

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Jelena M. Poljarević

Kompleksi Pt(II) i Pt(IV) sa novim diaminskim  
ligandima: sinteza, karakterizacija i  
antitumorska aktivnost

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.god.

University of Belgrade

Faculty of Chemistry

Jelena M. Poljarević

Pt(II) i Pt(IV) complexes with new diamine  
ligands: synthesis, characterization and  
antitumor activity

Doctoral dissertation

Belgrade, 2015.

**Mentori:**

dr Tibor J. Sabo

redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Sanja Grgurić-Šipka

vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

dr Sofija Sovilj

redovni profesor u penziji Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Srećko Trifunović

redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu

dr Ivanka Marković

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_ 2015. godine.

# **Zahvalnica**

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

Zahvaljujem se mentorima, prof. dr Tiboru Sabou i prof. dr Sanji Grgurić-Šipka, na ukazanom poverenju i velikoj pomoći tokom izrade ove disertacije, ali i rada u nastavi tokom ovih osam godina provedenih u laboratoriji 525. Takođe bih se zahvalila i članovima komisije, prof dr Sofiji Sovilj redovnom profesoru u penziji, Hemijskog fakulteta u Beogradu, prof dr Srećku Trifunoviću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu i dr Ivanki Marković, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Beogradu, na pomoći i korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja ove disertacije.

Hvala i dragoj koleginici Mileni, koja mi je pružala podršku i uveseljavala svaki naš zajednički proveden radni dan.

Hvala i svim mojim kolegama sa Hemijskog fakulteta, sa Katedre za opštu i neorgansku hemiju ali i sa drugih katedara.

Zahvaljujem se kolegama iz laboratorije 525 na podršci i razumevanju u toku izrade ove doktorske disertacije.

Hvala i kolegama sa Medicinskog fakulteta u Beogradu, na istrajnosti i pomoći u toku izrade ove disertacije, posebno dr Sonji Misirlić Denčić, koja mi je pružala veliku podršku i pomoć u radu.

Zahvaljujem se i kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta.

## **Veliko hvala:**

- ✓ mojim najdražim kolegama i prijateljima Ljiljani i Aleksandru, što su učinili da svaki trenutak proveden u laboratoriji 525 bude nezaboravan
- ✓ mojim prijateljima
- ✓ mami Radi i tati Mikanu, na podršci i roditeljskoj ljubavi i brizi svih ovih godina
- ✓ bratu Đorđu i njegovoj porodici na iskrenoj i nesebičnoj podršci i pomoći na svakom polju mog života i rada
- ✓ porodici Poljarević na razumevanju i podršci, onda kada je to bilo najpotrebnije.

***I na kraju jedno najveće HVALA mojim lepticama Milici i Dunji, i mom Tihomiru jer bez njih sve ovo ne bi vredelo.***



## IZVOD

### Kompleksi Pt(II) i Pt(IV) sa novim diaminskim ligandima: sinteza, karakterizacija i antitumorska aktivnost

U ovom radu opisana je sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost sedam organskih jedinjenja edda-tipa, šest kompleksa platine(IV) i pet kompleksa platine(II) sa ovim organskim molekulima kao ligandima.

Sintetisana su jedinjenja: (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidroklorid, njoj odgovarajući metil, etil, *n*-propil, *n*-butil, izobutil i izopentil estri i njima odgovarajući kompleksi platine(IV) i platine(II). Ligandi su sintetisani polazeći od neesencijalne aminokiseline, *S*-2-amino-3-cikloheksilpropanske kiseline hidrohlorida, iz koje je sintetisana diamindikarboksilna kiselina i njeni estri. U reakciji kalijum-tetrahalogenidoplatinata(II), odnosno kalijum-heksahalogenidoplatinata(IV) i odgovarajućeg dehidrohlorovanog liganda dobijeni su diamindihalogenidoplatina(II) i diamintetrahalogenidoplatina(IV) kompleksi. Strukture svih sintetisanih jedinjenja utvrđene su standardnim spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom, NMR spektroskopijom, masenom spektrometrijom dok je pretpostavljena molekulska formula potvrđena elementalnom analizom. DFT i MM proračuni u saglasnosti su sa rezultatima ovih metoda i dali su mogućnost pretpostavke najstabilnijih geometrijskih izomera oktaedarskih platina(IV) kompleksa.

Biološka istraživanja zasnovana su na ispitivanju *in vitro* aktivnosti sintetisanih liganada i kompleksa na nekoliko tumorskih ćelijskih linija: C6 i U251 glioma, L929 fibrosarkoma i B16 melanoma, ćelije humanog melanoma A375, kancera debelog creva HCT116, ćelije humanog karcinoma pluća A549 i adenokarcinoma dojki MCF7. Rezultati su pokazali veoma dobru antitumorsku aktivnost ovih jedinjenja. Od svih sintetisanih liganada ističe se ligand *O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidroklorid, **L3**, koji je pokazao izuzetno dejstvo na izabranim tumorskim ćelijskim linijama, koje je istog reda veličine ili bolje od cisplatine. Najaktivniji među sintetisanim kompleksima, tetrahlorido(*O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato)platina(IV) kompleks, **K3**,

upotrebljen je u eksperimentu ispitivanja tipa ćelijske smrti na izabranoj U251 ćelijskoj liniji. Kompleksi platine(II) takođe su pokazali dobro antitumorsko dejstvo.

Ispitivano je i dejstvo sintetisanih kompleksa platine(IV) i liganada prema ćelijama imunog sistema, a detaljnija ispitivanja urađena su korišćenjem kompleksa tetrahlorido (*O,O'*-di-*n*-propil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato) platina(IV), **K4**, i pokazano je da ovaj kompleks nema negativan uticaj na ćelije imunog sistema.

**Ključne reči:** platinski kompleksi, *in vitro* antitumorska aktivnost, edda-tip liganada, geometrijski izomeri.

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Opšta i neorganska hemija

**UDK broj:** 546. 9

## S U M M A R Y

### Pt(II) and Pt(IV) complexes with new diamine ligands: synthesis, characterization and antitumor activity

In this thesis is described synthesis, characterization and biological activity of seven organic molecules edda-type, six platinum(IV) complexes and five platinum(II) complexes with those molecules as ligands.

Here were synthesized: (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-amino-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride and its methyl, ethyl, *n*-propyl, *n*-butyl, isobutyl and isopentyl esters, as well as their platinum(IV) and platinum(II) complexes. Ligands were synthesized starting from nonessential aminoacid *S*-2-amino-3-cyclohexylpropanoate acid hydrochloride via diaminodicarboxylic acid and its esters. Diamindichalogenidoplatinum(II) and diamintetrachalogenidoplatinum(IV) complexes were synthesized in the reaction of potassium-tetrachalogenidoplatinum(II) or potassium-hexachalogenidoplatinum(IV) and corresponding ligands. Structures of synthesized molecules were confirmed by standard spectroscopic methods: infrared spectroscopy, NMR spectroscopy, mass spectrometry and molecular formulas were confirmed by elemental analysis. DFT and MM calculations were in agreement with all spectroscopic methods and were used for determination of the most stable geometric isomers for two octahedral platinum(IV) complexes.

Results of biological tests showed *in vitro* activity of synthesized ligands and complexes against wide spectrum of tumor cell lines: C6 and U251 glioma, L929 fibrosarcoma and B16 melanoma, human melanoma A375, colon cancer cells HCT116, human lung carcinom A549 and breast adenocarcinoma MCF7. Results indicated very good antitumor activity of those compounds. Ligand, *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-amino-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride, **L3**, was very effective against all tumor cell lines, comparable or superior to the antitumor action of cisplatin. The most active complex was tetrachlorido(*O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-amino-(3-cyclohexyl)propanoato)platinum(IV) complex, **K3**, and it was used for examination the most possible way of cell death, on the chosen U251 cell line. Platinum(II) complexes showed good antitumor activity against all cell lines.

In this work it was also described immunomodulatory effect of complex **K4**, tetrachlorido (*O,O'*-di-*n*-propyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-amino-(3-cyclohexyl)propanoato) platinum(IV) complex) on cells of immune system. It was concluded that this complex has no negative influence on the cells of immune system.

**Keywords:** platinum complexes, *in vitro* antitumor activity, edda-type of ligands, geometrical isomers.

**Scientific area:** Chemistry

**Scientific Sub-area:** General and Inorganic Chemistry

**UDC number:** 546.9

## LISTA SKRAĆENICA

FDA - Food and Drug Administration, američka agencija za odobravanje upotrebe hrane i lekova

CTR1 – bakar transportni protein

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

GG – guanin-guanidino fragment DNK

Met – metionin

Cys – cistein

SAR – structure activity relationship: struktura – aktivnost odnos

QSAR – Quantitative structure–activity relationship: kvantitativan struktura – aktivnost odnos

GSH – glutation

DACH – 1,2-diamincikloheksan

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid (redukovani oblik)

JM216 – satraplatina

edda – etandiamin-*N,N'*-diacetat

eddp – etandiamin-*N,N'*-di-3-propanoat

pdda – 1,3-propilendiamin- *N,N'*-diacetat

HL60 – ćelijska linija humane promijelocitne leukemije

REH – ćelijska linija humane limfocitne leukemije

MOLT-4 – ćelijska linija humane akutne limfoblastne leukemije

KG-1 – ćelijska linija humane akutne mijelogene leukemije

JVM-2 – ćelijska linija humane hronične leukemije B ćelija

K-562 – ćelijska linija humane eritroleukemije

AIF – faktor indukcije apoptoze

A549 – ćelijska linija humanog alveolarnog adenokarcinoma

518A2 – ćelijska linija humanog melanoma

1411HP – ćelijska linija humanih germinativnih tumorskih ćelija testisa

H12.1– ćelijska linija humanih germinativnih tumorskih ćelija testisa

HeLa – ćelijska linija humanog carcinoma grlića materice

C6 – ćelijska linija glioma pacova

U251 – ćelijska linija humanog glioma

L929 – ćelijska linija fibrosarkoma miša  
B16 – ćelijska linija melanoma miša  
PBMC – mononuklearne ćelije periferne krvi  
HCT116 – ćelijska linija humanog karcinoma debelog creva  
ROS – reaktivne kiseonične vrste  
DMSO – dimetilsulfoksid  
LC/MS – tečno-masena spektrometrija  
ATR – tehnika snimanja infracrvenih spektara (razblažena totalna reflektanca)  
[D6]DMSO – deuterisani dimetilsulfoksid  
TFA – trifluorsićetna kiselina  
FT-IR – tehnika snimanja infracrvenih spektara sa obradom podataka furijeovom transformacijom  
HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom  
DAD – detektor sa nizom dioda  
DFT – teorija funkcije gustine naelektrisanja  
B3LYP – Becke, 3-parametar, Lee-Yang-Parr teorija funkcije gustine naelektrisanja  
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansufonska kiselina  
EDTA – etilendiamintetraacetat  
MTT test – kolorimetrijska tehnika za određivanje vijabiliteta ćelija uz pomoć (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijum bromida  
DHR – dihidrorodamin  
FITC – fluorescein-izotiocijanat  
ApoStat – pankaspazni inhibitor obeležen fluorescein-izotiocijanatom  
FL – fluorescencija  
PBS – puferovani fiziološki rastvor  
IFN- $\gamma$  – interferon gama  
IL -17 – interleukin-17  
SPC – ćelije slezine  
LNC – ćelije limfnog čvora  
RBC – crvene krvne ćelije  
PC12 ćelije – ćelije feohromocitoma pacova  
LPS – lipopolisaharid

