчић.

2.5.2. Испитивање цитотоксичности изабраних комплекса Au(III) јона на 4T1 ћелији и спречавању раста тумора дојке код BALB/с миша*Ћелијска култура*

У експерименталним моделима је коришћена 4T1 ћелијска линија мишјег тумора дојке (American Type Culture Collection, Manassas, ATCCVA, USA; CRL-2539).

Животиње

Испитивање цитотоксичних ефеката комплекса вршена су на BALB/c женским мишевима. Животиње су држане у кавезима при константној температури и влажности, при чему су излагане светлости и мраку по 12 сати. Вода и храна су им биле доступне све време.

BALB/c женски мишеви (n=30), 7-9 недеља стари, су подељени у једну контролну и 4 експерименталне групе (n=6 у свакој групи).

Имплантација тумора и ињектовање лека

Ћелијске линије 4T1 мишјег тумора дојке (5×10^4) култивисане су у 60 μL RPMI 1640, а потом инокулисане директно у масно јастуче млечне жлезде BALB/c миша. Десет минута након инокулације тумора првог, четвртог, осмог, дванаестог, шеснаестог и двадесетог дана експеримента мишевима из експерименталних група су ињектовани комплекси $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и цисплатина (100 μL) концентрације 62,5 μM , који су предходно растворени у DMSO.

Тест цитотоксичности (MTT)

Утицај $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и цисплатине на преживљавање ћелије је одређиван помоћу MTT колориметријске методе,¹³² на начин као што је описао у делу 2.5.1.

Мерење раста примарног тумора и одређивање обима тумора

Морфометрија је тренутно стандардна метода за одређивање обима тумора због ниске цене рада и једноставности методе.^{133,134} Током експеримента мерење величине тумора је вршено свакога дана помоћу нонијуса. Како би се одредио обим тумора експерименталне животиње су сециране двадесетепрвог дана, при чему је тумор

уклоњен. Одређиван је највећи уздужни пречник (дужина) и највећи попречни пречник (ширина) тумора. Обим тумора је израчунат коришћењем модификоване формуле 2.3:

$$\text{Обим тумора} = 1/2 \times (\text{дужина} \times \text{ширина}^2)^{134,135} \quad (2.3)$$

2.5.3. Испитивање цитотоксичности комплекса Au(III) јона на A549 епителу ћелијске линије карцинома плућа

Културе A549 епитела ћелијске линије карцинома плућа

Култура A549 добијена је од American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. Ове ћелије су култивисане на Dulbecco's Modified Eagle подлози (DMEM), која садржи 10% FBS, 100 IU/mL пеницилина G и 100 µg/mL стрептомицина.

Тест цитотоксичности

Утицај комплекса Au(III) на преживљавање A549 ћелије одређен је помоћу МТТ колориметријске методе и LDH (Лактат дехидрогеназе) теста.

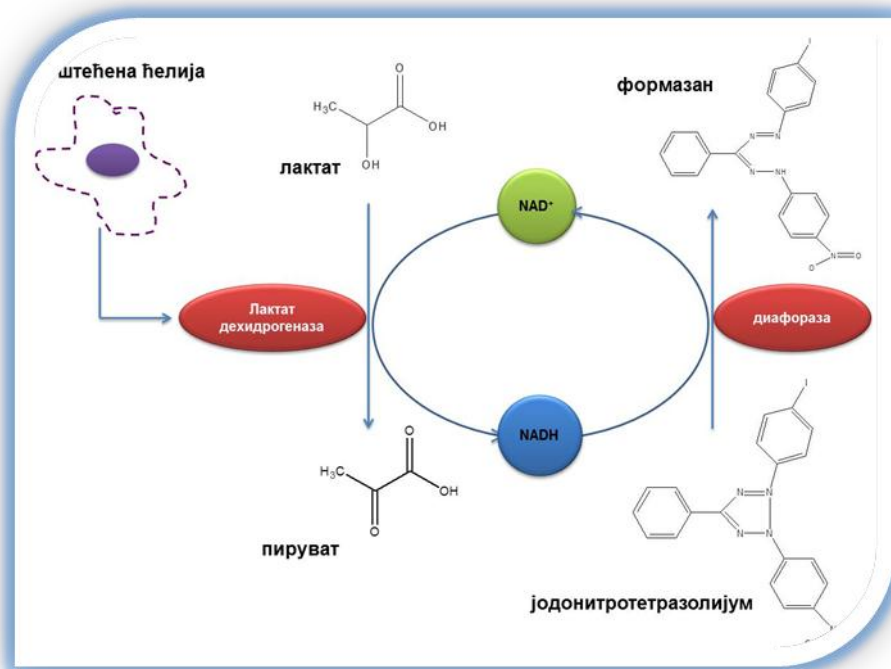
МТТ тест

Утицај $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ на преживљавање ћелије је одређен помоћу МТТ колориметријске методе,¹³² као што је раније описано у делу 2.5.1.

LDH (лактат дехидрогеназа) тест

Лактат дехидрогеназа (LDH) је стабилни ензим присутан у цитоплазми ћелија који се убрзо по оштећењу плазма мембране отпушта у медијум у којем се ћелије гаје. За испитивање оштећења ћелија користи се *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* (Roche Applied Science). Кит садржи мешавину супстрата која се додаје у супернатанте испитиваних ћелија. Активност LDH се одређује куплованом ензимском реакцијом којом се

јодонитротетразолијум, INT, редукује до формазана, наранџасто-црвене боје, растворљивог у води.



Слика 2.4. Шематски приказ LDH теста

У првој ензимској реакцији LDH редукује NAD^+ до NADH , а лактат оксидује до пирувата. У другој реакцији диафораза катализује оксидацију NADH у NAD^+ и редукцију INT до формазана. Кит садржи катализаторе (диафорузу/ NAD), лактат и INT (Слика 2.4).

Активност LDH ензима у супернатантима третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. Пораст LDH активности директно је пропорционална количини створеног формазана, па је интензитет боје директно пропорционалан броју мртвих ћелија. Интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 450 до 500 nm.

Ћелије су припремљене за LDH тест на исти начин као и за MTT тест. Разлика је само у медијуму за култивацију који садржи 1% FBS-а, због високе активности лактат-дехидрогеназе у серуму. За LDH тест коришћене су 3 контроле:

1. активност ензима у самом медијуму, бланк;
2. спонтано ослобађање лактат дехидрогеназе из ћелија, ћелије су излагане само медијуму;
3. максимално ослобађање лактат дехидрогеназе из одређеног ћелијског типа, ћелије су третиране 1% тритоном X који изазива пермеабилizацију ћелијске мембране.

После 24 сата излагања ћелија комплексима, супернатанти су покупљени и пребачени у нове микротитар плоче. У 100 μL супернатанта додато је по 100 μL радног раствора LDH кита. Плоче су држане 30 минута у мраку на собној температури, а затим је у сваки отвор микротитар плоче додато по 50 μL 1M HCl. Оптичка густина узорак је мерена на 450 nm на Zenyth 3100 мултифункционалном читачу. Процент мртвих ћелија је дат формулом 2.4:

$$\% \text{ мртвих ћелија} = (E-B)/((T-B)-(K-B)) \times 100 \quad (2.4)$$

E-означава отвор са испитиваним супстанцама; B-бланк; T-отвор са ћелијама третираним тритоном X; K-отвор са нетретираним ћелијама.

Тест за детекцију апоптозе (AnnexinV/PI)

Апоптозу карактерише премештање фосфатидил серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. Annexin V-FITC је флуоресцентна проба која се везује за фосфатидил серин, изложен на ћелијској мембрани. Пропидијум јодид (PI) се везује за ДНК присутну у ћелији само уколико је интегритет ћелијске мембране нарушен. Сматра се да су Annexin V(-); PI(-) ћелије живе, annexin V(+); PI(-) ћелије у раним фазама апоптозе и Annexin V(+); PI(+) ћелије у касним фазама апоптозе. У експоненцијалној фази раста ћелије су пресејане на 9 нових фласкова. Када ћелије прекрију 70% дна флашка, медијум се замени раствореним испитиваним комплексом. Након 24 сата изложености комплексу ћелије су прикупљене из фласкова, опране 2 пута у комплетном медијуму и ресуспендоване у пуферу који омогућава везивање Annexin-a V (10X пуфер: 0.1 M Hepes, pH 7.4; 1.4 M NaCl; 25 mM CaCl₂) до густине

1.000.000 ћелија/ cm^3 . У 100 μL такве суспензије је додато 5 μL Annexin-a V (BD Pharmingen, Сједињене Америчке Државе) и 5 μL PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS-a) (Sigma Aldrich, Немачка). После истека 15 минута инкубације на собној температури и у мраку, додато је по 400 μL 10X пуфера за везивање. Анализирано је 20000 догађаја на Fасscalibur BD проточном цитометру, а подаци су обрађени у Winmdi 2,9 програму.

Сва горе наведена испитивања цитотоксичности различитих концентрација изабраних комплекса Au(III) јона вршена су у сарадњи са групом професора др Небојише Арсенијевића са Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

2.5.4. Испитивање ефеката ауротиомалата и комплекса Au(III) јона на покретљивост изолованих јајовода жена

Јајоводи су добијени од 18 пацијенткиња (један јајовод од сваког пацијента) током абдоминалне хистеректомије. Свим пацијентима је оперисан фиброид материце који је проузроковао продужено крварење из материце. Пацијенти нису имали регуларно менструално крварење најмање три месеца пре пријема у болницу. Просек година пацијената је $44,6 \pm 5,4$, тј. пацијенти су имали од 36 до 56 година. Испитивања су одобрена од стране Етичког комитета Клиничког центра Крагујевац. Пацијенти су потписали пристанак.

Сви пацијенти су оперисани у периоду од 2008. до 2010. године на Гинеколошкој клиници Клиничког центра у Крагујевцу. Време прикупљања узорака је било 22 месеца, из разлога што је тешко добити неоштећене узорке исте величине. Нико од пацијената није примао полне хормоне 45 дана пре операције. Операције пацијената су обављене под општом анестезијом.

Након одстрањивања јајоводи су смештани у посуду од 250 cm^3 , која је испуњена De Jalons раствором (154 mM NaCl, 5,95 mM NaHCO₃, 5,63 mM KCl, 0,54 mM CaCl₂·2H₂O, 2,78 mM глукоза), кроз који се проводи гас (95% O₂ и 5% CO₂, 5 cm^3/min). Ове посуде су транспортоване у лабораторију.

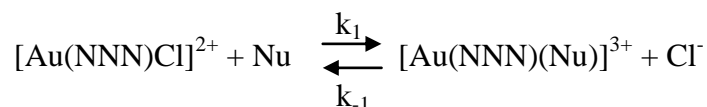
Испитивање утицаја различитих концентрација комплекса $Au(III)$ јона на спонтане контракције изолованих јајовода, вршено је у сарадњи са групом професора др Слободана Јанковића са Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

3.1. Резултати испитивања реакција супституције неких монофункционалних комплекса Au(III) са азот-донорским биомолекулима

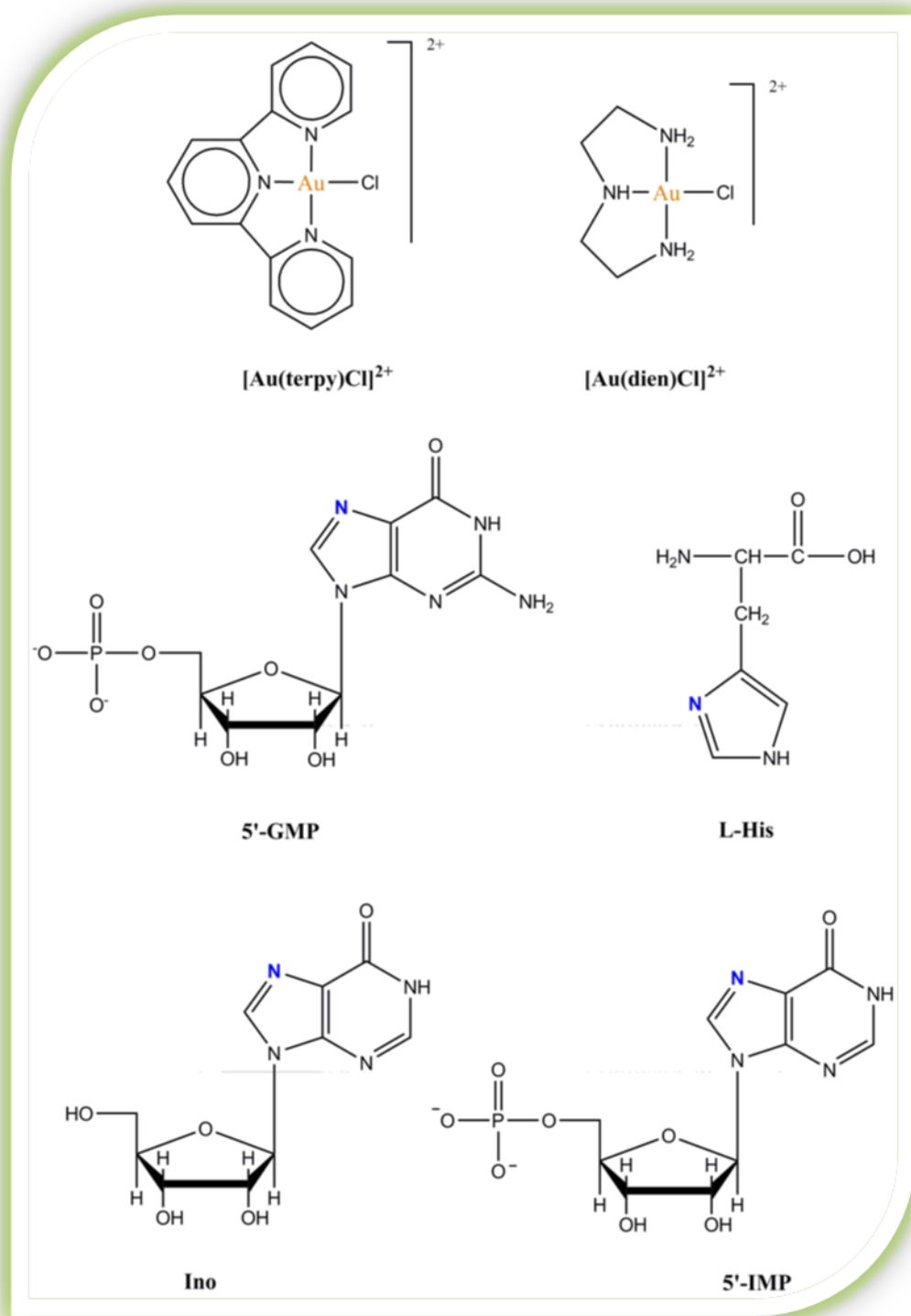
Супституционе реакције монофункционалних комплекса Au(III) јона, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ са INO, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His проучаване су спектрофотометријски праћењем промене апсорбанце раствора са временом на радној таласној дужини, као реакције *псеудо*-првог реда. На Слици 3.1. приказане су структурне формуле испитиваних комплекса и лиганата. Реакције су праћене у зависности од концентрације нуклеофила и температуре на stopped-flow инструменту.

Процес супституције испитиваних монофункционалних комплекса, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ са изабраним лигандима одвија се на начин као што је приказано Шемом 3.1.



NNN = terpy, dien; Nu = 5'-GMP, 5'-IMP, Ino, L-His

Шема 3.1.



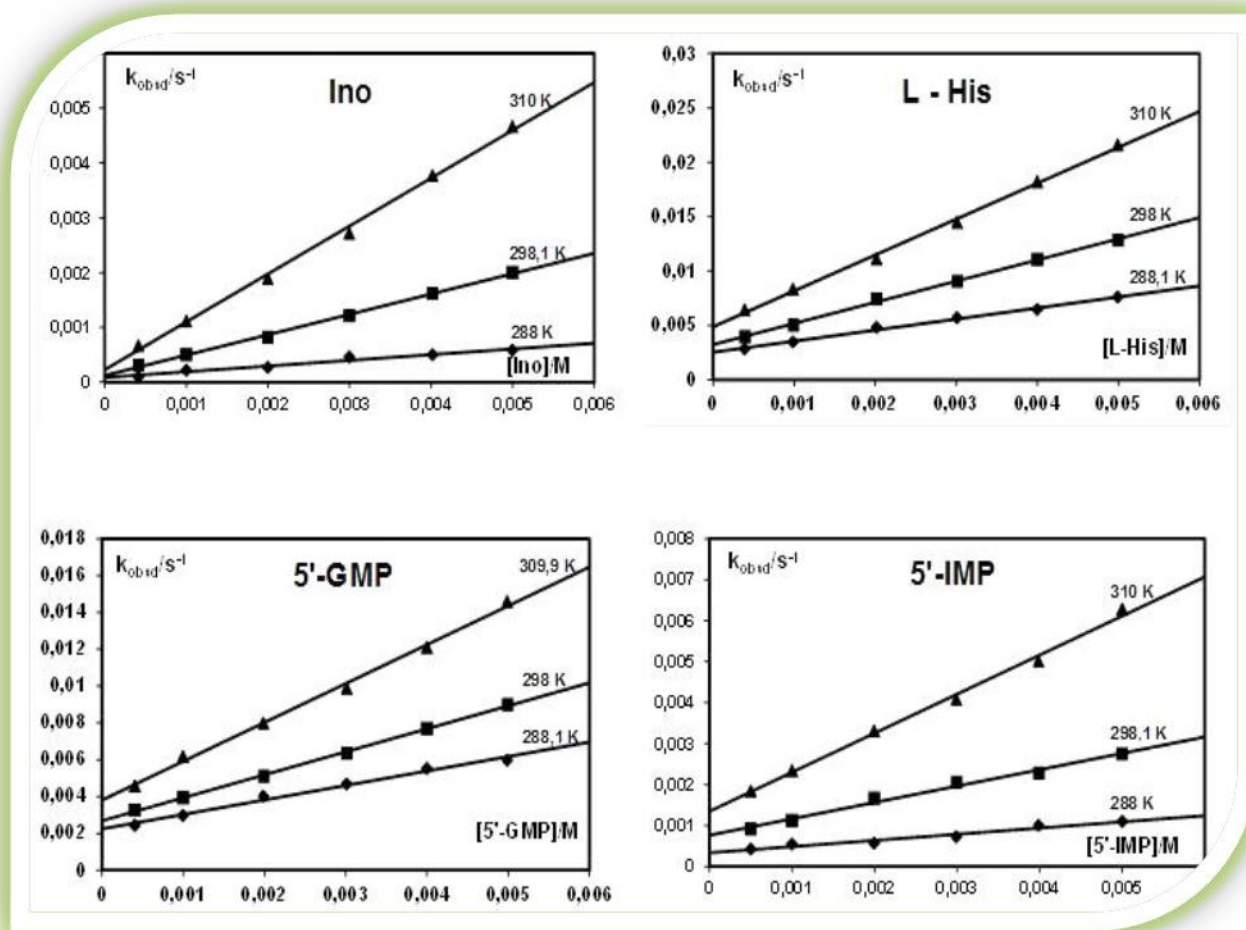
Слика 3.1. Структурне формуле проучаваних комплекса и лигананда

Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса одвијају се по два кинетичка пута.¹¹⁶ Један је солволитички пут, у току ког молекула растварача улази у координациону сферу комплекса и координује се за јон метала, након чега долази до брзе супституције координованог молекула растварача нуклеофилом. Други пут је пут директне нуклеофилне супституције у току ког долази до директне супституције хлорида нуклеофилом. У испитиваном случају солволитички пут је сузбијен додатком 10 mM NaCl у раствор комплекса, тако да се пут директне нуклеофилне супституције одиграва реверзибилно као што је приказано Шемом 3.1. При условима реакције *псеудо*-првог реда константе брзине које карактеришу процес супституције могу да се одреде из линеарне зависности константе брзине *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације нуклеофила, а према једначини 3.1. Из нагиба добијене праве може да се одреди константа k_1 , која карактерише пут директне нуклеофилне супституције, док из одсечка може да се одреди константа k_{-1} , која карактерише повратну реакцију.

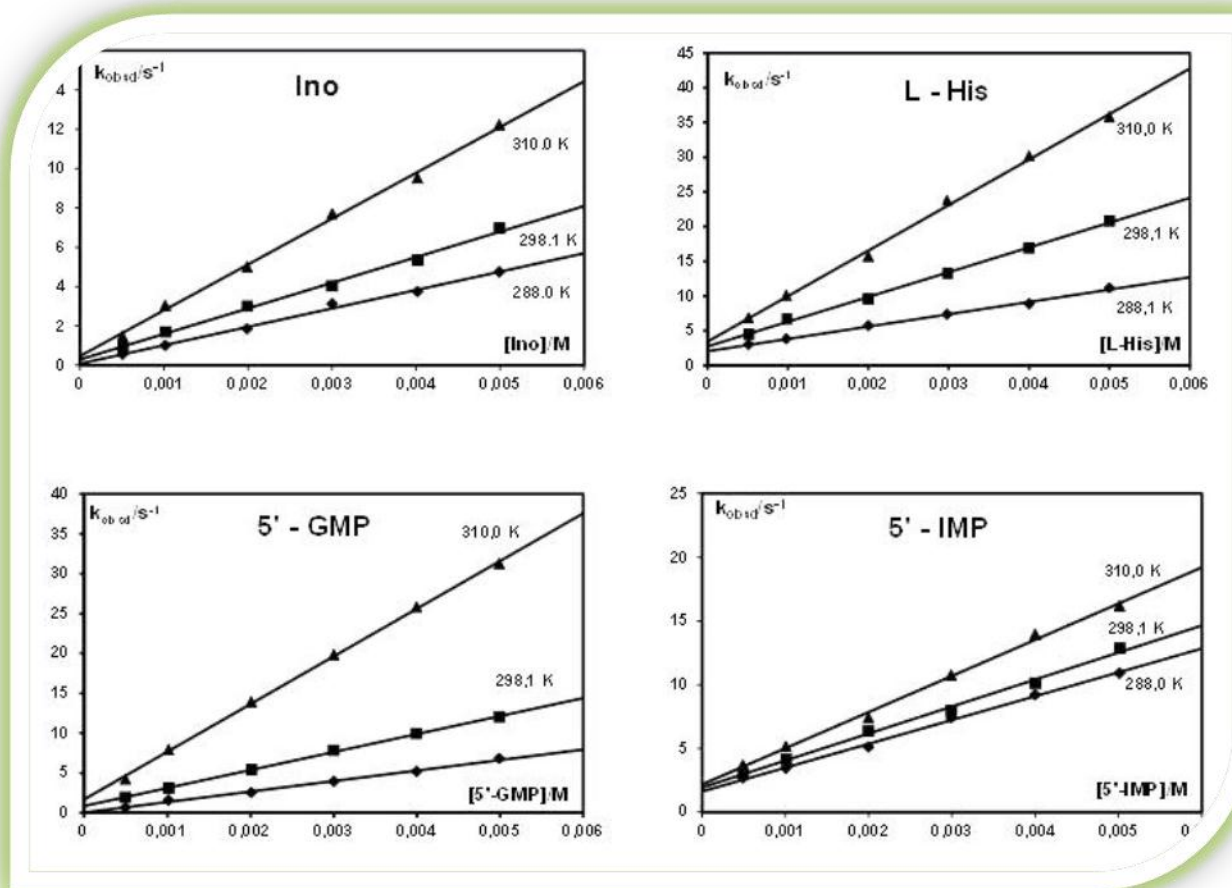
$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Nu}] + k_{-1}[\text{Cl}^-] \quad (3.1.)$$

На Сликама 3.2. и 3.3. приказане су све експериментално добијене вредности зависности константе брзине *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , у функцији од концентрације лиганата, на три температуре (288, 298 и 308 K).

Добијене вредности константи брзине, као и вредности термодинамичких параметара ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger за супституционе реакције изучаваних комплекса Au(III) јона са лигандима INO, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His дате су у Табели 3.1.



Слика 3.2. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда, k_{obs} , од концентрације лиганда и температуре за реакцију супституције $[Au(dien)Cl]^{2+}$ са Ino, L-His, 5'-GMP и 5'-IMP у 25 mM Нере снуфери, $[Cl] = 10$ mM и $pH = 7,2$.



Слика 3.3. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда, k_{obs} од концентрације лиганда и температуре за реакцију супституције $[Au(terpy)Cl]^{2+}$ са Ino, L-His, 5'-GMP и 5'-IMP у 25 mM Нерес пуферу, $[Cl] = 10$ mM и $pH = 7,2$.

Табела 3.1. Константе брзине и активациони параметри за проучаване супституционе реакције $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ комплекса у 25 mM Нерес пуферу, pH = 7,2 и 10 mM NaCl на 298 K.

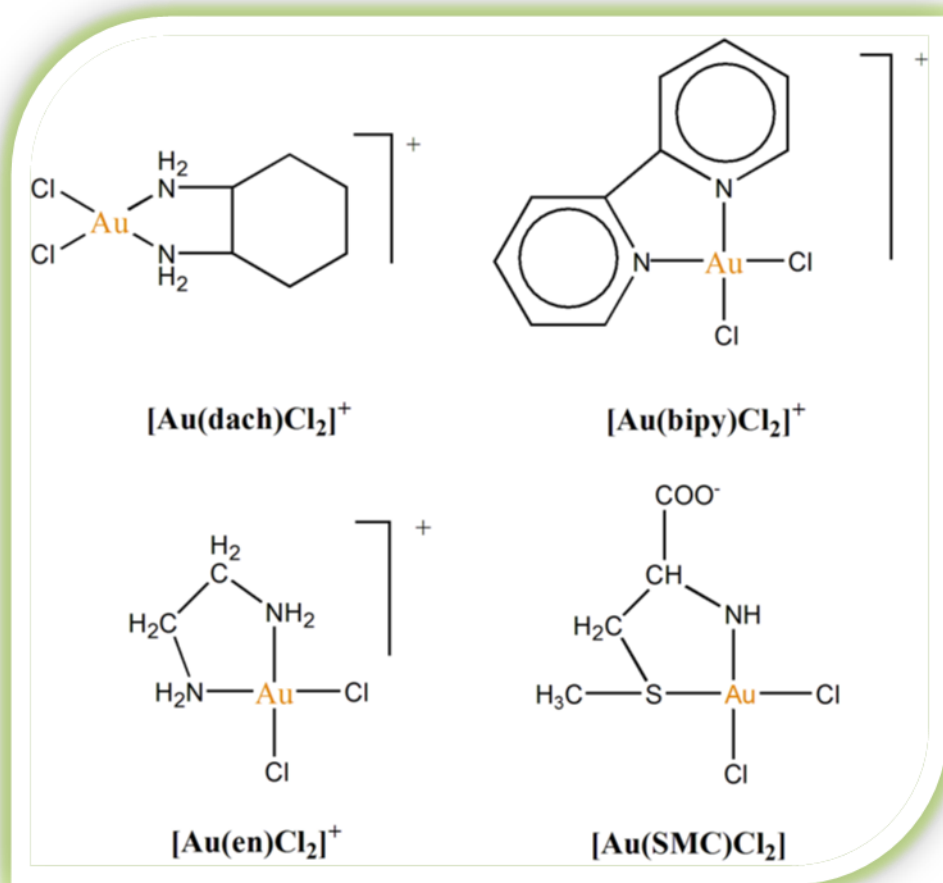
	$k_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$	$k_{-1}[\text{Cl}^-]/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-1}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{-1}^\ddagger/\text{J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$
$[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$						
L-His	1.94 ± 0.05	37 ± 4	-130 ± 10	$(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	19 ± 3	-164 ± 8
5'-GMP	1.24 ± 0.02	31 ± 1	-154 ± 4	$(2.68 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	15 ± 3	-180 ± 9
5'-IMP	0.399 ± 0.003	60 ± 4	-70 ± 10	$(8.0 \pm 0.7) \times 10^{-4}$	47 ± 1	-87 ± 4
Ino	0.370 ± 0.009	69 ± 1	-38 ± 4	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	29 ± 4	-160 ± 10
$[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$						
L-His	$(3.56 \pm 0.08) \times 10^3$	21 ± 2	-125 ± 5	2.7 ± 0.2	15 ± 2	-125 ± 6
5'-GMP	$(2.25 \pm 0.03) \times 10^3$	49 ± 7	-31 ± 8	0.89 ± 0.09	42 ± 2	-121 ± 6
5'-IMP	$(2.11 \pm 0.07) \times 10^3$	12 ± 3	-157 ± 9	1.94 ± 0.02	7 ± 1	-153 ± 5
Ino	$(1.30 \pm 0.04) \times 10^3$	29 ± 4	-110 ± 10	0.28 ± 0.02	17 ± 3	-57 ± 9

На основу вредности константи брзине датих у Табели 3.1. може се видети да комплекс $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ показује три пута већу реактивност у односу на $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ комплекс. Разлика у реактивности испитиваних комплекса може се приписати постојању ароматичних пиридинских прстенова у координационој сфери $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ комплекса. Пиридински прстенови повећавају електрофилност јона метала, тако што долази до делокализације електронске густине услед π -повратне донације између јона метала и пиридина.¹³⁴⁻¹³⁷ Ред реактивности нуклеофила је исти за оба проучавана комплекса, тј. реактивност нуклеофила опада на следећи начин: $\text{L-His} > 5' \text{-GMP} > 5' \text{-IMP} > \text{Ino}$. Амино киселина L-His , као најмањи молекул од изабраних нуклеофила, реагује брже од осталих испитиваних нуклеофила и координује се преко $N3$ атома имидазолског прстена, као што је раније показано.^{104,138,139} У реакцијама са протеинима или пептидима, комплекси Au(III) јона могу да се вежу преко N или O атома из пептидног или протеинског ланца.¹³⁹ Координација Au(III) комплекса са N -донорским молекулима доказана је кристалном структуром и NMR испитивањима.¹⁴⁰

Координација $5' \text{-GMP}$, $5' \text{-IMP}$ и Ino се одиграва преко $N7$ атома пуринске базе.¹³⁸ Међутим, везивање јона метала из комплекса са фосфатном групом из $5' \text{-GMP}$ и $5' \text{-IMP}$ има велики утицај на повећање реактивности у односу на Ino код кога не постоји могућност за овај тип везивања.¹⁴¹ Постојање ових електростатичких интеракција може да допринесе бољој стабилности насталих производа између неких монофункционалних комплекса Au(III) и ДНК.¹⁴²

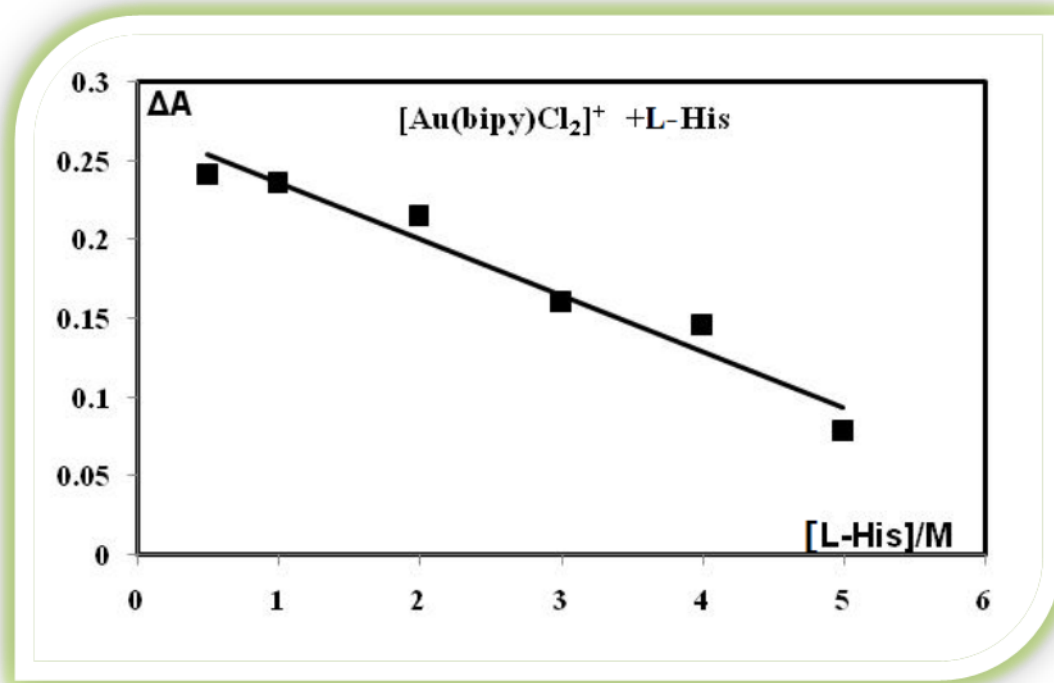
3.2. Резултати испитивања реакција супституције бифункционалних $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ комплекса са азот-донорским биомолекулима

Такође, испитиване су и супституционе реакције бифункционалних комплекса $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ са азот-везивним нуклеофолима 5'-GMP, 5'-IMP, Ino и L-His. Структурне формуле испитиваних комплекса приказане су на Слици 3.4.

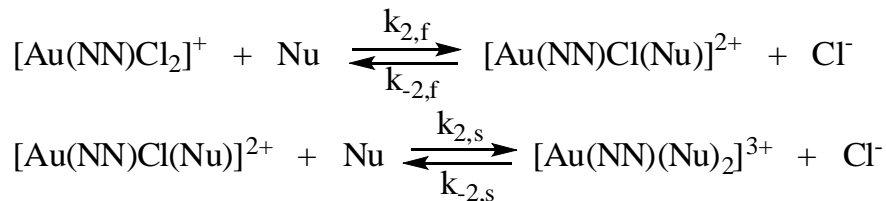


Слика 3.4. Структурне формуле проучаваних комплекса $\text{Au}(\text{III})$

Супституционе реакције $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ са нуклеофилима 5'-GMP, 5'-IMP, Ino и L-His проучаване су на физиолошкој $\text{pH} = 7,2$ у 25 mM HEPES пуферу и у присуству 20 mM NaCl. Праћењем промене апсорбанце од концентрације нуклеофила добијена је линеарна зависност (Слика 3.5). Са Сlike 3.5. се може видети да са порастом концентрације нуклеофила промена апсорбанце опада, што указује да се процес супституције одиграва реверзibilно, као што је приказано на Шеми 3.2.^{143,144}



Слика 3.5. Промена апсорбанце, ΔA_{295} , на 295 nm у функцији од концентрације нуклеофила за реакцију између $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и L-His у 25 mM HEPES пуферу ($\text{pH} = 7,2$), $[\text{Cl}^-] = 20 \text{ mM}$.



NN = dach, bipy; Nu = 5'-GMP, 5'-IMP, Ino, L-His

Шема 3.2.

Први корак реакције је реверзибилна супституција једног хлоридног јона нуклеофилом. Други корак реакције је такође реверзибилна супституција другог хлоридног јона нуклеофилом.

Константа брзине реакције *псеудо*-првог реда за први корак, $k_{\text{obsd},f}$, и за други корак, $k_{\text{obsd},s}$, праћена је у зависности од концентрације улазног нуклеофила, при чему је у свим испитиваним случајевима добијена линеарна зависност. На Сликама 3.6. и 3.7. приказане су све експериментално добијене вредности зависности константе брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , у функцији од концентрације лиганда, на три температуре (288, 298 и 308 K).

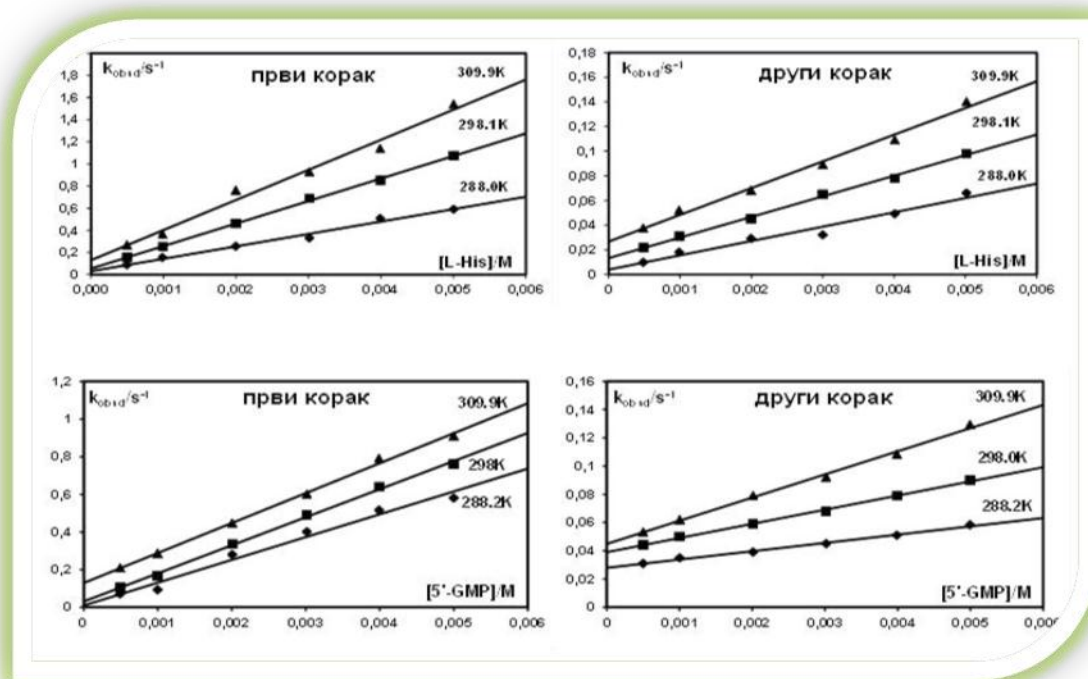
Константа брзине реакције *псеудо*-првог реда зависи од концентрације нуклеофила и може да се прикаже једначином 3.2. Константа $k_{2,f}$ представља константу брзине директне реакције првог ступња реакције, а $k_{-2,f}$ је константа брзине повратне реакције. Директна реакција другог корака представљена је константом $k_{2,s}$, а $k_{-2,s}$ представља константу повратне реакције. Из једначине могу да се одреде константе $k_{2,f}$ и $k_{-2,f}[\text{Cl}^-]$ из нагиба, односно, одсечка добијене линеарне зависности $k_{\text{obsd},f}$ и концентрације нуклеофила. Константа повратне реакције $k_{-2,f}$ зависи од концентрације хлорида, $[\text{Cl}^-]$.

$$k_{\text{obsd},f} = k_{2,f}[\text{Nu}] + k_{-2,f}[\text{Cl}^-] \quad (3.2)$$

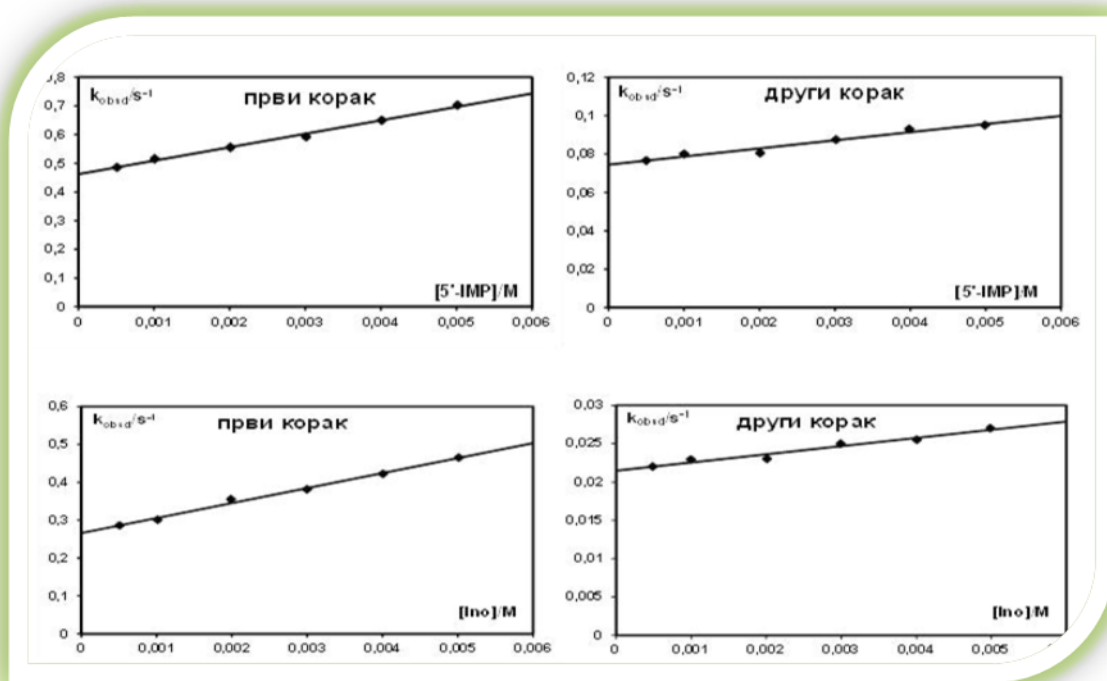
У складу са тим и константа брзине реакције *псеудо*-првог реда за други реакциони корак може да се представи једначином 3.3.

$$k_{\text{obsd},f} = k_{2,s}[\text{Nu}] + k_{-2,s}[\text{Cl}^-] \quad (3.3)$$

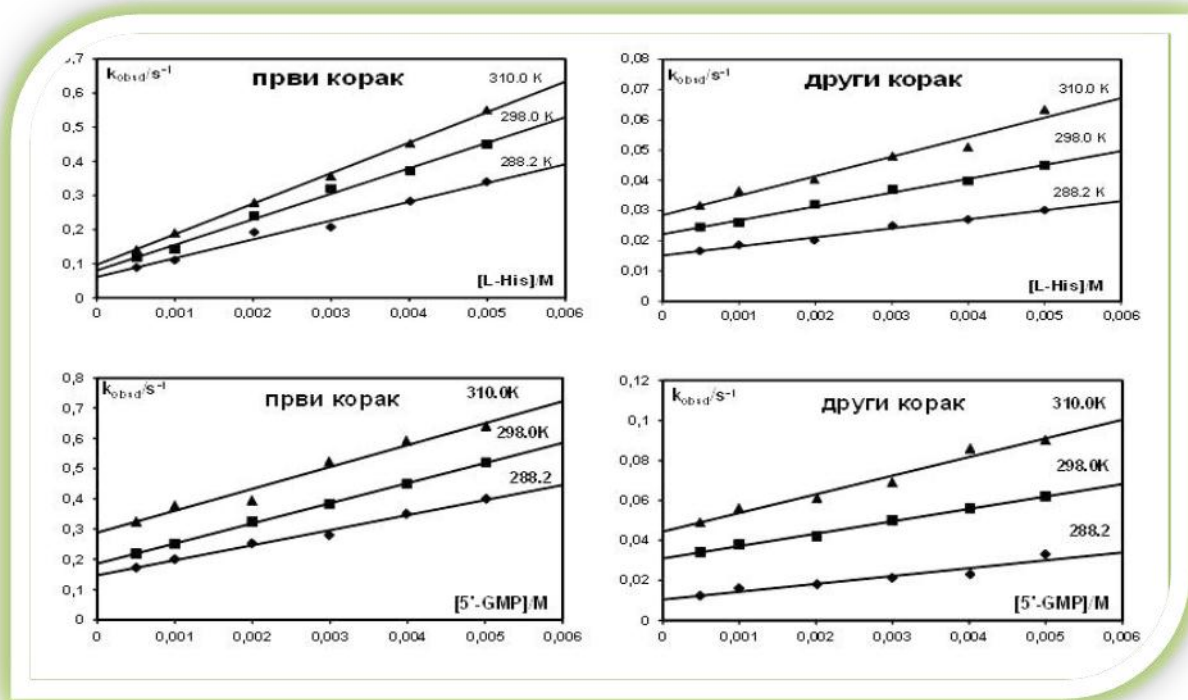
Добијене зависности константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији од времена израчунате су као експоненцијалне једначине другог реда, помоћу компјутерског програма OriginPro 8. Добијено је добро слагање између израчунатих и експериментално добијених вредности што се види са Слика 3.6, 3.7., 3.8. и 3.9. Добијене вредности константи брзине за први и други корак реакције за све испитиване супституционе реакције дате су у Табели 3.2.