ConA – konkanavalin A

MTT-3 – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijum bromid

RNK – ribonukleinska kiselina

cDNK – komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina

A375 – ćelijska linija humanog melanoma

MCF7 – ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke

MRC5 –ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta

H460 – ćelijska linija humanog krupnoćelijskog tumora pluća

MM – molekulsko-mehanički proračuni

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Opšti deo.....	3
2.1. Cisplatina i mehanizam delovanja .....	3
2.2. Nedostaci cisplatine i njeni analozi.....	4
2.3. EDDA (etilendiamin- <i>N,N'</i> -diacetato) tip liganada i njihovi kompleksi platine(II) i platine(IV).....	10
2.4. Tumor i poznati mehanizmi ćelijske smrti .....	23
2.5. Cilj rada.....	25
3. Eksperimentalni deo .....	27
3.1. Sinteze liganada i odgovarajućih kompleksa platine(II) i platine(IV).....	27
3.1.1. ( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid (L1).....	27
3.1.2. <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoat dihidrohlorid (L2 - L5).....	27
3.1.3. Dihalogenido(( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(IV) kompleksi (K1, K1').....	27
3.1.4. Tetrahlorido( <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(IV) kompleksa (K2 – K5).....	28
3.1.5. Dihlorido( <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato)platina(II) kompleksi (K2a, K3a).....	28
3.1.6. Dijodido( <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleksa (K2b – K4b).....	28
3.2. Karakterizacija sintetisanih jedinjenja .....	29
3.2.1. ( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid (L1).....	29
3.2.2. <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoat dihidrohlorid (L2 – L5) .....	29
3.2.3. Dihalogenido(( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil) propanato)platina(IV) kompleksi .....	32
3.2.4. Tetrahlorido( <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(IV) kompleksi .....	33
3.2.5. Dihlorido( <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(II) kompleksi.....	35
3.2.6. Dijodido( <i>O,O'</i> -dialkil-( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(II) kompleksi.....	36
3.3. Materijal i metode .....	38
3.3.1. Supstance korišćene u sintezama .....	38



3.3.2. Spektroskopske metode kojima su okarakterisana sintetisana jedinjenja .....	38
3.3.3. Određivanje sadržaja platine u lizatima ćelija.....	39
3.3.4. Elementalna analiza.....	39
3.3.5. Molekulsko-mehanički i DFT proračuni.....	39
3.3.6. Ispitivanja biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja na ćelijama i ćelijskim linijama <i>in vitro</i> .....	39
3.3.6.1. Ćelijske linije.....	40
3.3.6.2. Ispitivanja ćelijskog vijabiliteta.....	41
3.3.6.3. Analiza parametara ćelijske smrti i produkcije ROS metodom protočne citometrije.....	44
3.3.6.4. Ispitivanje koncentracija citokina u ćelijama primenom enzimskog eseja.....	45
3.3.6.5. Statistička obrada rezultata.....	46
4. Rezultati i diskusija .....	46
4.1. Sinteza liganada i kompleksa.....	46
4.2. Spektroskopija .....	49
4.2.1. Infracrvena spektroskopija .....	49
4.2.2. NMR spektroskopija .....	51
4.2.2.1. NMR spektroskopija liganada.....	51
4.2.2.2. NMR spektroskopija kompleksa platine(II) i platine(IV).....	52
4.2.3. Masena spektrometrija .....	54
4.3. Molekulsko-mehanički i DFT proračuni .....	57
4.4. Pretpostavljene strukture sintetisanih jedinjenja.....	57
4.5. <i>In vitro</i> antitumorska aktivnost dihalogenido( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(IV) i tetrahalogenido( <i>O,O'</i> -dialkil-(( <i>S,S</i> )-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato) platina(IV) kompleksa.....	58
4.5.1. Pretpostavljeni mehanizam delovanja kompleksa platine(IV) u ćeliji.....	62
4.5.2. Ispitivanje dejstva sintetisanih kompleksa platine(IV) na ćelije imunog sistema.....	65
5. Zaključak .....	69
6. Literatura: .....	71
7. Prilog .....	78

## 1. Uvod

Metali i njihova jedinjenja se vekovima unazad primenjuju u medicinske svrhe. Doba moderne medicinske hemije, koja uključuje lekove na bazi metala, započelo je otkrićem cisplatine (*cis*-diammindihloridoplatina(II)). Naizgled, bez posebnog značaja, ovo jedinjenje jednostavne strukture pokazalo je izuzetne antitumorske karakteristike, što je navelo istraživače da započnu višedecenijsku „potragu“ za još boljim i efikasnijim hemoterapeutikom [1,2]. Kompleksi metala pokazali su se značajnim u ovoj oblasti, kao dobra osnova za dizajn novih lekova. Veliki broj geometrijskih izomera i različiti koordinacioni brojevi metalnih jona omogućavaju da se fino podese i kinetički (brzina izmene liganada) i termodinamički (jačina metal-ligand veze, elektrodni potencijal) parametri prilikom sinteze kompleksa metala – potencijalnog leka. Značajno je da u osmišljavanju i sintezi novih kompleksa, veliku ulogu imaju i ligandi, kako zbog „prepoznavanja“ mesta na koje treba kompleks da se veže u ciljnoj ćeliji, tako i zbog redoks procesa u kojima učestvuje ligand koji se eventualno oslobodi u ćeliji [2,3].

Značajno mesto među sintetisanim i ispitivanim kompleksima metala zauzimaju platinski kompleksi. Ovi kompleksi su u širokoj upotrebi kao antitumorski agensi i do danas je oko 30 kompleksa platine(II) i platine(IV) ušlo u neku od faza kliničkih ispitivanja [4,5].

Posebno mesto u današnjim istraživanjima zauzimaju kompleksi platine sa diam(m)inskim ligandima. Deceniju i po unazad uspešno je sintetisan veliki broj liganada edda (etilendiamin-*N,N'*-diacetat) tipa i njihovi odgovarajući kompleksi metala (platina, rutenijum, kobalt, paladijum) [7-15]. Među njima posebno se ističu kompleksi platine i rutenijuma svojim izvanrednim antitumorskim dejstvom potvrđenim u *in vitro* eksperimentima na velikom panelu različitih tumorskih ćelijskih linija [10,16-18]. Od velikog značaja bilo bi i utvrđivanje tačnog mehanizma delovanja ovih potencijanih antitumorskih agenasa u ćelijama.

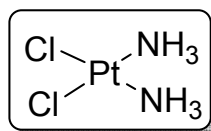
U ovom radu su opisani sinteza i karakterizacija kompleksa platine(II) i platine(IV) sa (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanskom kiselinom i njenim *n*-alkil estrima. Pretpostavlja se da su strukturne promene kod ovih novosintetisanih liganada u odnosu na prethodno sintetisan veliki broj strukturno sličnih jedinjenja, značajno uticale

na fizička svojstva odgovarajućih kompleksa platine sa ovim molekulima kao ligandima, što je, pretpostavlja se, imalo za posledicu njihovo izuzetno dobro antitumorsko dejstvo.

## 2. Opšti deo

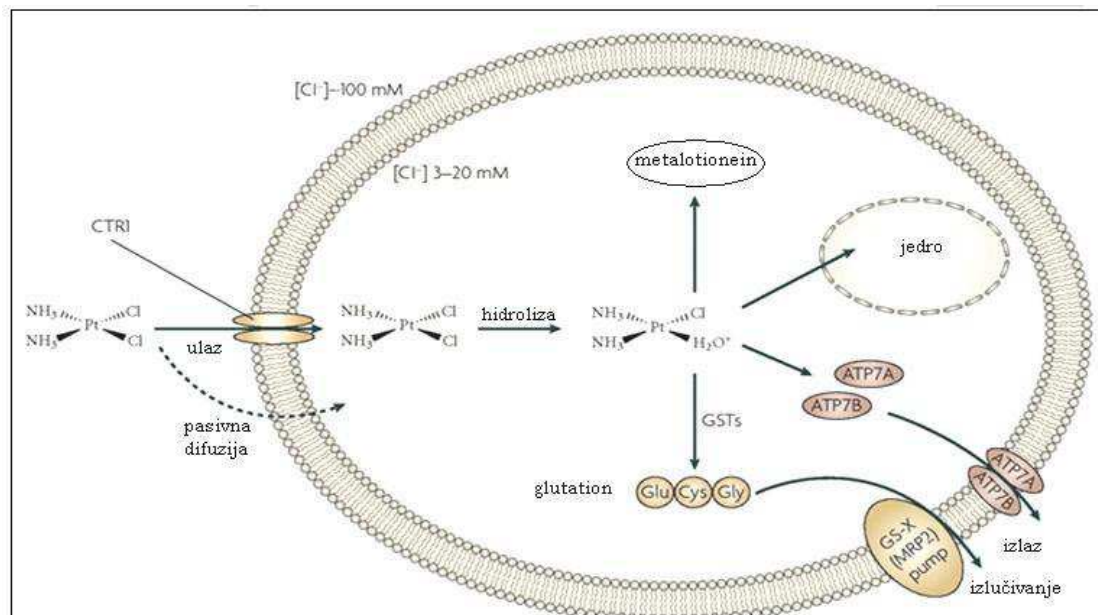
### 2.1. Cisplatina i mehanizam delovanja

Davne 1845. godine prvi put je sintetisana a 1893. godine i prvi put u literaturi opisana struktura jedinjenja *cis*-diammindihloridoplatina(II) – cisplatina (Slika 1) [1].



Slika1. Struktura cisplatine

Međutim, tek 1965. godine prvi put se pominje dobra antitumorska aktivnost ovog jedinjenja. Cisplatina je prvi lek na bazi platine, sa antitumorskim dejstvom, odobren od FDA [2,17,18]. Najefikasniji je u terapiji tumora testisa (procenat izlečenja je blizu 100%) ali je vrlo efikasan i u lečenju raka jajnika, bubrega i vrata [19]. Cisplatina se unosi u organizam intravenski. Zahvaljujući visokoj koncentraciji hlorida u krvnoj plazmi (100 mM) cisplatina ostaje strukturno nepromenjena. U tumorsku ćeliju dospeva ili prostom difuzijom kroz ćelijsku membranu ili aktivnim transportom pomoću bakar-transportera CTR1. Zbog višestruko manje koncentracije hloridnih jona u citosolu (3-20 mM) u odnosu na vanćelijsku tečnost, dolazi do brze hidrolize i izmene hloridnih liganada molekulima vode (Slika 2). Nakon hidrolize, katjonski kompleks platine ( $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ) ulazi u jedro gde formira koordinativnu vezu sa atomima azota nukleinskih baza DNK, najčešće guanina. Koordinacijom za guaninske azotove atome susednih lanaca DNK, formira se bifunkcionalni GG makrohelat.  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  predstavlja vrstu lanca (veze) između lanaca DNK. Ovako modifikovana DNK je trajno oštećena i nemoguće je na njoj izvršiti transkripciju i replikaciju. Kao posledica zaustavljanja ćelijskog ciklusa, dolazi do ćelijske smrti [2-4, 20-23].



Slika 2. Mehanizam transporta cisplatine kroz ćelijsku membranu i njenog delovanja u ciljnoj ćeliji [2].

## 2.2. Nedostaci cisplatine i njeni analozi

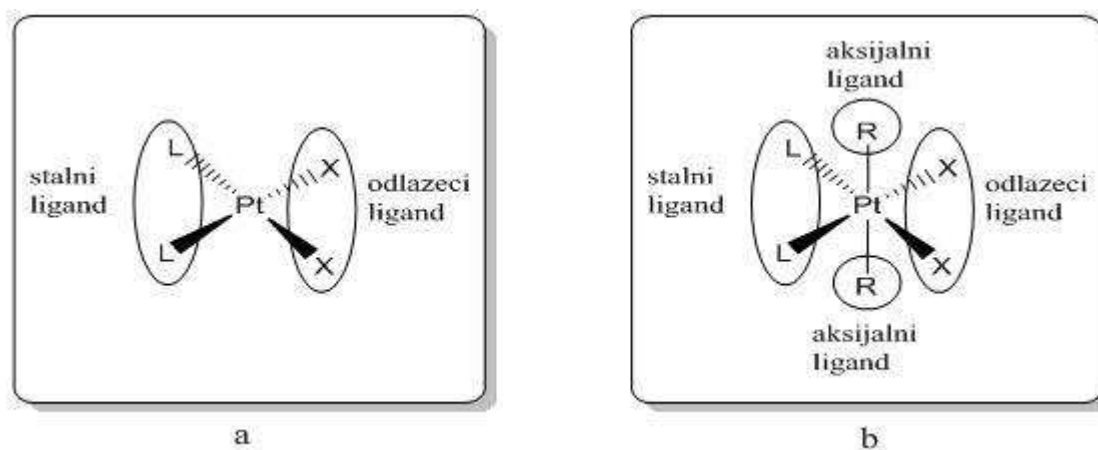
Uprkos izvanrednom uspehu cisplatine ovaj lek ima i brojne nedostatke. Gledajući sa biološke strane, cisplatina ne pokazuje dovoljnu selektivnost prema ćelijama u organizmu, tj. toksična je, te deluje toksično i na ne-tumorske ćelije. Lek nakon duže primene izaziva nefrotoksičnost, ototoksičnost ili anemiju. Sa hemijske strane gledano, ovaj kompleks platine(II) je izuzetno reaktivan. Zapravo već u krvnoj plazmi može reagovati sa aminokiselinama koje sadrže sumpor (Met i Cys), tj. sa proteinima koji u sebi sadrže Met i Cys: metalotioneinom ili albuminom. U ćeliji, u  $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  obliku, može reagovati sa najrazličitijim hemijskim vrstama, karbonatnim jonom, fosfatima, metioninom, glutationom ili metalotioneinima (proteini i aminokiseline koje imaju slobodne donorske S i N atome). Sve ovo znatno smanjuje efikasnost i iskorišćenje ovog leka [3,19,24-27].

Zato je bilo potrebno sintetisati selektivniji, manje reaktivan molekul, potencijalni citostatik. Tako su nastali platinski kompleksi druge i treće generacije. Kompleksi druge generacije su strukturni analozi cisplatine, osmišljeni tako da prevaziđu toksičnost cisplatine, dok su kompleksi treće generacije nastali kao još napredniji analozi sa osnovnim zadatkom da deluju na tumorske ćelije otporne na cisplatinu. Od 1978. godine, kada je FDA odobrila cisplatinu kao lek, još sedam platina(II) kompleksa ušlo

je u kliničku upotrebu: 2 u svetu (karboplatina i oksaliplatina) i 5 u pojedinim zemljama (nedaplatina, loboplatina, heptaplatina, miruplatina i cikloplatina)[24,28,29].

Još od 1973. godine uporedo sa biološkim ispitivanjima vršena su i teorijska predviđanja u oblasti odnosa struktura-aktivnost (SAR i QSAR istraživanja). Rosenberg i njegova grupa među prvima su obavili ovakva istraživanja i ukazali na strukturalna svojstva potencijalnog citostatika:

- kompleks platine(II) trebalo bi da ima dve *cis* orijentisane am(m)ino grupe
  - odlazeći ligandi bi takođe trebalo da budu u *cis* položaju
  - u celini kompleks bi trebalo da bude neutralan
  - aminski ligandi bi trebalo da budu ili primarni ili sekundarni amini.
- [20,21,30,31] (Slika 3).



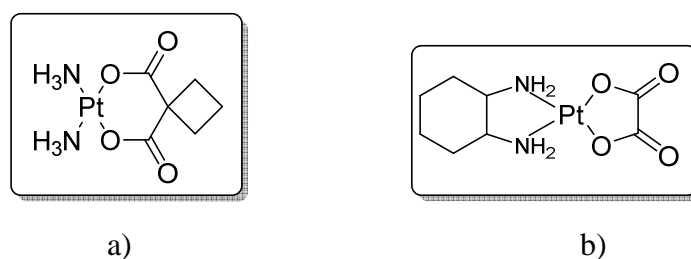
Slika 3. Komponente platinskih kompleksa za koje se očekuje da pokazuju dobru antitumorsku aktivnost [21].

Utvrđeno je da svaki od liganda (Slika 3), ima svoju ulogu u struktura-aktivnost odnosu sintetisanog kompleksnog jedinjenja. **L** ligandi, stalni ligandi, formiraju najjaču vezu sa platinom i ostaju netaknuti u konačnom jedinjenju kompleksa i DNK. Od ovih liganada uglavnom zavisi otpornost ćelija tumora na lek. Menjajući ovaj ligand može se postići da se prevaziđe otpornost nekih ćelijskih linija prema cisplatinu. **Oksaliplatina** je analog cisplatine koji ima voluminozni i hidrofobni diamincikloheksil ligand koji se „uklapa“ u veliku brazdu DNK i tako onemogućava prilaz enzima koji „popravljaju“ DNK. Glavna prednost oksaliplatine u odnosu na cisplatinu jeste što deluje na tumorske ćelije

koje su otporne prema cisplatinu. Danas je ovo lek izbora za kolorektalni tumor [24,32-35].

**X** ligand (Slika 3a, 3b) je odlazeći ligand. Veza Pt-X je najslabija i ovo je mesto eventualne hidrolize u ćeliji. Stoga, ovaj ligand direktno utiče na kinetiku reakcije leka i DNK. Lakše odlazeće grupe mogu dovesti do brze hidrolize u ćeliji ili izmene ovog liganda drugim nukleofilima u ćeliji. Modifikacijom ovih liganada može se postići smanjenje broja sporednih reakcija u ćeliji. Obe grupe liganada, i **L** i **X**, utiču na lipofilnost i rastvorljivost kompleksa.

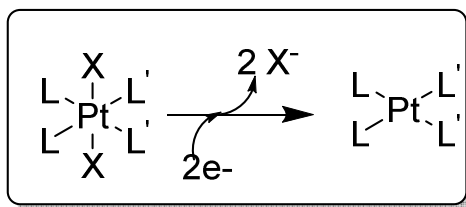
**Karboplatina** ima u svojoj strukturi bidentatni ciklobutandikarboksilatni ligand koji utiče na smanjenje broja sporednih reakcija ovog leka u ćeliji. Ove izmene uticale su da karboplatina ne bude nefrotoksična i da se može koristiti u većim dozama od cisplatine. Danas, karboplatina predstavlja osnovnu terapiju u lečenju raka jajnika [2,21,24,36-39] (Slika 4).



Slika 4. Strukture a) karboplatine i b) oksaliplatine.

Uglavnom zbog velikog broja sporednih reakcija cisplatine i njenih analoga u ćeliji, posle 1983. godine počinju i QSAR ispitivanja platina(IV) kompleksa. Ovi kompleksi, 5d<sup>6</sup> niskospinske elektronske konfiguracije Pt(IV) jona, imaju oktaedarsku geometriju, što u odnosu na platina(II) komplekse daje dva nova aksijalna liganda, čime se povećava kinetička stabilnost i smanjuje reaktivnost ovih kompleksa u poređenju sa platina(II) kompleksima. **R** ligandi (Slika 3b) bi trebalo da budu lipofilni, da bi kompleks lakše prošao kroz membranu kao i da veza Pt-R bude jaka, da ne bi lako dolazilo do hidrolize i sporednih reakcija. Takođe, ovi ligandi predstavljaju potencijalno mesto vezivanja za tzv. nosače u ćelijama, nanočestice koje omogućavaju nesmetan prolaz leka do ciljnog mesta u ćeliji. Pretpostavljeno je da ova struktura kompleksa platine(IV) utiče na stabilnost kompleksa, što predstavlja osnovu za njihovu potencijalnu oralnu primenu [4,32,33].

QSAR ispitivanja u kombinaciji sa biološkim testovima pokazala su da ove strukture treba osmisliti tako da farmakokinetički parametri koji utiču na efikasnost leka: redoks potencijal,  $E_p$ , brzina redukcije platine u ćeliji, i lipofilnost ( $\log P$ ), budu što optimalniji. Na ove parametre značajno utiče odabir aksijalnih liganada ali i voluminoznost ekvatorijalnih liganada (am(m)inskih liganada) [40,41]. Aksijalni ligandi mogu biti veoma različiti ali su među prvima sintetisani kompleksi sa hlorido, acetato i hidroksido ligandima. Pretpostavljeno je da će ovi ligandi, kao lako odlazeći, uticati na brzu redukciju metala u ćeliji. Cilj je da kompleks platine(IV) stigne netaknut do ciljne ćelije, uđe u nju i tamo u prisustvu različitih redukujućih molekula bude redukovano do aktivne platina(II) vrste (Šema 1). Redukujući molekuli u ćeliji su najčešće glutation (GSH) ili askorbat.



Šema 1. Dvoelektronska redukcija platina(IV) kompleksa u ćeliji.

Najviše vrednosti potencijala i najbrža redukcija odigrava se kod kompleksa sa hlorido, a najsporije sa hidroksido ligandima. Kao ekvatorijalni, aminski ligandi u sintetisanim kompleksima figurisali su amonijak, cikloheksilamin, etilendiamin i njihovi derivati (Tabela 1).

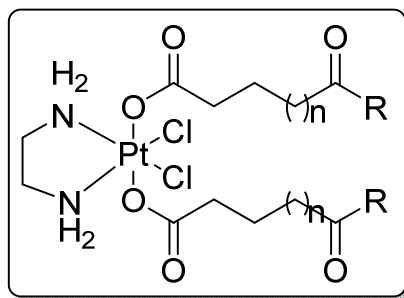
Tabela 1. Primer uticaja aksijalnog liganda na  $E_p$  i *in vitro* antitumorsku aktivnost u kompleksu sa cisplatina osnovnim motivom.

	X	$E_p$ (mV vs. Ag/3 M AgCl, KCl)	$IC_{50}$ A2780 (IM)	$IC_{50}$ HCT116 ( $\mu M$ )
	Cl <sup>-</sup>	-204	$1,52 \pm 0,21$	$11,87 \pm 3,87$
	OH <sup>-</sup>	-815	$8,11 \pm 0,84$	$33,29 \pm 4,41$
	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	-565	$9,48 \pm 0,45$	$33,26 \pm 4,08$

Lipofilniji molekuli lakše ulaze u ćeliju pa se struktura sintetisanih kompleksa i tome mora prilagoditi. Preteča ovoj pretpostavci bio je primer platina(II) kompleksa sa hiralinim voluminoznim ligandima DACH (1R,2R-diaminocikloheksan) tipa. Ovaj



molekul lako ulazi u ćeliju i verovatno se stvara DACH-Pt-DNK adukt koji onemogućava prilaz enzimima koji bi „popravili“ DNK. Kompleksi ovog tipa pokazali su se jako aktivni prema cisplatina otpornim ćelijskim linijama, pa otuda i ideja da bi i kompleksi platine(IV) trebalo da imaju voluminozne ekvatorijalne ligande. QSAR proračuni za seriju diam(m)indihloridobis(karboksilato)platina(IV) kompleksa, pokazali su da je najbolje koristiti diaminske ekvatorijalne ligande, a lipofilnost povećati povećanjem alkil niza na karboksilatu. U tom smislu sintetisana je serija etilendiamin-Pt(IV) kompleksa sa različitim alkil-estrima aksijalno vezanih u kompleksu, koji su pokazali dobro slaganje vrednosti lipofilnosti, IC<sub>50</sub> vrednosti i količine akumuliranog kompleksa u ćeliji. Veća količina kompleksa u ćeliji, sa višim vrednostima lipofilnosti, značila je i veću citotoksičnost ovih kompleksa [3,35] (Slika 5, Tabela 2).



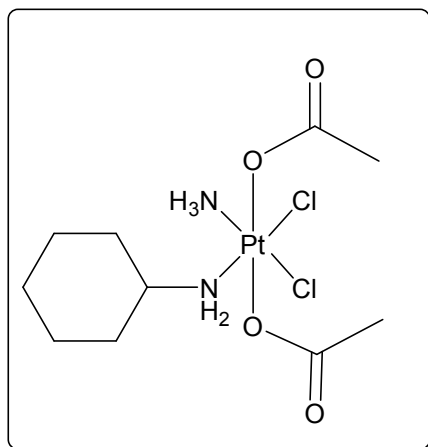
Slika 5. Struktura etilendiamin-Pt(IV) kompleksa u kojima je ispitivana veza dužine alkil ostatka lipofilnosti i antitumorske aktivnosti [3,36].

Tabela 2. Vrednosti log P i IC<sub>50</sub> za seriju etilendiaminskih kompleksa platine(IV) različite dužine alkil niza [3,36].

n	R	log P	IC <sub>50</sub> HeLa
0	OCH <sub>3</sub>	-0,81 ± 0,02	3,6 ± 1,3
0	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-0,32 ± 0,01	0,68 ± 0,04
1	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,24 ± 0,01	2,1 ± 1,0
0	OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,70 ± 0,01	0,11 ± 0,01
0	OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	1,69 ± 0,02	0,032 ± 0,007

Ekvatorijalni ligandi su se pokazali značajnim zbog toga što su stalni i određuju strukturu platina(II) kompleksa koji ostaje u ćeliji, kao aktivna vrsta, nakon redukcije polaznog platina(IV) kompleksa [25].

Najveći uspeh doživeo je kompleks **JM216 – satraplatina** (Slika 7).