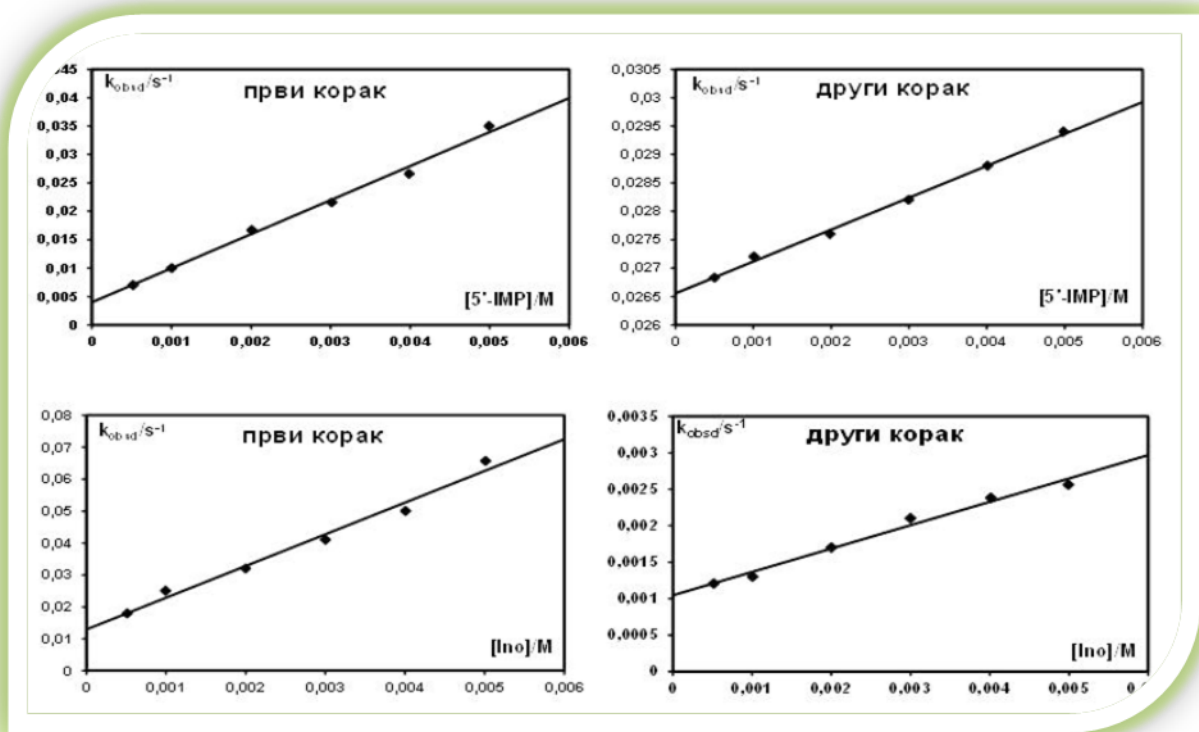
Слика 3.6. Зависност константе брзине реакције *псеудо*-првог реда за први корак, $k_{\text{obsd},f}$ и за други корак, $k_{\text{obsd},s}$, од концентрације лиганда и температуре за реакцију супституције $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ са *L-His* и *5'-GMP* у 25 mM *Нерес* пуферу, $[\text{Cl}^-] = 20$ mM и $\text{pH} = 7,2$.



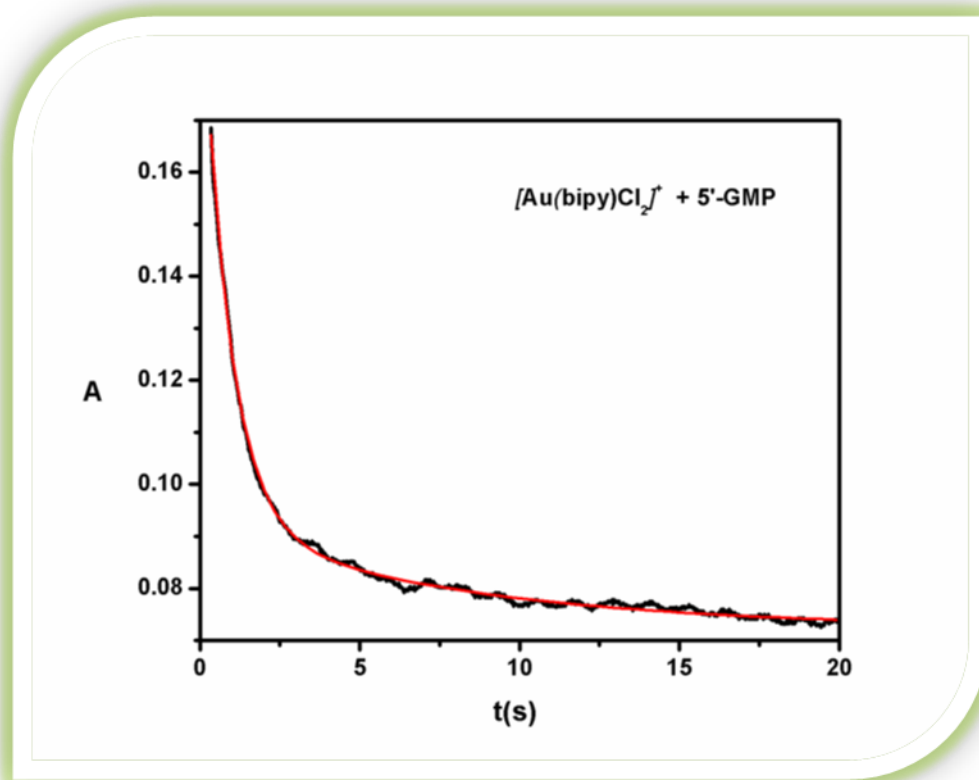
Слика 3.7. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда за први корак, $k_{obsd,f}$ и други корак, $k_{obsd,s}$ од концентрације лиганда за реакцију супституције $[Au(bipy)Cl_2]^+$ са Ino и 5'-IMP на 298K у 25 mM HEPES пуферу, $[Cl^-] = 20$ mM и $pH = 7,2$.



Слика 3.8. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда за први корак, $k_{obsd,f}$ и други корак, $k_{obsd,s}$ од концентрације лиганда и температуре за реакцију супституције $[Au(dach)Cl_2]^+$ са L-His и 5'-GMP у 25 mM *Нерес* пуферу, $[Cl^-] = 20$ mM и $pH = 7,2$.



Слика 3.9. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда за први корак, $k_{obsd,f}$ и други корак, $k_{obsd,s}$ од концентрације лиганда за реакцију супституције $[Au(dach)Cl_2]^+$ са Ino и $5'-IMP$ на 298 K у 25 mM $Нерес$ пуферу, $[Cl^-] = 20\text{ mM}$ и $pH = 7,2$.



Слика 3.10. График зависности апсорбанце од времена за реакцију супституције $[Au(bipy)Cl_2]^+$ ($1 \cdot 10^{-4}$ M) комплекса са 5'-GMP ($3 \cdot 10^{-3}$ M) на 320 nm, $T = 298$ K, 25 mM Нерес пуфер, pH = 7,2 и 20 mM NaCl.

Први корак реакције је супституција једног хлоридног јона из комплекса са *N3* атомом из имидазоловог прстена у реакцијама са L-His, односно *N7* атомом из пуринске базе у реакцијама са Ino, 5'-IMP и 5'-GMP.^{83,145,146} Координација L-His са Au(III) комплексима зависи од pH. Такође, познато је да при физиолошким условима Au(III) комплекси подлежу хидролизи.¹⁴⁷ Поред тога, публиковано је да L-His може да се координује за диаква комплекс Au(III) бидентатно.⁹⁴ Реакције између неких бифункционалних Au(III) комплекса и *N*-везивних нуклеофила укључујући 5'-GMP су испитиване раније.^{83,91,147,148} Ове интеракције могу да буду врло значајне јер је ДНК потенцијална мета за многе антиканцерогене агенсе на бази метала.^{91,92} Приликом везивања Au(III) комплекса са 5'-GMP, осим формирања везе преко *N7* из 5'-GMP,

постоје такође и нековалентне интеракције које доприносе већој стабилности наgraђеног производа.^{91,92}

Други корак реакције представља супституцију другог хлоридног јона из полазног комплекса, при чему се формира 1 : 2 комплекс. Ред реактивности нуклеофила је исти за оба проучавана комплекса тј. реактивност нуклеофила опада на следећи начин: L-His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino.

На основу резултата приказаних у Табели 3.2. може се приметити да се први и други корак супституције $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ комплекса одиграва брже него код $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ комплекса. Већа реактивност $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ комплекса може се приписати чињеници да је у овом комплексу повећана електрофилност Au(III) као последица присуства пиридина у молекулу *bipy* лиганда, на начин као што је предходно описано за $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ комплекс.¹⁴⁹

Све реакције су проучаване на различитим температурама, што је омогућило израчунавање активационих параметара, ентропије активирања и енталпије активирања, коришћењем Ајрингове једначине. Добијени активациони параметри приказани су у Табели 3.2., где се може видети да је и у првом и другом кораку ентропија активирања значајно негативна што указује на асоцијативни механизам супституције.

Табела 3.2. Константе брзине и активациони параметри за проучаване супституционе реакције бифункционалних $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ комплекса у 25 mM Нерес пуферу, pH = 7,2 и 20mM NaCl.

$[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$						
<i>Први корак</i>	$k_{2,f}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,f}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{2,f}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$k_{-2,f}[\text{Cl}^-]/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-2,f}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,f}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
L-His	$(2.04 \pm 0.06) \times 10^2$	26 ± 6	-110 ± 20	$(5.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	47 ± 3	-110 ± 10
5'-GMP	$(1.49 \pm 0.05) \times 10^2$	7 ± 3	-180 ± 10	$(3.9 \pm 0.9) \times 10^{-2}$	86 ± 2	-7 ± 2
5'-IMP	$(0.47 \pm 0.02) \times 10^2$	-	-	$(4.62 \pm 0.08) \times 10^{-1}$	-	-
Ino	$(0.40 \pm 0.02) \times 10^2$	-	-	$(2.66 \pm 0.07) \times 10^{-1}$	-	-
<i>Други корак</i>	$k_{2,s}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,s}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{2,s}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$k_{-2,s}[\text{Cl}^-]/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-2,s}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,s}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
L-His	16.7 ± 0.6	19 ± 2	-160 ± 8	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	71 ± 2	-48 ± 7
5'-GMP	10.3 ± 0.3	33 ± 3	-120 ± 10	$(3.9 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	14 ± 3	-169 ± 9
5'-IMP	4.3 ± 0.5	-	-	$(7.4 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	-	-
Ino	1.1 ± 0.1	-	-	$(2.10 \pm 0.05) \times 10^{-2}$	-	-
$[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$						
<i>Први корак</i>	$k_{2,f}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,f}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{2,f}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$k_{-2,f}[\text{Cl}^-]/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-2,f}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,f}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
L-His	75 ± 2	14 ± 3	-160 ± 10	$(8.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	14 ± 4	-180 ± 20
5'-GMP	66 ± 2	10 ± 3	-170 ± 10	$(1.86 \pm 0.04) \times 10^{-1}$	21 ± 5	-190 ± 20
5'-IMP	6.0 ± 0.3	-	-	$(4.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	-	-
Ino	9.9 ± 0.9	-	-	$(1.20 \pm 0.03) \times 10^{-2}$	-	-
<i>Други корак</i>	$k_{2,s}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,s}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{2,s}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$k_{-2,s}[\text{Cl}^-]/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-2,s}^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,s}^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
L-His	4.6 ± 0.3	24 ± 4	-160 ± 20	$(2.2 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	19 ± 5	-180 ± 20
5'-GMP	6.2 ± 0.3	27 ± 5	-140 ± 10	$(3.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	48 ± 2	-120 ± 10
5'-IMP	0.56 ± 0.02	-	-	$(2.60 \pm 0.01) \times 10^{-2}$	-	-
Ino	0.32 ± 0.03	-	-	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	-	-

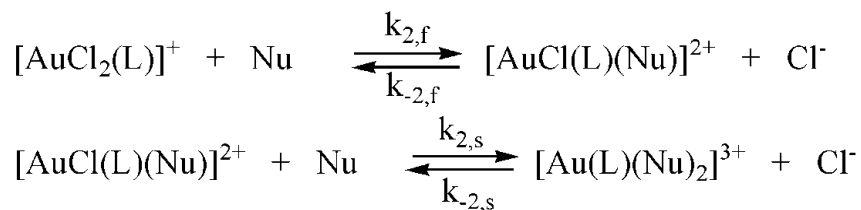
3.3. Резултати испитивања реакција супституције бифункционалних $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса са азот-донорским биомолекулима

Испитиване су супституционе реакције комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ са *N*-донорским лигандима Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His спектрофотометријски, праћењем промене апсорбанце са временом на радној таласној дужини, као реакције *псеудо*-првог реда. Све реакције су праћене при физиолошким условима тј. на $\text{pH} = 7,2$ у 25 mM Нерес пуферу у присуству 20 mM NaCl. Реакције су праћене на различитим температурама и различитим концентрацијама нуклеофила на stopped-flow инструменту.

Праћећи промену апсорбанце реакционе смеше са временом на одређеној таласној дужини, а при условима реакције *псеудо*-првог реда, добијене су кинетичке криве. Прерачунавањем добијених експерименталних података добијене су вредности за константу брзине реакције *псеудо*-првог реда за први ($k_{\text{obsd},f}$) и други ($k_{\text{obsd},s}$) корак супституције.

Праћена је зависност добијених вредности константи брзине реакције *псеудо*-првог реда, за први ($k_{\text{obsd},f}$) и други ($k_{\text{obsd},s}$) корак, у функцији од концентрације нуклеофила, при чему је добијена линеарна зависност у свим посматраним случајевима. На Сликама 3.11. и 3.12. приказане су све експериментално добијене вредности зависности константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила за супституционе реакције $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса и нуклеофила Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His на три температуре (288, 298 и 308 K) за оба реакциона корака.

Супституционе реакције квадратно-планарних Au(III) комплекса при датим експерименталним условима одвијају се као што је приказано на Шеми 3.3. Први корак реакције је реверзибилни процес у оквиру ког се један хлоридо јон супституише. Међутим, како је у раствору концентрација хлорида 20 mM, солволитички пут је елиминисан и успоставља се равнотежа. Други корак реакције, где долази до супституције другог хлоридо јона нуклеофилом, је такође равнотежна реакција.¹¹⁶



L = S-метил-L-цистеин или етилендиамин

Nu = 5'-IMP, 5'-GMP, Ino или L-His

Шема 3.3.

Константа брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , зависи од концентрације нуклеофила на начин као што је приказано једначинама 3.4 и 3.5. Константа $k_{2,f}$ представља константу брзине директне реакције првог ступња реакције, а $k_{-2,f}$ је константа брзине повратне реакције. Директна реакција другог корака представљена је константом $k_{2,s}$, а $k_{-2,s}$ представља константу повратне реакције. Као што се види из једначине константе $k_{2,f}$ и $k_{-2,f}$ могу да се одреде из нагиба односно одсечка правих приказаних на Сликама 3.11., 3.12., 3.13. и 3.14.

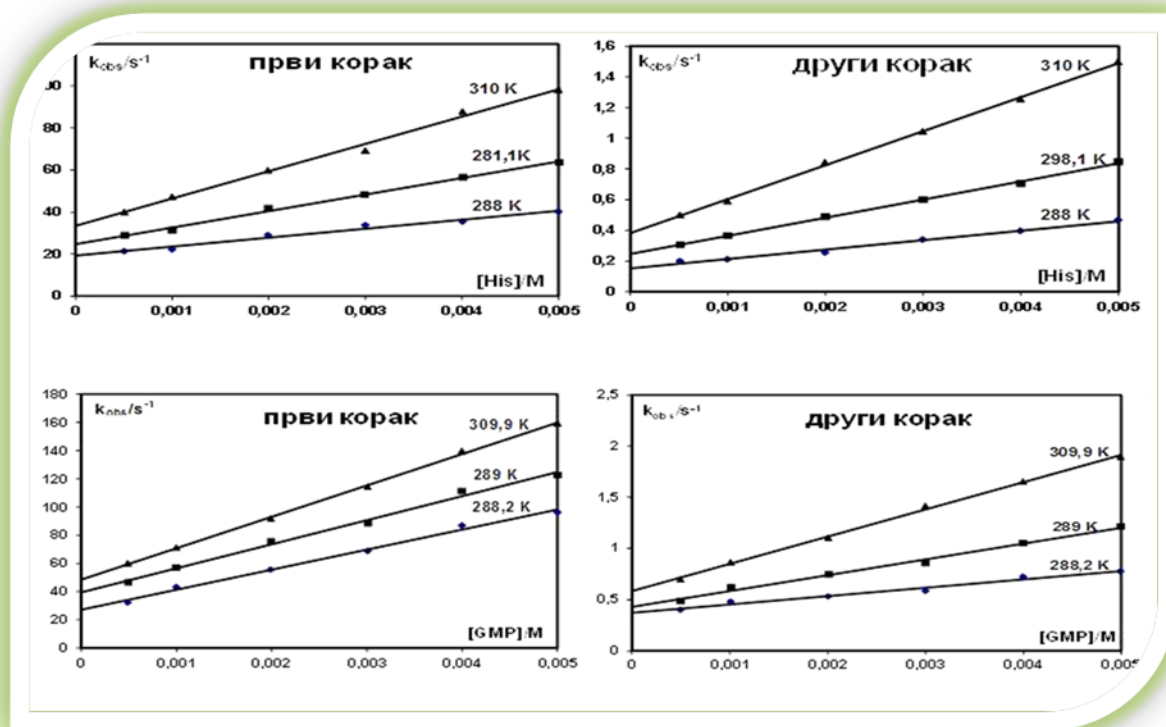
$$k_{\text{obsd},f} = k_{-2,f} + k_{2,f}[\text{Nu}] \quad (3.4)$$

Константа брзине *псеудо*-првог реда за други корак реакције може да се прикаже једначином 3.5.

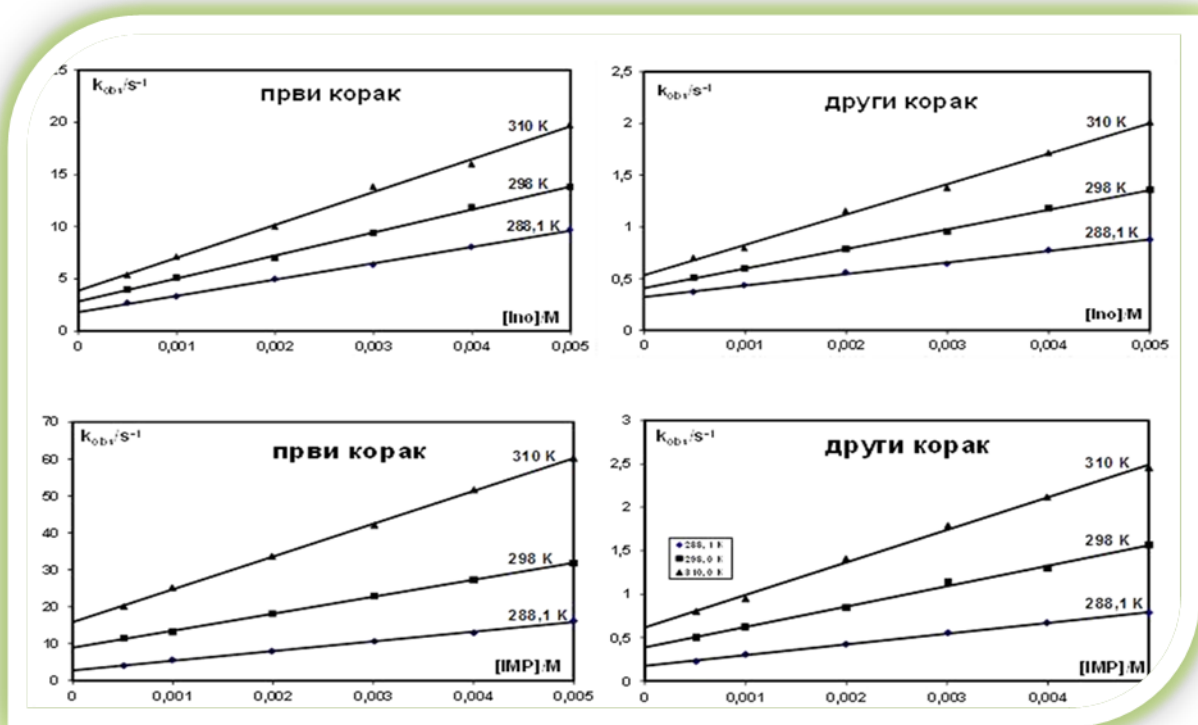
$$k_{\text{obsd},s} = k_{-2,s} + k_{2,s}[\text{Nu}] \quad (3.5)$$

Добијене зависности константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији од времена израчунаване су као експоненцијалне једначине другог реда, при чему је добијено добро слагање између израчунатих и експериментално добијених вредности што се види

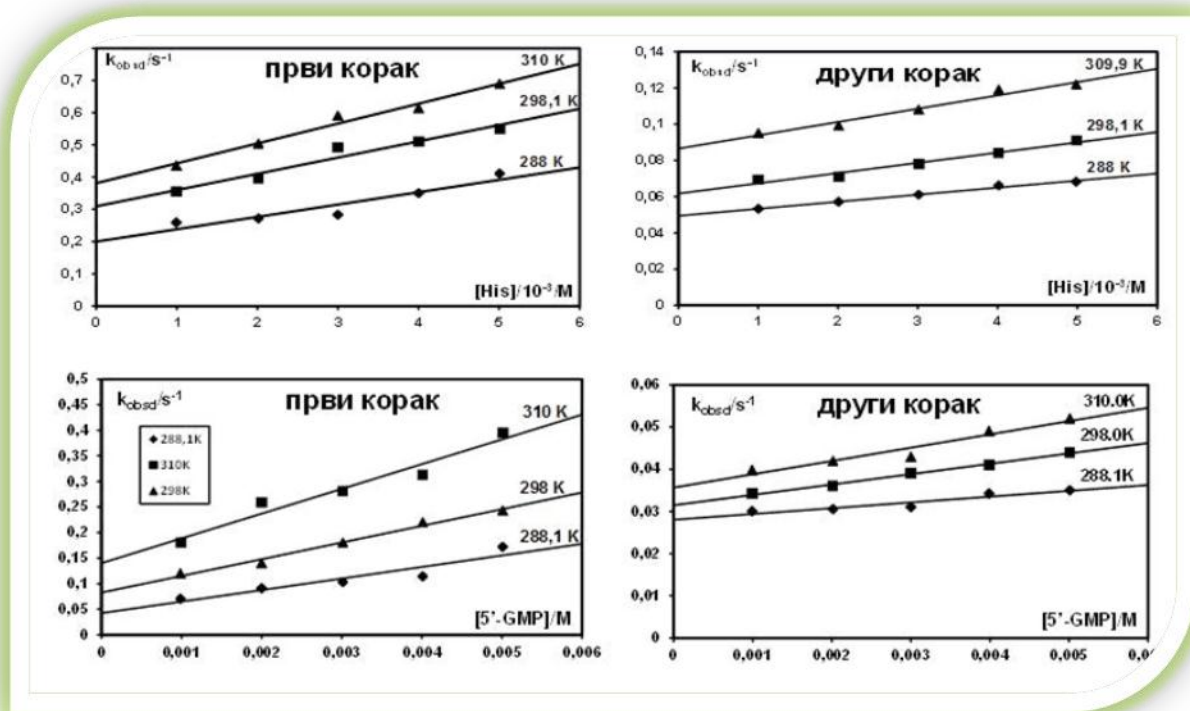
са Слика 3.11., 3.12., 3.13. и 3.14. Добијене вредности константи брзине за први и други корак реакције за све испитиване супституционе реакције дате су у Табели 3.3.



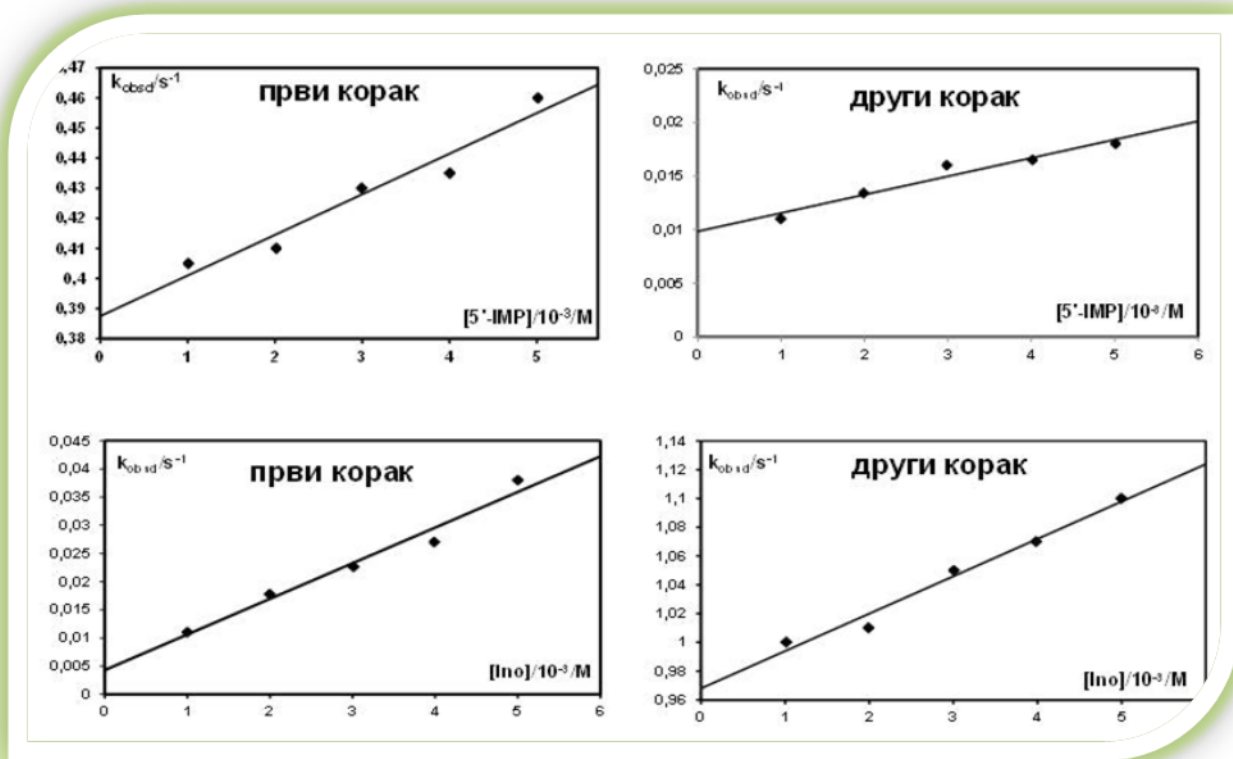
Слика 3.11. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда од концентрације нуклеофила за први и други корак супституције $[Au(SMC)Cl_2]$ комплекса са N -донорским нуклеофилима L -His и $5'$ -GMP на три температуре (288, 298 и 308 K) у 25 mM Нерес пуферу, $[Cl^-] = 20$ mM и $pH = 7,2$.



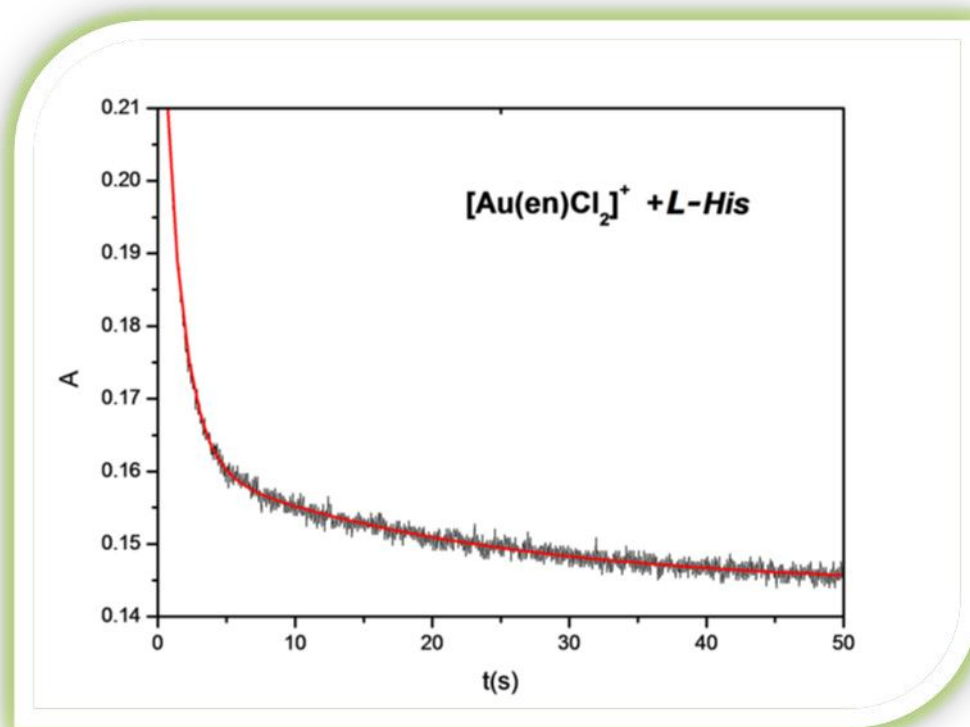
Слика 3.12. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда од концентрације нуклеофила за први и други корак супституције $[Au(SMC)Cl_2]$ комплекса са *N*-донорским нуклеофилима *Ino* и 5'-*IMP* на три температуре (288, 298 и 308 K) у 25 mM *Нерес* пуферу, $[Cl^-] = 20$ mM и $pH = 7,2$.



Слика 3.13. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда од концентрације нуклеофила за први и други корак супституције $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса са N -донорским нуклеофилима $L\text{-His}$ и $5'\text{-GMP}$ на три температуре (288, 298 и 308 K) у 25 mM *Neres* пуферу, $[\text{Cl}^-] = 20 \text{ mM}$ и $\text{pH} = 7,2$.



Слика 3.14. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда од концентрације нуклеофила за први и други корак супституције $[Au(en)Cl_2]^+$ комплекса са *N*-донорским нуклеофилима Ino и 5'-IMP на три температуре (288, 298 и 308 K) у 25 mM *Neres* пуферу, $[Cl^-] = 20$ mM и $pH = 7,2$.



Слика 3.15. Кинетичка крива за супституциону реакцију између ($1 \cdot 10^{-4}$ M) $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и L-His ($3 \cdot 10^{-3}$ M) на 300nm , $T = 298$ K, 25 mM *Нерес пуфер*, $\text{pH} = 7,2$ и 20 mM NaCl .

Први корак реакције одиграва се кроз нуклеофилни напад $N7$ атома пуринске базе из молекула INO , $5'$ - IMP и $5'$ - GMP , или нападом $N3$ донорског атома имидазоловог прстена из молекула L-His , а добија се производ у коме је један хлоридо јон из полазног комплекса супституисан.^{92,141} На основу добијених вредности константи брзине за први корак супституције, ($k_{2,f}$), за $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекс може се видети да највећу реактивност показује $5'$ - GMP , док L-His , иако мањи молекул, показује мању реактивност. Нешто мању реактивност од $5'$ - GMP и од L-His показују $5'$ - IMP и Ino . Овакав ред реактивности испитиваних N -донорских нуклеофила може се приписати стерним и електронским карактеристикама изабраних нуклеофила. Испитивани $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекс је неутралан с обзиром да је на $\text{pH} = 7,2$ карбоксилна група координоване аминокиселине депротонувана. Ред реактивности испитиваних нуклеофила у реакцији

супституције са комплексом $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ је другачији у односу на $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекс: $\text{L-His} > 5'-\text{GMP} > 5'-\text{IMP} > \text{Ino}$.

Други корак реакције представља супституцију другог хлоридног јона из $\text{Au}(\text{III})$ комплекса нуклеофилом при чему се формира 1:2 комплекс. Међутим, други корак супституције је спорији у односу на први корак у просеку 10 - 20 пута. Такође, редослед реактивности испитиваних нуклеофила није исти као код првог реакционог корака. Добијени кинетички подаци јасно указују да $5'-\text{GMP}$ реагује брже од $5'-\text{IMP}$ и Ino . На $\text{pH} = 7,2$ поменути нуклеофили се координују преко $N7$ атома, као што је раније речено. Најмања реактивност Ino може да се објасни постојањем пре-асоцијације између комплекса метала и фосфатне групе из молекула $5'-\text{GMP}$ и $5'-\text{IMP}$. Код комплекса $\text{Pt}(\text{II})$ показано је да наведени процес смањује константу брзине,⁷¹ али код комплекса $\text{Au}(\text{III})$ имамо супротан ефекат.

Као најмање волуминозан молекул од испитиваних нуклеофила L-His реагује најбрже у реакцији са $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплексом. Међутим, у реакцијама са $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплексом услед постојања пре-асоцијације, $5'-\text{GMP}$ се показао као најбољи нуклеофил⁷¹ иако је $N3$ атом на $\text{pH} = 7,2$ потпуно депротонован.¹⁵⁰

Инертни лиганд у координационој сфери комплекса такође има велики утицај на брзину одигравања супституционе реакције. Реакције $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса одигравају се два пута брже у односу на истоимене реакције $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса. Разлика у реактивности ова два комплекса може да се припише различитим структурним и електронским карактеристикама SMC и en лиганада. Такође, *транс*-ефекат, који је изражен код комплекса $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ повећава његову реактивност.

Већина супституционих реакција испитивана је на различитим температурама. Промена ентропије активирања је негативна што указује на асоцијативни механизам супституције.¹¹⁶ У свим испитиваним реакцијама промена ентропије активирања има негативну вредност и за први и за други корак супституције (Табела 3.3).

Комплекс $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ реагује око 10^6 - 10^7 пута брже у односу на цисплатину, док $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ реагује 10^3 - 10^4 пута брже од цисплатине. Ови резултати потврђују да се супституционе реакције $\text{Au}(\text{III})$ комплекса одигравају знатно брже у односу на истоимене реакције $\text{Pt}(\text{II})$ комплекса.^{71,138,151,152}

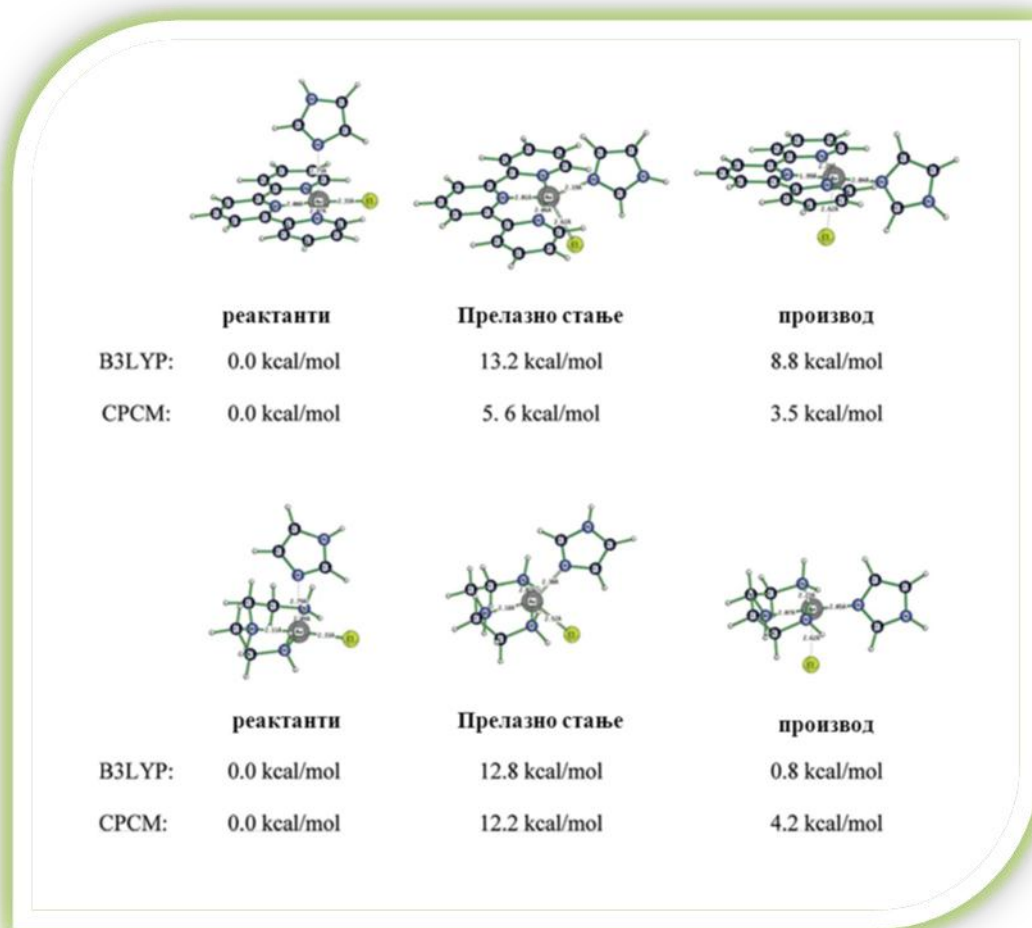
Табела 3.3. Константе брзине и активациони параметри за проучаване супституционе реакције $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса за први ($k_{2,f}$) и други ($k_{2,s}$) корак реакције у 25 mM Нерес пуферу на 298 K, pH = 7,2 и 20 mM NaCl.