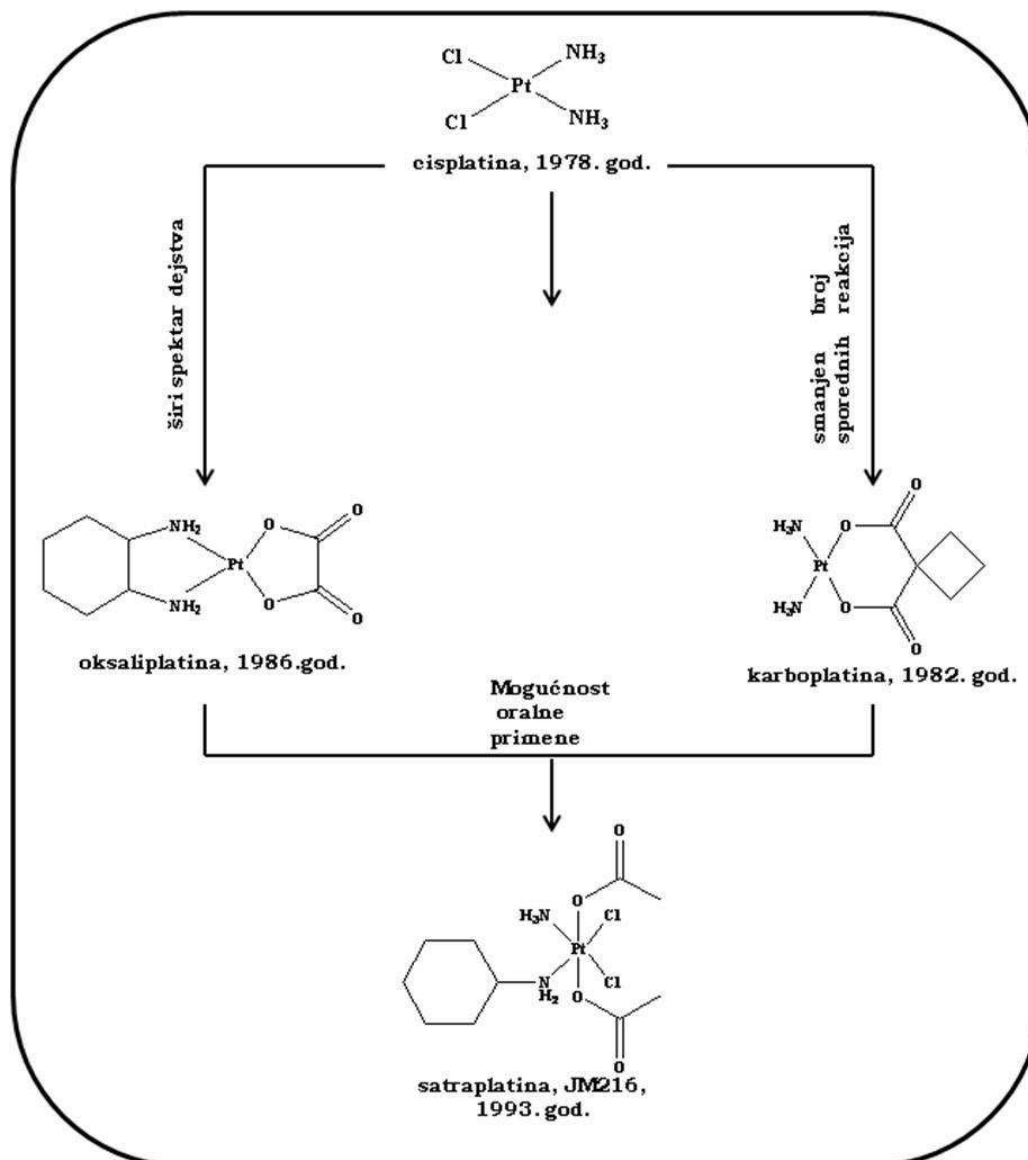


Slika 6. Struktura satraplatine - JM216

Satraplatina je lipofilni molekul, lako ulazi u ćeliju, inertan je i stabilan, te je zbog svega ovoga potencijalno oralno primenljiv. U ćeliji se redukuje pomoću citohroma C, a zatim i hemoglobina u prisustvu NADH. Ovom prilikom može nastati veliki broj različitih platina(II) kompleksa, među kojima je najčešće prisutan i najznačajniji *cis*-ammindihlorido(cikloheksilamin)platina(II). Satraplatin je prošao I, II i III fazu prekliničkih ispitivanja ali još uvek nije prošao sve neophodne testove kako bi zaista ušao u kliničku upotrebu. Pokazao se boljim od cisplatine u *in vitro* uslovima a sporedni efekti koje cisplatina izaziva ovde nisu uočeni [24,41-43].

Sintetisana je i serija platina(IV) kompleksa sličnih JM216, sa alifatičnim, aromatičnim i alicikličnim aminima, normalnog i razgranatog niza, koji su pokazali veću aktivnost od cisplatine. Uprkos velikim naporima i detaljnim ispitivanjima i predviđanjima, nijedan platina(IV) kompleks, uključujući i JM216, do sada nije odobren za kliničku upotrebu [32] (Slika 7).

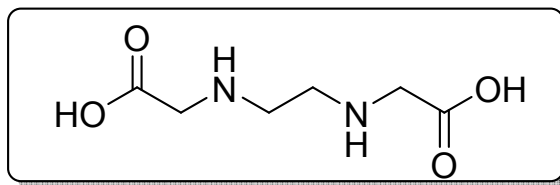
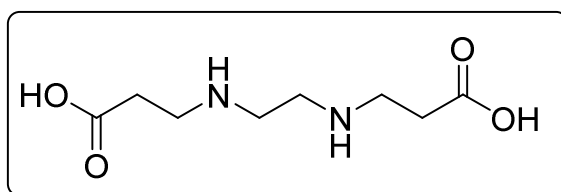
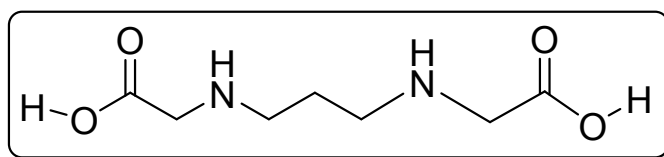
Veoma dobri rezultati bioloških ispitivanja oksaliplatine i satraplatine, ohrabрили su i dali ideju za sintezu kompleksa platine(II) i platine(IV) sa ligandima edda tipa, kao njihovim analogima, u cilju dobijanja potencijalno boljih antikancerogenih supstanci.



Slika 7. Platinski kompleksi koji su postigli najviše uspeha i njihov put razvoja.

### 2.3. EDDA (etilendiamin-*N,N'*-diacetato) tip liganada i njihovi kompleksi platine(II) i platine(IV)

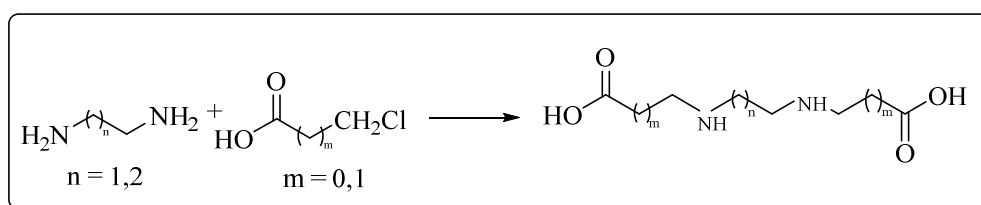
Poslednjih deceniju i po značajno mesto u sintezi i ispitivanju antitumorskih svojstava sintetisanih kompleksa zauzimaju kompleksi platine(IV) i platine(II) sa ligandima edda (etilendiamin-*N,N'*-diacetato) tipa. Ligandi edda-tipa su zapravo etilendiamin ili propilendiamin dikarboksilne kiseline i njihovi estri [8]. Osnovne diamindikarboksilne kiseline su (Slike 8, 9, 10):

Slika 8. edda (etilendiamin-*N,N'*-dietanska kiselina) - H<sub>2</sub>edda.Slika 9. eddp (etilendiamin-*N,N'*-di-3-propanska kiselina) - H<sub>2</sub>eddp.Slika 10. 1,3-pdda (1,3-propilendiamin-*N,N'*-dietanska kiselina) – H<sub>2</sub>pdda.

Dobri rezultati u ispitivanju antitumorske aktivnosti kompleksa platine sa ligadima edda-tipa ukazali su na značajan uticaj tog tipa liganada u njima. Ovi diaminski ligandi spadaju u grupu jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju etilendiaminski fragment. Prema teorijskim ispitivanjima i proračunima ovakva struktura u organskom molekulu može biti osnova za jedinjenje značajne antitumorske aktivnosti prema nekim tumorskim ćelijama [44].

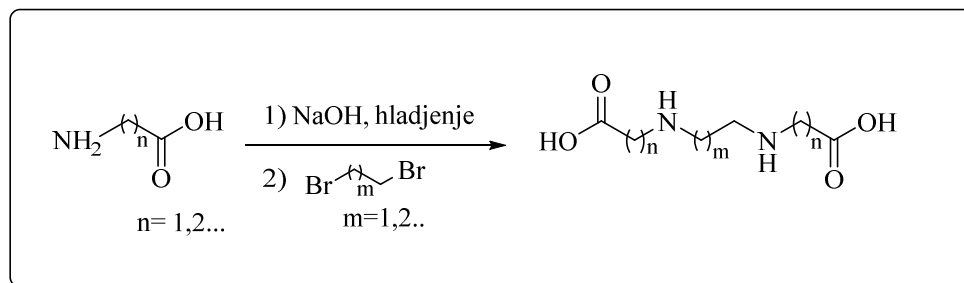
Sinteza edda-tipa liganada vrši se na jedan od sledećih načina:

- 1) diamin reaguje sa hlorovanim organskim kiselinama u molskom odnosu 1:2 [45] (Šema 2)



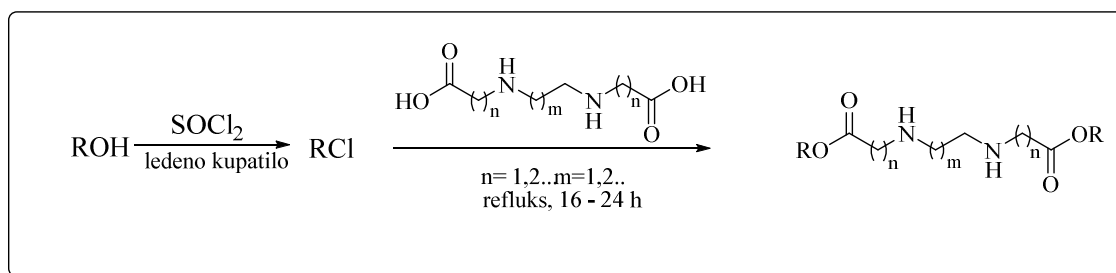
Šema 2. Mogući načini sinteze dikarboksilnih kiselina edda-tipa.

ili 2) neutralisana natrijumova so amino kiseline reaguje sa odgovarajućim dibromalkanom (Šema 3) [46];



Šema3. Mogući načini sinteze dikarboksilnih kiselina edda-tipa.

a zatim se dobijena diamindikarboksilna kiselina esterifikuje pomoću tionil-hlorida (Šema 4) [47].



Šema 4. Reakcija dobijanja estara diamindikarboksilnih kiselina.

Antitumorska *in vitro* ispitivanja do sada sintetisanih liganada ovog tipa nisu pokazala značajnije rezultate.

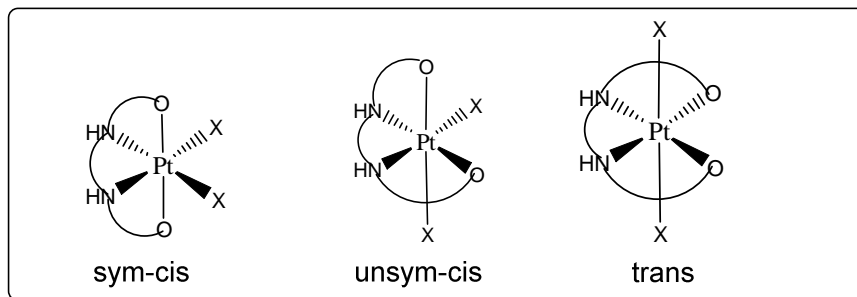
Prva serija liganada ovog tipa, koja je pokazala izuzetno dobro dejstvo prema širokom panelu različitih tumorskih ćelijskih linija, jeste serija *n*-alkil estara (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline, tj. serija liganada koja su opisana u ovoj tezi. Veliko interesovanje za ovu grupu jedinjenja proisteklo je iz jako dobrih rezultata  $IC_{50}$  vrednosti na leukemijskim ćelijama: HL-60, REH, MOLT-4, KG-1, JVM-2 i K-562. Ovo je bila polazna tačka da se pokuša objasniti tip ćelijske smrti kao i mehanizam delovanja ovih molekula u ciljnoj ćeliji [48]. Pokazano je da su metil, etil i *n*-propil estar izuzetno aktivni, dok *n*-butil estar i polazna kiselina ne pokazuju značajnije rezultate. Najaktivniji među njima bio je etil estar ( $IC_{50}$  10,7  $\mu$ M – 45,4  $\mu$ M, u poređenju sa cisplatinom 17,1 – 37,7  $\mu$ M, na ćelijskim linijama HL-60, REH, MOLT-4, KG-1, JVM-2, i K-562), te je on iskorišćen da se detaljnije ispita tip ćelijske smrti i

eventualno utvrdi mehanizam dejstva, i to na ćelijskoj liniji HL-60. Utvrđeno je da se radi o apoptozi kao tipu ćelijske smrti, uz povećanje produkcije superoksida u ćeliji i membranske depolarizacije. Apoptoza je ovde praćena oslobađanjem fosfatidilserina i DNK fragmentacijom, bez prisustva autofagije. Zaključak istraživanja bio je da je ovde prisutna apoptoza nezavisna od kaspaza, praćena oksidativnim stresom, mitohondrijalnom disfunkcijom i AIF (faktor indukcije apoptoze) translokacijom [48,49].

Zanimljivo je da su u ranijim serijama sličnih liganada uvek sa porastom *n*-alkil niza opadale IC<sub>50</sub> vrednosti, dok ovde to nije slučaj. Pokazano je i da razgranati estri ove serije jedinjenja nemaju značajne, čak pokazuju vrlo visoke IC<sub>50</sub> vrednosti [18].

Sintetisana je i serija *n*-alkil estara analoga (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline, tj. *n*-alkil estri *N,N'*-metilen-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline. Ni kod ove serije liganada nije uočena značajnija *in vitro* antitumorska aktivnost [16].

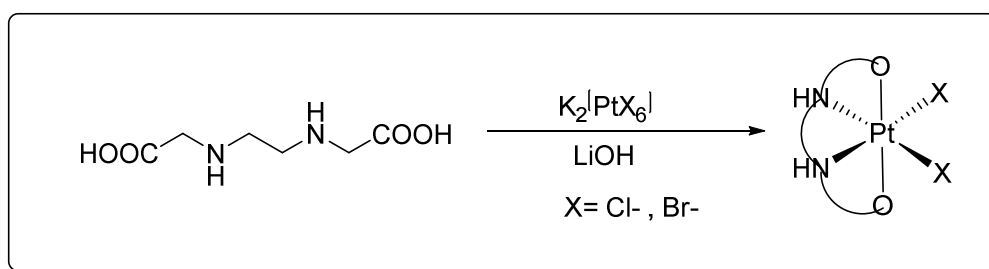
Prvi kompleksi, sa ligandima edda-tipa, sintetisani su još 50-ih godina dvadesetog veka, ali sa osnovnim ciljem da se ispita način koordinacije H<sub>2</sub>edda, tj. izražena sposobnost ovog molekula da gradi helatne komplekse sa metalnim jonima. Kako bi se što bolje objasnila veza između strukture i sposobnosti helatacije ovog molekula, najpre su određene konstante stabilnosti u kompleksima nekih dvovalentnih metalnih jona sa ovim ligandom. Konstante nisu ukazivale na stabilne komplekse [45]. Kasnije je Liu pokazao da ovaj ligand ipak gradi stabilne komplekse sa platina(II) i platina(IV) jonom. Od značaja je bilo i ispitati način koordinacije ovog liganda, tj. geometriju dobijenih kompleksa. Izvršena je oksidacija kvadratno-planarnog kompleksa platine(II) u prisustvu vodonik peroksida i potvrđeno je da se edda ligand koordinuje tetradentatno i da postoji mogućnost nastanka tri geometrijska izomera edda-Pt(IV) kompleksa. U jednom od njih dva hloridna liganda su *cis* orijentisana, acetato grupe *trans* jedna u odnosu na drugu (*sym-cis* izomer). Kod drugog su i dva hlorido liganda i dve acetato grupe *cis* jedna u odnosu na drugu (*unsym-cis* izomer). I najzad kod trećeg izomera hlorido ligandi su orijentisani *trans* jedan u odnosu na drugi (*trans* izomer). Utvrđeno je da je favorizovan nastanak *sym-cis* izomera (Slika 11).



Slika 11. Mogući geometrijski izomeri edda-Pt(IV) kompleksa.

Pokazano je, takođe da je ovaj tip kompleksa moguće sintetisati na dva osnovna načina:

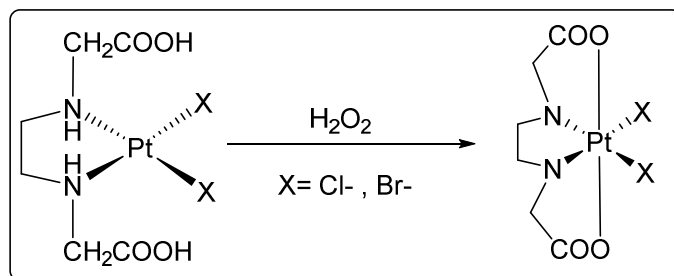
1) direktnom reakcijom kalijum-haksahalogenidoplatinata(IV) i H<sub>2</sub>edda (Šema 5)



Šema 5. Reakcija direktne sinteze edda-Pt(IV) kompleksa.

ili

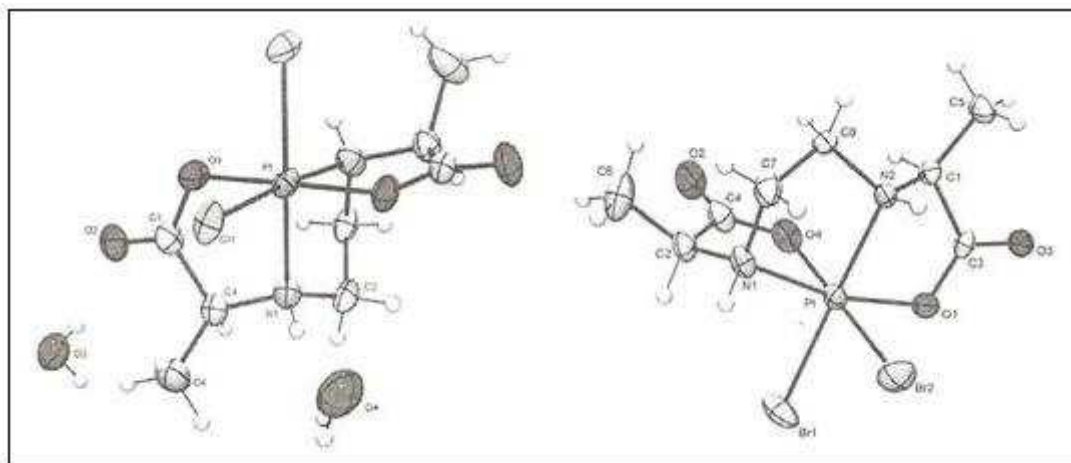
2) oksidacijom edda-Pt(II) kompleksa (Šema 6) [50].



Šema 6. Reakcija dobijanja edda-Pt(IV) kompleksa oksidacijom odgovarajućih edda-Pt(II) kompleksa.

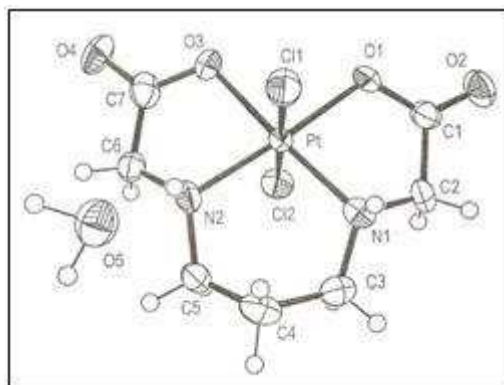
U kompleksima u kojima je prisutan hlorido ligand, pokazano je da oba sintetička puta daju isti proizvod a to je *sym-cis*-[Pt(edda)Cl<sub>2</sub>] kompleks. Pretpostavljeno je da i drugi ligandi edda-tipa daju isti proizvod. Značajan doprinos ovim istraživanjima dali su rezultati istraživačke grupe Sabo, u kojoj su nakon 50-ih godina dvadesetog veka, prvi put sintetisani kompleksi edda-tipa, koji su pokazali značajne rezultate, kako sa hemijske, tako i sa biološke tačke gledišta [8-10]. Tako je u ovoj grupi sintetisan kompleks edda-Pt(IV) kod koga je kristalografskom strukturnom analizom potvrđeno da

je favorizovana *trans* geometrija [9]. Kasnija istraživanja pokazala su da je moguće dobiti i *cis* konformacijski izomer ovog kompleksa, i to *sym-cis* izomer kod dihlorido kompleksa, a *uns-cis* izomer kod dibromido kompleksa (Slika 12) [51].



Slika 12. ORTEP prezentacija *sym-cis* geometrijskog izomera u  $[\text{Pt}(\text{edda})\text{Cl}_2]$  kompleksu (levo), *uns-cis* geometrijskog izomera u  $[\text{Pt}(\text{edda})\text{Br}_2]$  (desno) [51].

Prisustvo *trans* geometrije utvrđeno je i u 1,3-pdda-Pt(IV) kompleksu (Slika 13) [52].

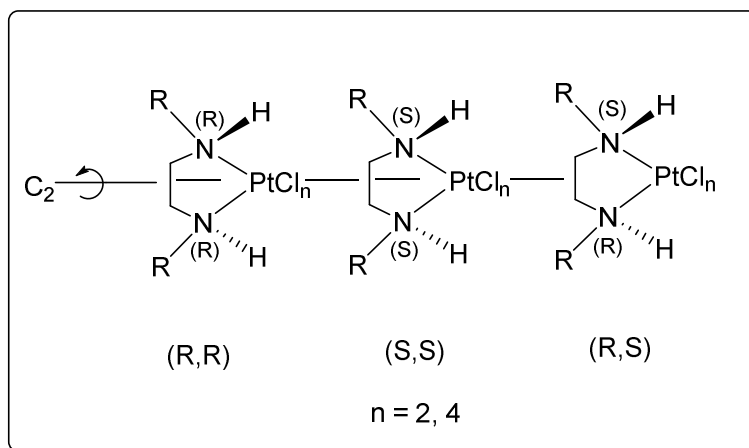


Slika 13. ORTEP prezentacija geometrijskog izomera *trans*-pdda-Pt(IV) [52].

Pretpostavlja se da su strukturne karakteristike eddp, odnosno pdda liganada zaslužne za ovakve rezultate. Naime, eddp ima jedan ugljenikov atom više u aminokarboksilato nizu, dok pdda ima ugljenikov atom više u diaminskom mostu, u odnosu na edda ligande. Ovakva struktura povećava helatni prsten prilikom koordinacije (nastaje šestočlani prsten) i tada je najpovoljnije da nastane ili *uns-cis*, ili *trans* izomer [8].

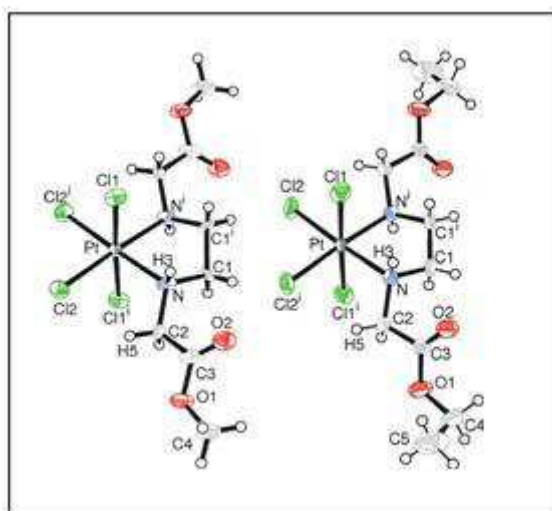


Za razliku od tetradentatno koordinovanih kiselina: edda, eddp i pdda, njihovi odgovarajući estri koordinuju se bidentatno samo preko azotovih atoma. Kod kompleksa platine(IV) sa metil i etil estrom edda prisutna je oktaedarska, a kod platina(II) kompleksa kvadratno-planarna geometrija. Koordinacijom etil estra edda za platinu(II) ili platinu(IV), teorijski se mogu dobiti tri izomera (R,R; S,S; R,S) (Slika 14).