$[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]^+$						
<i>Први корак</i>	$k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	k_1/s^{-1}	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
His	$(7.86 \pm 0.03) \cdot 10^3$	35 ± 3	-70 ± 10	24.8 ± 0.8	16 ± 1	-104 ± 3
Ino	$(2.20 \pm 0.05) \cdot 10^3$	21 ± 1	-123 ± 3	2.85 ± 0.02	15 ± 3	-100 ± 10
5'-IMP	$(4.59 \pm 0.06) \cdot 10^3$	43 ± 2	-46 ± 6	8.93 ± 0.02	36 ± 2	-82 ± 7
5'-GMP	$(1.71 \pm 0.07) \cdot 10^4$	13 ± 2	-136 ± 4	39.4 ± 0.2	9 ± 2	-131 ± 5
<i>Други корак</i>	$k_2'/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	k_1'/s^{-1}	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
His	$(1.18 \pm 0.03) \cdot 10^2$	41 ± 2	-84 ± 6	0.246 ± 0.007	28 ± 2	-84 ± 7
Ino	$(1.89 \pm 0.04) \cdot 10^2$	31 ± 3	-120 ± 10	0.408 ± 0.009	23 ± 3	-140 ± 10
5'-IMP	$(2.35 \pm 0.07) \cdot 10^2$	35 ± 3	-100 ± 10	0.387 ± 0.002	29 ± 4	-94 ± 6
5'-GMP	$(1.54 \pm 0.07) \cdot 10^2$	37 ± 4	-100 ± 10	0.430 ± 0.003	22 ± 4	-110 ± 10
$[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$						
<i>Први корак</i>	$k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	k_1/s^{-1}	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
His	51 ± 2	14 ± 5	-170 ± 10	$(3.09 \pm 0.06) \cdot 10^{-1}$	20 ± 3	-192 ± 9
Ino	6.3 ± 0.4	/	/	$(0.40 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	/	/
5'-IMP	14 ± 1	/	/	$(3.87 \pm 0.06) \cdot 10^{-1}$	/	/
5'-GMP	33 ± 2	24 ± 3	-140 ± 10	$(8.2 \pm 0.7) \cdot 10^{-2}$	39 ± 2	-139 ± 8
<i>Други корак</i>	$k_2'/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$	k_1'/s^{-1}	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJmol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
His	5.7 ± 0.5	19 ± 2	-168 ± 8	$(6.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$	17 ± 2	-180 ± 10
Ino	$(2.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$	/	/	$(0.10 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	/	/
5'-IMP	1.7 ± 0.2	/	/	$(0.90 \pm 0.07) \cdot 10^{-2}$	/	/
5'-GMP	2.5 ± 0.1	26 ± 2	-154 ± 9	$(3.1 \pm 0.04) \cdot 10^{-2}$	8 ± 4	-140 ± 10

3.4. ДФТ израчунавања

ДФТ рачуном добило се више података о томе да ли се испитиване реакције Au(III) комплекса одигравају по асоцијативном (A) или по механизму измене I_a. Израчунавања су вршена за два модела реакције, тј. за реакције које полазе од [Au(terpy)Cl]²⁺ и [Au(dien)Cl]²⁺ комплекса. Као модел лиганда изабран је имидазол због сличности са испитиваним хетероцикличним нуклеофилима. Како би се испитао механизам супституције коришћени су као полазни комплекси [Au(terpy)Cl]²⁺(имидазол) и [Au(dien)Cl]²⁺(имидазол). Нуклеофил имидазол је у оба реактанта смештен на 2,7 Å од Au(III) катјона, док се Cl⁻ анјон у оба случаја налази на 2,33 Å од Au(III) катјона. Преко прелазних стања {[Au(terpy)Cl(имидазол)]²⁺}[‡] и {[Au(dien)Cl(имидазол)]²⁺}[‡], која су карактеристична за механизам измене добијени су производи [Au(terpy)(имидазол)]³⁺·Cl⁻ и [Au(dien)(имидазол)]³⁺·Cl⁻. У прелазном стању Au–N_{имидазол} веза је знатно краћа и то 2,19 Å код {[Au(terpy)Cl(имидазол)]²⁺}[‡] и 2,30 Å код {[Au(dien)Cl(имидазол)]²⁺}[‡]. Такође, Au–Cl веза износи 2,62 Å и 2,52 Å редом (Слика 3.16). Током тражења прелазног стања карактеристичног за механизам измене, примећено је скраћивање везе Au–N_{имидазол} за око 65% код прелазног стања у односу на исту дужину везе код реактанта, што указује на механизам измене са асоцијативним карактером тј. I_a механизам. Није било доказа да се формира интермедијер са координационим бројем 5, што је типично за асоцијативни механизам (A).

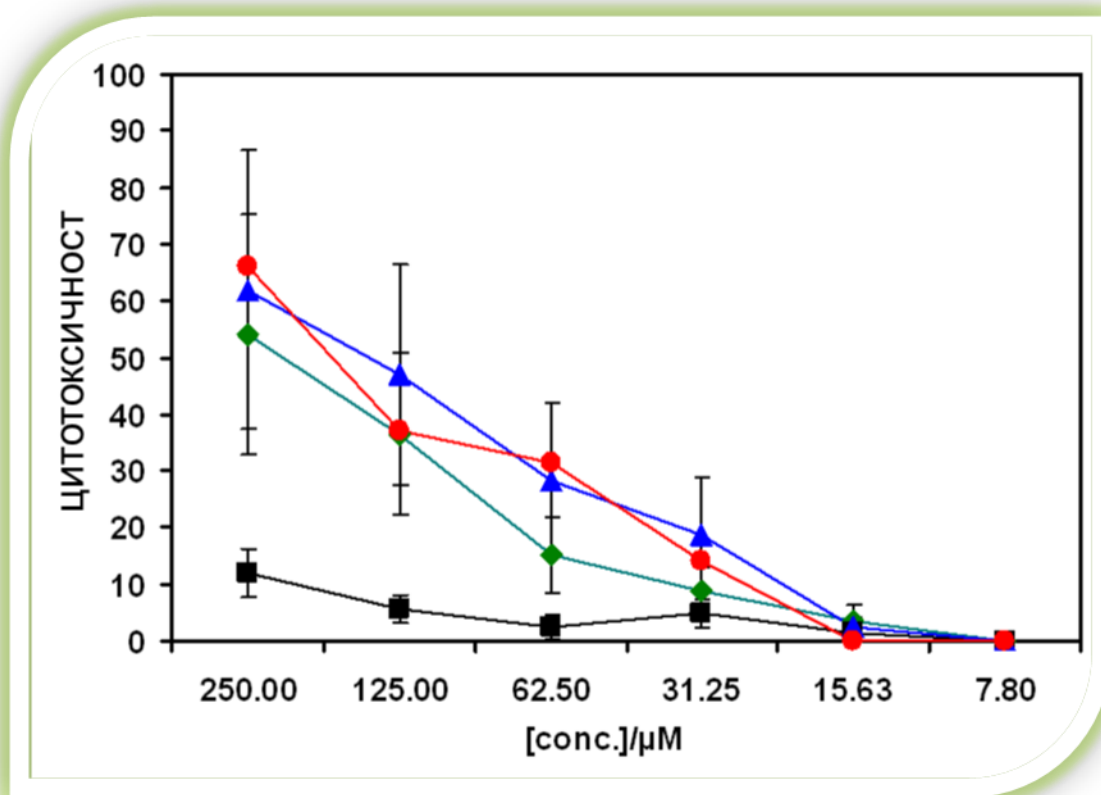
Анализирајући енергије активације, узимајући у обзир растварач (B3LYP(CPCM)/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp) за [Au(terpy)Cl]²⁺ и [Au(dien)Cl]²⁺, добијена је за 50% нижа енергија активације за *terpy* у односу на *dien* комплекс, што је у сагласности са експериментално добијеним резултатима. Одговарајући производ има за 4 kcalmol⁻¹ већу енергију у односу на реактант, што се може приписати делокализацији наелектрисања током процеса супституције.



Слика 3.16. Израчуната релативне стабилности структура реактанта, прелазног стања и производа.

3.5. Резултати добијени испитивањем цитотоксичности $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса

Испитиван је утицај $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ комплекса, као и цисплатине на CLL ћелију.¹⁵³⁻¹⁵⁴ Сва четири испитивана комплекса показују цитотоксичне ефекте на CLL ћелији као што је приказано на Слици 3.17.



Слика 3.17. Цитотоксичност (\blacklozenge) $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, (\blacksquare) $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, (\blacktriangle) $[\text{Au}(\text{en})_2\text{Cl}_2]^+$ и (\bullet) цисплатине на CLL ћелији. CLL ћелија је третирана са различитим дозама испитиваних комплекса у опсегу од 7,8 до 250 μM . Преживљавање ћелије је одређено на основу МТТ теста. Свака тачка представља средњу вредност и стандардну девијацију 3 експериментална мерења са 3 понављања по дози.

Концентрације од 250 μM до 15,625 μM $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса показују већу цитотоксичност у односу на исте концентрације $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса. Међутим, концентрације од 250 μM до 15,625 μM $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса показују значајно мању цитотоксичност у односу на исте концентрације $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и цисплатине.

Концентрација од 15,625 μM свих испитиваних $\text{Au}(\text{III})$ комплекса и цисплатине показује исту цитотоксичност на CLL ћелији (у опсегу од 1,5 - 3,6 % цитотоксичности). Међутим, концентрација од 7,8 μM свих испитиваних комплекса $\text{Au}(\text{III})$ и цисплатине не показује цитотоксичност на CLL ћелији.

Сва три испитивана комплекса Аu(III) јона и цисплатина (концентрација у опсегу од 250 μM до 7,8 μM) показују цитотоксичност на CLL ћелији која зависи од концентрације коришћених комплекса.

3.6. Резултати добијени испитивањем цитотоксичности изабраних комплекса Аu(III) на 4T1 ћелији и спречавању раста тумора дојке код BALB/c миша

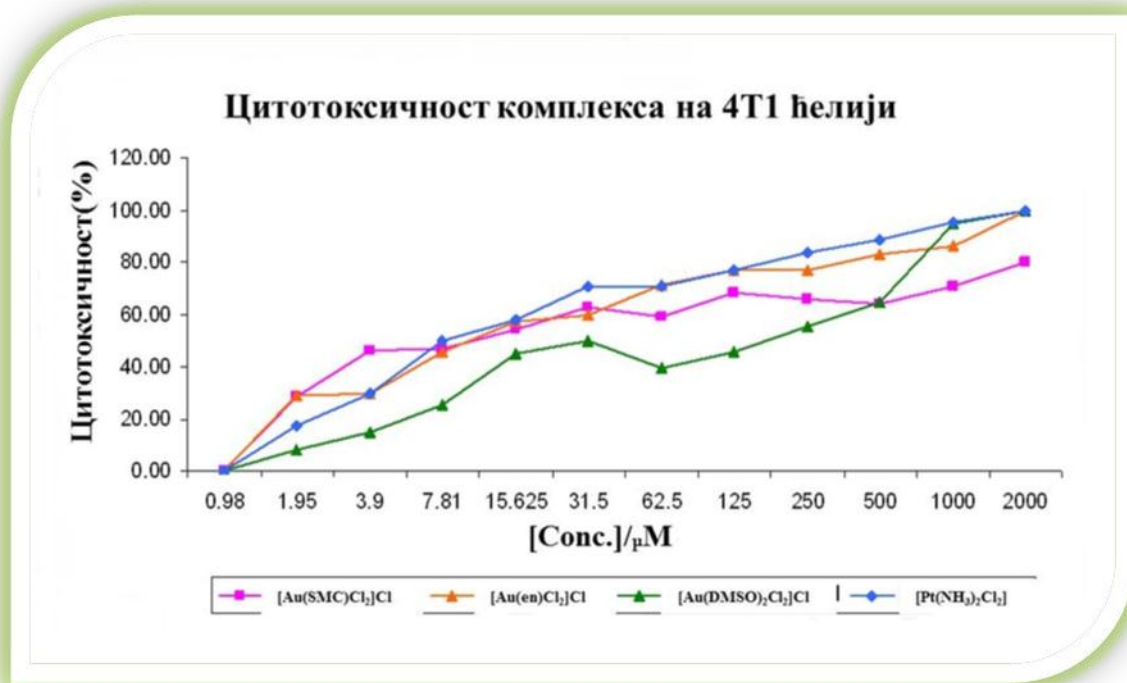
Испитивана је цитотоксичност комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{Au}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2]^+$ и цисплатине на 4T1 ћелији и добијени резултати приказани су на Сликама 3.18 и 3.19.

Смањење концентрације комплекса праћено је значајним смањењем процента апоптоличних ћелија.

Цитотоксичност комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и цисплатине у опсегу концентрације од 2000 μM до 500 μM је већа у односу на цитотоксичност $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса исте концентрације.

Концентрације комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и цисплатине у опсегу 500 μM до 62,5 μM показују већу цитотоксичност у односу на $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ истих концентрација.

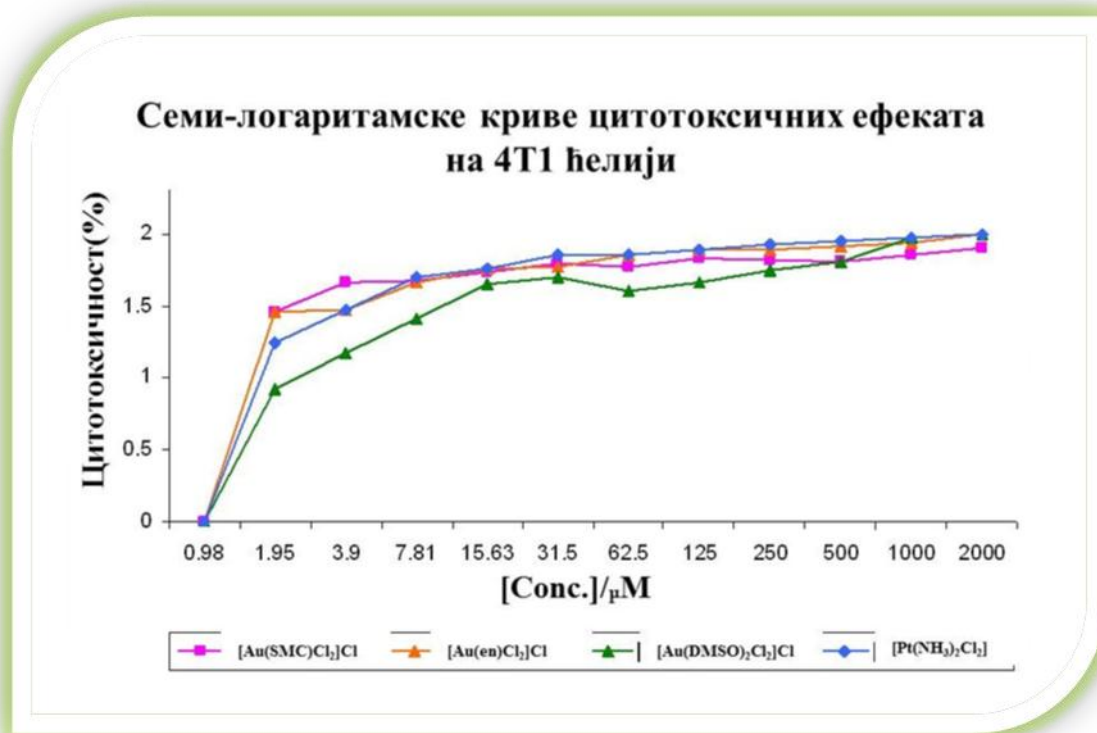
При концентрацији комплекса од 125 μM и 62,5 μM , $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ показује већу цитотоксичност него $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и цисплатина. Међутим, цисплатина показује већу цитотоксичност у односу на сва три испитивана Аu(III) комплекса при концентрацији од 31,5 μM .



Slika 3.18. Резултати испитивања цитотоксичности комплекса $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и цисплатине на 4Т1 ћелији. 4Т1 ћелија је засејавана са различитим дозама тестираних комплекса у опсегу од 0,98 до 2000 μM . Преживљавање ћелије је одређивано на основу МТТ тестова. Свака тачка представља средњу вредност и стандардну девијацију 3 експериментална мерења са 3 понављања по дози.

Комплекси $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ и цисплатина при концентрацијама од 15,63 μM и 7,81 μM показују готово исту цитотоксичност на 4Т1 ћелији. При концентрацији од 3,9 μM $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекс показује највећи цитотоксичност (Слика 3.18).

При ниским концентрацијама (1,95 μM) комплекси $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ показују већу цитотоксичност од цисплатине. $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ у опсегу концентрације од 500 μM до 1,95 μM показује значајно мању цитотоксичност у поређењу са испитиваним комплексима истих концентрација (Слика 3.18).

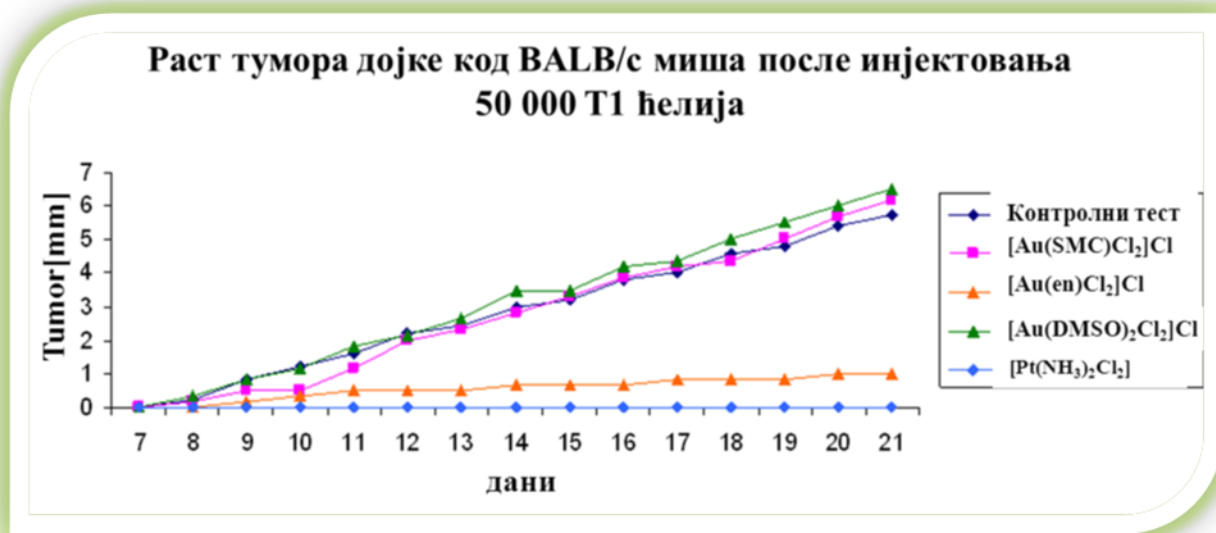


Слика 3.19. Семи-логаритамске криве цитотоксичности $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и цисплатине на 4Т1 ћелији. Свака тачка представља средњу вредност и стандардну девијацију 3 експериментална мерења са 3 понављања по дози.

Сви испитивани $\text{Au}(\text{III})$ комплекси и цисплатина при концентрацији од $0,98 \mu\text{M}$ не показују цитотоксичност на 4Т1 ћелији (Слика 3.18). Међутим, испитивани $\text{Au}(\text{III})$ комплекси и цисплатина (у опсегу концентрација од $2000 \mu\text{M}$ до $0,98 \mu\text{M}$) показују цитотоксичност на 4Т1 ћелији која зависи од концентрације коришћеног комплекса (Слика 3.19).

Тумор је уочен први пут код миша из контролне групе осмог дана експеримента, као и код два миша која су примила $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и код једног миша који је примио $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$. Такође, тумор је примећен деветог дана експеримента код миша који је примио $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$. То је једини миш који је примио дозу $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и ког кога је настао тумор (Слика 3.20). До краја експеримента тумор је примећен код свих мишева из

контролне групе (6/6) и код свих мишева који су примили дозу $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ (6/6). Међутим, тумор је примећен код само једног миша који је примио дозу $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ (1/6) (Слика 3.20).

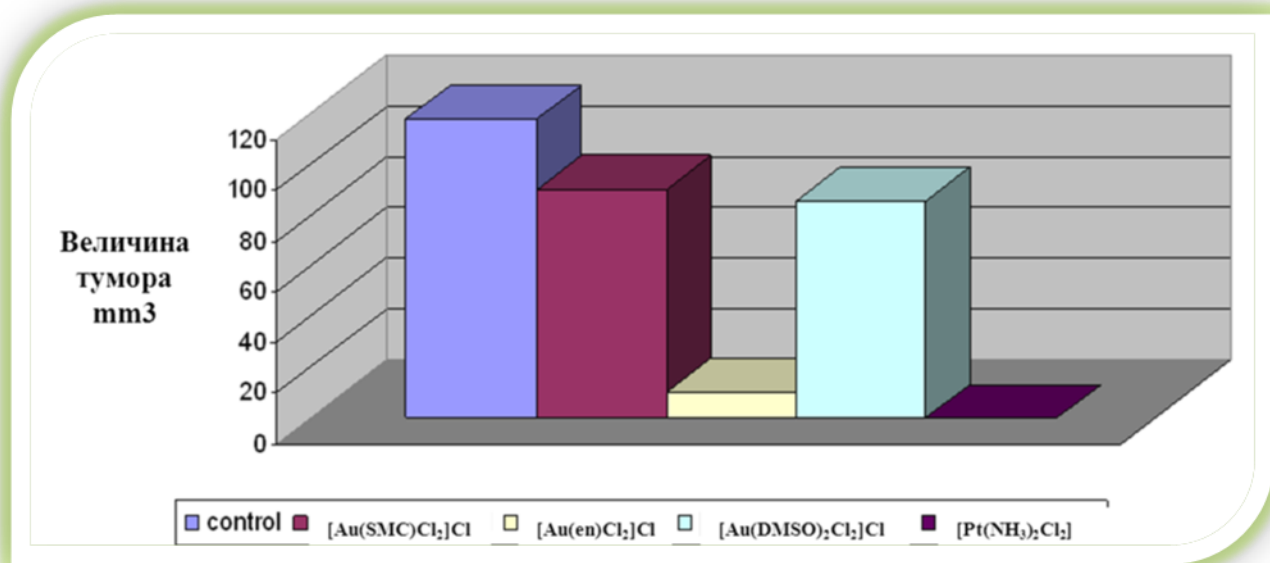


Слика 3.20. Раст тумора дојке код BALB/c миша после инокулације 5×10^4 4T1 ћелија. Свака тачка представља средњу вредност величине тумора, која је мерена свакога дана на мишевима из сваке групе.

Како би се одредила величина тумора, експерименталне животиње су сециране двадесетпрвог дана експеримента и тумор је уклоњен (Слика 3.20). Примећено је да су тумори код контролних мишева већи од тумора добијених из мишева који су примили дозу Au(III) комплекса (Слика 3.20). Од свих испитиваних Au(III) комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]$ најбоље утиче на превенцију раста тумора. Најмањи тумор је добијен из миша који је примио дозу $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]$ (Слика 3.20).

Миш из контролне групе и мишеви који су примили дозе комплекса $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и цисплатине изгубили су на тежини током експеримента, док је миш који је примио дозу $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса добио на тежини током експеримента (Слика 3.21).

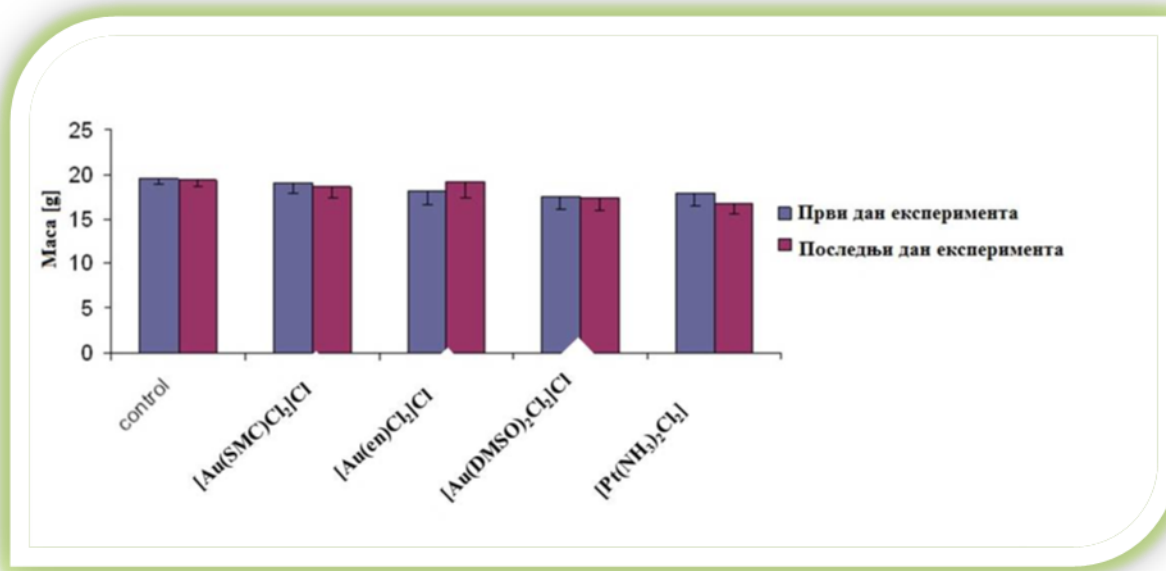
Наведени добијени резултати на основу *in vitro* експеримената показују да испитивани комплекси Au(III) и цисплатина показују цитотоксичност на 4Т1 ћелији. Смањење концентрације праћено је значајним смањењем процента апоптотичних ћелија.



Слика 3.21. Величина тумора мерена двадесетпрвог дана експеримента. Свака колона представља средњу вредност величине тумора одређене у свакој групи.

Од тестираних комплекса Au(III), [Au(en)Cl₂]⁺ је показао најбољу цитотоксичност *in vitro*. Цитотоксичност [Au(en)Cl₂]⁺ и цисплатине је слична при свим испитиваним концентрацијама. Једино при концентрацији од 3,9 μM комплекс [Au(SMC)Cl₂] је показао већу цитотоксичност од комплекса [Au(en)Cl₂]⁺ и цисплатине, док при врло ниским концентрацијама (1,95 μM) обе комплекса [Au(en)Cl₂]⁺ и [Au(SMC)Cl₂] показују већу цитотоксичност од цисплатине.

Резултати *in vivo* експеримената показују да комплекс [Au(en)Cl₂]⁺ може да спречи раст примарног тумора дојке код BALB/c миша (Слика 3.20 и 3.21). Само код једног миша који је примао дозу [Au(en)Cl₂]⁺ комплекса је настао тумор, при чему се тумор појавио касније у односу на контролну групу мишева и групу мишева који су примили [Au(SMC)Cl₂] и [AuCl₂(DMSO)₂]⁺ комплексе (Слика 3.20).



Слика 3.22. Тежина BALB/c мишева током експеримента (мерења су вршена првог и последњег дана експеримента). Свака колона представља средњу вредност тежине мишева из сваке групе.

In vivo експерименти су потврдили резултате добијене *in vitro* испитивањима тј. показали су да комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ има најбољу цитотоксичност на 4Т1 ћелији у односу на све испитиване $\text{Au}(\text{III})$ комплексе.

Код мишева који су примали дозе цисплатине није примећен настанак тумора (0/6), међутим, два миша су угинула током експеримента. Један миш је угинуо деветог дана а други двадесетог дана експеримента, док су сви мишеви који су примали дозе $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ комплекса преживели до краја експеримента (Слика 3.22).

Комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ мишеви су боље толерисали од $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ и цисплатине, што потврђује повећање тежине код мишева који су примали $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ (Слика 3.22). Разлог мање токсичности $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ у односу на цисплатину може да буде различити механизам антитуморског дејства злато комплекса у поређењу са цисплатином. Цисплатина акнтитуморска својства испољава на тај начин што реагује са ДНК при чему формира производ у коме је онемогућена транскрипција и репликација

ДНК, што је праћено апоптозом.^{155,156} Механизам антитуморског дејства злато комплекса као ни болошка мета за везивање Au(III) комплекса још увек нису познати. Међутим, нека новија истраживања су показала да се механизам дејства ових комплекса састоји од модификације површине протеина и инхибиције функције протеасоме,¹⁵⁷ што је потуно другачији механизам од механизма дејства Pt(II) комплекса.¹⁵⁸

У *in vivo* експериментима показало се да је $[\text{Au(en)Cl}_2]^+$ комплекс стабилнији у физиолошким условима од $[\text{Au(SMC)Cl}_2]$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$. Могуће објашњење је да комплекси $[\text{Au(SMC)Cl}_2]$ и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ садрже сумпор у координационој сфери, што за последицу има мању стабилност и мању реактивност при физиолошким условима од $[\text{Au(en)Cl}_2]^+$ комплекса.¹⁵⁸ Такође, код ових комплекса је дошло до брже редукције при физиолошким условима.

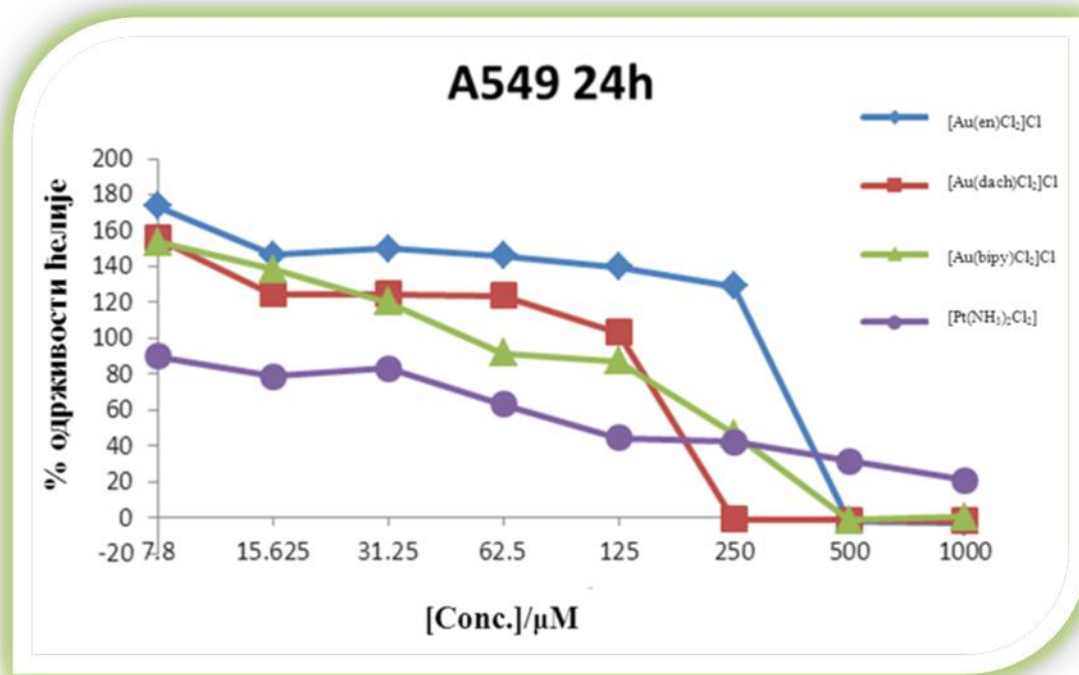
На основу свих изложених резултата може се рећи да је комплекс $[\text{Au(en)Cl}_2]^+$ добар кандидат за будућа фармаколошка испитивања у области испитивања и лечења канцера дојке.

3. 7. Резултати добијени испитивањем цитотоксичности комплекса Au(III) на А549 епителу ћелијске линије карцинома плућа

Испитивани комплекси Au(III) јона, $[\text{Au(en)Cl}_2]^+$, $[\text{Au(dach)Cl}_2]^+$ и $[\text{Au(bipy)Cl}_2]^+$ показују цитотоксичност на А549 ћелији (Слике 3.22, 3.23 и 3.24). Повећање концентрације комплекса праћено је значајним повећањем процента апоптотичних ћелија. У концентрацијском опсегу од 7,8 μM до 250 μM сви тестирани комплекси показују сличану и малу цитотоксичност. Међутим, разлику у цитотоксичности показују при концентрацији од 250 μM . $[\text{Au(dach)Cl}_2]^+$ показује велику цитотоксичност при чему је примећена скоро 100% смрт ћелије. $[\text{Au(bipy)Cl}_2]^+$ показује малу цитотоксичност и доводи до смрти ћелије у 40% случајева. Занимљиво је да се А549 ћелије умножавају након третирања са $[\text{Au(en)Cl}_2]^+$ (концентрација комплекса 250 μM). Сва три испитивана комплекса злата показују 100% цитотоксичност при концентрацији од 500 μM (Слика 3.22)

Резултати добијени на основу LDH тестова се подударају са резултатима добијеним на основу МТТ тестова (Слика 3.23).

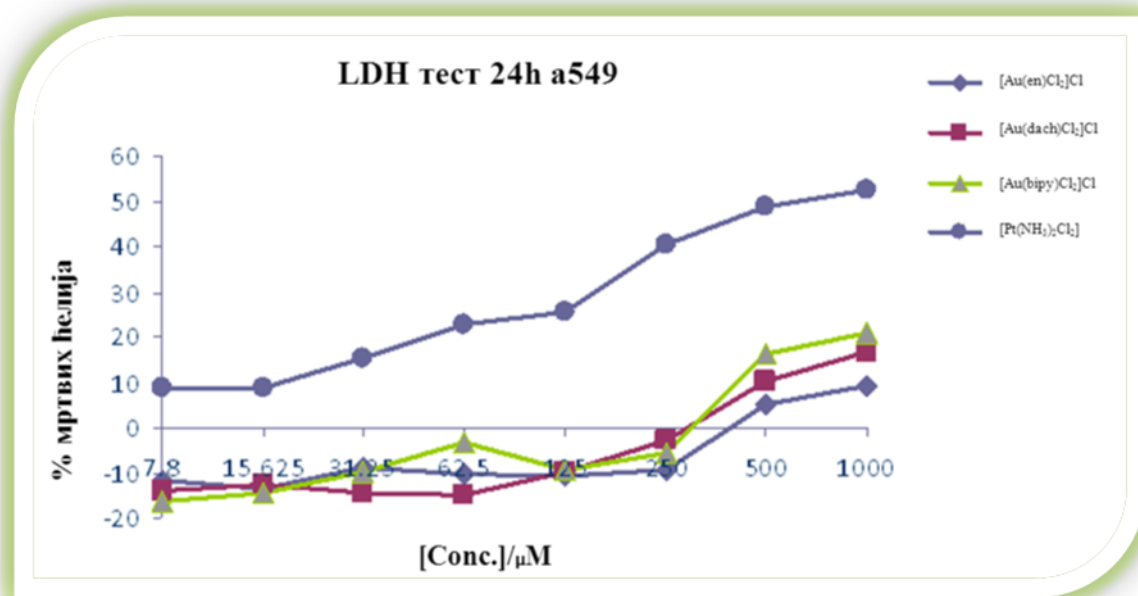
На основу одрађених тестова утврђено је да је већина ћелија угине на самом почетку апоптозе (Слика 3.24).



Слика 3.23. Резултати цитотоксичности добијени на основу МТТ теста.

Резултати добијени применом проточне цитометрије показују да код примене цисплатине у раној фази апоптозе смрт ћелије је изражена код 54,77% ћелија, за [Au(en)Cl₂]⁺ 7,16 %, за [Au(dach)Cl₂]⁺ 21,19 % и за [Au(bipy)Cl₂]⁺ 60,92 %.

Може се закључити да [Au(bipy)Cl₂]⁺ комплекс показује већу цитотоксичност на А549 ћелији, после 24 сата третирања ћелије овим комплексом, у поређењу са цисплатином. Такође, показало се на основу МТТ тестова да при концентрацији од 250 µМ и [Au(bipy)Cl₂]⁺ комплекс и цисплатина показују исти ниво цитотоксичности.

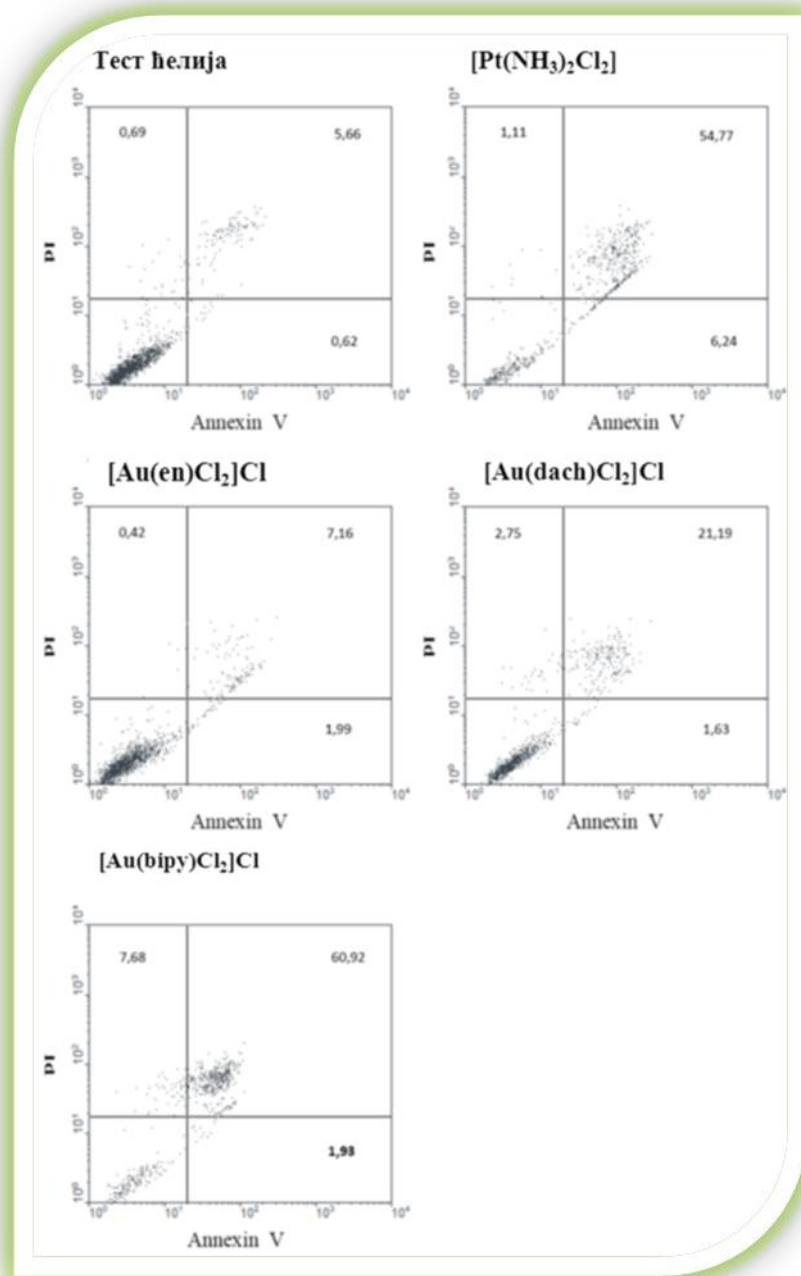


Слика 3.24. Резултати цитотоксичности добијени на основу LDH теста

Сви испитивани комплекси Au(III) показују цитотоксичност на A549 епителу ћелијске линије карцинома плућа (Слике 3.22, 3.23, 3.24). Смањење концентрације праћено је значајним смањењем процента апоптотичних ћелија. При највећој и најмањој коришћеној концентрацији (од 500 µM до 7,8 µM) сви комплекси показују сличну цитотоксичност. Међутим, при концентрацији од 250 µM, за коју предпостављамо да може да се користи *in vivo*, [Au(bipy)Cl₂]⁺ показује најбољу цитотоксичност од свих испитиваних комплекса Au(III) и има сличну цитотоксичност као и цисплатина која је коришћена као контролни комплекс. При концентрацији од 250 µM, након само 24 сата од третирања ћелија са комплексом [Au(bipy)Cl₂]⁺ скоро све A549 ћелије су угинуле (Слика 3.24).

Тест апоптотичности показује велики проценат апоптозе у раној фази након третмана са [Au(bipy)Cl₂]⁺ (60,92 %) комплексом, док проценат апоптозе код цисплатине износи 54,77 %, а код [Au(dach)Cl₂]⁺ 21,19 % и [Au(en)Cl₂]⁺ 7,16 % што указује да је апоптоза главни механизам по коме [Au(bipy)Cl₂]⁺ испољава своју цитотоксичност (Слика 3.25).

У складу са приказаним резултатима може се закључити да $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ комплекс може да буде добар кандидат за будућа фармаколошка испитивања, као и нови терапеутски агент за предклиничка испитивања карцинома плућа.



Слика 3.25. Резултати теста апоптозе.

3. 8. Резултати добијени испитивањем ефеката ауротиомалата и комплекса Au(III) јона на покретљивост изолованих јајовода човека

Изоловани препарати ампула

Узорци свих пацијената су показали спонтану активност која се састоји од наизменичних контракција са амплитудом од $10,7 \pm 3,9 \mu\text{N}$ ($3,9 \mu\text{N}$ = стандардна девијација /SD/) и фреквенцијом од 3 до 7 циклуса по минути.