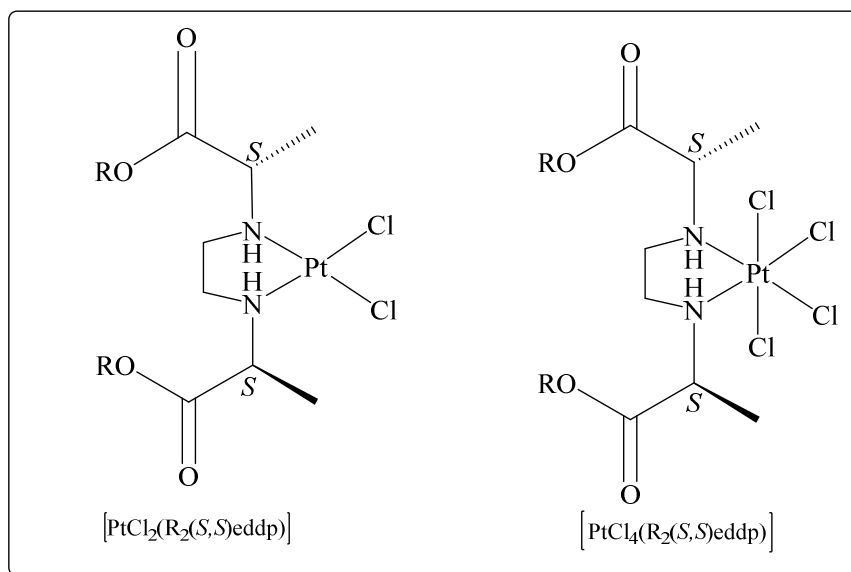
Slika 14. Mogući stereoizomeri kompleksa platine(II) i platine(IV) sa estrima edda.

Kristalografski podaci pokazali su da je kompleks sa etil estrom edda dobijen kao smeša dva enantiomera (R,R i S,S). DFT proračunima pokazano je da je i energetski najpovoljnije da nastanu enantiomeri. Naime, ovi proračuni su pokazali da je zbog prisustva nešto jačih intramolekulskih vodoničnih N-H·····Cl interakcija u R,R izomeru, povoljniji njegov nastanak nego R,S izomera (Slika 15) [7].



Slika 15. ORTEP prezentacija kpleksa Pt(IV) i etil estra (levo), metil estra (desno) [7]

Kod kompleksa sa estrima eddp očekivana je ista raspodela izomera. Jedina razlika jeste u tome što ovde imamo i u ligandu dodatni asimetrični C atom (Slika 16).



Slika 16. Kompleksi eddp- Pt(II) i Pt(IV) sa prikazanim asimetričnim atomima u ligandu.

Do sada su u literaturi opisani ligandi (*S,S*) konfiguracije i njihovi odgovarajući kompleksi, što je direktna posledica upotrebe *S*-aminokiselina u sintezi etilendiamindikarboksilnih kiselina i njihovih estara [10,53]. U sintezi kompleksa *n*-alkil estara eddp-a sa platinom(IV), primećena je i sporedna reakcija hidrolize estara, što je dovelo do toga da je bilo moguće sintetisati samo komplekse sa *n*-butil i *n*-pentil estrima eddp-a [10]. Kasnije, polazeći od natrijum-heksahloridoplatinata(IV) i odgovarajućeg (metil, etil, *n*-propil) estra eddp-a, dobijeni su željeni kompleksi [54]. Ovi kompleksi danas privlače pažnju i kao strukturno slična jedinjenja satraplatini i tetraplatini, pa su u skladu sa tim izvršena i *in vitro* ispitivanja njihovog antitumorskog dejstva [55-57].

Najpre su ispitivana *in vitro* antitumorska svojstva diamindihloridoplatina(IV) kompleksa, u kojima su diaminski ligandi edda ili eddp, kiseline i estri. Pokazano je i da je edda-platina(IV) kompleks aktivniji prema tumoru humanih jajnih ćelija od odgovarajućeg eddp analoga. Međutim, kako je već rečeno, da je kod ova dva kompleksa prisutan različit tip geometrije (edda, *cis*; eddp, *trans*), ne može se sa sigurnošću tvrditi da li je razlog manje aktivnosti eddp kompleksa geometrija kompleksa ili dodatna metilenska grupa u ligandu (Tabela 3) [9].

Tabela 3. IC<sub>50</sub> (μM) vrednosti za komplekse *cis*-[Pt(edda)Cl<sub>2</sub>], *trans*-[Pt(eddp)Cl<sub>2</sub>], *trans*-[Pt(eddp)Br<sub>2</sub>] i cisplatinu, na tumorskim humanim jajnim ćelijama.

Ćelijska linija	<i>trans</i> - [Pt(eddp)Cl <sub>2</sub> ]	<i>trans</i> - [Pt(eddp)Br <sub>2</sub> ]	<i>cis</i> -[Pt(edda)Cl <sub>2</sub> ]	cisplatina
A2780	92,6 ± 12,0	30,3 ± 7,5	8,2	0,20 ± 0,05
A2780cisR	277,0 ± 24,0	90,0 ± 14,0	>25	3,5 ± 0,6

Kao što se već na ovim ćelijskim linijama vidi i promena halogenido liganada donekle utiče na promenu aktivnosti ovih kompleksa. Aktivnost eddp-platina(IV) kompleksa sa hlorido, bromido i jodido ligandima redom opada, a takođe je i značajno lošija od aktivnosti cisplatine. Ovaj trend među sintetisanim kompleksima je i očekivan s obzirom na to da je hlorido ligand lakše odlazeći ligand od bromido liganda. Time se kod hlorido-Pt(IV) kompleksa postiže brža i lakša redukcija u ćeliji [51].

Značajno povećana aktivnost ovih kompleksa dobija se esterifikacijom edda ili eddp. Ovime se smanjuje helatni efekat liganda u kompleksu ali se povećava njegova lipofilnost i ostavlja mogućnost da se pretpostavljenom redukcijom platina(IV) kompleksa u tumorskoj ćeliji dobije aktivna diaminska platina(II) vrsta koja bi se vezala za DNK.

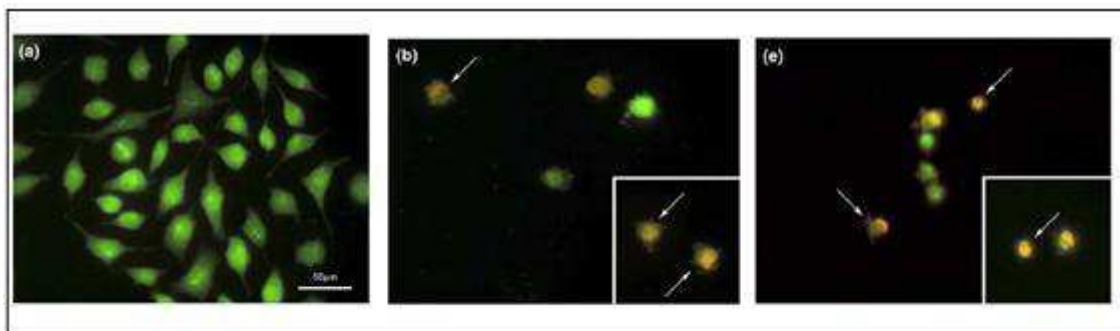
*In vitro* testovi na ćelijskoj liniji humanog alveolarnog adenokarcinoma, A549, ćelijskoj liniji humanog melanoma 518A2 i ćelijskoj liniji humanih germinativnih tumorskih ćelija testisa, 1411HP i H12.1, pokazali su da su kompleksi platine(IV) sa metil, etil i *n*-propil estrima edda aktivni, ali ne i aktivniji od cisplatine. Takođe je uočen trend porasta aktivnosti sa povećanjem dužine alkil niza u estarskom delu liganda (Tabela 4) [7].

Tabela 4. IC<sub>50</sub> (μM) vrednosti kompleksa platine(IV) sa estrima edda na raznim ćelijskim linijama [7].

Ćelijska linija kompleks	A549	518A2	1411HP
[Pt(Meedda)Cl <sub>4</sub> ]	85,88 ± 17,55	74,09 ± 12,67	62,35 ± 7,77
[Pt(Etedda)Cl <sub>4</sub> ]	65,75 ± 6,91	64,34 ± 5,15	35,18 ± 12,38
[Pt(Proedda)Cl <sub>4</sub> ]	60,17 ± 4,15	60,22 ± 9,69	39,87 ± 12,06
Cisplatina	1,50	1,60	2,70

U seriji kompleksa platine(IV) sa estrima eddp-a, prvi sintetisani sa *n*-butil i *n*-pentil estrima, pokazali su dobru aktivnost prema ćelijama HeLa i K562 (ali ne bolju od

cisplatine), dok su prema humanim PBMC ćelijama pokazali veću aktivnost od cisplatine. U ovim eksperimentima prvi put je pokušano da se objasni i mehanizam ćelijske smrti ispitivanih ćelija. Utvrđeno je da se radi o apoptozi, što će se i kasnije pokazati kao najčešći put smrti tumorskih ćelija pod dejstvom kompleksa platine(IV) i platine(II) sa ligandima ovog tipa (Slika 17) [58].

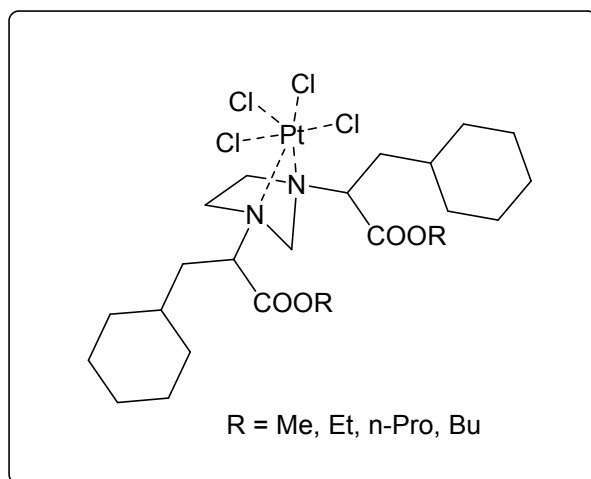


Slika 17. He-La ćelije nakon 24-časovnog tretmana različitim kompleksima platine, obojene etidijum-bromidom i akridin-narandžastom bojom: cisplatina (a), [Pt(dbeddp)Cl<sub>4</sub>] (b), [Pt(dveddp)Cl<sub>4</sub>] (c). Uočava se promena morfologije ćelija sa kondenzacijom i/ili fragmentacijom jezdra [58].

Ispitujući dalje uticaj platina(IV) kompleksa na ćelijsku liniju melanoma miša, B16, pokazano je da ovaj kompleks deluje značajno brže od cisplatine, izazivajući istovremeno i nekrotičnu i apoptotičnu ćelijsku smrt. Ono što posebno privlači pažnju jesu urađeni *in vivo* eksperimenti čiji rezultati pokazuju da je ovaj kompleks efikasniji od cisplatine i ne izaziva oštećenje bubrega, što je obećavajući faktor u daljim *in vivo* istraživanjima.

Kompleksi platine(IV) sa izobutil i izopentil estrima eddp, pokazali su se jako aktivnim na HeLa i K562 ćelijskim linijama. Dobijeni rezultati pokazuju veoma niske IC<sub>50</sub> vrednosti (2,63 i 1,76 µM) i apoptozu kao tip smrti ispitivanih ćelija [54]. Ovi kompleksi, kao i novosintetisani kompleks sa ciklopentil estrom eddp, indukuju kaspazno-zavisnu apoptozu praćenu autofagijom kod cisplatina-rezistentnih ćelijskih linija humanog karcinoma debelog creva (HCT116) [59].

Poslednjih godina sintetisano je nekoliko kompleksa platine(IV) sa ligandima edda tipa: *n*-alkil estri *N,N'*-metilen-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline. Aktivnost ovih kompleksa ispitivana je na šest tipova tumorskih ćelijskih linija i dobijeni rezultati pokazuju da ovi kompleksi imaju bolju citotoksičnu aktivnost od cisplatine. Eksperimentalni podaci pokazuju da ovi kompleksi izazivaju kaspazama indukovanu apoptozu (Slika 18, Tabela 5) [16].