Спонтане промене у наизменичној активности изолованих ампула нису примећене ни после два сата од почетка праћења ($F = 0,057$, $df_1 = 10$, $df_2 = 32$, $p > 0,05$).

Ауротиомалат (од $2,9 \times 10^{-9}$ М до $4,9 \times 10^{-4}$ М), $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (од $3,3 \times 10^{-9}$ М до $4,2 \times 10^{-5}$ М), $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (од $2,9 \times 10^{-9}$ М до $4,2 \times 10^{-5}$ М), $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ (од $1,9 \times 10^{-8}$ М до $1,0 \times 10^{-5}$ М) и DMSO (од $1,9 \times 10^{-8}$ М до $1,0 \times 10^{-5}$ М) нису утицали на спонтане контракције изолованих „Fallopian tube ампула“ ($F = 0,873$, $df_1 = 8$, $df_2 = 27$, $p > 0,05$; $F = 1,573$, $df_1 = 7$, $df_2 = 18$, $p > 0,05$; $F = 1,279$, $df_1 = 7$, $df_2 = 24$, $p > 0,05$, и $F = 0,636$, $df_1 = 7$, $df_2 = 23$, $p > 0,05$ редом).

Изоловани препарати превлаке

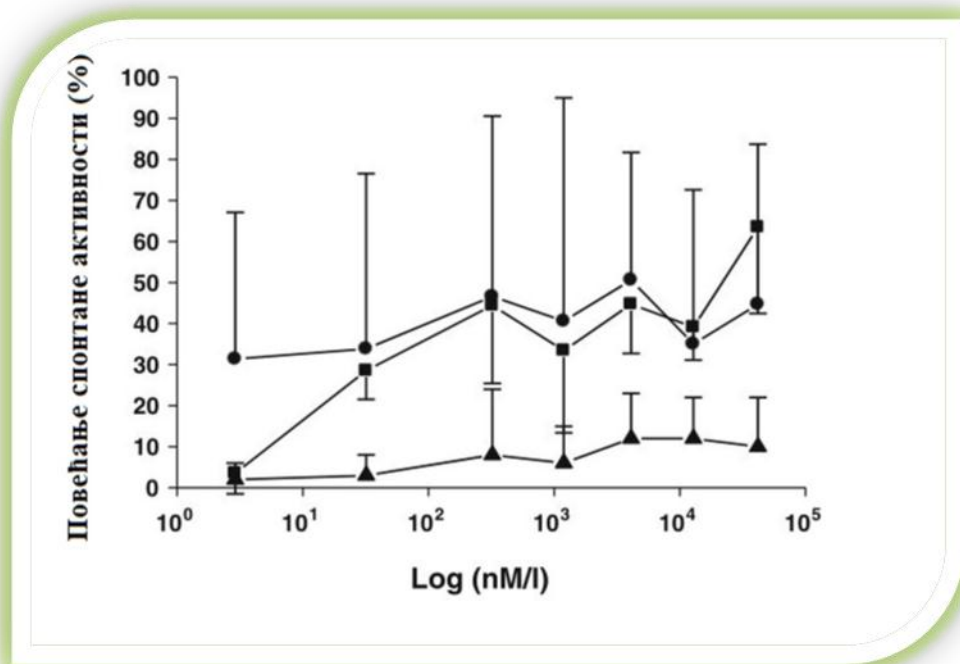
Узорци свих пацијената су показали спонтану активност која се састоји од наизменичних контракција са амплитудом од $7,6 \pm 2,8 \mu\text{N}$ ($2,8 \mu\text{N}$ = стандардна девијација /SD/) и фреквенцијом од 3 до 8 циклуса по минути.

Спонтане промене у наизменичној активности изолованих превлака нису примећене ни после два сата од почетка праћења ($F = 0,057$, $df_1 = 10$, $df_2 = 32$, $p > 0,05$).

Комплекс $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ (од $2,9 \times 10^{-9}$ М до $4,2 \times 10^{-5}$ М) показује повећање спонтане контракције изолованих превлака при чему контракције зависе од концентрације коришћеног комплекса ($\text{EC}_{50} = (8,62 \pm 5,08) \times 10^{-6}$ М, $r = 0,620$, $p < 0,05$) (Слика 3.26).

Ауротиомалат (од $2,9 \times 10^{-9}$ М до $4,9 \times 10^{-4}$ М), $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (од $3,3 \times 10^{-9}$ М до $4,2 \times 10^{-5}$ М) и $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ (од $1,9 \times 10^{-8}$ М до $1,0 \times 10^{-5}$ М) нису утицали на спонтане контракције изолованих превлака ($F = 0,900$, $df_1 = 8$, $df_2 = 36$, $p > 0,05$; $F = 0,130$, $df_1 = 6$, $df_2 = 21$, $p > 0,05$ и $F = 0,290$, $df_1 = 10$, $df_2 = 44$, $p > 0,05$, редом).

Наша истраживања су показала да само један од испитиваних Au(III) комплекса показује ефекат. Комплекс $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ доводи до стимулисања спонтане активности изолованих јајовода. Овај ефекат треба приписати самом злату, Au(III), Au(I) или Au(0). Како испитивани комплекс није стабилан и лако отпушта злато, за разлику од ауротиомалата и $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, то би могло да објасни бољи контакт са ћелијама глатких мишића, а самим тим и бољи ефекат овог испитиваног комплекса. Друге студије су такође потврдиле већу биолошку активност органских једињења злата са слабијим везама између самог злата и органског дела молекула.¹⁵⁹⁻¹⁶² Разлике у стабилности органских једињења злата, што за последицу има разлике у биолошкој активности наведених једињења, свакако треба узети у обзир приликом синтетисања нових лекова на бази злата.



Слика 3.26. Семи-логаритамске криве ефеката $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и ауротиомалата на спонтане контракције изолованих превлака јајовода. Свака тачка представља средњу вредност добијену на основу експеримената на изолованим јајоводима од различитих особа.

ЗАКЉУЧАК

Изучавањем супституционих реакција монофункционалних Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$, са Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His утврђено је да:

- Изучавани азот-донорски лиганди показују велики афинитет према комплексима Au(III), $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$
- реактивност нуклеофила опада у низу: L-His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino
- комплекс $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ показује три пута већу реактивност у односу на $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ комплекс
- на основу вредности активационих параметара за све изучаване супституционе реакције утврђен је асоцијативни механизам супституције
- ДФТ израчунавања за реакције $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ комплекса са имидазолом указују да се супституција одиграва по механизму измене (I_a) или по асоцијативном механизму (A).

Испитивањем супституционих реакција бифункционалних Au(III) комплекса, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, са нуклеофолима 5'-GMP, 5'-IMP, Ino и L-His утврђено је да:

- Испитивани азот-донорски лиганди су, и у овом случају, показали велики афинитет према одабраним Au(III) комплексима
- све супституционе реакције испитиваних бифункционалних Au(III) комплекса се одигравају у два корака. Први корак представља супституцију једног хлоридо јона, а други корак супституцију другог хлоридо јон из полазног комплекса. Константа

брзине за први реакциони корак је већа од константе брзине за други корак супституције у свим испитиваним реакцијама

- реактивност нуклеофила опада у низу: L-His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino
- уочено је да се први и други корак супституционе реакције $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ комплекса одигравају брже него у случају $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ комплекса
- реакције супституције $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$ комплекса одигравају се два пута брже у односу на реакције $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса
- вредности активационих параметара за све посматране супституционе реакције указују на асоцијативни механизам супституције
- све реакције супституције су праћене редукцијом Au(III) до Au(I) или Au(0). Ове редокс реакције су споре.

На основу испитивања цитотоксичности комплекса $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{SMC})\text{Cl}_2]$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ на ћелијским линијама различитих тумора примећено је да:

- комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ показује исти ниво цитотоксичности као и цисплатина на CLL ћелији, што га чини добрим кандидатом за будућа фармаколошка испитивања
- *in vitro* испитивања на 4T1 ћелијској линији указују да најбољу цитотоксичност показује $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекс
- *in vivo* испитивања на BALB/c мишима такође указују да комплекс $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ најбоље утиче на спречавање раста тумора дојке миша, што чини овај комплекс добрим кандидатом за будућа испитивања у области канцера дојке.
- испитивањем цитотоксичности $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ комплекса на A549 епителу ћелијске линије карцинома плућа утврђено је да комплекс $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ показује најбољу цитотоксичност
- од изучаваних Au(III) комплекса $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ и $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ само $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ стимулише спонтану активност изолованих јајовода. Овај ефекат треба приписати јону злата, јер је комплекс $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ нестабилан и лако се распада у раствору.

На крају можемо истаћи да резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације доприносе бољем разумевању механизма супституционих реакција Au(III) комплекса. Испитивање супституционих реакција монофункционалних и бифункционалних Au(III) комплекса, који имају различите инертне азот-донаторске лиганде, може помоћи разумевању везе између структуре и реактивности. Резултати добијени на основу испитивања супституционих реакција Au(III) комплекса са биолошки значајним лигандима могу помоћи да се добије више информација о могућим интеракцијама ових комплекса у *in vivo* условима и њиховој примени као антитуморских лекова. Испитивања цитотоксичности Au(III) комплекса открила су нам да неки од комплекса могу да постану кандидати за будућа фармаколошка тестирања на различитим карциномима.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Lippert, *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of Leading Antitumor Drugs*, Wiley-VCH, Zurich, 1999, pp. 183-221.
2. P. C. A. Bruijninx and P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, 2009, **61**, 1.
3. E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, 2011.
4. C. F. Shaw, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2589.
5. A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1692.
6. I. Ott, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1670.
7. S. J. Berners-Price, A. Filipovska, *Metallomics*, 2011, **3**, 863–873.
8. C. Gabbiani, A. Casina, L. Messori, *Gold Bull.*, 2007, **40**, 73–81.
9. X. Wang, Z. Guo, *Dalton Trans.*, 2008, **87**, 1521–1532.
10. A. Lagun, *Modern Supramolecular Gold Chemistry: Gold-Metal Interactions and Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008, ch. 1.
11. P. J. Sadler, Z. Guo, *Pure and Applied Chemistry*, 1998, **70**, 863.
12. E.R.T. Tiekink, *Metallotherapeutic Drugs & Metal-based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine*. Marcen, Gielen, Wiley, 2005.
13. G.C. Bond, C. Louis, D. T. Thompson, *Catalysis by Gold, Catalytic Science Series* vol. 6.
14. A.S.K. Hashmi, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 3180.
15. R. Koch, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1927, **16**, 756.
16. Empire Rheumatism Council, *Ann. Rheum. Dis.*, 1961, **20**, 315.
17. R. Eisler, *Inflamm. Res.*, 2003, **52**, 487.
18. J. Chaudiere, A.L. Tappel, *J. Inorg. Biochem.*, 1984, **20**, 313.
19. J.R. Roberts, C.F. Shaw, *Biochem. Pharmacol.*, 1998, **55**, 1291.
20. S. Gromer, L.D. Arscott, C.H. Williams, R.H. Schirmer, K. Becker, *J. Biol. Chem.*, 1998, **7**, 20096.
21. T. Vlak, I. Jajic, *Reumatizam*, 1992, **39**, 25.
22. P. Clark, P. Tugwell, K. Bennett, C. Bomardier, *J. Rheumatol*, 1989, **16**, 442.

23. I. Ott, X. Qian, Y. Xu, D.H. Vlecken, I.J. Marques, D. Kubat, J. Will, W.S. Sheldrick, P. Jesse, A. Prokop, C.P. Bagowski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 1160.
24. M. Deponte, S. Urig, L.D. Arscott, K. Fritz-Wolf, R. Reau, C. Herold-Mende, S. Konkarevic, M. Meyer, E. Davioud-Charvet, D.P. Ballou, C.H. Williams, K. Becker, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 20628.
25. S. Urig, K. Fritz-Wolf, R. Reau, C. Herold-Mende, K. Toth, E. Davioud-Charvet, K. Becker, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 1881.
26. S.J. Berners-Price, C.K. Mirabelli, R.K. Johnson, M.R. Mattern, F.L. McCabe, L.F. Faucette, C.M. Sung, S.M. Mong, P.J. Sadler, S.T. Crooke, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 5486.
27. C.K. Mirabelli, D.T. Hill, L.F. Faucette, F.L. McCabe, G.R. Girard, D.B. Bryan, B.M. Sutton, J.O. Bartus, S.T. Crooke, R.K. Johnson, *J. Med. Chem.*, 1987, **30**, 2181.
28. F. Caruso, R. Villa, M. Rossi, C. Pettinari, F. Paduano, M. Pennati, M.G. Daidone, N. Zaffaroni, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, **73**, 773.
29. F. Caruso, C. Pettinari, F. Paduano, R. Villa, F. Marchetti, E. Monti, M. Rossi, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 1584.
30. D. Suresh, M.S. Balakrishna, K. Rathinasamy, D. Panda, S.M. Mobin, *Dalton Trans.*, 2008, **15**, 2812.
31. E. Barreiro, J.S. Casas, M.D. Couce, A. Sanchez, A. Sanchez-Gonzalez, J. Sordo, J.M. Varela, E.M.V. Lopez, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 184.
32. a) B. Rosenberg, L. V. Camp, *Nature*, 1965, **205**, 698; b) B. Rosenberg, L. V. Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature*, 1969, **222**, 385; c) B. Rosenberg, L. V. Camp, *Canc. Res.*, 1970, **30**, 1799; d) B. Rosenberg, L. V. Camp, E. B. Grimley, A. J. Thomson, *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 1347.
33. P. C. A. Bruijninx, P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, 2009, **61**, 1.
34. C. Gabbiani, M. A. Cinellu, L. Maiore, L. Massai, F. Scaletti, L. Messori, *Inorg. Chim. Acta*, 2012, 393, 115–124.
35. L. Oehninger, R. Rubbiani, I. Ott, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 3269-3284.
36. Z. E. Housecroft, A. G. Sharp, *Inorganic Chemistry*, Essex, England, 2001, ch. 6, 19-25.
37. R. V. Parish, B. P. Howe, J. P. Wright, J. Mack, R. G. Pritchard, R. G. Buckley, A. M. Elsome, S. P. Fricker, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 1659.

38. R.G. Buckley, A.M. Elsome, S.P. Fricker, G.R. Henderson, B.R. Theobald, R.V. Parish, B.P. Howe, L.R. Kelland, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 5208.
39. M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando, L. Randaccio, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 1983.
40. S. Carotti, M. Marcon, M. Marussich, T. Mazzei, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, *Chem.Biol. Interact.*, 2000, **125**, 29.
41. D. Fan, C.-T. Yang, J.D. Ranford, , P.F. Lee, J.J. Vittal, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2003, **13**, 2680.
42. G. Marcon, S. Carotti, M. Coronello, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, T. Mazzei, M. A. Cinellu, G. Minghetti, *J Med Chem.*, 2002, **45**, 1672.
43. L. Ronconi, L. Giovagnini, C. Marzano, F. Bettio, R. Graziani, G. Pilloni, D. Fregona, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 1867.
44. C.M. Che, R. W.-Y. Sun, W-Y. Yu, C.-B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Commun.*, 2003, **14**, 1718.
45. A. Casini, M. A. Cinellu, G. Minghetti, C. Gabbiani, M. Coronello, E. Mini, L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 5524
46. M. Coronello, E. Mini, B. Caciagli, M.A. Cinellu, A. Bindoli, C. Gabbiani, L. Messori., *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 6761.
47. M.P. Rigobello, L. Messori, G. Marcon, M. Bragadin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1634.
48. M.P. Rigobello, G. Scutari, A. Folda, A. Bindoli, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **67**, 689.
49. Y.Omata, M. Folan, M. Shaw, R.L. Messer, P.E. Lockwood, D. Hobbs, S. Bouillaguet, H.Sano, J.B. Lewis, J.C.Wataha, *Toxicol. In Vitro.*, 2006, **20**, 882-90.
50. M. Berggren, A. Gallegos, J.R. Gasdaska, P.Y. Gasdaska, J. Warneke, G. Powis, *Anticancer Res.*, 1996, **16**, 3459.
51. H. Nakamura, J. Bai, Y. Nishinaka, S. Ueda, T. Sasada, G. Ohshio, M. Ima-mura, A. Takabayashi, Y. Yamaoka, J. Yodoi, *Cancer Detect. Prev.*, 2000, **24**, 53.
52. A.K. Rundlof, E.S.J. Arner, *Antioxid. Redox Signal.*, 2004, **6**, 41.
53. A.S. Humphreys, A. Filipovska, S.J. Berners-Price, G.A. Koutsantonis, B.W. Skelton, A.H. White, *Dalton Trans.*, 2007, **21**, 4943.
54. E.S. Arner, A. Holmgren, *Semin. Cancer Biol.*, 2006, **16**, 420.

55. P.B. Cassidy, K. Edes, C.C. Nelson, K. Parsawar, F.A. Fitzpatrick, P.J. Moos, *Carcinogenesis*, 2006, **27**, 2538.
56. D. Saggiaro, M.P. Rigobello, L. Paloschi, A. Folda, S.A. Moggach, S. Parsons, L. Ronconi, D. Fregona, A. Bindoli, *Chem. Biol.*, 2007, **14**, 1128.
57. M. Coronello, E. Mini, B. Caciagli, M.A. Cinellu, A. Bindoli, C. Gabbiani, L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 6761.
58. O. Rackham, S.J. Nichols, P.J. Leedman, S.J. Berners-Price, A. Filipovska, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, **74**, 992.
59. C. Marzano, V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, M.P. Rigobello, *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, **42**, 872.
60. J.J. Liu, P. Galettis, A. Farr, L. Maharaj, H. Samarasingha, A.C. McGechan, B.C. Baguley, R.J. Bowen, S.J. Berners-Price, M.J. McKeage, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 303.
61. Y.M. Go, D.P. Jones, *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1780**, 1273.
62. P.H. Bessette, F. Aslund, J. Beckwith, G. Georgiou, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 13703.
63. Ž. D. Bugarčić, J. Bogojeski, B. Petrović, S. Hochreuther, R. Van Eldik, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 12329.
64. B. Petrović, Ž. D. Bugarčić, A. Dees, I. Ivanović-Burmazović, F. Hainemann, R. Puchta, S. N. Steinmann, C. Corminboeuf, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 1516.
65. J. Rosić, Ž. D. Bugarčić, R. Puchta, R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 5439-5445.
66. T. Soldatović, Ž. D. Bugarčić, R. Van Eldik, *Dalton Trans.*, 2009, 4526-4532.
67. Ž. D. Bugarčić, J. Rosić, B. Petrović, N. Summa, R. Puchta, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 1141-1150.
68. D. Petrović, B. Stojimirović, B. Petrović, Z. M. Bugarčić, Ž. D. Bugarčić, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 4203-4211.
69. N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž. D. Bugarčić, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 461-475.
70. T. Soldatović, Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1472-1479.
71. Ž. D. Bugarčić, T. Soldatović, R. Jelić, B. Algueró, A. Grandas, *Dalton. Trans.*, 2004, 3869-3877.
72. Ž. D. Bugarčić, F. W. Heinemann, R. Van Eldik, *Dalton Trans.*, 2004, 279-286.

73. C. S. Gibson, W. M. Colles, *J. Chem. Soc.*, 1931, **2**, 2407.
74. L. K. Minacheva, A. S. Gladkaya, V. G. Sakharova, G. M. Don, R. N. Shchelokov, M. A. Porai-Koshits, *Zh. Neorg. Khim.*, 1988, **33**, 683.
75. S. Zhu, W. Gorski, D. R. Powell, J. A. Walmsley, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2688-2694.
76. F. H. Fry, G. A. Hamilton, J. Turkevich, *Inorg. Chem.*, 1966, **5**, 1943.
77. D. W. Gibson, M. Beer, R. J. Barnett, *Biochemistry*, 1971, **10**, 3669.
78. D. Chatterji, U. S. Nandi, S. K. Podder, *Biopolymers*, 1977, **16**, 1863.
79. Y. Mizuno, S. Komiya, *Inorg. Chim. Acta*, 1986, **125**, 13.
80. S. Janković, A. Djeković, Ž. D. Bugarčić, S. Janković, G. Lukić, M. Folić, D. Čanović, *BIOMETALS*, 2012, **25**, 919.
81. A. Djeković, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić, R. Puchta, R. van Eldik, *Dalton. Trans.*, 2012, **41**, 3633.
82. M. Arsenijević, M. Milovanović, V. Volarević, A. Djeković, T. Kanjevac, N. Arsenijević, S. Đukić, Ž. D. Bugarčić, *Medic. Chem.*, 2012, **8(1)**, 2.
83. M. Milovanović, A. Djeković, V. Volarević, B. Petrović, N. Arsenijević, Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 944.
84. J. A. Cuadrado, W. Zhang, W. Hang, V. Majidi, *J. Environ. Monitor.*, 2000, **2**, 355.
85. W. H. Baddley, F. Basolo, H. B. Gray, C. Nolting, A. J. Poe, *Inorg. Chem.* 1963, **2**, 921.
86. B. A. Al-Maythaly, A. A. Isab, M. I.M. Wazeer, A. Ibdah, *Inorg. Chim. Acta*, 2010, **363**, 3200.
87. W. H. Baddley, F. Basolo, H. B. Gray, C. Nolting, A. J. Poe, *Inorg. Chem.* 1963, **2**, 921.
88. R. C. Elder, J. W. Watkins, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 223.
89. G. Nardin, L. Randaccio, G. Annibale, G. Natile, B. J. Pitteri, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1980, **10**, 220.
90. L. S. Hollis, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 4293.
91. L. Messori, P. Orioli, C. Tempi, G. Marcon, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2001, **281**, 352.
92. Y. Mizuno, S. Komiya, *Inorg. Chim. Acta*, 1986, **125**, L13.
93. B. Pitteri, M. Bortoluzzi, *Trans. Met. Chem.*, 2006, **31**, 1028.
94. A. Casini, M. C. Diawara, R. Scopelliti, S. M. Zakeeruddin, M. Gratzel, P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 2239.
95. L. Cao, M. C. Jennings, R. J. Puddephatt, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 1361.

96. G. Marangoni, B. Pitteri, G. Annibale, M. Bortoluzzi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, **32**, 765.
97. L. Cattalini, A. Orio, M. L. Tobe, *J. Am. Chem. Society*, 1967, **89**, 3130.
98. A. V. Vujačić, J. Z. Savić, S. P. Sovilj, K. Meszaros Szecsényi, N. Todorović, M. Ž. Petković, V. M. Vasić, *Polyhedron*, 2009, **28**, 593.
99. F. K. Keter, S. O. Ojwach, O. A. Oyetunji, I. A. Guzei, J. Darkwa, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, **362**, 2595.
100. A. Ericson, L. I. Elding, S. K. C. Elmroth, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1997, **17**, 1159.
101. S. Elmroth, L. H. Skibsted, L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 2703.
102. S. K. C. Elmroth, L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 2337.
103. J. Berglund, L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 513.
104. B. Đ. Glišić, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 6887.
105. (a) Sun, R. W.-Y, Li, C. K.-L, Ma, D.-L, Yan, J. J, Lok, C.-N, Leung, C.-H, Zhu, N, Che, C.-M, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 3097–3113. (b) Sun, R. W.-Y, Che, C.-M, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1682–1691. (c) Lum, C. T, Yang, Z. F, Li, H. Y, Sun, R. W.-Y, Fan, S. T, Poon, R. T. P, Lin, M. C. M, Che, C.-M, Kung, H. F, *Int. J. Cancer*, 2006, **118**, 1527–1538. (d) Wang, Y, He, Q.-H, Sun, R. W.-Y, Che, C.-M, Chiu, J.-F, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 11553–11564. (e) Wang, Y, He, Q.-Y, Che, C.-M, Chiu, J.-F, *Proteomics*, 2006, **6**, 131–142. (f) Sun, R. W.-Y, Yu, W.-Y, Sun, H, Che, C.-M, *ChemBioChem*, 2004, **5**, 1293–1298. (g) Che, C.-M, Sun, R. W.-Y, Yu, W.-Y, Ko, C.-B, Zhu, N, Sun, H, *Chem. Commun.* 2003, **32**, 1718–1719.
106. (a) Ronconi, L, Giovagnini, L, Marzano, C, Bettio, F, Graziani, R, Pilloni, G, Fregona, D, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 1867–1881. (b) Giovagnini, L, Ronconi, L, Aldinucci, D, Lorenzon, D, Sitran, S, Fregona, D, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1588–1595. (c) Mlacic, V, Chen, D, Ronconi, L, Landis-Piwowar, K. R, Fregona, D, Dou, Q. P, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 10478–10486. (d) Saggioro, D, Rigobello, M. P, Paloschi, L, Folda, A, Moggach, S. A, Parsons, S, Ronconi, L, Fregona, D, Bindoli, A, *Chem. Biol.* 2007, **14**, 1128–1139.
107. (a) Ott, I, Quian, X, Xu, Y, Vlecken, D. H. W, Marques, I. J, Kubutat, D, Will, J, Sheldrick, W. S, Jesse, P, Prokop, A, Bagowski, C. P. J, *Med. Chem.*, 2009, **52**, 763–770. (b) Vergara, E, Casini, A, Sorrentino, F, Zava, O, Cerrada, E, Rigobello, M. P, Bindoli, A, Laguna, M, Dyson, P. J, *Chem. Med. Chem.*, 2010, **5**, 96–102. (c) Urig, S, Fritz-Wolf, K, Reau, R, Herold-Mende, C, Toth, K, Davioud-Charvet, E, Becker, K, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, **45**, 1881–1886. (d) Scheffler, H, You, Y, Ott, I, *Polyhedron*, 2010, **29**, 66–69. (e) Bagowski,

- C. B, You, Y, Scheffler, H, Vlecken, D. H, Schmitz, D. J, Ott, I, *Dalton Trans.*, 2009, **62**, 10799–10805.
108. (a) Weaver, J, Gaillard, S, Toyce, C, Macpherson, S, Nolan, S. P, Riches, A, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 6620–6624. (b) Rubbiani, R, Kitanovic, I, Alborzina, H, Can, S, Kitanovic, A, Onambele, L. A, Stefanopoulou, M, Geldmacher, Y, Sheldrick, W. S, Wolber, G, Prokop, A, Wolf, S, Ott, I, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 8608–8618. (c) Hickey, J. L, Ruhayel, R. A, Barnard, P. J, Baker, M. V, Berners-Price, S. J, Filipovska, A, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12570–12571. (d) Barnard, P. J, Berners-Price, S, *J. Coord. Chem. Rev.* 2007, **251**, 1889–1902. (e) Baker, M. V, Barnard, P. J, Berners-Price, S. J, Brayshaw, S. K, Hickey, J. L, Skelton, B. W, White, A, H, *Dalton Trans.*, 2006, **42**, 3708–3715. (f) Baker, M. V, Barnard, P. J, Berners-Price, S. J, Brayshaw, S. K, Hickey, J. L, Skelton, B. W, White, A. H, *J. Organomet. Chem.*, 2005, **690**, 5625–5635. (g) Barnard, P. J, Baker, M. V, Berners-Price, S. J, Skelton, B. W, White, A. H, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2004, 1038–1047. (h) Ray, S, Mohan, R, Singh, J. K, Samantaray, M. K, Shaikh, M. M, Panda, D, Ghosh, P, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 15043–15053.
109. 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.
110. 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.
111. C. Gabbiani, A. Casini, G. Kelter, F. Cocco, M. A. Cinellu, H.-H. Fiebig, L. Messori, *Metallomics*, 2011, **3**, 1318–1323.
112. M. G. Mendoza-Ferri, C. G. Hartinger, M. A. Mendoza, M. Groessl, A. E. Egger, R. E. Eichinger, J. B. Mangrum, N. P. Farrell, M. Maruszak, P. J. Bednarski, F. Klein, M. A. Jakupec, A. A. Nazarov, K. Severin, B. K. Keppler, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 916.
113. M. Baron, C. Tubaro, M. Basato, A. Biffis, M. M. Natile, C. Graiff, *Organometallics*, 2011, **30**, 4607–4615.
114. T. Zou, C. T. Lum, S. S-Y Chui, C-M Che, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 1–5.
115. C. H. Langford, H. B. Gray, *Ligand Substitution Processes*, Benjamin, New York, 1974, ch. 2.
116. M. L. Tobe, J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanism*, Longman, England, 1999, p. 70, p. 364.

117. Ž. D. Bugarčić, *Kinetika i Mehanizam Supstitucionih Reakcija*, PMF Kragujevac, 1996, pp. 12-32.
118. I. Gal, in *Mehanizmi Neorganskih Reakcija*, Naučna knjiga, 1979, ch. 2 and 3.
119. K. J. Laidler, in *Chemical Kinetics*, Harper and Row, New York, 1987, ch. 4 and 6.
120. J. H. Espenson, in *Chemical Kinetics and Reaction Mechanism*, 2nd Ed, McGraw Hill, New York, 1995, ch. 2 and 6.
121. M. Kotowski, R. van Eldik, in *Inorganic High Pressure Chemistry, Kinetics and Mechanism*, Ed., R. van Eldik, Elsevier, Amsterdam, 1986, ch. 1, 3 and 4.
122. R. van Eldik, T. Asano and W. J. Le Noble, *Chem. Rev.*, 1989, **59**, 93.
123. G. Nardin, L. Randaccio, G. Annibale, G. Natile, B. Pitteri, *J. Chem. Soc., Dalton. Trans.*, 1979, **1**, 220.
124. L. S. Hollis, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 4293–4299.
125. B. P. Block, J. C. Bailar, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4722–4725.
126. S. Zhu, W. Gorski, D. R. Powell, J. A. Walmsley, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2688–2694.
127. A. R. Khokhar, Q. Xu, S. Al-Baker, J. L. Bear, *Inorg. Chim. Acta*, 1992, **194**, 243.
128. a) A.D. Becke, *J. Phys. Chem.* 1993, **97**, 5648. (b) C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 1988, **37**, 785.(c) P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, *J. Phys. Chem.* 1994, **98**, 11623.(d) T.H. Dunning Jr, P.J. Hay, *Mod.Theor. Chem.* 1976, **3**, 1.(e) P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 1985, **82**, 270.(f) P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 1985, **82**, 284.(g) P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 1985, **82**, 299.(h) S. Huzinaga in *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
129. (a) R. Puchta, R. Meier, N. J. R. van Eikema Hommes, R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 4063. (b) A. Scheurer, H. Maid, F. Hampel, R. W. Saalfrank, L. Toupet, P. Mosset, R. Puchta, N. J. R. Van Eikema Hommes, *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 2566. (c) P. Illner, A. Zahl, R. Puchta, N. VanEikema Hommes, P. Wasserscheid, R. van Eldik, *J. Organomet. Chem.* 2005, **690**, 3567. (d) Ch. F. Weber, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid, R. van Eldik, *Angew. Chem.* 2005, **117**, 6187; Ch. F. Weber, R. Puchta, N. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid, R. van Eldik, *Angew. Chem Int. Ed.* 2005, **44**, 6033.
130. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H.

- Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, *Gaussian 03, Revision B.03*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2004.
131. a) V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem.*, 1998, **102**, 1995. b) M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, V. J. Barone, *Comp. Chem.*, 2003, **24**, 669.
132. T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.*, 1983, **65**, 55–63.
133. D. M. Euhus, C. Hudd, M. C. LaRegina, F. E. Johnson, *J Surg. Oncol.*, 1986, **31**, 229.
134. M. M. Tomayko, C. P. Reynolds, *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989, **24**, 148.
135. Ž. D. Bugarčić, B. Petrović, E. Zangrando, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 2650–2656.
136. D. Jaganyi, A. Hofmann, R. van Eldik, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 1680–1683.
137. A. Hofmann, D. Jaganyi, O. Q. Munro, G. Liehr, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 1688–1700.
138. P. J. Sadler, R. E. Sue, *Met.-Based Drugs*, 1994, **1**, 107–144.
139. S. L. Best, P. J. Sadler, *Gold Bull.*, 1996, **29**, 87–93.
140. U. Rychlewska, B. Warzajtis, B. Dj. Glišić, M. D. Živković, S. Rajković, M. I. Djuran, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 6887
141. J. Arpalahti, M. Mikola, S. Mauristo, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 3327–3332.
142. L. Messori, P. Orioli, C. Tempi, G. Marcon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **281**, 352–360.
143. N. Summa, W. Schiessl, R. Puchta, N. Eikema Hommes, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2948–2959.
144. U. Frey, J. D. Ranford, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 1333–1340.
145. L. H. Skibsted, in: A. G. Skypes, (Ed.), *Advances, Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, Academic Press, 1986, pp 137–183.

146. Y. Mizuna, S. Komiya, *Inorg. Chim. Acta*, 1986, **125** (1), 13–15.
147. A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M. Agostina Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H.-H. Fiebig, L. Messori, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 1139–1149.
148. G. Marcon, T. O'Connell, P. Orioli, L. Messori, *Met.-Based Drugs*, 2000, **7**, 253–256.
149. S. Jovanović, B. Petrović, D. Čanović, D. Ž. Bugarčić, *Int. J. Chem. Kinet.*, 2011, **43**, 99–106.
150. S. Rajković, C. Kallay, R. Serenyi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Savago, *Dalton Trans.*, 2008, **32**, 5059–5071.
151. O. M. Ni Dhubhghaill, P. J. Sadler, in: B. K. Keppler (Ed.), *Gold Complexes in Cancer Chemotherapy, Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim 1993, pp. 221–248.
152. A. Ericson, J. C. Arthur, R. S. Coleman, L. I. Elding, S. K. C. Elmroth, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1998, **10**, 1687–1692.
153. L. Pleyer, A. Egle, T. N. Hartmann, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2009, **7**, 405–418.
154. J. Chen, N. A. McMillan, *Cancer Biol. Ther.*, 2008, **2**, 174–179.
155. M. J. Abrams, B. A. Murrer, *Metal compounds in therapy and diagnosis*, 1993, **261**, 725–730.
156. I. Ott, R. Gust, *Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs*. *Arch Pharm (Weinheim)* 2007, **340**, 117–126.
157. L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanello, *J Med Chem.*, 2006, **49**, 1648–1657.
158. C. Marzano, F. Bettio, F. Baccichetti, A. Trevisan, L. Giovagnini, D. Fregona, *ChemBiol Interact.*, 2004, **148**, 37–48.
159. S. Suzuki, N. Yamauchi, T. Miyamoto, M. Muranaka, *J Allergy Clin Immunol* 1983, **72**, 469–74.
160. D. K. Ledford, Y. Sakamoto, C. O'Connor, K. Krzanowski, R. F. Lockey, J. B. Polson, J. Krzanowski, *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1989, **298**, 237–46.
161. H. Itoh, I. Muramatsu, P. Patel, K. Lederis, M. D. Hollenberg, *J Pharmacol.*, 1988, **95**, 821–9.
162. N. L. Gottlieb, H. E. Brown, *Arthritis Rheum.*, 1977, **20**, 1026–30.

БИОГРАФИЈА

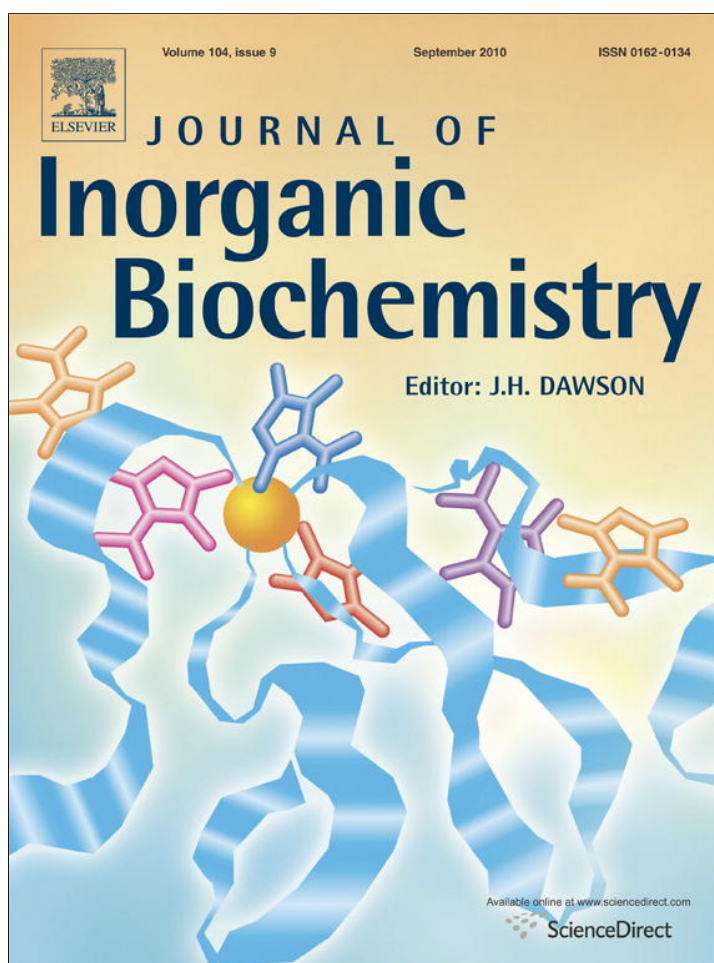


Ана С. Ђековић, је рођена 26.03.1984. године у Краљеву. Основну школу је завршила у Јошаничкој Бањи 1999. године, а средњу Медицинску школу „Сестре Нинковић“, фармацевтски смер, у Крагујевцу 2003. године. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група хемија, смер истраживање и развој, уписала се школске 2003/04 године, где је и дипломирала 14.04.2008. године, са просечном оценом 8,76.

Докторске студије, смер неорганска хемија, уписала је школске 2008/09. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Бави се испитивањем интеракција комплекса злата(III) са биолошки значајним лигандима. Од априла 2008. године запослена је на Државном универзитету у Новом Пазару као сарадник у научно-истраживачком центру. Септембра 2010. године изабрана је у звање асистента на Државном универзитету у Новом Пазару (Департман за хемијско-технолошке науке), где и сада ради. На Природно-математичком факултету у Крагујевцу изабрана је у звање истраживач-приправник 2009. године, а у звање истраживач-сарадник 2012.године, за рад на пројекту који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат бр. 172011, 2011-2014).

Ради израде експерименталног дела докторске дисертације боравила је два пута по месец дана на Универзитету Ерланген-Нирнберг, Ерланген, Немачка, у истраживачкој групи проф. др Руди ван Елдика.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbioLigand substitution reactions and cytotoxic properties of $[\text{Au}(\text{L})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ complexes (L = ethylenediamine and S-methyl-L-cysteine)Marija Milovanović^a, Ana Djeković^b, Vladislav Volarević^a, Biljana Petrović^b,
Nebojša Arsenijević^a, Živadin D. Bugarčić^{b,*}^a University of Kragujevac, Centre for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia^b University of Kragujevac, Faculty of Science, R. Domanovića 12, P. O. Box 60 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2009

Received in revised form 30 April 2010

Accepted 30 April 2010

Available online 8 May 2010

Keywords:

Gold(III)

Complexes

DNA

Kinetics

Cytotoxic

ABSTRACT

We have studied the kinetics of the complex formation of gold(III) complexes, $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ (dichlorido (ethylenediamine)aurate(III)-ion) and $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ (dichlorido (S-methyl-L-cysteine)aurate(III)) with four biologically N-donor nucleophiles. It was shown that studied ligands have a high affinity for gold(III) complex, which may have important biological implications, since the interactions of Au(III) with DNA is thought to be responsible for the anti-tumour activity. The $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex is more reactive than $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$. L-His reacts faster than the other N-donor nucleophiles in the reaction with $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, but in the reaction with $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ 5'-GMP is the best nucleophile. Gold(III) complexes are much more reactive than Pt(II) complexes with the same nucleophiles. The activation parameters for all studied reactions suggest an associative substitution mechanism. The cytotoxicity of gold(III) complexes, $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ and $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ was evaluated in vitro against chronic lymphocytic leukemia cells, obtained from blood of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). The $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ complex show comparable cytotoxicity profiles compared to cisplatin.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Metal complexes have been used for decades as drugs in medicine. For instance, cisplatin and the second generation of the complexes such as carboplatin and oxaliplatin are still the most widely used agents for the treatment of different types of cancer [1]. The success of cisplatin has aroused great interest in the study of metal complexes as possible application in medicine [2–5].

Gold(III) complexes have a long tradition in applications in medicine as drugs [6–10]. In particular, during the last 10–20 years, much interest has focused on gold(III) complexes [11–13]. Gold(III) complexes are square-planar d^8 , isoelectronic and isostructural to Pt(II) complexes. Moreover, gold(III) compounds appear to be very good candidates for anticancer investigations. On the other hand, because of their reductive potential, gold(III) complexes are not very stable under physiological conditions [12]. Before there were not many reports in the literature describing the cytotoxic properties and in vivo anti-tumour effects of gold(III) complexes [14,15]. During the last years, much interest has focused on gold(III) complexes as a number of newly synthesized complexes [13]. The acceptable solution

stability of these gold(III) complexes [16,17] facilitated extensive pharmacological investigation, both in vitro and in vivo [18–22].

However, compared to the corresponding Pt(II) complexes, ligand substitution reactions of gold(III) complexes [23–26] have not been extensively studied. Probably because of their poor kinetic and redox stabilities, there is a tendency for reduction Au(III) to Au(I) and disproportionation to colloid Au(0) [27].

Interest in the reactions of some biological N-donor nucleophiles with gold(III) complexes could be very important because there is evidence of direct interactions of gold(III) complexes with DNA [20,28,29].

We have performed and now report here a detailed study on the complex formation kinetics of some selected gold(III) complexes, viz. $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ and $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (en is ethylenediamine, SMS is S-methyl-L-cysteine) with some biologically important molecules such as: 5'-GMP, inosine (INO), 5'-IMP and L-His. The reactions were studied in aqueous solutions at physiological pH (7.2), using stopped-flow technique. In addition, we evaluated and report here cytotoxic activity in vitro towards the chronic lymphocytic leukemia cells (CLL). It was envisaged that this study could throw more light on the interactions of gold(III) complexes with nitrogen-donor nucleophiles.

Fig. 1 shows the structures of the investigated complexes. The set of nucleophiles was selected because of their difference in nucleophilicity, steric hindrance, binding properties and biological relevance (structures are shown in Fig. 2).

* Corresponding author. Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia. Tel.: +381 34300262; fax: +381 34335040.
E-mail address: bugarcic@kg.ac.rs (Ž.D. Bugarčić).

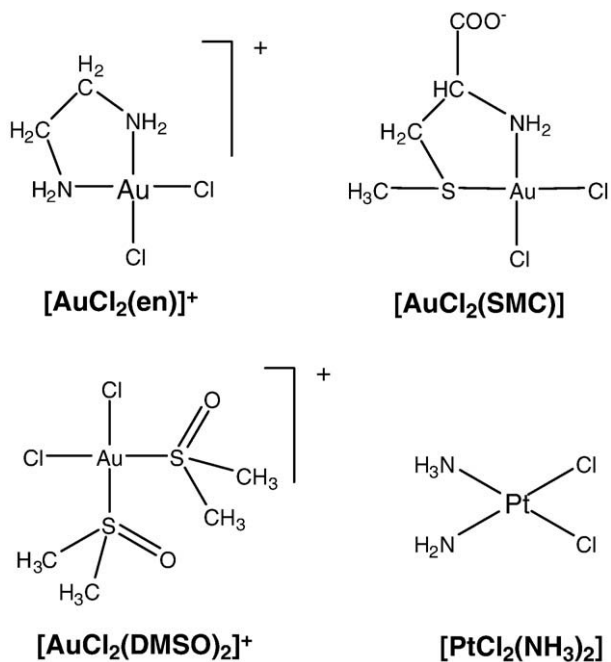


Fig. 1. Structures of the investigated complexes.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and solutions

The nucleophiles INO, 5'-IMP, 5'-GMP and L-His were obtained from Acros Organics and Fluka. Nucleophile stock solutions were prepared shortly before use by dissolving the chemicals in purified water. The ligands en, SMC and DMSO as well as Hepes buffer (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) were obtained from Aldrich. Starting potassium-tetrachloroaurate(III) compound, $\text{K}[\text{AuCl}_4]$, was purchased from ABCR GmbH & Co. KG, 98 %, while cisplatin, cis-diamminedichloroplatinum(II), cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, was purchased from Aldrich. All the other chemicals were of the highest purity commercially available and were used without further purification. Ultra pure water was used in all experiments.

For the cytotoxicity determination further chemicals were used: fetal bovine serum (FBS), growth medium RPMI 1640, penicillin G, streptomycin; (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT), phosphate-buffered saline (PBS); dimethyl sulphoxide (DMSO), histopaque 1077, trypan blue staining (all from Sigma Chemicals, Germany); 96 well plates (Sarstedt, Germany) and Haemacel (Theraselect GmbH, Germany).

2.2. Synthesis of complexes

The compound $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was prepared according to the published procedure [30]. $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$, was synthesized by dissolving KAuCl_4 (0.2 g, 0.53 mM) in 5 mL 0.05 M HCl in the dark.

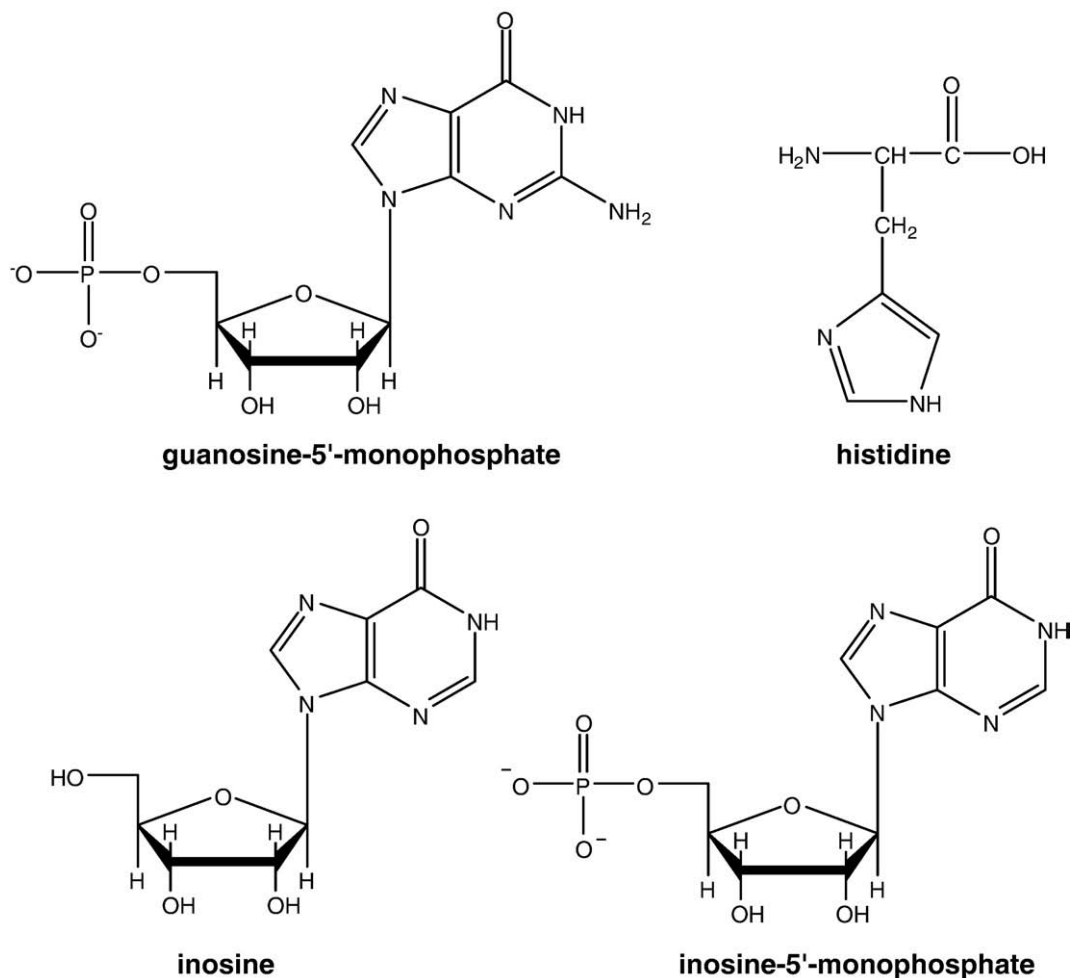


Fig. 2. Structures of studied nucleophiles.

Under continuous stirring to the solution were dropped, first, 75 μL of DMSO (1.06 μM) and later solution of 0.1 M NaOH, to adjust pH about 4.5. The mixture was stirred for 5 h at room temperature and the obtained yellow solution was left in the darkness to evaporate. After few days formed dark yellow crystals were filtrated, washed with cold water and dried. Found: H, 1.87; C, 7.21; S, 7.18. Calc. for $\text{AuC}_4\text{S}_2\text{O}_2\cdot\text{H}_{12}\text{Cl}_3$: H, 1.84; C, 7.32; S, 7.76%. $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ was synthesized starting from acid HAuCl_4 . An acid (0.2 g, 0.8 mmol) was dissolved in a little amount of water. To the solution was added S-methyl-L-cysteine (0.105 g, 0.8 mmol). After mixing the pH was adjusted between 4 and 5 with solution of 0.1 M NaOH. The mixture was stirred for a few hours and the clear solution was left to evaporate in the dark at room temperature. After few days a brown powder was formed. Found: H, 3.08; C, 10.73; N, 2.77; S, 7.01. Calc. for $\text{AuC}_4\text{SO}_3\cdot\text{H}_{11}\text{NCl}_3$: H, 3.07; C, 10.52; N, 3.07; S, 7.02%.

2.3. Instrumentation

Chemical analyses were performed on a Varian III CHNOS Elemental Analyzer, Elemental Analysensysteme, GmbH. The optical density was measured using microplate multimode detector Zenyth 3100. UV-visible (UV-VIS) spectra were recorded on Shimadzu UV 250 and Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrophotometers with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. Kinetic measurements were carried out on an Applied Photophysics SX.18MV stopped-flow instrument coupled to an online data acquisition system. The temperature was controlled throughout all kinetic experiments to $\pm 0.1^\circ\text{C}$. All kinetic measurements were performed under *pseudo*-first-order conditions, i.e., at least a 10-fold excess of the entering nucleophile was used.

2.4. Kinetic measurements

Spectral changes resulting from the mixing of complex and nucleophile solutions were recorded over the wavelength range 220 to 450 nm to establish a suitable wavelength at which kinetic measurements could be performed (working wavelengths are given in Supp. inform. Tables S1–S8). Reactions were initiated by mixing equal volumes of the complex and ligand solutions directly in the stopped-flow instruments and were followed for at least eight half-lives. Complex-formation was monitored as a change in absorbance with time under *pseudo*-first-order conditions (an example is shown in Supp. inform. Fig. S1). The kinetic traces were evaluated using the OLIS KINFIT (Jeferson, GA) set of programs. All kinetic runs were fitted to a double exponential function. The observed *pseudo*-first-order rate constants, k_{obsd} , were calculated as the average value from five to eight independent kinetic runs. Experimental data are reported in Tables S1–S8 (Supp. material).

The temperature dependence of the second-order rate constants was studied for all substitution reactions, over the range from 15 to 37°C .

2.5. Cell preparation

Chronic lymphocytic leukemia cells (CLL) were obtained from heparinized whole blood of patients with chronic lymphocyte leukemia who had not been receiving therapy during the last six months. CLL cells were separated by density gradient centrifugation. Cells were washed three times in haemacel and resuspended in RPMI 1640 (20% FBS, 100 IU/mL penicillin G and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin). Cell number and viability were determined by trypan blue staining. The study was approved by the Ethics Committee of Clinical Center "Kragujevac". Patients signed the informed consent forms.

2.6. Cytotoxicity assay (MTT)

Gold(III) complexes are biologically active substances of special interest as potential anticancer agents. Effects of $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ and cisplatin, $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, on cell viability were determined using MTT colorimetric technique [31]. CLL cells were diluted with a medium to 1×10^6 cells/mL and aliquots (5×10^5 cells/100 μL) were placed in individual wells in 96-multiplates. In addition, each well received 100 μL of either $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ or cisplatin, which had been serially diluted 2-fold in a medium to concentrations ranging from 250 μM to 7.8 μM . Cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2 incubator for 24 h. After incubation multiplates were centrifuged, supernatant was removed, MTT solution (5 mg/mL in PBS, 10 μL) was added to each well and the plates were incubated for an additional 4 h. The multiplates were centrifuged, cell-free supernatants were suctioned off, and DMSO (150 μL) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula (Eq. (1)):

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 - ((TS - BGO) - E) / (TS - BGO) \times 100 \quad (1)$$

where BGO is for background of medium alone, TS is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is for experimental well.

3. Results and discussion

3.1. Kinetic measurements

Here we report the results of kinetic studies of some d^8 square-planar bifunctional gold(III) complexes. The substitution reactions of $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ and $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ with nitrogen bonding nucleophiles Ino, 5'-IMP, 5'-GMP and L-His were investigated spectrophotometrically by following the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time under *pseudo*-first-order conditions. All reactions were studied at physiological pH 7.2 in 25 mM Hepes with the presence of 10 mM NaCl, to prevent the hydrolysis of the complexes. All reactions were studied as a function of nucleophile concentration and temperature using stopped-flow technique. The complex, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, was unstable and spontaneously reduced under the experimental conditions, so it was not possible to study the complex formation.

Following the changes of absorbance of the reaction mixture at suitable wavelength with the time we obtained kinetic traces for studied *pseudo*-first-order reactions. By fitting these data as a two exponential model in which the amplitudes have an opposite sign we obtained the values for the *pseudo*-first-order rate constants for the first ($k_{\text{obsd},f}$) and the second ($k_{\text{obsd},s}$) steps of the substitution.

The obtained *pseudo*-first order rate constants first ($k_{\text{obsd},f}$) and the second ($k_{\text{obsd},s}$) steps of the substitution were plotted versus the concentrations of the entering nucleophiles. A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all reactions. Representative plots for the substitution reactions of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex with nucleophiles Ino, 5'-IMP, 5'-GMP and L-His are shown in Fig. 3. Graphics, where is shown a temperature and concentration dependence of *pseudo*-first order rate constants for all studied substitution reactions, are presented in Supp. material (Figs. S2–S9).

Substitution reactions of square-planar Au(III) complexes under these experimental conditions can in general proceed according to Eqs. (2) and (3). The first step is a reversible process where in the direct reaction nucleophile substitutes one chloride ion from the coordination sphere of the starting complex. However, due to the presence of 10 mM NaCl, the solvolytic step is eliminated and the reaction becomes equilibrium. The second step is also in equilibrium

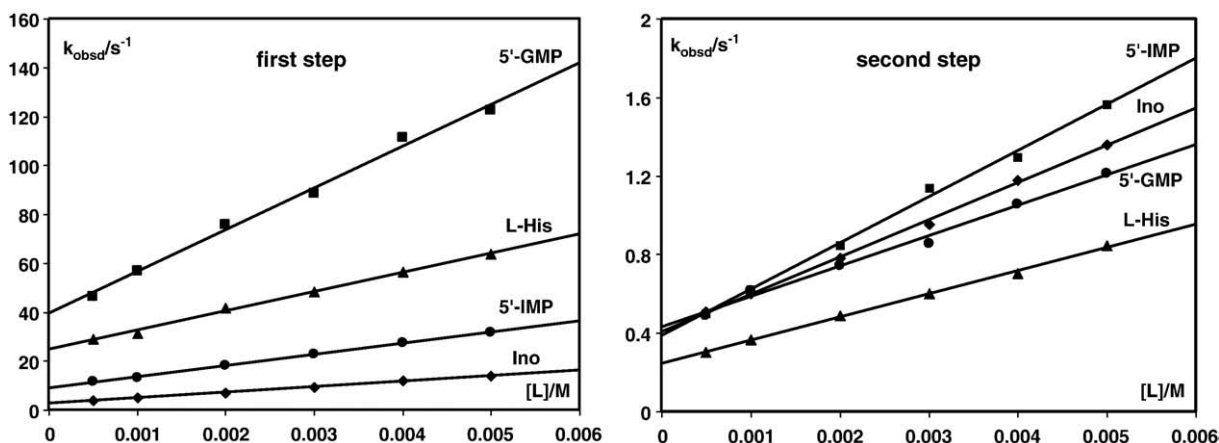
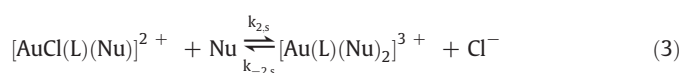
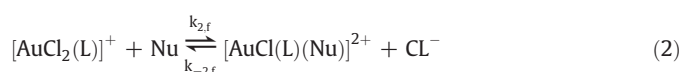


Fig. 3. Pseudo-first order rate constants, k_{obsd} , as a function of ligand concentration for the first and second steps of the substitution reactions between $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex and studied N-donor nucleophiles at 298 K in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) with the addition of 10 mM NaCl.

when another molecule of nucleophile substitutes the other chloride ion [32].



L = S-methyl-L-cysteine or ethylenediamine

Nu = 5'-GMP, 5'-IMP, Ino or L-His.

The observed pseudo-first-order rate constant, $k_{\text{obsd},f}$ as a function of the total concentration of nucleophile is described by Eq. (4) and the rate constants $k_{2,f}$ and $k_{-2,f}$ can be determined from the slopes and intercepts of the plots (Fig. 3).

$$k_{\text{obsd},f} = k_{-2,f} + k_{2,f}[\text{Nu}]. \quad (4)$$

The observed rate constants for the second reaction step can be expressed as given in Eq. (5).

$$k_{\text{obsd},s} = k_{-2,s} + k_{2,s}[\text{Nu}]. \quad (5)$$

All kinetic traces gave excellent fits to a double exponential (an example is shown in Fig. S1, Supp. mat.). The rate constants for the first and the second reaction steps for the all reactions, calculated by Origin 6.1, are summarized in Table 1 and in Table S9 (Supp. material).

The first reaction step occurs via nucleophilic attack of the N7 donor atom of purine base comprised in INO, 5'-IMP and 5'-GMP nucleophiles, or N3 donor atom of imidazole ring in the case of His, resulting in the formation of a product by departure of one chloride ion [33,34]. The rate constant for the first reaction step ($k_{2,f}$) for the reaction of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex shown the order of reactivity of used nucleophiles. Surprisingly, the highest reactivity shows 5'-GMP, while L-histidine, as the smallest nucleophile, reacts slower than 5'-GMP. Slightly less reactivity shows 5'-IMP and Ino. This order of reactivity of these N-bonding nucleophiles can be attributed to their electronic and steric properties. The complex $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ is neutral because carboxylic group of coordinated amino-acid is ionized at pH = 7.2. The reactivity of used ligands toward $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ complex follows a different order: His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino.

The second step is the substitution of another chloride ion of the studied Au(III) complexes with nucleophiles, resulting in formation of 1:2 complexes. However, the second step is slower compared to the first step for all substitution reactions, about 10–20 times, respec-

tively. Also, the order of reactivity of nucleophiles in the case of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex is not the same as it was in the first step. The kinetic data clearly show that 5'-GMP reacts faster with studied complexes than 5'-IMP and Ino. At pH = 7.2, coordination via the N7 atom is occurring. The higher reactivity of nucleotides than Ino can be attributed to a primary process that involves partial pre-association of the metal complexes with the phosphate group in 5'-GMP and 5'-IMP. In the case of Pt(II) complexes this process slows down the reaction rate [35], but in the case of Au(III) complexes the influence is opposite.

The less voluminous L-histidine reacts faster than the other three N-donor nucleophiles in the reaction with $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ complex. But, in the reaction with $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex partial pre-association of 5'-GMP has a dominant influence on the reaction rate [35] although L-histidine is smaller and N3 atom at pH = 7.2 completely deprotonated [36].

Also, the type of coordinated inert ligand has a large effect on reaction rate. The reactions of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex are approximately two order of magnitude faster than those with $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ complex. The difference in the reactivity between these two complexes could be explained by electronic differences between SMC and en.

Table 1

Rate constants and activation parameters for the first ($k_{2,f}$) and second ($k_{2,s}$) steps of the substitution reactions of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ and $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ complexes at 298 K in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2 and 10 mM NaCl).

$\text{AuCl}_2(\text{SMC})$	$k_{2,f}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
His	$(7.86 \pm 0.03) \cdot 10^3$	35 ± 3	-70 ± 10
Ino	$(2.20 \pm 0.05) \cdot 10^3$	21 ± 1	-123 ± 3
5'-IMP	$(4.59 \pm 0.06) \cdot 10^3$	43 ± 2	-46 ± 6
5'-GMP	$(1.71 \pm 0.07) \cdot 10^4$	13 ± 2	-136 ± 4
	$k_{2,s}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
His	$(1.18 \pm 0.03) \cdot 10^2$	41 ± 2	-84 ± 6
Ino	$(1.89 \pm 0.04) \cdot 10^2$	31 ± 3	-120 ± 10
5'-IMP	$(2.35 \pm 0.07) \cdot 10^2$	35 ± 3	-100 ± 10
5'-GMP	$(1.54 \pm 0.07) \cdot 10^2$	37 ± 4	-100 ± 10
$[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$	$k_{2,f}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
His	51 ± 2	14 ± 5	-170 ± 10
Ino	6.3 ± 0.4	–	–
5'-IMP	14 ± 1	–	–
5'-GMP	33 ± 2	24 ± 3	-140 ± 10
	$k_{2,s}/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
His	5.7 ± 0.5	19 ± 2	-168 ± 8
Ino	$(2.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$	–	–
5'-IMP	1.7 ± 0.2	–	–
5'-GMP	2.5 ± 0.1	26 ± 2	-154 ± 9

The temperature dependence was studied for the most reactions. The entropy of activation is large and negative, which is in line with an associative substitution mechanism [32]. In all cases, the activation entropies for the first and for the second reactions are negative.

The complex $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ reacts about 10^6 – 10^7 times faster than cisplatin, while $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ reacts 10^3 – 10^4 times faster. These results confirm the fact that reactions of Au(III) complexes are much faster than Pt(II) complexes [6,8,23,35].

3.2. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay experiments were conducted to determine effects of Au(III) complexes and cisplatin on cell viability using a CLL cells as target cells [37–39]. All of four complexes showed cytotoxic effect on CLL cells (Fig. 4). The concentration decrease is followed by markedly decrease of apoptotic cell's percentage.

The concentrations from 250 μM to 15.6 μM of $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ complex showed higher cytotoxic effect in comparison with the same concentrations of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$. However, concentrations from 250 μM to 15.6 μM of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ showed significantly lower cytotoxic effect in comparison with the same concentrations of $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ and cisplatin.

The concentration 15.6 μM of all tested Au(III) complexes and cisplatin complex showed approximately the same cytotoxic effect on CLL cells (in range 1.5–3.6% of cytotoxicity) while the concentration 7.8 μM of all studied Au(III) complexes and cisplatin showed no cytotoxic effect on CLL cells.

All of three tested gold(III) complexes and cisplatin complex (concentration from 250 μM to 7.8 μM) showed concentration-dependent cytotoxic effect on CLL cells.

4. Conclusions

In conclusion this work demonstrated that gold(III) complexes react much faster than Pt(II) complexes with the same nucleophiles. N-bonding ligands have a higher affinity for gold(III) complex than chloride, which may have important biological implications. The type of coordinated inert ligand has a large effect on reaction rate. The $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ complex is more reactive than $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$. Histidine reacts faster than the other N-donor nucleophiles in the reaction with $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, but in the reaction with $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$ 5'-GMP is the best nucleophile. The activation parameters for all studied reactions suggest an associative substitution mechanism. This study also demonstrated that gold(III) complexes exhibit relevant cytotoxic properties when tested on chronic lymphocytic leukemia cells (CLL).

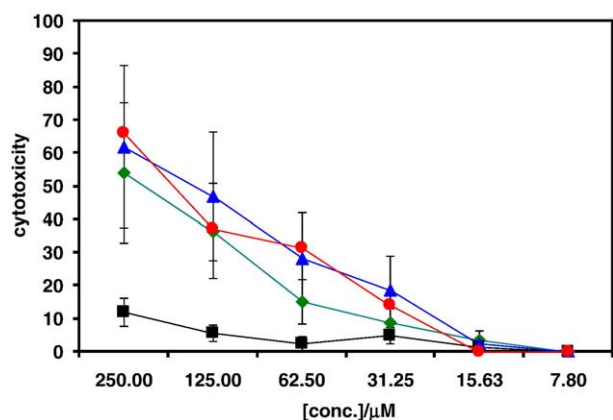


Fig. 4. Cytotoxicity of (♦) $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$, (■) $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]$, (▲) $[\text{AuCl}_2(\text{en})_2]^+$ and (●) cisplatin to CLL cells. CLL cells were cultured with different doses of tested complexes ranging from 7.8 to 250 μM . Cell viability was determined based on MTT assay. Each point represents a mean value and standard deviation of 3 experiments with 3 replicates per dose.

Thus, gold complexes have good potential for the treatment of cancer. The $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$ complex shows comparable cytotoxicity profiles compared to cisplatin. In line with the obtained results $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ complex seems to be good candidates for future pharmacological evaluation.

Abbreviations

INO	inosine
5'-IMP	inosine-5'-monophosphate
FBS	fetal bovine serum
MTT	3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide
PBS	phosphate buffered saline
CLL	lymphocyte leukemia cells
BGO	background of medium
TS	total viability/spontaneous death of untreated target cells
RPMI 1640	mixture of 20% FBS, 100 IU/mL penicillin G and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin developed by Moore at al. at Roswell Park Memorial Institute.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia, project No. 142008 and No. 145065. Also, we would like to thank Dr. Snežana Trifunović, from the Faculty of Chemistry, University of Belgrade, for elementary analysis of the complexes.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.04.014.

References

- [1] B. Lippert (Ed.), *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.
- [2] Y. Yung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* 107 (2007) 1387–1406.
- [3] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Dalton Trans.* (2008) 183–194.
- [4] X. Wang, Z. Guo, *Dalton Trans.* (2008) 1521–1532.
- [5] L. Ranconi, P.J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 1633–1648.
- [6] P.J. Sadler, R.E. Sue, *Metal Based Drugs* 1 (1994) 107–144.
- [7] S.L. Best, P.J. Sadler, *Gold Bull.* 29 (1996) 87–93.
- [8] O.M. Ni Dhubhghaill, P.J. Sadler, in: B.K. Keppler (Ed.), *Gold Complexes in Cancer Chemotherapy, Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, 1993, pp. 221–248.
- [9] C. Gabbiani, A. Casina, L. Messori, *Gold Bull.* 40 (2007) 73–81.
- [10] L.H. Skibsted, in: A.G. Skypes (Ed.), *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, Academic Press, 1986, pp. 137–183.
- [11] C.F. Shaw III, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2589–2600.
- [12] L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3541–3548.
- [13] I. Ott, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 167–1681.
- [14] R.C. 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.* 39 (1996) 5208–5214.
- [15] P. Calamai, S. Carotti, A. Guerri, T. Mayyeyi, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, G.P. Speroni, *Anticancer Drug Des.* 13 (1998) 67–80.
- [16] L. Giovagnini, L. Ronconi, D. Aldinucci, D. Lorenzon, S. Sitran, D. Fregoni, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 1588–1595.
- [17] C.M. Che, R.W.Y. Sun, W.Y. Yu, C.B. Ko, N.Y. Zho, H.Z. Sun, *Chem. Commun.* (2003) 1718–1719.
- [18] A. Casina, C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P.J. Dyson, B.K. Keppler, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 564–575.
- [19] E.R.T. Tieking, *Inflammopharmacology* 16 (2008) 138–142.
- [20] L. Messori, P. Orioli, C. Tempi, G. Marcon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281 (2001) 352–360.
- [21] A. Garza-Ortiz, H. den Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A.L. Spek, J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 1922–1930.
- [22] A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M. Agostina Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H.-H. Fiebig, L. Messori, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 1139–1149.
- [23] A. Ericson, J.C. Arthur, R.S. Coleman, L.L. Elding, S.K.C. Elmroth, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1998) 1687–1692.
- [24] B. Pitteri, M. Bortoluzzi, *Trans. Met. Chem.* 31 (2006) 1028–1033.

- [25] B. Pitteri, M. Bortoluzzi, V. Bertolasi, *Trans. Met. Chem.* 33 (2008) 649–654.
- [26] A.V. Vujačić, J.Z. Savić, S.P. Sovilj, K. Mesyaros Syecsenzi, N. Todorović, M.Ž. Petković, V.M. Vasić, *Polyhedron* 28 (2009) 593–599.
- [27] P. Calamai, A. Guerri, L. Messori, P. Orioli, G.P. Speroni, *Inorg. Chim. Acta* 35 (1999) 1659–1667.
- [28] C.K. Mirabelli, R.K. Johnson, C.M. Sung, L.F. Faucette, K. Muirhead, S.T. Crooke, *Cancer Res.* 45 (1985) 32–39.
- [29] S.T. Crooke, C.K. Mirabelli, *Am. J. Med.* 75 (1983) 109–113.
- [30] S. Zhu, W. Gorski, D.R. Powell, J.A. Walmsley, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 2688–2694.
- [31] T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [32] M.L. Tobe, J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison Wesley Longman Inc., Essex, 1999.
- [33] J. Arpalahti, M. Mikola, S. Mauristo, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 3327–3332.
- [34] Y. Mizuna, S. Komiya, *Inorg. Chim. Acta* (1986) L13–L15.
- [35] Ž.D. Bugarčić, T. Soldatović, R. Jelić, B. Alguero, A. Grandas, *Dalton Trans.* (2004) 3869–3877.
- [36] S. Rajkovic, C. Kallay, R. Serenyi, G. Malandrinos, N. Hadjiladis, D. Sanna, I. Savago, *Dalton Trans.* (2008) 5059–5071.
- [37] L. Pleyer, A. Egle, T.N. Hartmann, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7 (2009) 405–418.
- [38] J. Chen, N.A. McMillan, *Cancer Biol. Ther.* 2 (2008) 174–179.
- [39] J. Chen, K.V. Inamdar, C.E. Bueso-Ramos, *Ann. Diagn. Pathol.* 5 (2007) 363–389.

Kinetics and mechanism of the reactions of Au(III) complexes with some biologically relevant molecules†

Ana Djeković,^a Biljana Petrović,^a Živadin D. Bugarčić,^{*a} Ralph Puchta^b and Rudi van Eldik^{*b}

Received 29th September 2011, Accepted 20th December 2011

DOI: 10.1039/c2dt11843b

The kinetics of the substitution reactions between the mono-functional Au(III) complexes, [Au(dien)Cl]²⁺ and [Au(terpy)Cl]²⁺ (dien = 3-azapentane-1,5-diamine, terpy = 2,2',6',2''-terpyridine) and bi-functional Au(III) complexes, [Au(bipy)Cl]²⁺ and [Au(dach)Cl]²⁺ (bipy = 2,2'-bipyridine, dach = (1*R*,2*R*)-1,2-diaminocyclohexane) and biologically relevant ligands such as L-histidine (L-His), inosine (Ino), inosine-5'-monophosphate (5'-IMP) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), were studied in detail. All kinetic studies were performed in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of NaCl to prevent the spontaneous hydrolysis of the chloride complexes. The reactions were followed under *pseudo*-first order conditions as a function of ligand concentration and temperature using stopped-flow UV-vis spectrophotometry. The results showed that the mono-functional complexes react faster than the bi-functional complexes in all studied reactions. The [Au(terpy)Cl]²⁺ complex is more reactive than the [Au(dien)Cl]²⁺ complex, which was confirmed by quantum chemical (DFT) calculations. A more than 50% lower activation energy for the terpy than for the dien based complex was found. The bi-functional [Au(bipy)Cl]²⁺ complex is more reactive than the [Au(dach)Cl]²⁺ complex. The reactivity of the studied nucleophiles follows the same order for all studied systems, *viz.* L-His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino.

According to the measured activation parameters, all studied reactions follow an associative substitution mechanism. Quantum chemical calculations (B3LYP/LANL2DZp) suggest that ligand substitution in [Au(terpy)Cl]²⁺ and [Au(dien)Cl]²⁺ by imidazole follows an interchange mechanism with a significant degree of associative character. The results demonstrate the strong connection between the reactivity of the complexes toward biologically relevant ligands and their structural and electronic characteristics. Therefore, the binding of gold(III) complexes to 5'-GMP, constituent of DNA, is of particular interest since this interaction is thought to be responsible for their anti-tumour activity.

Introduction

One of the major goals of modern bioinorganic and bio-organometallic medicinal chemistry research is the development of novel metallo drugs with a pharmacological activity different from platinum drugs.^{1–11} Among the new non-platinum anti-tumour drugs, gold complexes have recently gained considerable attention as a class of compounds with different pharmacodynamic and -kinetic properties than cisplatin, but with strong cell growth inhibiting effects.^{3,4} In many cases the cell growth inhibiting effects could be related to anti-mitochondrial effects that make the gold complexes interesting drugs.^{1,3} Some gold

complexes described as antiproliferative comprise a broad variety of different species including phosphine complexes, as well as gold complexes in different oxidation states.¹² Also, some Au(I) compounds used for the treatment of rheumatoid arthritis, such as gold thiolates, were considered for possible anti-tumour activity.¹ It has been shown that Au(I) compounds inhibit tumour cell proliferation *in vitro*,⁴ but unfortunately their *in vivo* effectiveness was found to be very limited.^{1–4}

Since Au(III) is iso-electronic and iso-structural with Pt(II), square planar Au(III) complexes could be suitable candidates for biological tests.⁶ However, during the early 90's there was a revival of interest toward Au(III)-based anti-tumour compounds in an attempt to obtain pharmaceutically useful substances with an even better stability profile. As a result, some structurally variable square planar Au(III) complexes were prepared and tested as potentially new anti-tumour drugs.^{3,8–15} These novel Au(III) complexes show high cytotoxic effects *in vitro* against some representative human tumour lines, but their mode of action is still unknown. However, gold compounds have a lower affinity for DNA than platinum complexes, so their mode of action is referred to as "DNA independent".⁸ These observations

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: bugarcic@kg.ac.rs; Fax: +381(0)34335040; Tel: +381(0)34300262

^bInorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nürnberg, Egerlandstrasse 1, 91058 Erlangen, Germany. E-mail: vaneldik@chemie.uni-erlangen.de; Fax: +49(0)91318527387; Tel: +49(0)91318527350

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2dt11843b

led many scientists to postulate the existence of some other potential targets for gold complexes, such as thioredoxin reductase.

Cytotoxic effects of novel Au(III) compounds were measured on very few and often different tumour cell lines.^{16–22} Recently reported results have shown that several new Au(III) dithiocarbamate derivatives *in vitro* have even better cytotoxic properties than cisplatin toward a series of human tumour cell lines.^{8–12,23} Also, some Au(III) complexes show a very weak interaction with calf thymus DNA and slight modifications of the double helix.²⁴ Some Au(III) complexes could be significantly stabilized, even at neutral pH, with the appropriate choice of the inert ligands, preserving its peculiar biological properties. Thus, the presence of at least two nitrogen donors directly coordinated to the Au(III) centre leads to a significant decrease in the reduction potential of the complex.^{25–27}

In an attempt to define preliminary structure–function relationships within the new class of cytotoxic and potentially antitumour compounds, we studied the interactions between some Au(III) complexes with representative DNA fragments, the classic target of Pt(II) complexes. These results could throw more light on the cytotoxic action and mechanism of Au(III) complexes. Also, the investigation of the reactions between Au(III) complexes and amino acids could predict some gold–protein interactions and improve the understanding of possible targets responsible for their biological effects. Here we report the results of the kinetics of the substitution reactions of some mono-functional $[\text{AuCl}(\text{dien})]^{2+}$ and $[\text{AuCl}(\text{terpy})]^{2+}$, and bi-functional $[\text{AuCl}_2(\text{bipy})]^+$ and $[\text{AuCl}_2(\text{dach})]^+$ complexes, with biologically relevant ligands such as L-histidine, inosine, inosine-5'-monophosphate and guanosine-5'-monophosphate. All kinetic studies were performed in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) with the addition of NaCl to prevent the spontaneous hydrolysis of the complexes, under *pseudo*-first order conditions at three different temperatures. In addition, quantum mechanical calculations were performed to gain further insight into the nature of the ligand substitution mechanism for the reactions of $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ with imidazole.

The structures of the studied complexes and ligands are shown in Fig. 1 and 2.

Experimental

Chemicals

The nucleophiles inosine (Ino), inosine-5'-monophosphate sodium salt hydrate (5'-IMP), guanosine-5'-monophosphate sodium salt hydrate (5'-GMP), and L-histidine (L-His) were obtained from Acros Organics and Fluka. Nucleophile stock solutions were prepared shortly before use by dissolving the chemicals in ultra pure water. The ligands 2,2':6',2''-terpyridine (terpy) and 3-azapentane-1,5-diamine (dien), as well as Hepes buffer (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) were obtained from Aldrich. Other ligands 2,2'-bipyridyl (bipy) and (1*R*,2*R*)-1,2-diaminocyclohexane (dach) were also obtained from Acros Organics. The starting complex potassium-tetrachloridoaurate(III), $\text{K}[\text{AuCl}_4]$, was purchased from ABCR GmbH & Co. KG, 98%. All other chemicals were of the highest

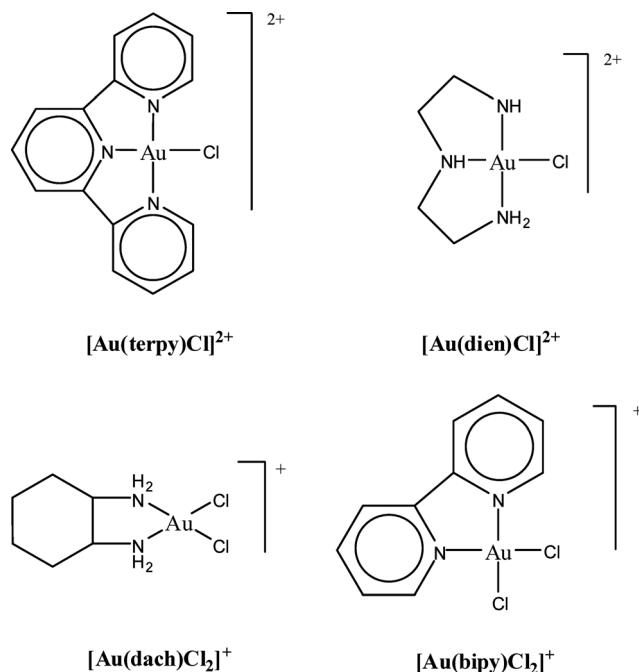


Fig. 1 Structures of the investigated mono-functional and bi-functional Au(III) complexes.

purity commercially available and were used without further purification. Ultra pure water was used in all experiments.

The solutions of complexes and ligands were prepared in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2). To prevent the hydrolysis of the studied complexes, the reactions of the mono-functional complexes were studied in the presence of 10 mM NaCl, whereas the reactions of the bi-functional complexes were studied in the presence of 20 mM NaCl. These concentrations were determined from spectra of the different Au(III) complexes recorded as a function of added chloride concentration (see Fig. S1 and S2, ESI).†

Synthesis of the complexes

The complexes $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}_2$, $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ were prepared according to published procedures.^{28–30} The complex $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ was synthesized starting from $\text{K}[\text{AuCl}_4]$. Firstly, the salt (0.2 g, 0.5 mmol) was dissolved in a small amount of water. Then the solution obtained by dissolving (1*R*,2*R*)-1,2-diaminocyclohexane (0.057 g, 0.5 mmol) into a mixture of MeOH/H₂O (1 : 1, v/v) was dropped into the solution of $\text{K}[\text{AuCl}_4]$. The reaction was stirred for 5 h at room temperature. The obtained yellow solution, after filtration, was left in the darkness to evaporate. After a few days the formed yellow crystals were filtrated, washed with cold water and dried. Found: H, 5.29; C, 13.66; N, 2.54; Calc. for $\text{AuC}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_3$: H, 5.34; C, 13.80; N, 2.71%.

Instrumentation

Chemical analyses were performed on a Varian III CHNOS Elemental Analyzer, Elemental Analysensysteme, GmbH.

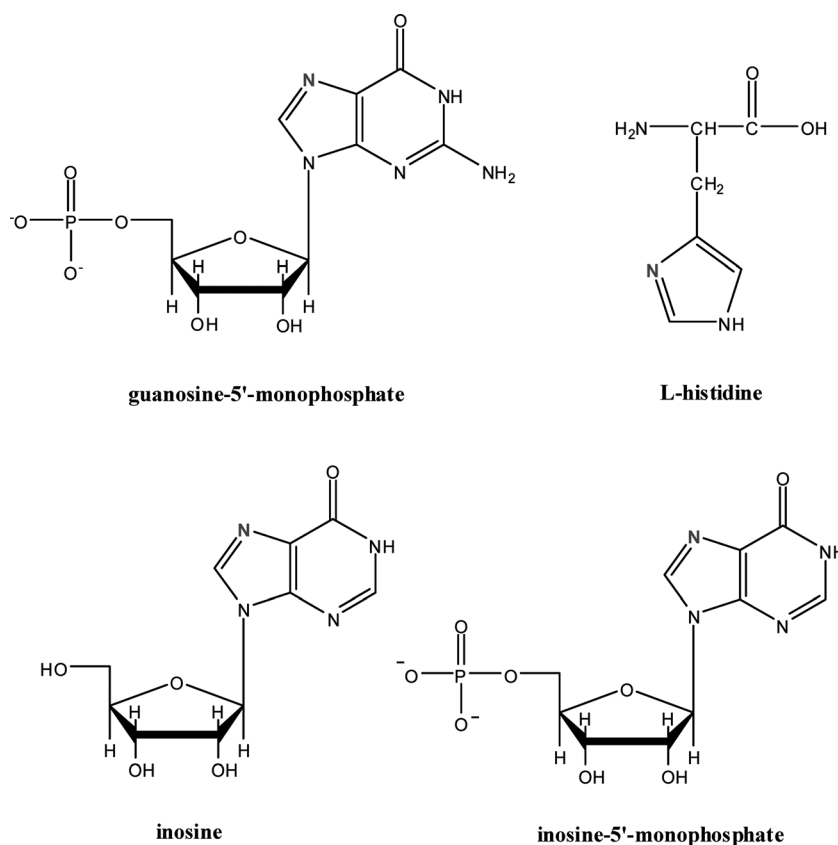


Fig. 2 Structures of the studied nucleophiles.