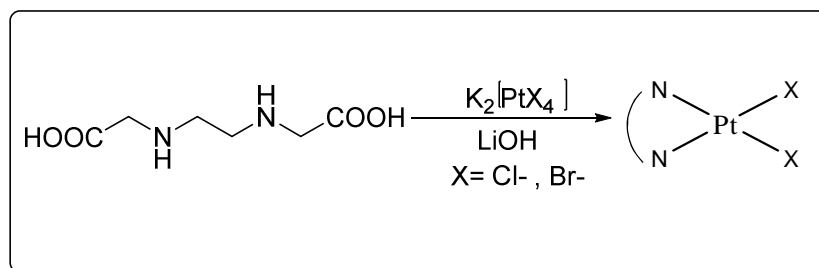
Slika 18. Kompleksi platine(IV) sa *n*-alkil estriima *N,N'*-metilen-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline.

Tabela 5. IC<sub>50</sub> (μM) vrednosti kompleksa platine(IV) sa estriima *N,N'*-metilen-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline na raznim ćelijskim linijama [14].

	<b>cisplatina</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>PC3</b>	12,5	8,1	6,2	5,4	5,1
<b>U251</b>	20	17,5	2,9	12,5	11,8
<b>A375</b>	45	9,1	7,2	5,7	6,2
<b>B16</b>	94,3	21,3	13,8	9,1	10,2
<b>HCT1 16</b>	>120	8,8	4,1	6,3	5,9
<b>CT26CL25</b>	120	11,3	5,2	6,3	6,3

Osim sinteze platina(IV) kompleksa ovog tipa sintetisani su i kompleksi platine(II). Sintetički put ovih kompleksa podrazumeva dva moguća načina:

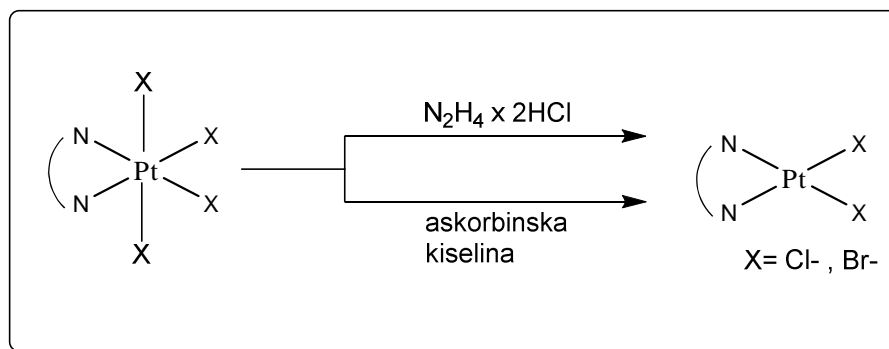
1) direktnu sintezu polazeći od kalijum-tetrahloridoplatinata(II) i odgovarajuće kiseline ili estra (Šema 7)



Šema 7. Reakciona šema direktne sinteze kompleksa edda-Pt(II).

ili

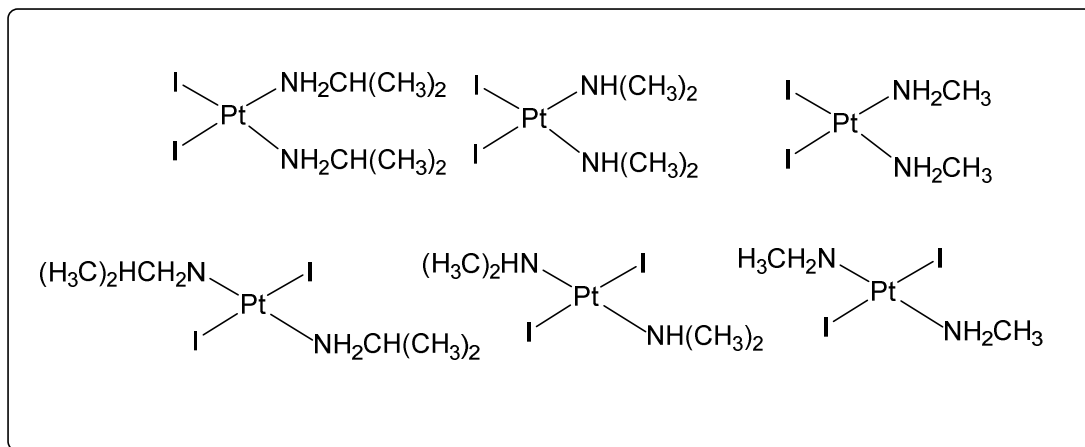
2) redukciju odgovarajućih platina(IV) kompleksa. Pogodni reagensi za redukciju su ili askorbinska kiselina ili hidrazin-dihidrohlorid (Šema 9).



Slika 9. Reakciona šema sinteze kompleksa edda-Pt(II) redukcijom odgovarajućeg edda-Pt(IV) kompleksa.

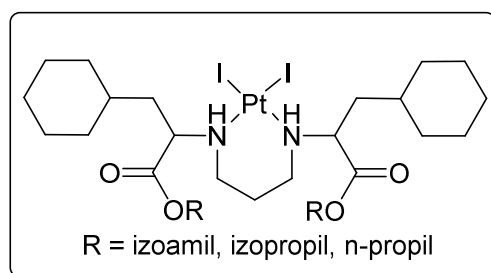
Što se platina(II) kompleksa tiče, esterifikacijom edda ili eddp kiseline dobija se platina(II) kompleks strukturno sličan oksaliplatini. Sve ovo ide u prilog dobrim rezultatima antitumorske aktivnosti ovih kompleksa. Uporedo sa pojedinačnim ispitivanjima kompleksa platine(II) sa estrima edda i eddp, upoređeni su i rezultati aktivnosti platina(II) i analognih platina(IV) kompleksa. Očekivano je, i potvrđeno, da su platina(IV) kompleksi aktivniji, što je verovatno posledica stabilnijeg i inertnijeg kompleksa platine(IV) u odnosu na platina(II) analog [14,53,54,58].

Poslednjih godina u literaturi su opisane i sinteze kvadratno-planarnih jodido kompleksa platine(II). Ranije se ovakva izmena halogenidnih liganada nije uzimala u obzir zbog pretpostavke da bi jodido kompleks bio inertniji (stabilnija Pt-I veza od Pt-Cl u vodenom rastvoru). U prilog tome je i veoma loš rezultat dobijen za *cis*-[PtI<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] u *in vivo* animalnom modelu, gde je ovo jedinjenje bilo potpuno neaktivno. Ipak je pokazano da neki *trans*-diamindijodidoplatina(II) kompleksi imaju bolju aktivnost od odgovarajućih *cis*-diamindihloridoplatina(II) kompleksa (Slika 19) [61].

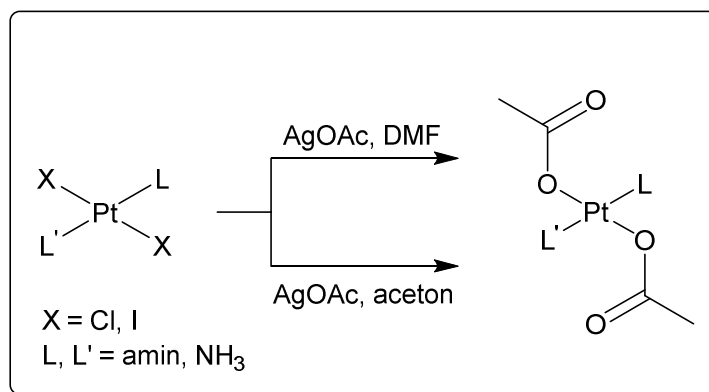


Slika 19. Strukture sintetisanih jodido kompleksa platine(II) [61].

Serijski sintetisani diamindijodidoplatina(II) kompleksi sa ligandima edda-tipa pokazali su dobru citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijskim linijama, bolju nego cisplatinu i što je još važnije veći afinitet za vezivanje za DNK ovih ćelija od cisplatinu. Ligandi upotrebljeni u ovim kompleksima su *n*-alkil estri (*S,S*)-propilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline (Slika 20) [62].

Slika 20. *n*-alkil estri (*S,S*)-propilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline [62].

Nedostatak ovih kompleksa je njihova slaba rastvorljivost, koja se može poboljšati zamenom halogenidnog liganada nekim drugim, npr. karboksilato ili nitro grupom. Sintetizacija ovih kompleksa zasniva se na izmeni halogenidnog liganada dodatkom srebrno-nitrata ili srebrno-acetata. U toku reakcije taloži se srebrno-halogenid, koji se najčešće odstranjuje ceđenjem kroz celit, a acetato ili nitro grupa vezuje se za metalni jon. Ovi kompleksi se bolje rastvaraju u vodi, što predstavlja prednost kada je u pitanju biološki sistem (Šema 10) [21].



Šema 10. Reakcija zamene halogenido liganda acetatom u cilju povećanja rastvorljivosti platina(II) kompleksa.

## 2.4. Tumor i poznati mehanizmi ćelijske smrti

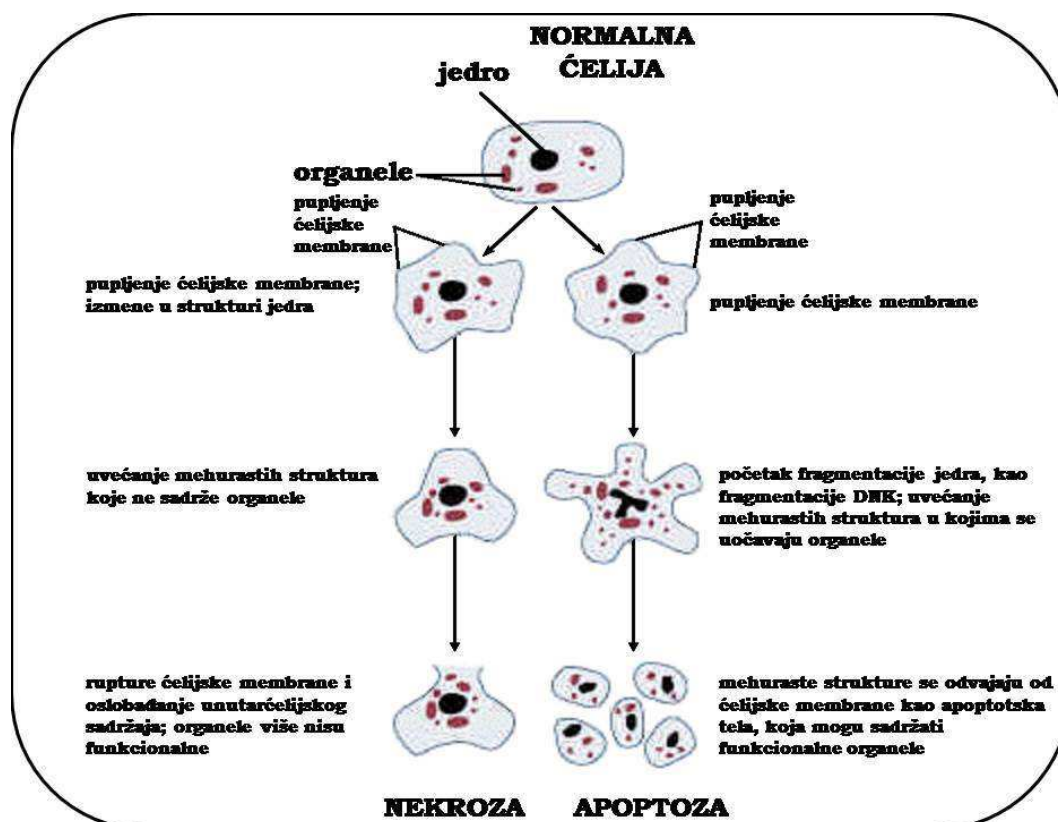
Tumorske ćelije predstavljaju genetski modifikovane ćelije, koje su usled ovih promena onemogućene da se dalje pravilno razvijaju. Tumor, prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije, predstavlja „nekontrolisan rast i razvoj ćelija“. Danas se smatra da je za 13% smrtnih slučajeva zaslužna neka vrsta tumora. Smatra se da će od 2030. godine biti oko 21,4 miliona slučajeva dijagnostikovanih tumora godišnje. Do 40-ih godina dvadesetog veka primenjivane su radioterapija i operativno uklanjanje tumora, a od tada i hemioterapija. Dva osnovna problema koja se javljaju kod hemioterapije jesu nedovoljna selektivnost hemoterapeutika i rezistentnost organizma prema hemoterapeuticima (urođena ili stečena). Selektivnost hemoterapeutika odnosi se na to da bi on trebalo da deluje na ciljnu tumorsku ćeliju i pri tome da ne oštećuje zdrave ćelije. Ovo je teško postići, pa je to upravo jedan od glavnih razloga što jako mali broj sintetisanih jedinjenja zapravo i uđe u kliničku upotrebu [2,3].