UV-VIS spectra were recorded on Shimadzu UV 250 and Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrophotometers with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. Kinetic measurements were performed on an Applied Photophysics SX.18MV stopped-flow instrument coupled to an online data acquisition system. The temperature was controlled throughout all kinetic experiments to ± 0.1 K.

Kinetic Measurements

To establish a suitable wavelength at which the kinetic measurements could be performed, spectral changes that resulted from mixing the complex and nucleophile solutions were recorded over the wavelength range 280 to 400 nm, and a suitable wavelength was selected. A typical example is shown in Fig. S3 (ESI).[†] After determination of the working wavelengths (see Tables S1 to S16, ESI),[†] the reactions were initiated by mixing equal volumes of the complex and ligand solutions directly in the stopped-flow instrument and followed until completion. All kinetic measurements were performed under *pseudo*-first-order conditions, *i.e.*, at least a 10-fold excess of the entering nucleophile was used. The kinetic traces were evaluated using the OLIS KINFIT (Jefferson, GA) set of programs. Kinetic runs were fitted as a single exponential function for the substitution reactions of the mono-functional $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ complexes, and as a double exponential function for the bi-functional $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ complexes (see Fig. S4, ESI,[†] where the decrease in the absorbance at 320 nm for the starting complexes is shown).

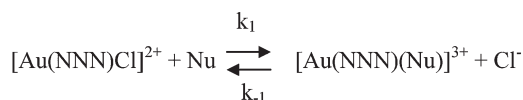
The observed *pseudo*-first-order rate constants, k_{obsd} , were calculated as the average value of five to eight independent kinetic runs. All reactions were followed at three different temperatures (288, 298 and 310 K). All calculations were performed by the computational programs Microsoft Excel and Origin 6.1. Observed experimental data are reported in Tables S1 to S18 (ESI).[†]

Quantum chemical methods

B3LYP/LANL2DZp hybrid density functional calculations, *i.e.*, with pseudo-potentials on the heavy elements and the valence basis set augmented with polarization functions, were performed.^{31,32} During the optimization of the structures no other constraints than symmetry were applied. In addition, the resulting structures were characterized as minima or transition state structures by computation of vibrational frequencies (for minima, all frequencies are positive, $\text{NImag} = 0$; for transition state structures, exactly one imaginary (negative) frequency is present, $\text{NImag} = 1$). The relative energies were corrected for zero point vibrational energies (ZPE) throughout. The GAUSSIAN suite of programs was used.³³ The influence of the bulk solvent was evaluated *via* single-point calculations using the CPCM formalism,³⁴ *i.e.*, B3LYP(CPCM)/LANL2DZp/B3LYP/LANL2DZp, and water as solvent.

Results and Discussion

Substitution reactions of the Au(III) complexes $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$, $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ with the



NNN = terpy, dien; Nu = 5'-GMP, 5'-IMP, Ino, L-His

Scheme 1

nucleophiles Ino, 5'-IMP, 5'-GMP and L-His were investigated spectrophotometrically by following the change of absorbance at the selected wavelengths as a function of time under *pseudo*-first-order conditions. All reactions were studied at physiological conditions (pH = 7.2) in 25 mM Hepes buffer. In order to suppress the spontaneous hydrolysis of the complexes, NaCl was added to the complex solutions. All reactions were studied as a function of nucleophile concentration and temperature using stopped-flow measurements.

The substitution process of the mono-functional $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ complexes with selected nucleophiles can in general proceed according to the reactions shown in Scheme 1.

Substitution reactions of square-planar metal complexes proceed according to two parallel pathways.^{13,35} One involves the formation of a solvent-coordinated complex, followed by rapid substitution of the coordinated solvent molecule by the entering nucleophile (solvolytic pathway), and the other involves direct nucleophilic attack by the entering nucleophile. In the present study the solvolysis pathway was suppressed through the addition of 10 mM NaCl (Fig. S),[†] and the remaining direct nucleophilic attack proceeds in a reversible manner as suggested in Scheme 1. Under *pseudo*-first-order conditions, these rate constants can be determined from the plot of the linear dependence of k_{obsd} versus total nucleophile concentration, according to the eqn (1). The slope of the line represents k_1 , whereas the intercept represents $k_{-1}[\text{Cl}^-]$. All kinetic data are summarized in Tables S1–S8 (ESI).[†]

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

Fig. 3 and 4 present representative plots of the data obtained for the substitution reactions of the mono-functional $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ complexes with Ino. The corresponding plots for the reactions with the other nucleophiles are given in Fig. S5–S10 (ESI).[†] The calculated values for the rate constants k_1 and $k_{-1}[\text{Cl}^-]$ for all the studied reactions are summarized in the Table 1.

From the values of the rate constants it can be seen that the $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ complex reacts faster than $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ with the selected nucleophiles by about three orders of magnitude. This difference in reactivity can be ascribed to the coordination geometry of the aromatic pyridine rings, leading to a relative increase in the electrophilicity of the metal centre as a consequence of electron density delocalization through the π -back bonding effects.^{35–38} The reactivity of the nucleophiles is the same for both complexes and follow the order L-His > 5'-GMP > 5'-IMP > Ino. The amino acid L-His, as the smallest nucleophile, reacts faster than the other nucleophiles and coordinates through the N3 donor atom of the imidazole ring under the selected

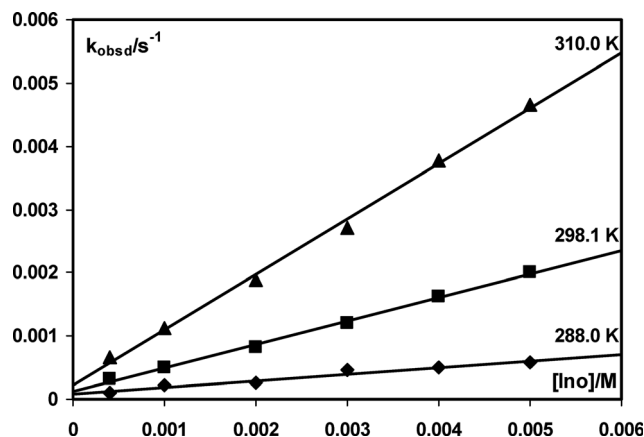


Fig. 3 *Pseudo*-first order rate constants, k_{obsd} , as a function of nucleophile concentration and temperature for the substitution reaction between $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ and Ino in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of 10 mM NaCl.

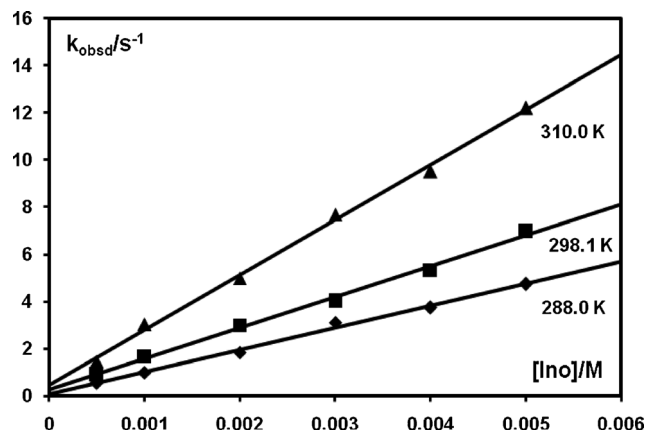


Fig. 4 *Pseudo*-first order rate constants, k_{obsd} , as a function of nucleophile concentration and temperature for the substitution reaction between $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and Ino in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of 10 mM NaCl.

experimental conditions as reported before.^{2,4} In the reactions with peptides and proteins, Au(III) complexes could bind strongly to N or O side-chains or to deprotonated amine nitrogens depending on the pH of the system.² The affinity of gold(III) for N-donor atoms has been confirmed by crystal structure and NMR studies.³⁹

The coordination of 5'-GMP, 5'-IMP and Ino is suggested to occur *via* nucleophilic attack of the N7 donor atom of the purine base, resulting in the formation of the product through displacement of chloride from the starting complex.² However, the presence of a primary process that involves partial pre-association of the metal complexes with the phosphate group in 5'-GMP and 5'-IMP, has a significant influence on the increase in their reactivity compared to inosine.⁴⁰ These electrostatic interactions can contribute to offer a better explanation for the stability and cytotoxic effects of the products formed between some mono-functional gold(III) complexes and DNA.²⁴

The substitution reactions of $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ with the nucleophiles Ino, 5'-IMP, 5'-GMP and L-His were also studied at the physiological pH 7.2 in 25 mM Hepes buffer

Table 1 Rate constants and activation parameters for substitution reactions of mono-functional $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ complexes at 298 K in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) and 10 mM NaCl

	$k_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$	$k_{-1}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1a}$	$\Delta H_{-1}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{-1}^\ddagger/\text{J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$
$[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$						
L-His	1.94 ± 0.05	27 ± 4	-140 ± 10	0.32 ± 0.02	16 ± 3	-200 ± 8
5'-GMP	1.24 ± 0.02	24 ± 1	-154 ± 4	0.268 ± 0.006	13 ± 3	-190 ± 9
5'-IMP	0.399 ± 0.003	60 ± 4	-53 ± 10	$(8.0 \pm 0.7) \times 10^{-2}$	47 ± 1	-111 ± 4
Ino	0.370 ± 0.009	69 ± 1	-38 ± 4	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	29 ± 4	-200 ± 10
$[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$						
L-His	$(3.56 \pm 0.08) \times 10^3$	40 ± 2	-40 ± 5	270 ± 20	13 ± 2	-148 ± 6
5'-GMP	$(2.25 \pm 0.03) \times 10^3$	49 ± 7	-31 ± 8	89 ± 9	35 ± 2	-66 ± 6
5'-IMP	$(2.11 \pm 0.07) \times 10^3$	10 ± 3	-142 ± 9	194 ± 2	7 ± 1	-177 ± 5
Ino	$(1.30 \pm 0.04) \times 10^3$	29 ± 4	-90 ± 10	28 ± 2	46 ± 2	-35 ± 7

^a Calculated from $k_{-1}[\text{Cl}^-]$ since $[\text{Cl}^-] = 10\text{ mM}$.

in the presence of 20 mM NaCl (Fig. S2, ESI),[†] to prevent hydrolysis of the bi-functional complexes. Furthermore, overall absorbance changes measured during the observed reactions as a function of nucleophile concentration indicated that these depended strongly on the nucleophile concentration, thus pointing towards reversible reactions (see Fig. S11–S14, ESI).^{†41,42} The substitution process can therefore be described as shown in Scheme 2.

The first step of the reaction is the reversible substitution of one chloride ligand from the coordination sphere by the entering nucleophile. The second step is also reversible when the second chloride ligand is displaced by another nucleophile.

The obtained *pseudo*-first-order rate constants for the first ($k_{\text{obsd},f}$) and second ($k_{\text{obsd},s}$) steps of the substitution process (data are given in Tables S9–S16, ESI)[†] were plotted against the

concentrations of the entering nucleophiles. A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all reactions. Representative plots for the reactions of $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ with L-His are shown in Fig. 5 and 6, and the data for the other nucleophiles are reported in Fig. S15–S20 (ESI).[†]

The observed *pseudo*-first-order rate constant as a function of the total nucleophile concentration is described by eqn (2) and the rate constants $k_{2,f}$ and $k_{-2,f}[\text{Cl}^-]$ can be determined from the slopes and intercepts of the plots, respectively.

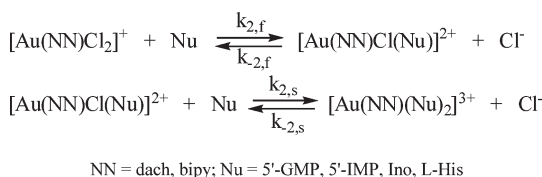
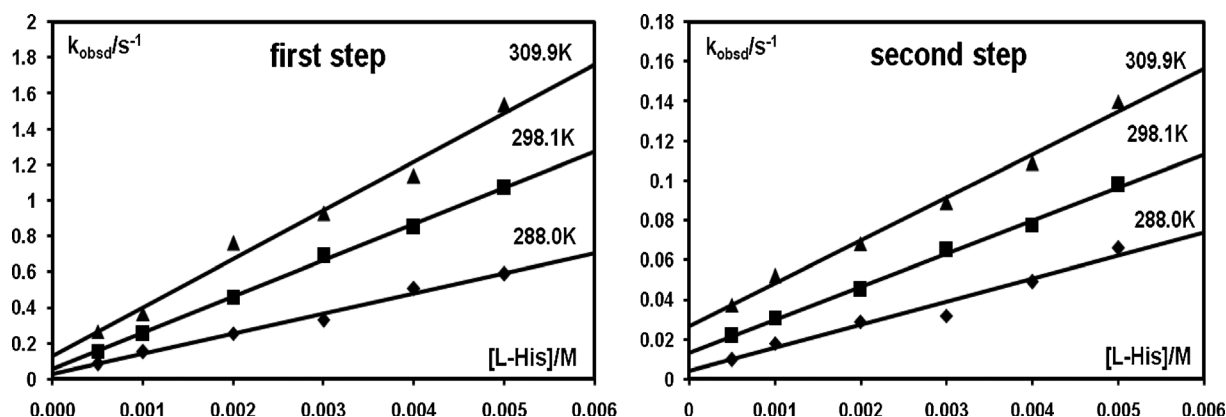
$$k_{\text{obsd},f} = k_{2,f}[\text{Nu}] + k_{-2,f}[\text{Cl}^-] \quad (2)$$

Similarly, the observed rate constants for the second reaction step can be expressed as given in eqn (3).

$$k_{\text{obsd},s} = k_{2,s}[\text{Nu}] + k_{-2,s}[\text{Cl}^-] \quad (3)$$

All kinetic traces gave excellent fits to a double exponential (a typical example is shown in Fig. S4, ESI).[†] The rate constants for the first and second reaction steps for the all reactions are summarized in Table 2.

The first reaction step occurs *via* nucleophilic attack of the N3 donor atom of the imidazole ring in the reaction with L-His or N7 donor atom of the purine base of in Ino, 5'-IMP and 5'-GMP,

**Scheme 2****Fig. 5** *Pseudo*-first order rate constants for the first ($k_{\text{obsd}1}$) and the second ($k_{\text{obsd}2}$) steps of the substitution reactions between $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ and L-His as a function of nucleophile concentration and temperature, in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of 20 mM NaCl.

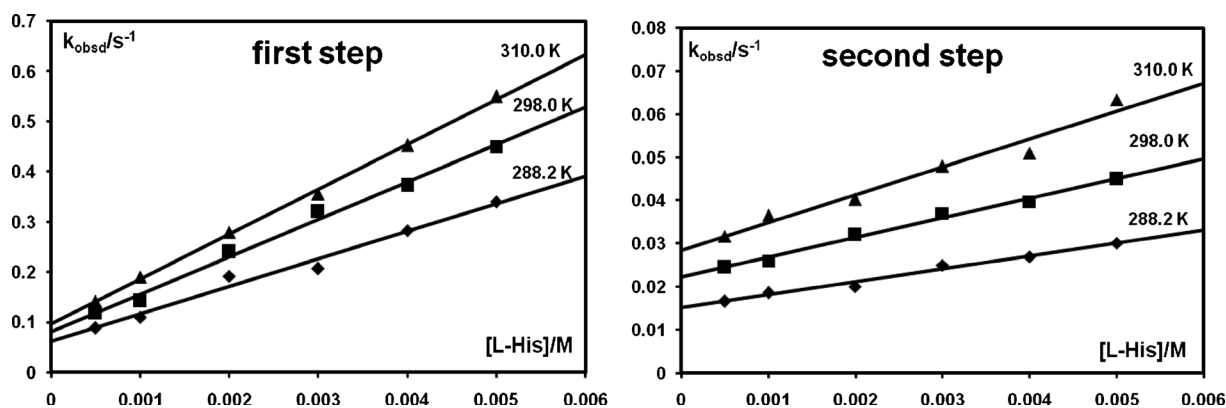


Fig. 6 Pseudo-first order rate constants for the first (k_{obsd1}) and the second (k_{obsd2}) steps of the substitution reactions between $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and L-His as a function of nucleophile concentration and temperature, in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of 20 mM NaCl.

Table 2 Rate constants and activation parameters for the first and the second steps of the substitution reactions of bi-functional $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ complexes at 298 K in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) and 20 mM NaCl

$[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$						
First step	$k_{2,\text{f}}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,\text{f}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{2,\text{f}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	$k_{-2,\text{f}}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1a}$	$\Delta H_{-2,\text{f}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,\text{f}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
L-His	$(2.04 \pm 0.06) \times 10^2$	26 ± 6	-110 ± 20	2.60 ± 0.05	47 ± 4	-80 ± 14
5'-GMP	$(1.49 \pm 0.05) \times 10^2$	5 ± 3	-180 ± 10	2.0 ± 0.5	68 ± 2	-6 ± 7
5'-IMP	$(0.47 \pm 0.02) \times 10^2$	—	—	23.1 ± 0.4	—	—
Ino	$(0.40 \pm 0.02) \times 10^2$	—	—	13.3 ± 0.4	—	—
a Calculated from $k_{-2}[\text{Cl}^-]$ since $[\text{Cl}^-] = 20 \text{ mM}$						
Second step	$k_{2,\text{s}}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,\text{s}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{2,\text{s}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	$k_{-2,\text{s}}/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-2,\text{s}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,\text{s}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
L-His	16.7 ± 0.6	17 ± 2	-160 ± 8	0.6 ± 0.1	70 ± 2	-15 ± 6
5'-GMP	10.3 ± 0.3	33 ± 3	-110 ± 10	2.0 ± 0.5	12 ± 4	-200 ± 14
5'-IMP	4.3 ± 0.5	—	—	3.7 ± 0.1	—	—
Ino	1.1 ± 0.1	—	—	1.05 ± 0.03	—	—
$[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$						
First step	$k_{2,\text{f}}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,\text{f}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{2,\text{f}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	$k_{-2,\text{f}}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-2,\text{f}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,\text{f}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
L-His	75 ± 2	12 ± 3	-160 ± 10	4.0 ± 0.1	11 ± 2	-190 ± 7
5'-GMP	66 ± 2	10 ± 3	-180 ± 10	9.3 ± 0.2	18 ± 3	-160 ± 10
5'-IMP	6.0 ± 0.3	—	—	0.20 ± 0.01	—	—
Ino	9.9 ± 0.9	—	—	0.60 ± 0.02	—	—
Second step	$k_{2,\text{s}}/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H_{2,\text{s}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{2,\text{s}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	$k_{-2,\text{s}}/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_{-2,\text{s}}^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_{-2,\text{s}}^\ddagger/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
L-His	4.6 ± 0.3	21 ± 4	-160 ± 20	1.10 ± 0.05	14 ± 4	-190 ± 12
5'-GMP	6.2 ± 0.3	27 ± 5	-140 ± 10	1.60 ± 0.05	47 ± 2	-85 ± 6
5'-IMP	0.56 ± 0.02	—	—	1.300 ± 0.005	—	—
Ino	0.32 ± 0.03	—	—	0.050 ± 0.005	—	—

resulting in the formation of the product by displacing one chloride ion.^{13,43,44} The coordination of Au(III) complexes to L-histidine also depends on the pH. However, under physiological conditions, gold(III) complexes could undergo hydrolysis.⁴⁵ Also, as published before, L-histidine could coordinate to a diaqua complex of Au(III) as bidentate ligand.⁴⁶ The interactions of some bi-functional gold(III) complexes and N-bonding ligands including 5'-GMP were studied before.^{16,24,43,47} These interactions could be very important because DNA is an important potential target for many metal-based anticancer agents.^{24,45} Therefore, for the binding of gold(III) complexes to 5'-GMP, beside the formation of a bond between the complex and the N7

donor atom of the purine base, some non-covalent interactions could further stabilize the product.^{24,39,45}

The second step includes the substitution of the second chloride ligand from the starting complex, by which the 1 : 2 complexes are formed. The obtained rate constants for the first step show the same order of nucleophile reactivity as it was observed for the reactions of the mono-functional complexes. L-histidine is the most reactive nucleophile. However, the first and the second steps of the substitution of the $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex are faster than the reactions of the $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ complex due to the increase in electrophilicity of the Au(III) centre in the case of the bipy complex as explained for the terpy complex above.⁴⁸

Most of the reactions were studied at different temperatures. The temperature dependence of the rate constants enabled the calculation of the activation enthalpies and entropies by use of the Eyring equation (Arrhenius and Eyring plots are shown in Fig. S21–S28, Supporting Information, ESI).[†] Activation parameters derived from these experiments are summarized in Tables 1 and 2. The entropy of activation for all studied systems for the forward and back reactions is significantly negative, which is in line with an associative substitution mechanism.

DFT calculations

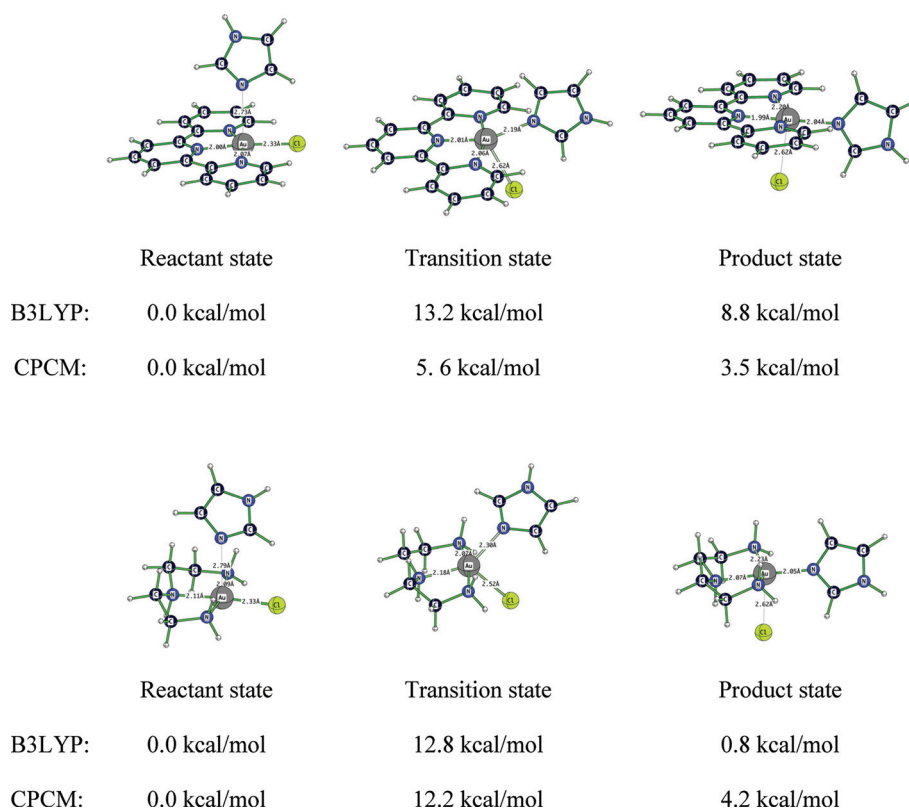
To gain further insight into the studied ligand-substitution mechanism, in particular to address the question of associative (A) vs. associative interchange (I_a) mechanism, we calculated the reaction pathways for two model reactions starting from $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$. As a model for the experimentally applied heterocyclic nucleophiles we used imidazole. To investigate the substitution mechanism we used as starting complexes $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+} \cdot (\text{imidazole})$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+} \cdot (\text{imidazole})$. The nucleophile imidazole is in both reactants located more than 2.7 Å away from the Au^{3+} cation, while the Cl^- anion is in both cases bound at a distance of 2.33 Å. Through the transition states $\{[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}(\text{imidazole})]^{2+}\}^\ddagger$ and $\{[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}(\text{imidazole})]^{2+}\}^\ddagger$, characteristic for an interchange mechanism, the products $[\text{Au}(\text{terpy})(\text{imidazole})]^{3+} \cdot \text{Cl}^-$ and $[\text{Au}(\text{dien})(\text{imidazole})]^{3+} \cdot \text{Cl}^-$ are reached. In the transition states the $\text{Au}-\text{N}_{\text{imidazole}}$ distance is significantly shortened to 2.19 Å in $\{[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}(\text{imidazole})]^{2+}\}^\ddagger$

and to 2.30 Å in $\{[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}(\text{imidazole})]^{2+}\}^\ddagger$. Simultaneously the $\text{Au}-\text{Cl}^-$ bond is elongated to 2.62 Å and 2.52 Å, respectively (see Scheme 3). While finding transition states characteristic for interchange mechanisms, the observed $\text{Au}-\text{N}_{\text{imidazole}}$ bond shortening between reactant and transition state by around 65% can be considered as an indication for an interchange mechanism with a significant degree of associative character, *i.e.* I_a type of mechanism. No evidence for the formation of a stable five-coordinate intermediate, typical for an associative (A) mechanism, was found.

On analysing the activation energies including the solvent model (B3LYP(CPCM)/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp)) for $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$, we obtain a more than 50% lower activation energy for the terpy than for the dien based complex, which is in agreement with the experimental work. The corresponding products are 4 kcal mol⁻¹ higher in energy than the reactants, which is probably due to charge separation during the substitution process.

Conclusions

This work describes the study of the kinetics and the mechanism of the reactions of the gold(III) complexes with selected nucleophiles such as guanosine-5'-monophosphate, inosine-5'-monophosphate, inosine and L-histidine. We found that these N-donor ligands have a high affinity for the gold(III) complexes which has important biological implications. In addition, the reported kinetic data clearly shows that the studied N-bonding ligands



Scheme 3 Calculated relative stabilities and structures of reactant, transition and product states. (B3LYP: B3LYP/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp) CPCM: B3LYP(CPCM)/LANL2DZp//B3LYP/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp)).

react according to an associative substitution mechanism with the gold(III) complexes, which is in excellent agreement with data reported previously.⁴³

Finally, these results contribute to a better understanding of the biochemical mechanism of some gold(III) complexes. Also, the type of coordinated inert (spectator) ligand has a large effect on the reaction rate when electronic communication with the metal centre can tune the electrophilic character of the metal, which in turn affects the rate of the nucleophilic associative substitution process. Furthermore, the study of mono-functional and bi-functional gold(III) complexes which have different inert nitrogen-donor ligands, could help to define the common structure–reactivity relationship and the connection with the reduction potential of the complexes. Also, the results of the substitution with biologically relevant ligands could help to gain more information on the possible interaction modes of gold(III) complexes with *in vivo* targets and their representative application in the study of their anti-tumour properties.

From the quantum chemical calculations (B3LYP/LANL2DZp) performed for the ligand substitution in $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ by imidazole, we conclude that the mechanism can be best addressed as an interchange mechanism, with a significant degree of associative character, *i.e.* I_a mechanism. No evidence for the formation of a stable five-coordinate intermediate was found. The activation energies for $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ calculated with the CPCM solvent model reflect the faster ligand substitution in $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ by a significantly lower activation energy, which is in agreement with the experimental findings.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 172011), the Deutsche Forschungsgemeinschaft and DAAD.

References

- 1 I. Ott, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1670–1681.
- 2 P. J. Sadler and R. E. Sue, *Met.-Based Drugs*, 1994, **1**, 107–144.
- 3 C. F. Shaw, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2589–2600.
- 4 S. L. Best and P. J. Sadler, *Gold Bull.*, 1996, **29**, 87–93.
- 5 O. M. Ni Dhubghaill and P. J. Sadler, in: B. K. Keppler, (Ed.), *Gold Complexes in Cancer Chemotherapy, Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, 1993, pp. 221–248.
- 6 C. Gabbiani, A. Casina and L. Messori, *Gold Bull.*, 2007, **40**, 73–81.
- 7 S. H. van Rijt and P. J. Sadler, *Drug Discovery Today*, 2009, **14**, 1089–1097.
- 8 A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini and L. Messori, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1692–1707.
- 9 A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M. A. Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H. H. Fiebig and L. Messori, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 1139–1149.
- 10 M. A. Cinellu, L. Maiore, M. Manassero, A. Casini, M. Arca, H. H. Fiebig, G. Kelter, E. Michelucci, G. Pieraccini, C. Gabbiani and L. Messori, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 336–339.
- 11 X. Wang and Z. Guo, *Dalton Trans.*, 2008, 1521–1532.
- 12 E. R. T. Tiekink, *Inflammopharmacology*, 2008, **16**, 138–142.
- 13 L. H. Skibsted, in: A. G. Skypes, (Ed.), *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, Academic Press, 1986, 137–183.
- 14 V. Milacic, D. Chen, L. Ronconi, K. R. Landis-Piowar, D. Fregona and Q. Ping Dou, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 10478–10486.
- 15 L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell and P. Zanello, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3541–3548.
- 16 A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M. Agostina Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H.-H. Fiebig and L. Messori, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 1139–1149.
- 17 R. C. Buckley, A. M. Elsome, S. P. Fricker, G. R. Henderson, B. R. C. Theobald, R. V. Parish, B. P. Howe and L. R. Kelland, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 5208–5214.
- 18 P. Calamai, S. Carotti, A. Guerri, T. Mayyei, L. Messori, E. Mini, P. Orioli and G. P. Speroni, *Anticancer Drug Des.*, 1998, **13**, 67–80.
- 19 L. Giovagnini, L. Ronconi, D. Aldinucci, D. Lorenzon, S. Sitran and D. Fregoni, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1588–1595.
- 20 C. M. Che, R. W. Y. Sun, W. Y. Yu, C. B. Ko, N. Y. Zho and H. Z. Sun, *Chem. Commun.*, 2003, 1718–1719.
- 21 A. Casina, C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P. J. Dyson, B. K. Keppler and L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 564–575.
- 22 A. N. Wein, A. T. Stockhausen, K. I. Hardcastle, M. R. Saadein, S. (Bruce) Peng, D. Wang, D. M. Shin, Z. Chen and J. F. Eichler, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.01.006 in press.
- 23 L. Ronconi, C. Marzano and P. Zanello, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 1648–1657.
- 24 L. Messori, P. Orioli, C. Tempi and G. Marcon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **281**, 352–360.
- 25 S. Carotti, A. Guerri, T. Mazzei, L. Messori, E. Mini and P. Orioli, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **281**, 90–94.
- 26 A. Garza-Ortiz, H. den Dulk, J. Brouwer, H. Kooijman, A. L. Spek and J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 1922–1930.
- 27 G. Marcon, S. Carotti and M. Coronello, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1672–1677.
- 28 G. Nardin, L. Randaccio, G. Annibale, G. Natile and B. Pitteri, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1979, **1**, 220–223.
- 29 L. S. Hollis and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 4293–4299.
- 30 B. P. Block and J. C. Bailar, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4722–4725.
- 31 (a) A. D. Becke, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 5648–5652; (b) C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Phys. Rev. B*, 1988, **37**, 785–789; (c) P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski and M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 11623–11627; (d) T. H. Dunning and P. J. Hay, *Mod. Theor. Chem.*, 1976, **3**, 1–28; (e) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 270–283; (f) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 284–298; (g) P. J. Hay and W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 299–310; (h) *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations* (Ed.: S. Huzinaga), Elsevier, Amsterdam, 1984.
- 32 The performance of the computational level employed in this study is well documented, see for example: (a) S. Klaus, H. Neumann, H. Jiao, A. Jacobi von Wangelin, D. Gördes, D. Strübing, S. Hübner, M. Hately, C. Weckbecker, K. Huthmacher, T. Riermeier and M. Beller, *J. Organomet. Chem.*, 2004, **689**, 3685–3700; (b) R. W. Saalfrank, Ch. Deutscher, H. Maid, A. M. Ako, S. Sperner, T. Nakajima, W. Bauer, F. Hampel, B. A. Heß, N. J. R. van Eikema Hommes, R. Puchta and F. W. Heinemann, *Chem.–Eur. J.*, 2004, **10**, 1899–1905; (c) P. Illner, A. Zahl, R. Puchta, N. J. R. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid and R. van Eldik, *J. Organomet. Chem.*, 2005, **690**, 3567–2576; (d) A. Scheurer, H. Maid, F. Hampel, R. W. Saalfrank, L. Toupet, P. Mosset, R. Puchta and N. J. R. van Eikema Hommes, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 2566–2574; (e) A. Scheurer, R. Puchta and F. Hampel, *J. Coord. Chem.*, 2010, **63**, 2868–2878; (f) M. Walther, B. M. Alzubi, R. Puchta, G. Linti, R. Meier and R. van Eldik, *J. Coord. Chem.*, 2011, **64**, 18–29 and references cited therein.
- 33 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, J. T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe,

- P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, *Gaussian 03, Revision B.03*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2004
- 34 (a) V. Barone and M. Cossi, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 1995–2001; (b) M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega and V. J. Barone, *J. Comput. Chem.*, 2003, **24**, 669–681.
- 35 M. L. Tobe and J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison Wesley Longman Inc, Essex, 1999, pp. 70–112.
- 36 Ž. D. Bugarčić, B. Petrović and E. Zangrando, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 2650–2656.
- 37 D. Jaganyi, A. Hofmann and R. van Eldik, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 1680–1683.
- 38 A. Hofmann, D. Jaganyi, O. Q. Munro, G. Liehr and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 1688–1700.
- 39 U. Rychlewska, B. Warzajtis, B. Dj. Glišić, M. D. Živković, S. Rajković and M. I. Djuran, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 8906, DOI: 10.1039/c0dt00163e.
- 40 J. Arpalahiti, M. Mikola and S. Mauristo, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 3327–3332.
- 41 N. Summa, W. Schiessl, R. Puchta, N. Eikema Hommes and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2948–2959.
- 42 U. Frey, J. D. Ranford and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 1333–1340.
- 43 M. Milovanović, A. Djeković, V. Volarević, B. Petrović, N. Arsenijević and D. Ž. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 944–949.
- 44 Y. Mizuna and S. Komiya, *Inorg. Chim. Acta*, 1986, **125** (1), 13–15.
- 45 A. Casini, M. C. Diawara, R. Scopelliti, S. M. Zakeeruddin, M. Gratzel and P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 2239–2245.
- 46 G. Marangoni, B. Pitteri, G. Annibale and M. Bertoluzzi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 765–771.
- 47 G. Marcon, T. O'Connell, P. Orioli and L. Messori, *Met.-Based Drugs*, 2000, **7**, 253–256.
- 48 S. Jovanović, B. Petrović, D. Čanović and D. Ž. Bugarčić, *Int. J. Chem. Kinet.*, 2011, **43**, 99–106.

The cytotoxic effects of some selected gold(III) complexes on 4T1 cells and their role in the prevention of breast tumor growth in BALB/c mice

V. Volarevic¹, M. Milovanovic¹, A. Djekovic², B. Petrovic², N. Arsenijevic¹, Z.D. Bugarcic²

¹Department of Microbiology and Immunology, Centre for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Kragujevac; ²Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Summary

Purpose: To investigate the cytotoxic activity of newly synthesized gold(III) complexes $[AuCl_2(en)]^+$, $[AuCl_2(SMC)]^+$, $[AuCl_2(DMSO)_2]^+$ (*en*: ethylenediamine, SMC: S-methyl-L-cysteine and DMSO: for dimethylsulfoxide) in 4T1 mouse breast cancer cell line *in vitro* and *in vivo* and to compare their antitumor characteristics with cisplatin complex $[PtCl_2(NH_3)_2]$.

Methods: The *in vitro*, effects of the tested complexes on 4T1 cell viability were determined using MTT colorimetric technique. *In vivo*, progression of mouse breast tumor growth in BALB/c mice was measured by using external caliper.

Results: Among the tested gold(III) complexes, $[AuCl_2(en)]^+$ showed best cytotoxic effects *in vitro*. The cytotoxic effects of $[AuCl_2(en)]^+$ and $[PtCl_2(NH_3)_2]$ were similar at all

concentrations. The data from the *in vivo* experiment showed that among the tested gold(III) complexes only $[AuCl_2(en)]^+$ can prevent the primary breast tumor growth. $[AuCl_2(en)]^+$ was tolerated well and much better than $[AuCl_2(DMSO)_2]^+$, $[AuCl_2(SMC)]^+$ and $[PtCl_2(NH_3)_2]$ complex which was confirmed by weight gain in mice that received $[AuCl_2(en)]^+$. In addition, mice that received $[AuCl_2(en)]^+$ showed better survival time in comparison with mice that received $[PtCl_2(NH_3)_2]$ complex.

Conclusion: $[AuCl_2(en)]^+$ complex seems to be good candidate for future pharmacological evaluation in breast cancer research.

Key words: cytotoxic effects *in vitro/in vivo*, gold(III) complexes, mouse breast cancer, prevention

Introduction

In preclinical studies it is necessary to test the cytotoxic effects of newly synthesized anticancer drugs *in vitro* and *in vivo* [1]. The use of orthotopic systems gives the most precise information about the capacities of the tested, newly synthesized anticancer drugs to prevent and/or to stop progression of primary tumor growth [2]. In addition, it is of crucial importance to test the newly synthesized therapeutic agents on murine cell lines that will metastasize in a similar manner and to similar locations as the same tumor type will in human.

The human breast cancer is the most prevalent malignancy among women, representing the second cause of cancer-related deaths [3,4]. The 4T1 mammary carcinoma cell line, originally isolated by Fred Miller and coworkers at the Karmanos Cancer Institute [5,6], when

introduced orthotopically is useful model for evaluation of primary breast cancer tumor growth progression [7]. In addition, the 4T1 tumor cell line has the capacity to metastasize to all organs affected in human breast cancer, including lungs, liver, brain and bone [8-14].

Although novel molecular pathways relevant to breast cancer biology and breast cancer therapy are explored continuously [15,16], it is expected that a whole array of new agents should be tested in combination or in sequence to standard chemotherapy with the aim to improve the outcome of high-risk breast cancer patients.

The big successes of cisplatin in cancer chemotherapy on one side, and the toxic side effects related to cisplatin treatment on the other side, stimulated the search for new and more selective metal-based anticancer drugs [17].

During the last 20 years, much interest has fo-

cused on gold(III) complexes and several reports that described their anticancer characteristics suggested gold(III) compounds as very good candidates for further anticancer investigations [18,19]. Although there is some evidence about their *in vivo* antitumor effects [20,21], gold(III) complexes are not stable under physiological conditions [19], so during the past few years much interest has focused on gold(III) complexes in a number of new synthesized complexes [22,23]. The acceptable solution stability of these newly synthesized gold(III) complexes facilitated extensive pharmacological investigation, both *in vitro* and *in vivo* [24-28].

However, compared to the corresponding platinum(II) complexes, ligand substitution reactions of gold(III) complexes have not been extensively studied [29].

Because gold(III) is isoelectronic (d^8) with platinum(II) and tetracoordinate gold(III) complexes have the same square-planar geometries as cisplatin [30] we decided to investigate the potential cytotoxic activity of some gold(III) complexes: $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ in 4T1 mouse breast cancer cell line *in vitro* and *in vivo* and to compare their cytotoxic effects with the cytotoxic effects of cisplatin $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (Figure 1).

It was envisaged that this study could throw more light on the anti-cancer properties of gold(III) complexes and to suggest the newly synthesized gold(III) complex that showed best anti-tumor characteristics for future pharmacological investigation.

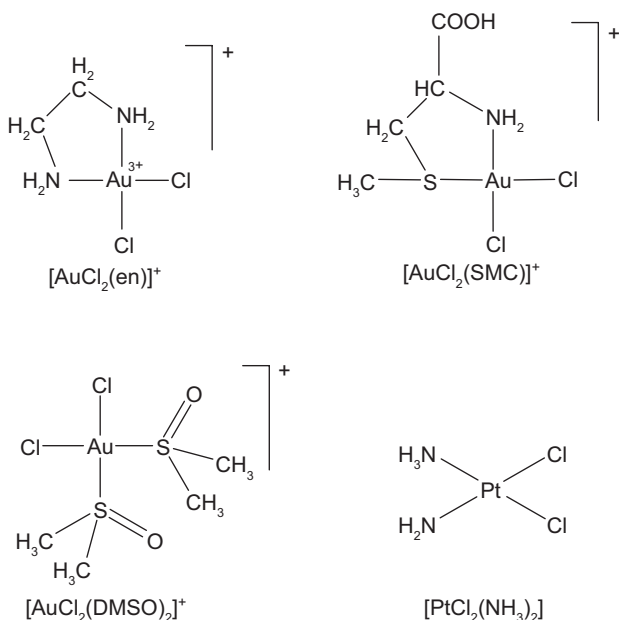


Figure 1. Structures of the investigated complexes.

Methods

Chemicals and ligands

The ligands: ethylenediamine (en), S-methyl-L-cysteine (SMC) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). Starting potassium tetrachloridoaurate(III) complex, $\text{K}[\text{AuCl}_4]$, was purchased from ABCR GmbH & Co. (Karlsruhe, Germany), while cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II), *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), was purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals were of the highest purity commercially available and were used without further purification. Ultra pure water was used in all experiments.

For the cytotoxicity determination further chemicals were used: fetal bovine serum (FBS), growth medium RPMI 1640, penicillin G, streptomycin, (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT), phosphate buffered saline (PBS), dimethylsulfoxide (DMSO), trypan blue staining (all from Sigma Chemicals, Germany); 96-well plates (Sarstedt, Germany) and Haemacel (Theraselect GmbH, Germany).

Synthesis of complexes

The $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ complex was prepared according to the published procedure [31]. Dichloridobis(dimethylsulphoxide)gold(III)-chloride, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$, was synthesized by dissolving $\text{K}[\text{AuCl}_4]$ (0.2 g, 0.53 mM) in 5 cm³ 0.05 M HCl in the dark. Under continuous stirring, to the solution were dropped, first, 75 μL of DMSO (1.06 μM) and later 0.1M NaOH, to adjust pH about 4.5. The mixture was stirred for 5 h at room temperature and the obtained yellow solution was left in the darkness to evaporate. After few days, the formed dark yellow crystals were filtered and dried. Found: H 1.87; C 7.21; S 7.18. Calc. for $\text{AuC}_4\text{S}_2\text{O}_2\text{H}_{12}\text{Cl}_3$: H 1.84; C 7.32; S 7.76%.

$[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ complex was synthesized starting from acid $\text{H}[\text{AuCl}_4]$. An acid (0.2 g, 0.8 mmol) was dissolved in a little amount of water on magnetic stirrer. S-methyl-L-cysteine (0.105 g, 0.8 mmol) was added to the solution. After mixing, the pH was adjusted between 4-5 with 0.1 M NaOH. The mixture was stirred a few hours and the clear solution was left to evaporate in the dark at room temperature. A brown powder was formed after few days. Found: H 3.08; C 10.73; N 2.47; S 7.01. Calc. for $\text{AuC}_4\text{SO}_3\text{H}_{11}\text{NCl}_3$: H 3.07; C 10.52; S 7.02%.

Cell culture

The mouse breast tumor cell line 4T1, syngeneic

in BALB/c mice, was purchased from American Type Culture Collection (ATCC).

Animals

The cytotoxic effects of the tested complexes were evaluated on BALB/c female mice. Animals were housed in cages under constant temperature and humidity conditions, exposed to light and dark for 12 h respectively, with food and water available *ad libitum*.

BALB/c female mice (n=30), 7-9 weeks old, were divided into one control and 4 experimental groups (n=6 in each group).

Tumor implantation and drug injection

4T1 mouse breast tumor cells (5×10^4), previously resuspended in 60 μ l of RPMI 1640, were inoculated into the 4th mammary fat pad of BALB/c mice. Ten min after tumor inoculation (1st day) and at 4th, 8th, 12th, 16th and 20th day of experiment, mice from the control group received saline (100 μ l) in the tail vein, while mice from the experimental groups received $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ and cisplatin $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (100 μ l in the tail vein in a concentration of 62.5 μ M, previously diluted in DMSO).

Cytotoxicity assay (MTT)

Gold(III) complexes are biologically active substances of special interest as potential anticancer agents. Effects of $[\text{AuCl}_2(\text{en})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]^+$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]^+$ and cisplatin, $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, on cell viability were determined using MTT colorimetric technique [32]. 4T1 cells were diluted with medium to 1×10^6 cells/ml and aliquots (5×10^3 cells/100 μ l) were placed in individual wells in 96-multiplates. About 24 h later, after the cell adherence, each well received 100 μ l of either $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ or $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, which had been serially diluted 2-fold in medium to concentrations ranging from 2000 μ M to 0.98 μ M. Cells were incubated at 37 $^\circ$ C in a 5% CO_2 incubator for 24 h. After incubation, multiplates were centrifuged, the supernatant was removed, fresh medium and MTT solution (5 mg/ml in PBS) 20 μ l were added to each well and the plates were incubated for an additional 4 h. The multiplates were centrifuged, cell-free supernatants were suctioned off, and DMSO (150 μ l) and glycine buffer were added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate multimode detector Zenyth 3100.

The percentage of cytotoxicity was calculated us-

ing the formula: cytotoxicity % = $100 - [(\text{TS} - \text{BG0}) - \text{E}] / (\text{TS} - \text{BG0}) \times 100$, where BG0 is for background of medium alone, TS is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is for experimental well.

Measurement of primary tumor growth and tumor volume

External caliper is currently the standard method for determination of tumor volume due to the low cost and high throughput of this simple method [33,34]. During 21 days, the growth of primary tumors was measured every day by external caliper. In order to determine tumor volume by external caliper, experimental animals were sacrificed on the 21st day and tumors were removed. The greatest longitudinal diameter (length) and the greatest transverse diameter (width) of tumors were determined. Tumor volume based on caliper measurements was calculated by the modified ellipsoidal formula: $\text{Tumor volume} = 1/2 \times (\text{length} \times \text{width}^2)$ [33,34].

Results

All 4 complexes showed cytotoxic effect *in vitro* on 4T1 cells (Figure 2 and 3).

Decrease of concentration was followed by markedly decrease of apoptotic cells percentage.

Concentrations from 2000 μ M to 500 μ M of $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ and $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ complexes showed higher cytotoxic effect in comparison with the same concentrations of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ complex.

Concentrations from 500 μ M to 62.5 μ M of $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ and $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ complexes showed higher cytotoxic effect in comparison with the same concentrations of $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ and $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$.

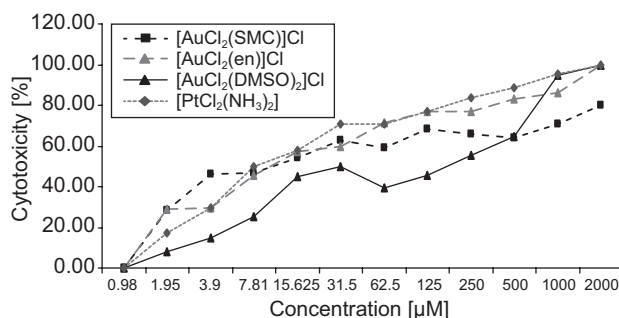


Figure 2. Toxicity of $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ and cisplatin $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ complex, using 4T1 cells as target cells. 4T1 cells were cultured with different doses of the tested complexes ranging from 0.98 to 2000 μ M. Cell viability was determined based on MTT assay. Each point represents a mean value and standard deviation of 3 experiments with 3 replicates per dose.

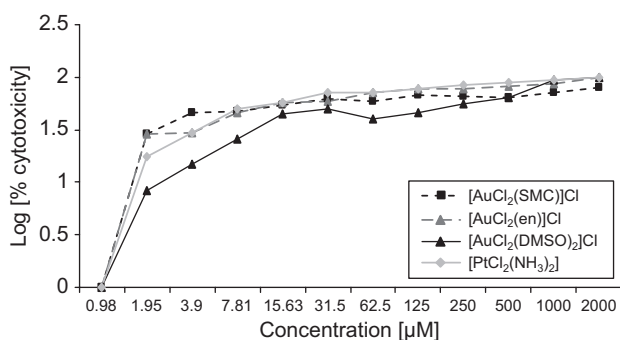


Figure 3. Semi-logarithmic plot of cytotoxic effects of $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ and cisplatin on 4T1 cells. Each point represents a mean value of 3 experiments with 3 replicates per dose.

At concentrations 125 μM and 62.5 μM , $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ complex showed higher cytotoxic effect than $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ and $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$.

Nevertheless, $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ complex showed higher cytotoxic effect in comparison with the same concentrations of all 3 gold(III) complexes at the concentration of 31.5 μM .

At concentrations 15.63 μM and 7.81 μM $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ and $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ complexes showed approximately the same cytotoxic effect on 4T1 cells, while at the concentration of 3.9 μM $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ showed higher cytotoxic effect than all other tested complexes (Figure 2).

At low concentration (1.95 μM) $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ and $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ complexes showed higher cytotoxic effect than $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$.

The concentrations from 500 μM to 1.95 μM of $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ showed significantly lower cytotoxic effect in comparison with the same concentrations of all other tested complexes (Figure 2).

The concentration 0.98 μM of all tested gold(III) complexes and cisplatin showed no cytotoxic effect on 4T1 cells (Figure 2).

All 3 tested gold(III) complexes and cisplatin (concentration from 2000 μM to 0.98 μM) showed concentration-dependent cytotoxic effect on 4T1 cells (Figure 3).

The tumors were noticed for the first time on the 8th day of the experiment in one mouse from the control group as well as in two mice that received $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ and in one mouse that received $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$. The tumor was noticed on the 9th day of the experiment in one mice that received $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$. That mouse was the only mouse from the $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ group that got tumor (Figure 4).

Till the end of the experiment, a tumor was noticed in all mice from the control group (6/6) and in all mice

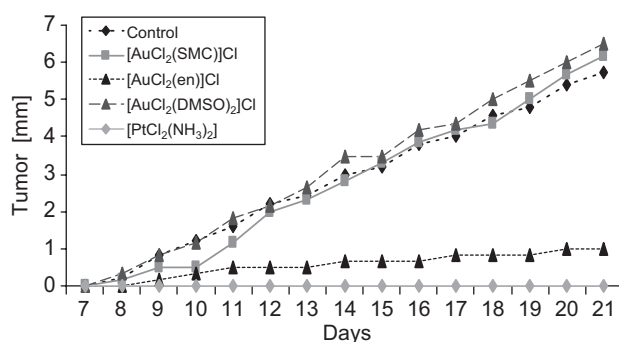


Figure 4. The breast tumor growth in BALB/c mice after injection of 5×10^4 4T1 cells. Each point represents a mean value of tumor size measured daily in mice from each group.

that received $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ and $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$ (6/6). However, tumor was noticed in only one mouse that received $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ (1/6) (Figure 4).

In order to determine the tumor volume by external caliper, experimental animals were sacrificed on the 21st day and tumors were removed (Figure 5). We noticed that tumors removed from control mice were bigger than tumors removed from mice which received gold(III) complexes (Figure 5). Among the tested gold(III) complexes, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ most effectively prevented tumor growth. The smallest tumor volume was noticed in mice that received $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ (Figure 5).

Mice from the control group and mice that received $[\text{AuCl}_2(\text{DMSO})_2]\text{Cl}$, $[\text{AuCl}_2(\text{SMC})]\text{Cl}$ and cisplatin showed weight loss and only mice that received $[\text{AuCl}_2(\text{en})]\text{Cl}$ gained weight during the experiment (Figure 6).

Discussion

The results from the *in vitro* experiment showed that all tested gold(III) complexes and cisplatin displayed cytotoxic effect on 4T1 cells. Decreases in concentrations were followed by markedly decrease in the number of apoptotic cells.

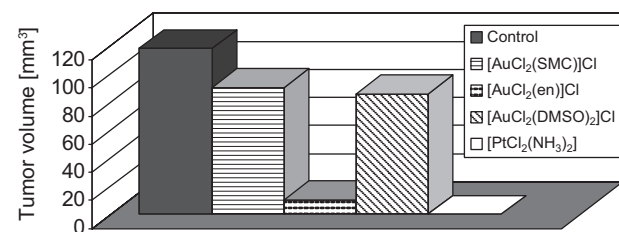


Figure 5. The tumor volume measured on the 21st day of the experiment. Each column represents a mean value of tumor volumes noticed in each group.

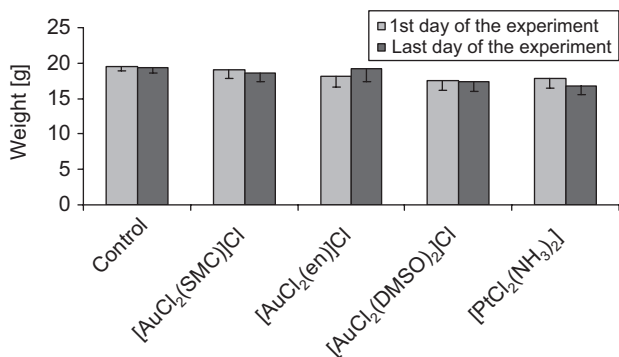


Figure 6. Weight of BALB/c mice during the experiment (measured on the 1st and last day of the experiment). Each column represents a mean value of mice weight from each group.

Among the tested Au(III) complexes, [AuCl₂(en)]Cl showed the best cytotoxic effects *in vitro*. The cytotoxic effects of [AuCl₂(en)]Cl and [PtCl₂(NH₃)₂] were similar at all concentrations. Only at the concentration of 3.9 μM [AuCl₂(SMC)]Cl complex showed higher cytotoxic effect than [AuCl₂(en)]Cl and [PtCl₂(NH₃)₂], while at very low concentration (1.95 μM) both [AuCl₂(en)]Cl and [AuCl₂(SMC)]Cl complexes showed higher cytotoxic effect than cisplatin.

All 3 tested gold(III) complexes and cisplatin (at all tested concentrations) showed concentration-dependent cytotoxic effect on 4T1 cells.

The data from the *in vivo* experiment showed that [AuCl₂(en)]Cl can prevent the primary breast tumor growth in BALB/c mice (Figures 4 and 5). Only one from 6 mice that received [AuCl₂(en)]Cl got tumor and the tumor in that mouse appeared later than the tumors which appeared in mice in the control group and in mice in the [AuCl₂(SMC)]Cl and [AuCl₂(DMSO)₂]Cl-groups (Figure 4).

So, the *in vivo* experiment confirmed the data obtained *in vitro* that [AuCl₂(en)]Cl has shown the best cytotoxic effects on 4T1 cells among all tested gold(III) complexes.

Although no tumor was noticed in mice that received cisplatin (0/6), 2 mice that received cisplatin died during the experiment. One mouse died on the 9th day and the second mouse died on the 20th day of the experiment, while all mice that received [AuCl₂(en)]Cl, [AuCl₂(DMSO)₂]Cl and [AuCl₂(SMC)]Cl stayed alive till the end of the experiment (Figure 4).

[AuCl₂(en)]Cl was tolerated well and much better than [AuCl₂(DMSO)₂]Cl, [AuCl₂(SMC)]Cl and cisplatin; this was confirmed by weight gain in mice that received [AuCl₂(en)]Cl (Figure 6) and by better survival time in mice that received [AuCl₂(en)]Cl in comparison with mice that received cisplatin. The possible reason why [AuCl₂(en)]Cl was less toxic than cisplatin might

be the different anticancer mechanisms utilized by gold complexes compared to cisplatin. Cisplatin exerts its anticancer effect by interacting with DNA and forming adducts that interfere with transcription and replication, followed by apoptosis [36]. The interactions of cisplatin with DNA result in Pt-GG intrastrand cross-link that is the critical lesion leading to cisplatin toxicity dominantly manifested by dysfunction of gastrointestinal and hematological systems [36,37]. Although the main biological targets for gold(III) complexes and the precise mechanisms responsible for gold-induced cytotoxicity are still unknown, some recently published data suggest that their mechanisms of action, such as modification of surface protein residues and inhibition of proteasome function [30], are substantially different from that of the Pt(II) complexes [38].

Several lines of evidence suggested that proteins rather than DNA are mainly targeted by gold complexes. The selective modification of surface protein residues by gold(III) complexes in a defined coordination geometry could be the molecular basis for their biological effects. Proteins containing exposed cysteine residues might be proper targets for gold(III) complexes that might cleave the disulfide bond of cystine and oxidize methionine and glycine suggesting the possibility that amino terminus of peptides and proteins could be deaminated by gold(III) complexes. In addition, it has been recently shown that proteasome inhibition by gold(III) complexes is associated with apoptosis of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [30].

In our *in vivo* experiment we showed that [AuCl₂(en)]Cl complex is more stable under physiological conditions than [AuCl₂(SMC)]Cl and [AuCl₂(DMSO)₂]Cl. The possible explanation is that [AuCl₂(SMC)]Cl and [AuCl₂(DMSO)₂]Cl have S donor atom in the coordination sphere and, because of that, these complexes are less stable and probably less active under physiological conditions than [AuCl₂(en)]Cl complex [19].

In line with all these results, [AuCl₂(en)]Cl complex seems to be a good candidate for future pharmacological evaluation in the field of breast cancer research and treatment.

References

- Hollingshead MG. Antitumor efficacy testing in rodents. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1500-1510.
- Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer* 2004; 40: 852-857.
- Dediu M, Median D, Alexandru A, Vremes G, Gal C, Gongu M. Adjuvant therapy with aromatase inhibitors in postmenopausal, estrogen receptor- positive breast cancer patients: up-

- front or sequential? *J BUON* 2009; 14: 375-379.
4. Karaca B, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R. Enhancement of taxane-induced cytotoxicity and apoptosis by gossypol in human breast cancer cell line MCF-7. *J BUON* 2009; 14: 479-485.
 5. Miller FR, Miller BE, Heppner GH. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis* 1983; 3: 22-31.
 6. Miller FR. Tumor subpopulation interactions in metastasis. *Invasion Metastasis* 1983; 3: 234-242.
 7. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imageable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 228.
 8. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2979-2988.
 9. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992; 52: 1399-1405.
 10. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res* 1998; 58: 1486-1493.
 11. Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK et al. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 1-13.
 12. Tomasevic Z, Radosevic-Jelic Lj, Jovanovic D. Brain metastases as late breast cancer relapse. Single institution experience and review of the literature. *J BUON* 2009; 14: 225-228.
 13. Chavdarova L, Piperkova E, Tsonevska A, Timcheva K, Dimitrova M. Bone scintigraphy in the monitoring of treatment effect of bisphosphonates in bone metastatic breast cancer. *J BUON* 2006; 11: 499-504.
 14. Alexandrova E, Sergieva S, Nikolova V, Danon S. Bone marrow micrometastases as a prognostic factor in early breast cancer patients. *J BUON* 2003; 8: 133-137.
 15. Tsakonas G, Kosmas C. Integration of novel targeted therapies into the systemic treatment of breast cancer-a review. *J BUON* 2007; 12: 319-327.
 16. Eniu A. Integrating biological agents into systemic therapy of breast cancer: trastuzumab, lapatinib, bevacizumab. *J BUON* 2007; 12 (Suppl 1): S119-126.
 17. Milacic V, Dou QP. The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: implications for breast cancer therapy. *Coord Chem Rev* 2009; 253: 1649-1660.
 18. Shaw CF. Gold-Based Therapeutic Agents. *Chem Rev* 1999; 99: 2589-2600.
 19. Messori L, Abbate F, Marcon G et al. Gold(III) complexes as potential antitumor agents: solution chemistry and cytotoxic properties of some selected gold(III) compounds. *J Med Chem* 2000; 43: 3541-3548.
 20. Buckley RG, Elsome AM, Fricker SP et al. Antitumor properties of some 2-[(dimethylamino)methyl]phenylgold(III) complexes. *J Med Chem* 1996; 39: 5208-5214.
 21. Calamai P, Carotti S, Guerri A et al. Cytotoxic effects of gold(III) complexes on established human tumor cell lines sensitive and resistant to cisplatin. *Anticancer Drug Des* 1998; 13: 67-80.
 22. Giovagnini L, Ronconi L, Aldinucci D, Lorenzon D, Sitran S, Fregona D. Synthesis, characterization, and comparative in vitro cytotoxicity studies of platinum(II), palladium(II), and gold(III) methylsarcosinedithiocarbamate complexes. *J Med Chem* 2005; 48: 1588-1595.
 23. Che CM, Sun RW, Yu WY, Ko CB, Zhu N, Sun H. Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epithelioid cancer cells. *Chem Commun (Camb)* 2003; 1718-1719.
 24. Casini A, Hartinger C, Gabbiani C et al. Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J Inorg Biochem* 2008; 102: 564-575.
 25. Tiekink ER. Anti-cancer potential of gold complexes. *Inflammopharmacology* 2008; 16: 138-142.
 26. Messori L, Orioli P, Tempi C, Marcon G. Interactions of selected gold(III) complexes with calf thymus DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 352-360.
 27. Garza-Ortiz A, den Dulk H, Brouwer J, Kooijman H, Spek AL, Reedijk J. The synthesis, chemical and biological properties of dichlorido(azpy)gold(III) chloride (azpy=2-(phenylazo)pyridine) and the gold-induced conversion of the azpy ligand to the chloride of the novel tricyclic pyrido[2,1-c][1,2,4]benzotriazin-11-ium cation. *J Inorg Biochem* 2007; 101: 1922-1930.
 28. Casini A, Kelter G, Gabbiani C et al. Chemistry, antiproliferative properties, tumor selectivity, and molecular mechanisms of novel gold(III) compounds for cancer treatment: a systematic study. *J Biol Inorg Chem* 2009; 14: 1139-1149.
 29. Ericson A, Arthur J, Coleman R, Elding L, Elmroth S. Kinetics of interaction of the thione unit in 4-thio-2-deoxyuridine and 4-thiouridine 5-monophosphate with rapidly reacting gold(III) complexes. *J Chem Soc Dalton Tran* 1998; 10: 1687-1692.
 30. Ronconi L, Marzano C, Zanella P et al. Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties. *J Med Chem* 2006; 49: 1648-1657.
 31. Zhu S, Gorski W, Powell DR, Walmsley JA. Synthesis, structures, and electrochemistry of gold(III) ethylenediamine complexes and interactions with guanosine 5'-monophosphate. *Inorg Chem* 2006; 45: 2688-2694.
 32. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
 33. Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol* 1986; 31: 229-234.
 34. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24: 148-154.
 35. Eckhardt S. Recent progress in the development of anticancer agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002; 2: 419-439.
 36. Abrams MJ, Murrer BA. Metal compounds in therapy and diagnosis. *Science* 1993; 261: 725-730.
 37. Ott I, Gust R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch Pharm (Weinheim)* 2007; 340: 117-126.
 38. Marzano C, Bettio F, Baccichetti F, Trevisan A, Giovagnini L, Fregona D. Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. *Chem Biol Interact* 2004; 148: 37-48.

Cytotoxicity of gold(III) Complexes on A549 Human Lung Carcinoma Epithelial Cell Line

Miloš Arsenijević¹, Marija Milovanovic¹, Vladislav Volarevic¹, Ana Djeković², Tatjana Kanjevac¹, Nebojša Arsenijević¹, Svetlana Đukić¹ and Živadin D. Bugarčić²

¹Faculty of Medicine, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica Street, 34000 Kragujevac, Serbia

²Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovica 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

Abstract: We have studied the kinetics of the complex formation of gold(III) complexes, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ (dichlorido(ethylenediamine)aurate(III)-ion), $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ (dichlorido(1,2-diaminocyclohexane)aurate(III)-ion) and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ (dichlorido(2,2'-bipyridyl)aurate(III)-ion) with guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP). It was shown that 5'-GMP have a high affinity for gold(III) complex, which may have important biological implications, since the interactions of Au(III) with DNA are thought to be responsible for the anti-tumor activity. The $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex is more reactive than $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ or $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$. The activation parameters for all studied reactions suggest an associative substitution mechanism. The cytotoxicity of gold(III) complexes was tested on A549 human lung carcinoma epithelial cell line and was evaluated by cytotoxic (MTT and LDH test) and apoptotic assays. The results showed that all tested gold(III) complexes displayed cytotoxic effect on A549 cells. Among the tested gold (III) complexes, AuBIPY showed the best cytotoxic effects.

Keywords: gold(III), complexes, DNA, kinetics, cytotoxic, A549 human lung carcinoma epithelial cell line.

INTRODUCTION

In recent years, great interest has been focused on gold(III) complexes as cytotoxic and anticancer drug [1-2]. To design a metal-based applicable anticancer drug, however, is quite challenging. Presently, platinum drugs are playing a major role in established medical treatments of cancer [3-4]. Gold(III) complexes are square-planar d^8 , isoelectronic and isostructural to Pt(II) complexes. Generally speaking, gold(III) complexes are not very stable under physiological conditions because of their high reduction potential and fast hydrolysis rate. Therefore, selection of a suitable ligand to stabilize the complex becomes a foremost challenge in the design of gold(III) with one or more multidentate ligand to enhance the stability of the complex. However, Au(III) is coordinated by at list two chelating nitrogen donors which lower the reduction potential of metal center and thereby stabilize the complex. The acceptable solution stability of these gold(III) complexes [5-6], facilitated extensive pharmacological investigation, both in vitro and in vivo [7-10].

We have performed and now report here a detailed study on the complex formation kinetics of some selected gold(III) complexes, viz. $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]$, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ with 5'-GMP. We choose 5'-GMP because it is the fragment of DNA, and it seems that DNA is the primary target for the gold(III) complexes. The reactions were studied in aqueous solutions at physiological pH (7.2), using stopped-flow technique.

In addition, we evaluated and report here *in vitro* cytotoxic activity of these complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. A549 cells are *in vitro* most usually used cancer cell line for research in the field of testing cytotoxicity and metabolism of new synthesized complexes towards human lung carcinoma epithelial cells [11].

It was envisaged that this study could throw more light on the interactions of gold(III) complexes with nitrogen-donor nucleophiles suggesting these complexes as potentially new therapeutic agents in the treatment of lung carcinoma.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Chemicals

The nucleophile guanosine-5'-monophosphate sodium salt hydrate, (5'-GMP) was obtained from Acros Organics. Nucleophile stock solutions were prepared shortly before use, by dissolving the chemicals in purified water. The ligands 2,2'-bipyridyl (bipy) and (1R,2R)-1,2-diaminocyclohexane (dach), ethylenediamine (en) were obtained from Acros Organics. Starting complex potassium tetrachloroaurate(III), $\text{K}[\text{AuCl}_4]$, was purchased from ABCR GmbH & Co. KG, 98%. All the other chemicals were of the highest purity commercially available and were used without further purification. Ultra pure water was used in all experiments.

The solutions of complexes and ligands were prepared in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.20). The reactions of bifunctional complexes were studied in the presence of 20 mM NaCl, to prevent the hydrolysis of complexes.

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II), *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), was purchased from Sigma-Aldrich.

*Address correspondence to this author at the Faculty of Medicine, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica Street, 34000 Kragujevac, Serbia; Tel: +381 34 306800; Fax: +38134306800, ext.112; E-mail: arne@medf.kg.ac.rs

2.2. Synthesis of the Complexes

The complexes $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ were prepared according to the published procedure [12]. Complex $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ was synthesized starting from KAuCl_4 . Salt (0.2 g, 0.5 mmol) was dissolved in a little amount of water and to the solution was dropped the solution obtained by dissolving (1R,2R)-1,2-diaminocyclohexane (0.057 g, 0.5 mmol) to the mixture of $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v). The reaction was stirred for 5 h at room temperature. Obtained yellow solution was left in the darkness to evaporate. After few days formed yellow crystals were filtrated, washed with cold water and dried. Found: H, 4.91; C, 13.66; N, 2.84; Calc. for $\text{AuC}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_3$: H, 5.34; C, 13.80; N, 2.71 %.

2.3. Instrumentation

Chemical analyses were performed on a Varian III CHNOS Elemental Analyzer, Element Analysensysteme, GmbH. The optical density was measured using microplate multimode detector Zenyth 3100. UV-VIS spectra were recorded on Shimadzu UV 250 and Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrophotometers with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. Kinetic measurements were carried out on an Applied Photophysics SX.18MV stopped-flow instrument coupled to an online data acquisition system. The temperature was controlled throughout all kinetic experiments to ± 0.1 K.

2.4. Kinetic Measurements

At the beginning of the investigations, spectral changes resulting from the mixing of complex and nucleophile solutions were recorded over the wavelength range 280 to 350 nm to establish a suitable wavelength at which kinetic measurements must be performed. After that, the reactions were initiated by mixing equal volumes of the complex and ligand solutions directly in the stopped-flow instruments and were followed for at least eight half-lives at determined wavelength (working wavelengths are given in Supp. Material, Tables S1-S3). All kinetic measurements were performed under *pseudo*-first-order conditions, *i.e.*, at least a 10-fold excess of the entering nucleophile was used. The kinetic traces were evaluated using the OLIS KINFIT (Jeferson, GA) set of programs. Kinetic runs were fitted as double exponential function for the reactions of bifunctional $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ complexes.

The observed *pseudo*-first-order rate constants, k_{obsd} , were calculated as the average value from five to eight independent kinetic runs. All experimental data are reported in Tables S1 – S3, Supp. Material.

All reactions were followed at three different temperatures (288, 298 and 310 K). The temperature was controlled throughout all kinetic experiments to ± 0.1 °C.

2.5. Culture of Human A549 Lung Carcinoma Epithelial Cell Line

The A549 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. The A549 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% FBS, 100 IU/mL penicillin G and

100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich chemical, Munich, Germany). A549 cells in passage 3 were used throughout these experiments.

2.6. Cytotoxicity Assays

Effects of gold(III) complexes on A549 cell viability were determined using MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric technique and LDH (Lactate dehydrogenase) assay.

2.6.1. MTT Assay

Gold(III) complexes are biologically active substances of special interest as potential anticancer agents. Effects of $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complexes on cell viability were determined using MTT colorimetric technique [13]. A549 cells were diluted with medium to 4×10^4 cells/mL and aliquots (4×10^3 cells/100µL) were placed in individual wells in 96-multiplates. After 24 hours, cells were treated with selected concentrations of complexes for 3 days. Control wells were prepared by the addition of culture medium. Wells containing culture medium without cells were used as blanks. After incubation drug containing medium was discarded and replaced with serum free medium containing 15% of MTT (5mg/ml) dye. After additional 4 h of incubation 37°C in a 5% CO₂ incubator, medium with MTT was removed and DMSO (150 µL) with glycine buffer (20 µL) was added to dissolve the blue formazan crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula:

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 - ((\text{TS} - \text{BG}_0) - \text{E}) / (\text{TS} - \text{BG}_0) \times 100$$

where BG₀ is for background of medium alone, TS is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is for experimental well.

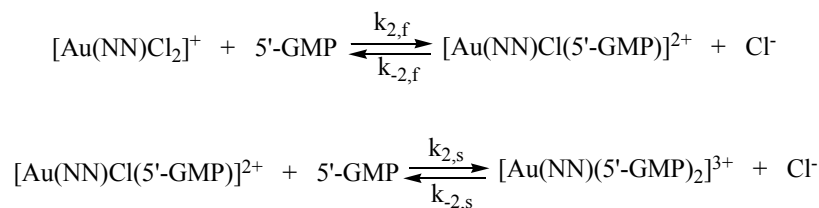
2.6.2. LDH Assay

LDH assays can be performed by assessing LDH released into the media as a marker of dead cells or performing lysis LDH as a marker of remaining live cells. LDH, therefore, is the most widely used marker in cytotoxicity study. [14] Cytotoxicity of gold complexes was examined by Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Applied Science). A549 cells were prepared and treated with complexes in the same manner as for MTT assay. Additional wells were prepared as high control, cells were treated with Triton X (1%). Cells exposed to medium were used as low controls. After treatment, supernatant (100µL) was transferred to new plate and incubated with an equivalent volume of substrate solution. After incubating the plates for 30 minutes at RT, 50 µl/well stop solution was added and data were acquired by spectrophotometry at 450 nm. The percentage of dead cells was calculated using the formula:

$$\% \text{ of dead cells} = (\text{exp. value} - \text{low control}) / (\text{high control} - \text{low control}) \times 100$$

2.7. Apoptosis Assay

For the detection of apoptosis, the Annexin V binding capacity of treated cells was examined by flow cytometry. At the onset of apoptosis, phosphatidylserine which is normally



NN = ethilendiamine, 2,2'-bipyridine or 1,2-diaminocyclohexane

Scheme 1.

found on the internal part of the plasma membrane becomes translocated to the external portion of the membrane and becomes available to bind to the annexin V-FITC. 7-AAD bind to the cellular DNA in cells where the cell membrane has been totally compromised [15]. After A549 cells reached subconfluency, medium was replaced with gold (III) complexes (500 μM). Exposed A549 cells were placed at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 24h. Cultured cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, Sigma Aldrich) and resuspended in 1x binding buffer (10x binding buffer: 0,1 M Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) at concentration 1x10⁶ / mL. Annexin FITC and propidium iodide (PI) were added to the 100 μL of cell suspension and incubated for 15 min at room temperature (25 oC) in the dark. After incubation 400 μL of 1x binding buffer was added to each tube and stained cells were analyzed within 1 hour using FACS Calibur (BD, San Jose, USA) and WinMDI software. Since, Annexin V FITC staining precedes the loss of membrane integrity that accompanies the later stage identified by PI, Annexin FITC positive, PI negative indicates early apoptosis, while viable cells are Annexin V FITC negative, PI negative. Cells that are late apoptosis or already dead are both Annexin V FITC and PI positive.

3. RESULTS

3.1. Kinetic Measurements

Here we report the results of kinetic studies of some bifunctional gold(III) complexes. The substitution reactions of gold(III) complexes $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ with nucleophile 5'-GMP were investigated spectrophotometrically by following the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time under *pseudo*-first-order conditions. All reactions were studied at physiological (pH = 7.20) conditions in 25 mM Hepes, with the presence of NaCl, to prevent the hydrolysis of the starting complexes. All reactions were performed as a function of nucleophile concentration and temperature using stopped-flow technique.

The substitution reactions of $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ with nucleophile 5'-GMP were studied also at physiological pH 7.20 in 25 mM Hepes with the presence of 20 mM NaCl, to prevent the hydrolysis of the complexes. The process of substitution could be described as shown in Scheme 1.

The first step of the substitution is a reversible process, where the direct reaction nucleophile substitutes one chloride ion from the coordination sphere of the starting complex. However, due to the presence of 20 mM NaCl solvolytic step

is eliminated and the reaction becomes equilibrium. The second step is also equilibrium when another molecule of nucleophile substitutes the other chloride ion.

The obtained *pseudo*-first order rate constants for the first ($k_{\text{obsd},f}$) and the second ($k_{\text{obsd},s}$) steps of the substitution (data are given in Tables S1- S3. Supp. Material) were plotted versus the concentrations of the entering nucleophiles. A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all reactions. Representative plots for the substitution reactions of $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ complexes with 5'-GMP are shown in Fig. (2), and in Supp. Mat., Fig. (1S and 2S).

The observed *pseudo*-first-order rate constant, $k_{\text{obsd},f}$, as a function of the total concentration of nucleophile is described by Eq. (1) and the rate constants $k_{2,f}$ and $k_{-2,f}$ can be determined from the slopes and intercepts of the plots.

$$k_{\text{obsd},f} = k_{-2,f} + k_{2,f}[\text{Nu}] \quad (1)$$

The observed rate constants for the second reaction step can be expressed as given in Eq. 2.

$$k_{\text{obsd},s} = k_{-2,s} + k_{2,s}[\text{Nu}] \quad (2)$$

All The rate constants for the first and the second reaction steps for the all reactions, calculated by OriginPro8, are summarized in Table 1.

The first reaction step occurs via nucleophilic attack of N7 donor atom of purine base comprised in 5'-GMP, resulting in the formation of a product by departing one chloride ion [16-17]. The second step includes the substitution of another chloride ion from the starting complex, when 1:2 complexes is formed. However, the first and the second steps of the substitution of $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex are faster than in the case of $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ complex due to the same effect of inert, bidentate, ligand as it was explained before [17].

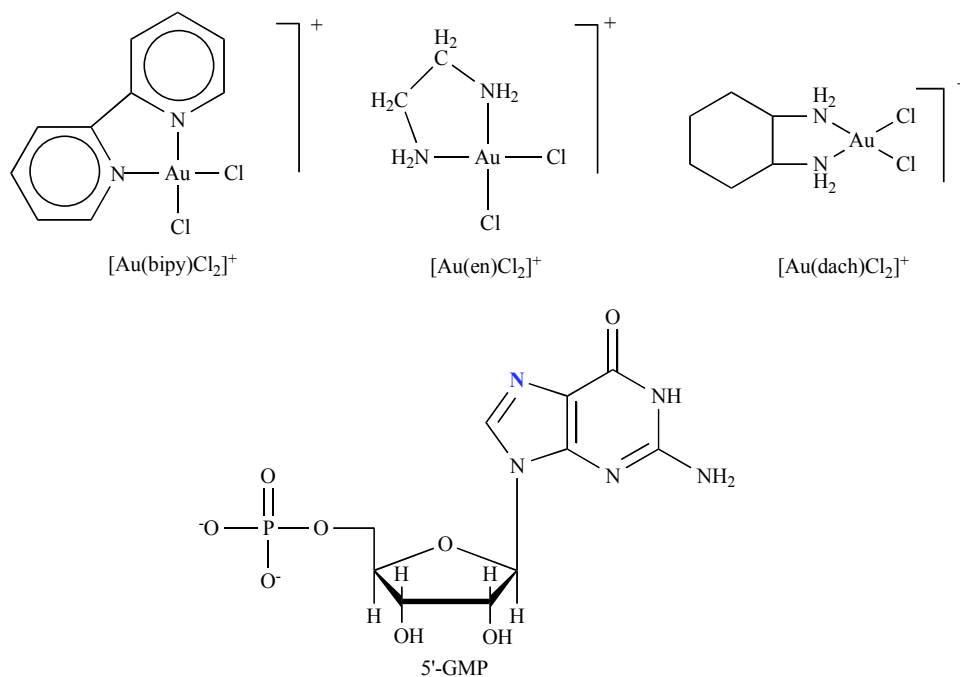
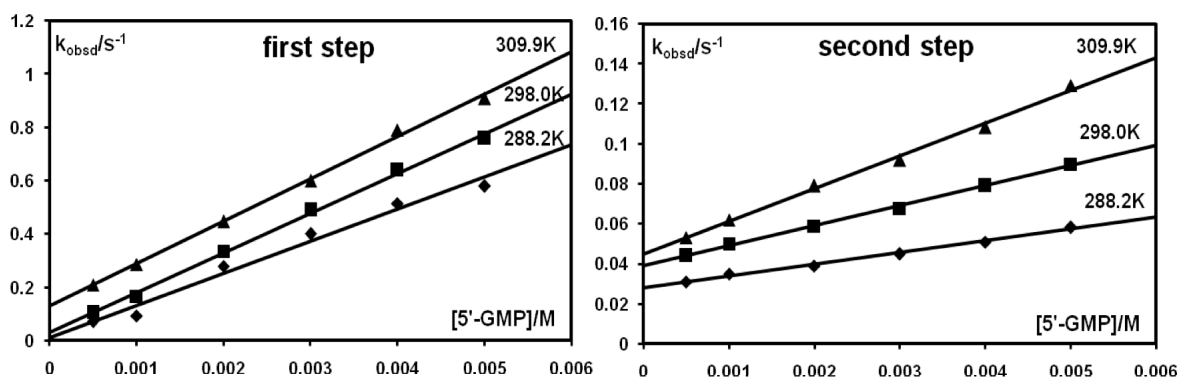
The temperature dependence of rate constants enabled the calculation of the activation enthalpies and entropies by using Eyring equation. Activation parameters derived from these experiments are summarized in Table 1. The entropy of activation for all studied systems is large and negative, which is in line with an associative substitution mechanism.

3.2. Gold (III) Complexes Showed Cytotoxic Effects and Induce Apoptosis of A549 Cells

All of three gold (III) complexes showed cytotoxic effect on A549 cells (Fig. 3, 4, 5). The concentration increase is followed by markedly increase of apoptotic cell's percentage. The concentrations from 7.8 μM to 250 μM of all tested

Table 1. Rate Constants and Activation Parameters for the First and the Second Steps of the Substitution Reactions of $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ Complexes with Ligand 5'-GMP at 298 K in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2 and 20 mM NaCl).

5'-GMP	$k_{2,f}/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/\text{J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$	$k_{1,f}/\text{s}^{-1}$	$\Delta H_1^\ddagger/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_1^\ddagger/\text{J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$
<i>First step</i>						
$[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$	$(1.49 \pm 0.05) \cdot 10^2$	7 ± 3	-180 ± 10	$(3.9 \pm 0.9) \times 10^{-2}$	86 ± 2	-7 ± 2
$[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$	$(6.6 \pm 0.2) \cdot 10^1$	10 ± 3	-170 ± 10	$(1.86 \pm 0.04) \cdot 10^{-1}$	21 ± 2	-190 ± 20
$[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$	$(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^1$	24 ± 3	140 ± 10	$(8.2 \pm 0.7) \cdot 10^{-2}$	39 ± 2	-139 ± 8
<i>Second step</i>						
$\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2^+$	$(1.03 \pm 0.03) \cdot 10^1$	33 ± 3	-120 ± 10	$(3.9 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	14 ± 3	-169 ± 9
$[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$	6.2 ± 0.3	27 ± 5	140 ± 10	$(3.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$	48 ± 2	-120 ± 10
$[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$	2.5 ± 0.1	26 ± 2	-154 ± 9	$(3.1 \pm 0.04) \cdot 10^{-2}$	8 ± 4	-140 ± 10

**Fig. (1).** Structures of the investigated complexes and nucleophile.**Fig. (2).** Pseudo-first order rate constants for the first (k_{obsd1}) and the second (k_{obsd2}) steps of the substitution reactions between $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex and 5'-GMP as a function of ligand concentration and temperature, in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) with the addition of 20 mM NaCl.

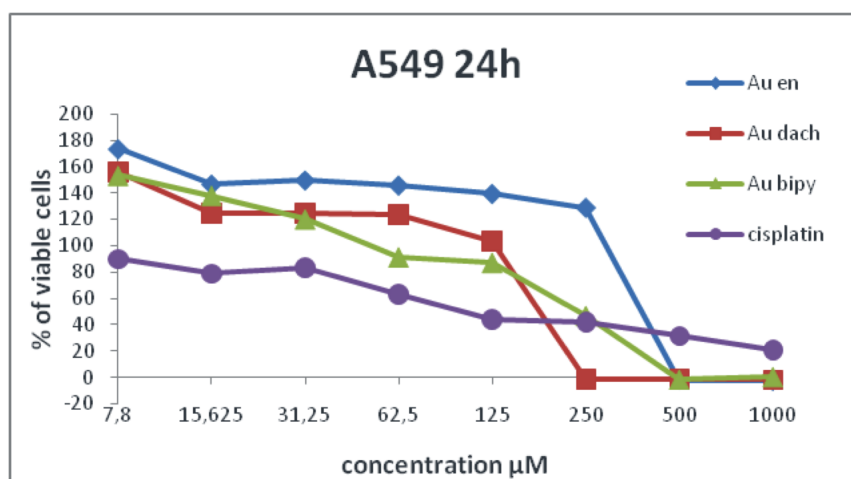


Fig. (3). The results of MTT cytotoxic assay.

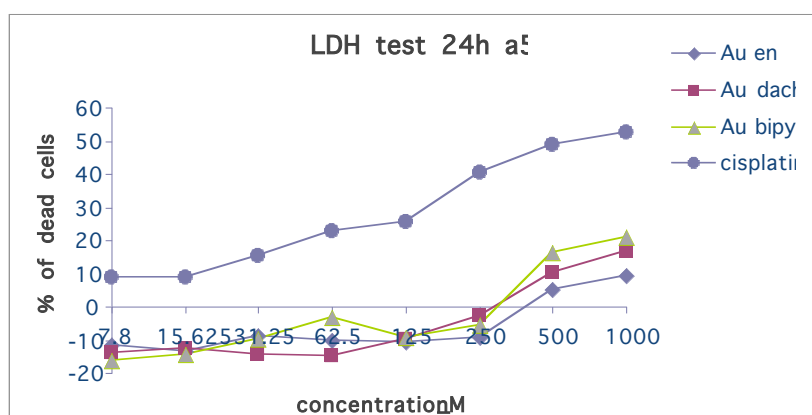


Fig. (4). The results of LDH cytotoxic assay.

complexes showed similar and low cytotoxic effect. However, gold complexes differ at concentration of 250 µM. $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ complex show high cytotoxicity with almost 100% of dead cells and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ had low cytotoxic effect (40% dead cells). Interestingly, A549 cells proliferated 24 h after treatment with $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ complex (at concentration 250 µM). All three gold (III) complexes show 100% of cytotoxicity at the concentration of 500 µM (Fig. 3).

Results obtained from LDH assay correlate with MTT results (Fig. 4). Apoptotic assay showed that most of dead cells were in the stage of early apoptosis (Fig. 5).

Flow cytometry results have shown that cisplatin had 54.77% cells in the early apoptosis, $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ 7.16%, $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ 21.19% and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ 60.92 %.

This indicates that $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ shows higher cytotoxic effect on A549 cells after 24hrs of exposure in comparison to the cisplatin. Also it is shown that at the concentration of 250 µM both cisplatin and $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ show same level of cytotoxicity measured through MTT assay.

4. DISCUSSION

Here we, for the first time, demonstrate the cytotoxic effects of newly synthesized $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$

$[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ gold (III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. Our results showed that all tested gold(III) complexes displayed cytotoxic effect on A549 cells (Fig. 3,4,5). The concentration decrease was followed by markedly decrease of apoptotic cell's percentage. At the highest and at the lowest concentrations (500 µM vs. 7.8 µM) all tested complexes showed similar cytotoxic effects. However, at the concentration of 250 µM for which we suppose that could be used *in vivo*, $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex showed the best cytotoxic effects among tested gold (III) complexes and similar cytotoxicity compared to cisplatin that we used as control. At concentration 250 µM, only 24 hours after treatment with $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ almost all A549 cells were dead (Fig. 3).

In addition, apoptotic assay showed high percentage of early apoptotic cells after treatment with $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ (60.92 %) compared with cisplatin (54.77%) and other tested gold (III) complexes ($[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ 21.19% and $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ 7.16%) suggesting apoptosis as the main mechanism of $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ cytotoxicity (Fig. 5).

The activation parameters for all studied reactions suggest an associative substitution mechanism. As previously described, the first reaction step occurs via nucleophilic attack of N7 donor atom of purine base comprised in 5'-

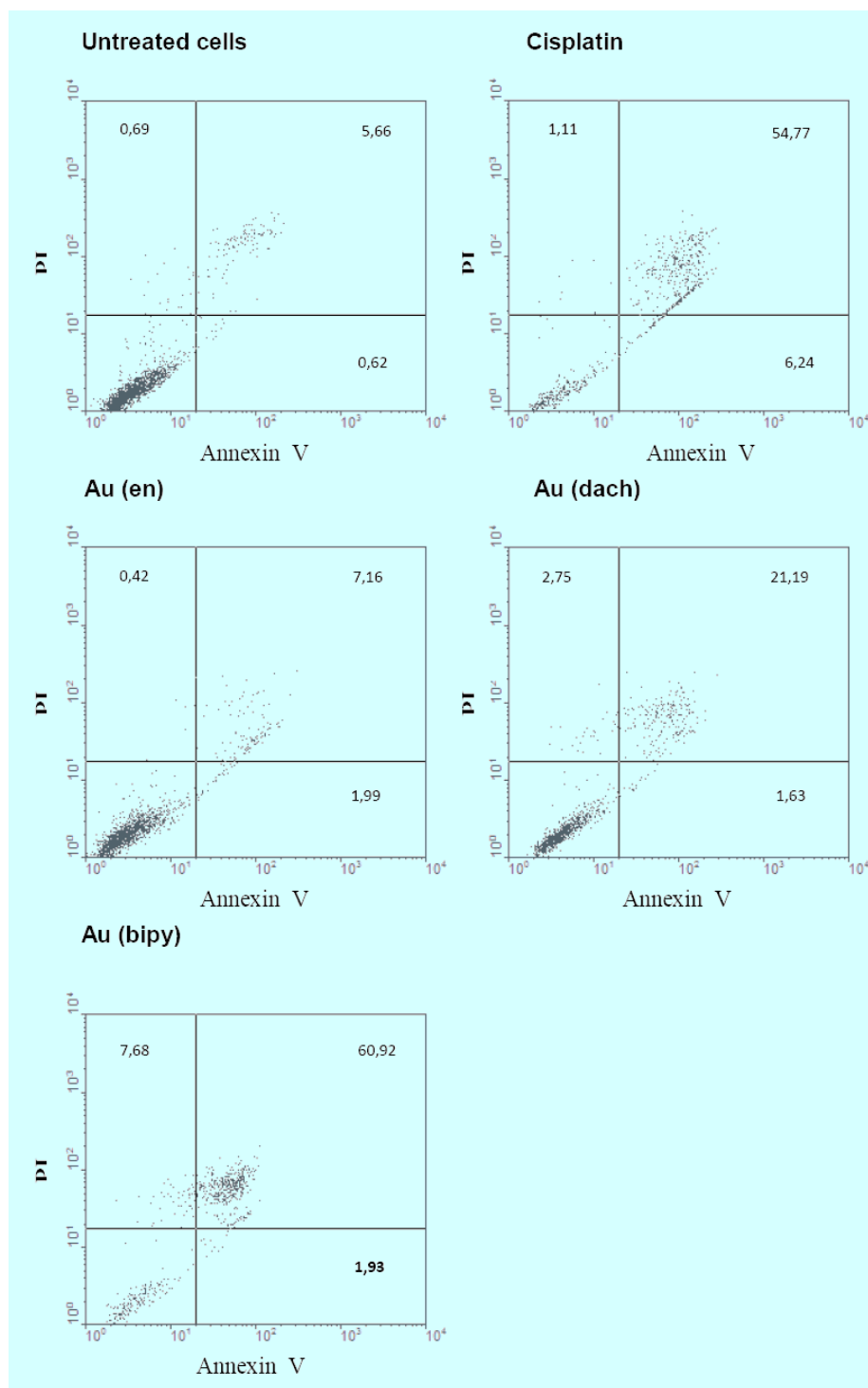


Fig. (5). The results of Apoptotic assay.

GMP, resulting in the formation of a product by departing one chloride ion [16-17]. The second step includes the substitution of another chloride ion from the starting complex, when 1:2 complexes is formed. Both the first and the second steps of the substitution of $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex are faster than in the case of $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ complexes suggesting better efficacy of $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ complex.

In line with the obtained results, we suppose that $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ complex could be a good candidate for future

pharmacological evaluation as new therapeutic agent in the pre-clinical studies for the treatment of lung carcinoma.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia, project No. 172011 and project No. ON 175069.

DISCLOSURE

Part of information included in this article has been previously published in Journal of Inorganic Biochemistry Volume 104, Issue 9, September 2010, Pages 944-949.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] Messori L, Marcon G. Gold complexes as antitumor agents. *Met. Ions Biol. Syst.* **2004**, *42*, 385-424.
- [2] Dyson PJ, Sava G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Trans.*, **2006**, *16*, 1929-1933
- [3] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 307-320.
- [4] Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3611-3616.
- [5] Giovagnini L, Ronconi L, Aldinucci D, Lorenzon D, Sitran S, Fregona D. Synthesis, characterization, and comparative in vitro cytotoxicity studies of platinum(II), palladium(II), and gold(III) methylsarcosinedithiocarbamate complexes. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 1588-1595.
- [6] Che CM, Sun RW, Yu WY, Ko CB, Zhu N, Sun H. Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells. *Chem. Comm.* **2003**, *14*, 1718-1719.
- [7] Casini A, Hartinger C, Gabbiani C, Mini E, Dyson PJ, Keppler BK, Messori L. Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 564-575.
- [8] Tiekink ER. Anti-cancer potential of gold complexes. *Inflammopharmacology.* **2008**, *16*, 138-142.
- [9] Garza-Ortiz A, den Dulk H, Brouwer J, Kooijman H, Spek AL, Reedijk J. The synthesis, chemical and biological properties of dichlorido(azpy)gold(III) chloride (azpy=2-(phenylazo)pyridine) and the gold-induced conversion of the azpy ligand to the chloride of the novel tricyclic pyrido[2,1-c][1,2,4]benzotriazin-11-ium cation. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 1922-1930.
- [10] Casini A, Kelter G, Gabbiani C, Cinellu MA, Minghetti G, Fregona D, Fiebig HH, Messori L. Chemistry, antiproliferative properties, tumor selectivity, and molecular mechanisms of novel gold(III) compounds for cancer treatment: a systematic study. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 1139-1149.
- [11] Zhu S, Gorski W, Powell DR, Walmsley JA. Synthesis, structures, and electrochemistry of gold(III) ethylenediamine complexes and interactions with guanosine 5'-monophosphate. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 2688-2694.
- [12] Sykes AG. *Advances in Inorganic and Bioinorganic Reaction Mechanisms*. Academic Press, New York, **1986**.
- [13] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1973**, *51*, 1417-1423.
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, **1983**, *65*, 55-63.
- [15] Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol.* **1999**, *19*, 163-165.
- [16] Shouman Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods.* **1998**, *217*, 61-70.
- [17] Milovanović M, Djeković A, Volarević V, Petrović B, Arsenijević N, Bugarcic ZD. Ligand substitution reactions and cytotoxic properties of [Au(L)Cl₂](+) and [AuCl₂(DMSO)₂]⁺ complexes (L=ethylenediamine and S-methyl-L-cysteine). *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 944-949.

Effects of aurothiomalate and gold(III) complexes on spontaneous motility of isolated human oviduct

Slobodan M. Janković · Ana Djeković ·
Živadin Bugarčić · Snezana V. Janković ·
Goran Lukić · Marko Folić · Dragan Čanović

Received: 14 January 2012 / Accepted: 7 May 2012 / Published online: 19 May 2012
© Springer Science+Business Media, LLC. 2012

Abstract Organic gold complexes have different biological activity, depending on their potential for interactions with key functional molecules. The aim of this study was to investigate potential of several newly synthesized organic gold complexes to influence spontaneous motility of the Fallopian tubes. The effects of $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ (dichloride(2,2'-bipyridyl)aurate(III)-ion), aurothiomalate, $[\text{Au}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ and DMSO on spontaneous motility of Fallopian tubes were tested on the isolated tube segments in vitro. Aurothiomalate (from 2.9×10^{-9} to 4.9×10^{-4} M/l), $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (from 3.3×10^{-9} to 4.2×10^{-5} M/l) and DMSO (from 1.9×10^{-8} to 1.0×10^{-5} M/l) did not affect spontaneous contractions of the isolated

Fallopian tube ampulla, while $[\text{Au}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (from 2.9×10^{-9} to 4.2×10^{-5} M/l) showed concentration-dependent increase (stimulation) of spontaneous contractions of the isolated Fallopian tube isthmus, and remained without effect on the isolated ampulla. The drugs designed as organic gold complexes with weaker bonds between the gold itself and organic part of a molecule could adversely affect motility of the Fallopian tubes, and theoretically fertility of women taking such drugs in their reproductive age.

Keywords Gold(III) · Complexes · Kinetics · Cytotoxicity · 5'-GMP · Fallopian tubes

S. M. Janković (✉) · S. V. Janković · M. Folić
Department of Pharmacology and Toxicology, Medical
Faculty, University of Kragujevac, Ul. Svetozara
Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia
e-mail: slobodan.jankovic@medf.kg.ac.rs

A. Djeković · Ž. Bugarčić (✉)
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University
of Kragujevac, R. Domanovića 12, P.O. Box 60,
34000 Kragujevac, Serbia
e-mail: bugarcic@kg.ac.rs

G. Lukić
Clinic for Gynecology and Obstetrics, Medical Faculty,
University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

D. Čanović
Clinic for surgery, Medical Faculty,
University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Introduction

There is long tradition of using gold and platinum drugs in medicine for treatment of various diseases. In particular, during the last 10–20 years, much interest has focused on gold(III) complexes (Messori and Marcon 2004; Dyson and Sava 2006). Presently, platinum drugs are playing a major role as established medical treatments of cancer (Wang and Lippard 2005; Reedijk 2003), while drugs with gold are used mostly in rheumatology. Gold(III) complexes are square-planar d^8 , isoelectronic and isostructural to Pt(II) complexes. Generally speaking, gold(III) complexes are not very stable under physiological conditions due to their high reduction potential and fast

hydrolysis rate. Therefore, selection of a suitable ligand to enhance the stability became a challenge in the design of gold(III) complexes. The Au(III) is best coordinated by at least two chelating nitrogen donors which lower the reduction potential of metal center and thereby stabilize the complex. Stability of these gold(III) complexes (Giovagnini et al. 2005; Che et al. 2003) in solution was acceptable, which facilitated extensive pharmacological investigation, both in vitro and in vivo (Casina et al. 2008; Tiekling 2008; Garza-Ortiz et al. 2007; Casini et al. 2009).

Female patients with rheumatoid arthritis do have decreased fertility rate, which is about 88 % of fertility rate in healthy females of the same age (Wallenius et al. 2011). Although reports on additional decreased fertility in female patients with rheumatoid arthritis who take gold-containing drugs are rare (Janssen and Genta 2000), it cannot be excluded due to paucity of published studies about this topic (Capell 2002).

The effects of gold complexes on motility of internal hollow organs were rarely investigated in the past. In an early study on isolated guinea pig tracheal rings sodium aurothiomalate and gold chloride inhibited contractile effect of histamine (Suzuki et al. 1983) in micromolar concentrations, but this effect was not reproduced in experiments on isolated proximal and distal canine airway smooth muscles (Ledford et al. 1989). Different effects on smooth muscles were observed for various organic compounds of gold: while auranofin markedly inhibited contractile response of the longitudinal muscle strips from the gastric body of the guinea-pig stomach, elicited by epidermal growth factor—urogastrone, aurothiomalate and aurothioglucose did not have any effect (Itoh et al. 1988). Also, direct vasodilating effect in the patients with rheumatoid arthritis was frequently observed after injection of aurothiomalate, but not after injection of aurothioglucose (Gottlieb and Brown 1977). Effects of gold compounds on smooth muscles probably depend on their ability to bind for enzymes or second messengers, like cGMP, which are involved in processes of contraction or relaxation; the binding of gold alters functioning of these regulatory molecules, and affects motility of hollow organs (Mietens et al. 2012).

The effects of organic gold compounds on smooth muscles of oviduct were not previously investigated at all. However, since aurothiomalate inhibits penetration of sperm into zona pellucida of hamster

oocyte (Corselli and Talbot 1987), influence of organic gold compounds on many different aspects of fertilization (including Fallopian tubes motility) could not be excluded. Being highly prevalent disease (overall sex and age adjusted prevalence is 0.72 %) (Myasoedova et al. 2010) with mean age of the patients of around 41 year (Owino et al. 2009), rheumatoid arthritis affects great number of females in their reproductive period. Since organic preparations of gold are still widely used for treatment of rheumatoid arthritis (Gibofsky and Yazici 2010), their eventual influence on process of fertilization could have significant clinical implications. The aim of our study was to investigate whether aurothiomalate and two novel organic compounds of gold influence spontaneous motility of the isolated human Fallopian tubes.

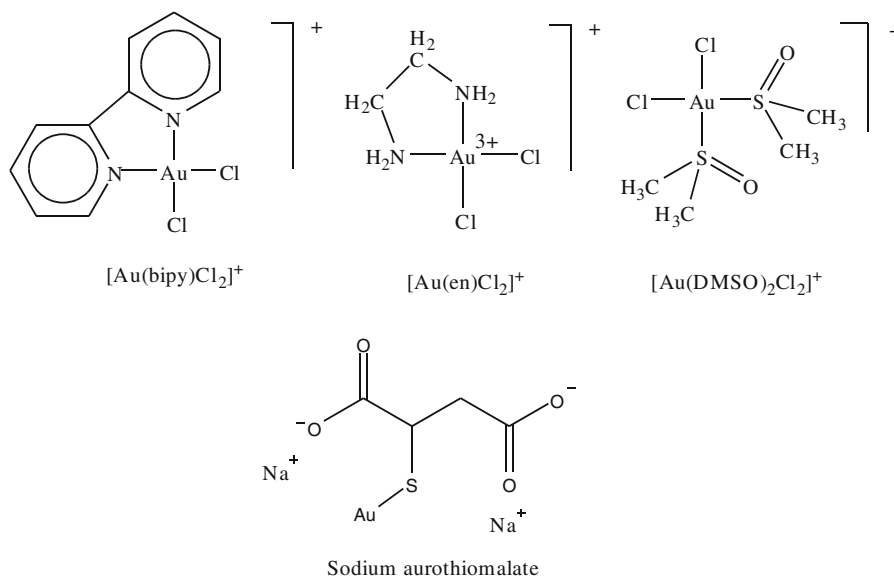
Materials and methods

Chemicals

The ligand 2,2'-bipyridyl(bipy) was obtained from Acros Organics. Starting complex potassium tetrachloridoaurate(III), $K[AuCl_4]$, was purchased from ABCR GmbH & Co. KG, 98 %. Gold sodium thiomalate hydrate (aurothiomalate) was purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). All the other chemicals were of the highest purity commercially available and were used without further purification. Ultra pure water was used in all experiments.

Synthesis of the complexes

The complex $[Au(bipy)Cl_2]Cl$ was prepared according to the published procedure (Zhu et al. 2006; Skibsted 1986; Milovanovic et al. 2010). Dichloridobis(dimethylsulphoxide)gold(III) chloride, $[Au(DMSO)_2Cl_2]Cl$, was synthesized by dissolving $KAuCl_4$ (0.2 g, 0.53 mM) in 5 cm³ 0.05 M HCl in the dark. Under continuous stirring to the solution were dropped, first, 75 μ l of DMSO (1.06 μ M) and later solution of 0.1 M NaOH, to adjust pH about 4.5. The mixture was stirred for 5 h at room temperature and the obtained yellow solution was left in the darkness to evaporate. After few days formed dark yellow crystals were filtrated, washed with cold water and dried. Found: H, 1.87; C, 7.21; S, 7.18. Calc. for $AuC_4S_2O_2H_{12}Cl_3$: H, 1.84; C,

Fig. 1 Structures of some gold compounds

7.32; S, 7.76 %. Structures of the investigated complexes are shown in Fig. 1.

Instrumentation

Chemical analyses were performed on a Varian III CHNOS Elemental Analyzer, Element Analysensysteme, GmbH. The optical density was measured using microplate multimode detector Zenyth 3100. UV–Vis spectra were recorded on Shimadzu UV 250 and Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrophotometers with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells.

Patients

Fallopian tubes were taken from 18 female patients (one tube from each patient) during abdominal hysterectomy with adnexectomy. All patients underwent surgery because of extensive uterine fibroids which were causing prolonged uterine bleeding. The patients were unable to identify regular menstrual bleeding for 3 months prior to hospital admission. The mean age of the patients was 44.6 ± 5.4 years, with the range from 36 to 56 years. The study was approved by Ethics Committee of Clinical Center “Kragujevac”, and the patient signed the informed consent forms.

All patients underwent surgery from 2008 to 2010 in the Gynecological Clinic of Clinical Centre “Kragujevac” in Kragujevac, Serbia. The time span of

sample collection was 22 months, due to difficulties in obtaining undamaged samples of the same size. None of the patients received sex hormones for one and a half months prior to the operation. The operations were performed under general anesthesia produced by gas N₂O, opioid fentanyl and neuroleptic droperidol. The anesthesia was induced by intravenous injection of thiopental sodium, and muscle relaxation achieved initially by succinyl-choline and later on by pancuronium. All patients were pre-medicated with 0.5 mg of atropine subcutaneously.

After clamping the blood supply and resecting a Fallopian tube it was placed in 250 ml dish filled with De Jalons solution (154 mM NaCl, 5.95 mM NaHCO₃, 5.63 mM KCl, 0.54 mM CaCl₂·2H₂O, 2.78 mM glucose) which was gassed (95 % O₂ and 5 % CO₂, 5 ml/min) and transported to the laboratory.

Isolated preparations

About fifteen minutes after taking a Fallopian tube in the operating room the isolated preparations were mounted in an isolated organ bath. Two types of Fallopian tube preparations were isolated: isthmus and ampulla. The serosa was removed from both the isthmus and the ampullar preparations. The isthmus preparations with following measures were used in the experiments: 4 cm in length, wall thickness 1.2 mm and the lumen diameter 1 mm. Also, the ampullar

preparations with following measures were used in the experiments: 5 cm in length, wall thickness 1.2 mm and the lumen diameter 5–6 mm. Both types of preparations were mounted in an organ bath longitudinally, analogous with Magnus preparations of rat ileum (Magnus 1904). Opposite walls of the preparation were attached to the bath base and the transducer, respectively.

The bath and the transducer

The isolated preparations were mounted in 75 ml isolated organ bath, filled with De Jalons solution (154 mM NaCl, 5.95 mM NaHCO₃, 5.63 mM KCl, 0.54 mM CaCl₂·2H₂O, 2.78 mM glucose). The bath solution was maintained at 37 °C and aerated with 95 % O₂ and 5 % CO₂. One end of the isolated preparation was attached to the bath base, and the other to the lever of the isometric transducer. The tension of the isolated preparations was continuously recorded with the isometric transducer (Palmer Bio Science, Los Angeles, CA, USA) and registered on personal computer using Majk Electronic interface and software (Majk Electronic, Mladenovac, Serbia and Montenegro). The isolated preparations were given a passive load of 1 mN and allowed to equilibrate for 1 h before an experiment started.

The agonists

The spontaneous contractions of isolated preparations were measured as area under the curve (AUC). The effects of experimental substances on area under the contraction curve were measured.

In the beginning of each experiment, at least one hour of spontaneous activity was recorded, in order to observe for spontaneous changes of phasic contractions. The experimental substances were added to the isolated organ bath cumulatively, without washing between the subsequent doses. The interval between two adjacent doses was always 5–6 min. After cumulating all doses of a substance, the bath was washed three times, and the isolated preparation was allowed to rest for further 30 min. The effect of each experimental substance was observed on at least four isolated preparations, taken from different individuals.

Statistics

The effect of each concentration of a test-substance on spontaneous contractions was expressed as a percentage of the maximum effect obtained with that agonist, and used for construction of concentration–response curves. The concentration–response relationship was determined by linear regression on logarithmically transformed data calculated according to the method of least squares. The range of values used for the linear regression was from 15 to 85 % of the maximal response, in the more linear part of the curve. The concentration of an agonist eliciting 50 % of its own maximum response (EC₅₀) and its confidence limits (1.96 × standard error) were determined graphically for each curve by linear interpolation (Bowman and Rand 1980; Kenakin 1984).

The significance of changes in phasic activity of the isolated preparations was tested by one-way analysis of variance.

Results

Isolated preparations of ampulla

Preparations from all patients showed spontaneous activity comprised of slow phasic contractions with amplitude of $10.7 \pm 3.9 \mu\text{N}$ ($3.9 \mu\text{N}$ = standard deviation [SD]) and frequency of 3–7 cycles per minute.

The spontaneous change in phasic activity of isolated ampulla was not observed after 2 h of follow-up ($F = 0.057$, $df_1 = 10$, $df_2 = 32$, $p > 0.05$).

Aurothiomalate (from 2.9×10^{-9} to 4.9×10^{-4} M/l), [Au(bipy)Cl₂]Cl (from 3.3×10^{-9} to 4.2×10^{-5} M/l), [Au(DMSO)₂Cl₂]Cl (from 1.9×10^{-8} to 1.0×10^{-5} M/l) and DMSO (from 1.9×10^{-8} to 1.0×10^{-5} M/l) did not affect spontaneous contractions of the isolated Fallopian tube ampulla ($F = 0.873$, $df_1 = 8$, $df_2 = 27$, $p > 0.05$; $F = 1.573$, $df_1 = 7$, $df_2 = 18$, $p > 0.05$; $F = 1.279$, $df_1 = 7$, $df_2 = 24$, $p > 0.05$; and $F = 0.636$, $df_1 = 7$, $df_2 = 23$, $p > 0.05$ respectively).

Isolated preparations of isthmus

Preparations from all patients showed spontaneous activity comprised of slow phasic contractions with

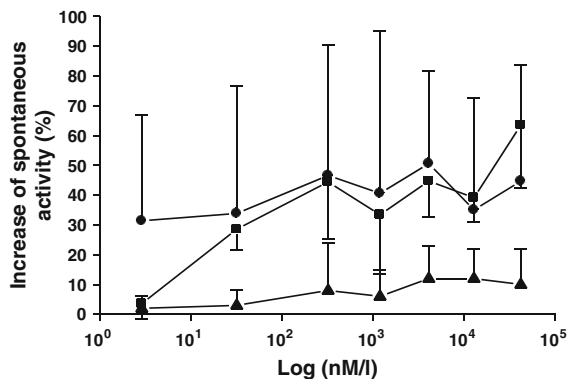


Fig. 2 Semi-logarithmic plot of stimulatory effects of [Au(DMSO)₂Cl₂]Cl (open square), aurothiomalate (black up-pointing triangle) and [Au(bipy)Cl₂]Cl (black circle) on spontaneous contractions of isolated human oviduct isthmus. Each point represents mean effect obtained from experiments on isolated preparations taken from four different persons. Error bars standard deviations. Half of the error bars was omitted for the sake of clarity

amplitude of $7.6 \pm 2.8 \mu\text{N}$ ($2.8 \mu\text{N}$ = standard deviation [SD]) and frequency of 3–8 cycles per minute.

The spontaneous change in phasic activity of isolated isthmus was not observed after 2 h of follow-up ($F = 0.395$, $df_1 = 7$, $df_2 = 22$, $p > 0.05$).

[Au(DMSO)₂Cl₂]Cl (from 2.9×10^{-9} to 4.2×10^{-5} M/l) showed concentration-dependent increase (stimulation) of spontaneous contractions of the isolated isthmus. ($EC_{50} = 8.62 \pm 5.08 \times 10^{-6}$ M/l, $r = 0.620$, $p < 0.05$) (Fig. 2).

Aurothiomalate (from 2.9×10^{-9} to 4.9×10^{-4} M/l), [Au(bipy)Cl₂]Cl (from 3.3×10^{-9} to 4.2×10^{-5} M/l) and DMSO (from 1.9×10^{-8} to 1.0×10^{-5} M/l) did not affect spontaneous contractions of the isolated Fallopian tube isthmus ($F = 0.900$, $df_1 = 8$, $df_2 = 36$, $p > 0.05$; $F = 0.130$, $df_1 = 6$, $df_2 = 21$, $p > 0.05$; and $F = 0.290$, $df_1 = 10$, $df_2 = 44$, $p > 0.05$, respectively) in a concentration-dependent manner (Fig. 2).

Discussion

Gold(III) complexes react much faster than Pt(II) complexes with the same nucleophiles (Bugarcic et al. 2008). Nucleotides (like 5'-GMP) have a higher affinity for gold(III) complex than chloride, which may have important biological implications. In our

previous study (Arsenijevic et al. 2012) we have shown that Au(III) readily binds to guanosine 5'-monophosphate (5'-GMP) via nucleophilic attack on N7 atom of guanine (Zhu et al. 2006; Skibsted 1986; Milovanovic et al. 2010) similar interaction could be expected from Au(III) and physiological precursor of 5'-GMP, guanosine-3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP). Decrease in free intracellular cGMP in human semen is associated with decreased sperm motility (Zhang and Zheng 1996; Mostafa 2007), decreased Leydig cell secretory function, decreased motility of epididymis, decreased prostatic secretory function and male infertility (Dimitriadis et al. 2009). On the other hand, increase in free intracellular cGMP is associated with increased viability of human granulosa luteinized cells, better development of pre-ovulatory follicles and increased fertilization rate of oocytes (Dineva et al. 2011). Au(III) complexes and other drugs containing gold which binds to the cGMP could adversely influence both male and female fertility, through decrease of intracellular free cGMP which should be available for normal signaling in reproductive tissues.

The type of coordinated inert ligand has a large effect on reaction rate. The [Au(bipy)Cl₂]⁺ complex is more reactive than [Au(en)Cl₂]⁺. The activation parameters for all studied reactions suggest an associative substitution mechanism. In the second step of the reaction, another chloride ion from the starting complex is substituted, and 1:2 complexes are formed. Both the first and the second steps of the substitution of [Au(bipy)Cl₂]⁺ complex are faster than in the case of [Au(en)Cl₂]⁺ complexes suggesting higher biological activity of [Au(bipy)Cl₂]⁺, similar to other labile gold complexes, like [Au(DMSO)₂Cl₂]Cl (Milovanovic et al. 2010).

Gold complexes could be good candidates for future pharmacological evaluation as new therapeutic agents in the pre-clinical studies for treatment of lung carcinoma, considering their recently described cytotoxic effect in vitro (Milovanovic et al. 2010). However, their adverse effects profile is also important, including interference with motility of hollow organs. It was shown that several metals (zinc, copper and titanium) may inhibit contractility of human airway smooth muscle cells, without affecting their viability (Berntsen et al. 2010). Although mechanism of their action remains unclear, it is unlikely to be mediated by some non-specific pathway, like

metal-induced generation of reactive oxygen species (Berntsen et al. 2010; Ozturk et al. 2009; Vaziri 2008). On the other hand, some heavy metals like lead induce contraction of vascular smooth muscle cells through activation of protein kinase C (Ozturk et al. 2009; Vaziri 2008). Incubation of isolated smooth muscle strips from aorta with cadmium led to augmentation of 5-hydroxytryptamine-stimulated inositol monophosphate accumulation and contraction (Sakurada and Wakabayashi 1999). All these experimental data suggest significant influence of metals, including gold, on tone and spontaneous activity of smooth muscle organs in human body.

In our study only one of the gold(III) preparations used, $[\text{Au}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$, produced stimulation of spontaneous activity of isolated oviduct. This effect should be attributed to the gold itself, since in our experiments with DMSO alone no changes in spontaneous motility of Fallopian tubes happened. Since gold is more easily released from this organic compound than from aurothiomalate or $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]\text{Cl}$, this could explain better contact of gold with smooth muscle cells and observed differences in the effects. Other studies have also confirmed higher biological activity of organic gold compounds with weaker bonds between the gold itself and organic part of a molecule (Suzuki et al. 1983; Ledford et al. 1989; Itoh et al. 1988; Gottlieb and Brown 1977). The difference in stability of organic gold compounds and subsequent difference in biological activity should be taken into account during design of novel drugs that contain gold.

Our patients were at the end of their reproductive period, and phase of their menstrual cycle could not be determined due to long period of irregular bleeding caused by uterine fibroids. This prevents extension of our findings to all phases of menstrual cycle, creating need for additional studies with gold complexes on isolated isthmus taken from women which unequivocally were in follicular or luteal phase.

Conclusion

In conclusion this work demonstrated that gold(III) complexes with weaker bonds between the gold itself and organic part of a molecule more readily influence motility of the Fallopian tubes' isthmus, causing stimulation. Excessive stimulation of the Fallopian tubes spontaneous motility by gold may hamper its

important role in the process of fertilization, leading to decreased fertilization rate in women taking drugs containing gold. Therefore, drugs designed as organic gold complexes with stronger bonds between the gold itself and organic part of a molecule could be better tolerated by women in their reproductive age.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia, projects nos. 172011 and 175007.

References

- Arsenijevic M, Milovanovic M, Volarevic V, Djekovic A, Kanjevac T, Arsenijevic N, Dukic S, Bugarcic ZD (2012) Cytotoxicity of gold(III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. *Med Chem* 8:2–8
- Berntsen P, Park CY, Rothen-Rutishauser B et al (2010) Biomechanical effects of environmental and engineered particles on human airway smooth muscle cells. *J R Soc Interface* 7:331–340
- Bowman WC, Rand MJ (1980) Principles of drug action. In: Bowman WC, Rand MJ (ed) *Textbook of pharmacology*, vol 43. Blackwell, Oxford, pp 1–46
- Bugarčić ZD, Petrović B, Bugarčić ZM et al (2008) Effects of cisplatin and other Pt(II) complexes on spontaneous motility of isolated human oviduct. *Toxicol In Vitro* 22: 1878–1882
- Capell H (2002) Longterm maintenance therapy with disease modifying antirheumatic drugs. *J Rheumatol Suppl* 66: 38–43
- Casina A, Hartinger C, Gabbiani C et al (2008) Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold–protein interactions for their mechanism of action. *J Inorg Biochem* 102:564–576
- Casini A, Kelter G, Gabbiani C et al (2009) Chemistry, anti-proliferative properties, tumor selectivity, and molecular mechanisms of novel gold(III) compounds for cancer treatment: a systematic study. *J Biol Inorg Chem* 14: 1139–1149
- Che CM, Sun RWY, Yu WY, Ko CB, Zho NY, Sun HZ (2003) Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells. *Chem Commun* 8:1718–1729
- Corselli J, Talbot P (1987) In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. *Dev Biol* 122:227–243
- Dimitriadis F, Tsounapi P, Saito M, Watanabe T, Sylakos A, Tsabalas S, Miyagawa I, Sofikitis N (2009) Is there a role for PDE5 inhibitors in the management of male infertility due to defects in testicular or epididymal function? *Curr Pharm Des* 15:3506–3520
- Dineva J, Vangelov I, Nikolov G, Gulenova D, Ivanova M (2011) Atrial natriuretic peptide is an antiapoptotic factor

- for human granulosa luteinized cells with impact on the results of COH/IVF in women undergoing IVF program. *J Obstet Gynaecol Res* 37:511–519
- Dyson PJ, Sava G (2006) Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Trans* 48:1929–1933
- Garza-Ortiz A, den Dulk H, Brouwer J, Kooijman H, Spek AL, Reedijk JJ (2007) The synthesis, chemical and biological properties of dichlorido(azpy)gold(III) chloride (azpy = 2-(phenylazo)pyridine) and the gold-induced conversion of the azpy ligand to the chloride of the novel tricyclic pyrido[2,1-c][1,2,4]benzotriazin-11-ium cation. *J Inorg Biochem* 101:1922–1930
- Gibofsky A, Yazici Y (2010) Treatment of rheumatoid arthritis: strategies for achieving optimal outcomes. *Ann Rheum Dis* 69:941–948
- Giovagnini L, Ronconi L, Aldinucci D, Lorenzon D, Sitran S, Fregoni DJ (2005) Synthesis, characterization, and comparative in vitro cytotoxicity studies of platinum(II), palladium(II), and gold(III) methylsarcosinedithiocarbamate complexes. *Med Chem* 48:1588–1592
- Gottlieb NL, Brown HE (1977) Acute myocardial infarction following gold sodium thiomalate induced vasomotor (nitritoid) reaction. *Arthritis Rheum* 20:1026–1030
- Itoh H, Muramatsu I, Patel P, Lederis K, Hollenberg MD (1988) Inhibition by anti-inflammatory agents of contraction induced by epidermal growth factor-urogastrone in isolated longitudinal smooth muscle strips from guinea-pig stomach. *J Pharmacol* 95:821–829
- Janssen NM, Genta MS (2000) The effect of immunosuppressive and anti-inflammatory medications on fertility, pregnancy and lactation. *Arch Intern Med* 160:610–619
- Kenakin TP (1984) The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol Rev* 36:165–222
- Ledford DK, Sakamoto Y, O'Connor C et al (1989) Lack of effect of gold salts on acetylcholine or histamine contraction of canine tracheal and bronchial smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 298:237–246
- Magnus R (1904) Versuche am überlebenden Dunndarm von Säugetieren. *Pflügers Archiv* 102:123–151
- Messori L, Marcon G (2004) Gold complexes as antitumor agents. *Met Ions Biol Syst* 42:385–424
- Mietens A, Tasch S, Feuerstacke C et al (2012) Phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibition, ANP and NO rapidly reduce epididymal duct contractions, but long-term PDE5 inhibition in vivo does not. *Mol Cell Endocrinol* 349:145–153
- Milovanovic M, Djeković A, Volarević V, Petrovic B, Arsenijević N, Bugarić ŽD (2010) Ligand substitution reactions and cytotoxic properties of [Au(L)Cl₂]⁺ and [AuCl₂(DMSO)₂]⁺ complexes (L = ethylenediamine and S-methyl-L-cysteine). *J Inorg Biochem* 104:944–949
- Mostafa T (2007) In vitro sildenafil citrate use as a sperm motility stimulant. *Fertil Steril* 88:994–996
- Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel S (2010) Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota. *Arthritis Rheum* 62:1576–1582
- Owino BO, Oyoo GO, Otiemo CF (2009) Socio-demographic and clinical aspects of rheumatoid arthritis. *East Afr Med J* 86:204–211
- Ozturk IM, Buyukakilli B, Balli E, Cimen B, Gunes S, Erdogan S (2009) Determination of acute and chronic effects of cadmium on the cardiovascular system of rats. *Toxicol Mech Method* 19:308–317
- Reedijk J (2003) New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3611–3616
- Sakurada K, Wakabayashi I (1999) Cadmium accumulation augments contraction and phosphoinositide hydrolysis of vascular smooth muscles. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 106:212–220
- Skibsted LH (1986) Ligand substitution and redox reactions of gold(III) complexes. In: Skypes AG (ed) *Advances in Inorganic and bioinorganic mechanisms*. Academic Press, New York, pp 137–183
- Suzuki S, Yamauchi N, Miyamoto T, Muranaka M (1983) Gold-induced reduction in reactivity to histamine in isolated guinea pig tracheal rings. *J Allergy Clin Immunol* 72(5 Pt 1): 469–474
- Tiekling ERT (2008) Anti-cancer potential of gold complexes. *Inflammopharmacology* 16:138–142
- Vaziri ND (2008) Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H454–H465
- Wallenius M, Skomsvoll JF, Irgens LM, Salvesen KÅ, Nordvåg BY, Koldingsnes W, Mikkelsen K, Kaufmann C, Kvien TK (2011) Fertility in women with chronic inflammatory arthritides. *Rheumatology (Oxford)* 50:1162–1167
- Wang D, Lippard S (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307–320
- Zhang H, Zheng RL (1996) Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions. *Free Radic Res* 25:347–354
- Zhu S, Gorski W, Powell DR, Walmsley JA (2006) Synthesis, structures, and electrochemistry of gold(III) ethylenediamine complexes and interactions with guanosine 5'-monophosphate. *Inorg Chem* 45:2688–2694