U cilju pronalaženja što efikasnijeg hemoterapeutika, potrebno je upoznati se sa mogućim tipovima ćelijske smrti. Dva najzastupljenija tipa ćelijske smrti su nekroza i apoptoza.

Kod oba tipa ćelijske smrti dolazi najpre do formiranja ispupčenja ćelijske membrane. Ćelijska membrana nekrotične ćelije ima sve više ovih ispupčenja i na kraju puca a sav ćelijski sadržaj (organele) se oslobađa u vanćelijski prostor, čime organele gube svoju funkciju i ćelija prestaje da postoji, a usled izlivanja unutarćelijskog sadržaja u vanćelijski prostor pokreće se zapaljenska reakcija koja može dovesti do oštećenja okolnih ćelija. Apoptozu karakteriše grupisanje organela, podela jedra i DNK, i



grupisanje njihovih delova u nastala ispupčenja na ćelijskoj membrani. Zatim se ćelija deli na veliki broj manjih apoptotičnih telašaca. Okolne ćelije ili makrofage „gutaju“ nastala telašca i tako ih uništavaju, a zapaljenska reakcija izostaje. Ovo je na neki način „recikliranje“ ćelijskog sadržaja u tkivima. Apoptoza se dešava pod uticajem unutarćelijske aktivacije, tj. ako više nije potrebna ćelija u tkivu postoje unutarćelijski mehanizmi koji pokreću njenu smrt. Kod nekroze to nije slučaj već je to slučaj proces. Zato se apoptoza još naziva i programirana ćelijska smrt (Slika 21).



Slika 21. Putevi apoptoze i nekroze, promene na ćeliji u toku ovih procesa [65].

Nekroza nastaje pod uticajem spoljašnjih ili unutrašnjih faktora koji uzrokuju ishemiju (drastičan gubitak kiseonika, glukoze ili hranljivih materija u ćeliji). Poznati molekuli čije povećanje koncentracije u ćeliji izaziva nekrozu jesu azot(II)-oksid i reaktivne kiseonične vrste, ROS. Apoptoza se dešava pod uticajem kaskadnog procesa aktivacije enzima koji su odgovorni za otpočinjanje i izvršenje programirane ćelijske smrti - prokaspaza. Prokaspaze se sintetišu kao neaktivne, a aktiviraju se hidrolizom peptidnog fragmenta, i dobija se aktivirani oblik prokaspaza - kaspaza i predstavlja protein sa cisteinom u aktivnom mestu. Kaspaze dalje aktiviraju druge kaspaze i tako redom. Ovaj

lančani proces dovodi do aktivacije enzima endonukleaza koje seku lance DNK i uzrokuju ćelijsku smrt [63-66].

## 2.5. Cilj rada

Cilj ove doktorske disertacije bio je:

1. Sinteza novih liganada edda-tipa i njima odgovarajućih kompleksa platine(II) i platine(IV).
2. Karakterizacija ovih jedinjenja standardnim spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom, NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom.
3. Pretpostavljenu molekulsku formulu potvrditi elementalnom analizom.
4. MM i DFT proračunima pokazati koji je favorizovan geometrijski izomer platina (IV) kompleksa.
5. Ispitati *in vitro* antitumorsku aktivnost sintetisanih jedinjenja. U odnosu na veliki broj analoga, struktura ovih jedinjenja je promenjena tako da budu lipofilnija i voluminoznija od svojih analoga, što bi za posledicu imalo bolju citotoksičnu aktivnost.

# **NAŠ RAD**

### 3. Eksperimentalni deo

#### 3.1. Sinteze liganada i odgovarajućih kompleksa platine(II) i platine(IV)

##### 3.1.1. (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid (L1)

Rastvoru natrijum-hidroksida (1,92 g (0,048 mol) u 10,00 cm<sup>3</sup> vode) dodato je 5,00 g (0,024 mol) *S*-2-amino-3-cikloheksilpropanske kiseline hidrohlorida i mešano pola sata na sobnoj temperaturi. Ovako pripremljena reakciona smeša zagrevana je do temperature ključanja, na oko 105 °C i dodato je 2,26 g (1,04 cm<sup>3</sup>) 1,2-dibrometana. Reakciona smeša refluktovana je 3 h.

Nakon toga rastvor se ohladi do sobne temperature, procedi i ispira rastvorom HCl:H<sub>2</sub>O (1:1).

Nastali beli talog *S,S*-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline, je proceden na vakuumu i ostavljen da se suši.

##### 3.1.2. *O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (L2 - L5)

Svi estri dobijeni su na sledeći način, koristeći odgovarajući alkohol:

U balon od 100 cm<sup>3</sup>, opremljen kondenzatorom sa kalcijum-hloridnom cevi, sipano je 20,00 cm<sup>3</sup> odgovarajućeg hladnog, apsolutnog alkohola. Uz hlađenje na ledenom kupatilu, ukapavano je 3,00 cm<sup>3</sup> tionil-hlorida. Nakon toga dodato je 1,20 g *S,S*-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline (2,72 mmol). Ovako pripremljena reakciona smeša je mešana, uz hlađenje, još sat vremena. Nakon toga smeša je zagrevana i refluktovana narednih 16-24 h. Dobijeni rastvor proceden je još dok je vruć, da se odstrani višak polazne kiseline. Hlađenjem filtrata, nastaje beli talog željenog estra. Talog je proceden i ostavljen da se suši.

##### 3.1.3. Dihalogenido((*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato) platina(IV) kompleksi (K1, K1')

Rastvoreno je 0,20 g (0,41 mmol) kalijum-heksahalogenidoplatinata(IV) u 15,00 cm<sup>3</sup> vode. U to je dodato 0,18 g (0,41 mmol) (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline dihidrohlorida i suspenzija je mešana uz zagrevanje

(temperatura kupatila je oko 80 °C). U toku zagrevanja i mešanja dodato je 15,00 cm<sup>3</sup> rastvora LiOH ( $c = 0,195 \text{ mol/dm}^3$ ), u porcijama od po 0,50 cm<sup>3</sup>, na svakih 15 min. Žuto-narandžasti talog kompleksa je proceden na vakuumu i ostavljen da se suši.

#### **3.1.4. Tetrahlrido(*O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato)platina(IV) kompleksi (K2 – K5)**

Rastvoreno je 0,20 g (0,41 mmol) kalijum-heksahloridoplatinata(IV) u 15,00 cm<sup>3</sup> vode. U to je dodato 0,41 mmol odgovarajućeg liganda (estra) i suspenzija je mešana uz zagrevanje (temperatura kupatila je oko 80 °C). U toku zagrevanja i mešanja dodato je 15,00 cm<sup>3</sup> rastvora LiOH ( $c = 0,195 \text{ mol/dm}^3$ ), u porcijama od po 0,50 cm<sup>3</sup>, na svakih 15 min.

Žuto-narandžasti talog kompleksa je proceden na vakuumu i ostavljen da se suši.

#### **3.1.5. Dihlorido(*O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato)platina(II) kompleksi (K2a, K3a)**

Rastvoreno je 0,10 g (0,24 mmol) kalijum-tetrahlroridoplatinata(II) u 10,00 cm<sup>3</sup> vode. Suspenzija ekvivalentne količine odgovarajućeg estra, 0,24 mmol, u 5,00 cm<sup>3</sup> metanola, pomešana je sa 5,00 cm<sup>3</sup> 0,096 mol/dm<sup>3</sup> rastvorom litijum-hidroksida. Dobijeni bistar rastvor pomešan je sa rastvorom kalijum-tetrahlroridoplatinata(II) i ostavljen da se meša preko noći na sobnoj temperaturi.

Dobijen je talog žute boje, koji je proceden i ostavljen da se suši.

#### **3.1.6. Dijodido(*O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato)platina(II) kompleksi (K2b – K4b)**

Rastvoru 0,10 g (0,24 mmol) kalijum-tetrahlroridoplatinata(II) u 5,00 cm<sup>3</sup> vode, dodat je rastvor 0,20 g (1,20 mmol) kalijum-jodida u 5,00 cm<sup>3</sup> vode. Dobijeni rastvor ostavljen je da se meša deset minuta. Boja rastvora se menja iz jako crvene boje kalijum-tetrahlroridoplatinata(II) u mrku boju kalijum-tetraiodidoplatinata(II). Suspenziji 0,24 mmol odgovarajućeg estra u 5,00 cm<sup>3</sup> metanola, dodato je 0,0115 g (0,48 mmol) čvrstog litijum-hidroksida, i sve to je mešano na ultrazvučnom kupatilu. Dobijeni bistar rastvor dodavan je u porcijama od po 0,50 cm<sup>3</sup> u rastvor kalijum-

tetraiodidoplatinata(II). U toku dodavanja rastvora estra formira se žuti talog. Nakon dodate celokupne količine rastvora estra, reakciona smeša ostavljena je da se meša još pola sata. Talog je proceden i ostavljen da se suši. Dobijeni kompleksi platine(II) prekrystalisani su iz acetona.

### 3.2. Karakterizacija sintetisanih jedinjenja

#### 3.2.1. (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid (L1)

Dobijena je supstanca bele boje u prinosu od 1,84 g, 34,52%. Tačka topljenja: 200 °C. Elementalna analiza  $C_{20}H_{38}O_4N_2Cl_2 \cdot 1,5H_2O$ : izračunato/nađeno: N – 5,98 / 5,93; C – 51,28 / 51,34, H – 8,74 / 8,24.  $^1H$  NMR spektar (200 MHz, [D6]DMSO):  $\delta$ = 0,91 (m, C5,6, 4H), 1,15 (m, C6,7, 8H), 1,15 (m,  $-CH_2-Cy$ , 4H; C4, 2H; C5, 4H), 3,78 (s,  $-NH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ , 4H), 3,80 ppm (m,  $-OOC-CH-NH_2$ , 2H).  $^{13}C$  NMR spektar (50 MHz, [D6]DMSO):  $\delta$ = 25,7 (C6), 25,8 (C4), 31,9 (C7), 32,9 (C5), 35,7 (C3), 50,3 (C8), 62,5 (C2), 171,8 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2900–2500, 1717, 1446, 1204, 888  $cm^{-1}$ . Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): m/z (%): 367,02 (68,42%) [ $M-2HCl+H$ ]<sup>+</sup>

#### 3.2.2. O,O'-dialkil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (L2 – L5)

#### O,O'-dimetil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid – L2

Dobijena je supstanca bele boje u prinosu od 0,68 g, 63,00%. Tačka topljenja: 204 °C. Elementalna analiza  $C_{22}H_{42}O_4N_2Cl_2 \cdot 0,5H_2O$ : Izračunato/nađeno: N – 5,85 / 5,89; C – 55,22 / 55,14; H – 9,06 / 8,64.  $^1H$  NMR spektar (200 MHz, [D6]DMSO): 0,88 (m, C7, 4H), 1,16 (m, C5,6, 8H), 1,70 (m,  $CH_2-Cy$ , 4H; C4, 2H; C5, 4H; C6, 4H), 3,41 (s,  $-NH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ , 4H), 3,78 (m,  $CH_3-OOC-$ , 6H), 4,15 (m,  $-OOC-CH-NH_2-$ , 2H), 10,00 ppm (m,  $NH_2^+$ , 4H).  $^{13}C$  NMR spektar (50 MHz, [D6]DMSO): 25,7 (C7), 26,0 (C6), 32,0 (C5), 33,2 (C4), 36,9 (C3), 42,0 ( $-OCH_3$ ), 53,3 (C8), 57,5 (C2), 170,2

ppm (**C1**). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu} = 2900\text{--}2500, 1739, 1491, 1224, 802 \text{ cm}^{-1}$ . Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): m/z (%):  $[\text{M}-2\text{HCl}+\text{H}]^+$  397,31 (35,71).

***O,O'*-diethyl-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid – L3**

Dobijena je bela supstanca u prinosu od 0,97 g, tj. 72,00%. Tačka topljenja: 208 °C. Elementalna analiza  $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cl}_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ : Izračunato/nađeno: N – 5,51 / 5,50; C – 56,70 / 56,40; H – 9,36 / 8,92.  $^1\text{H}$  NMR spektar (200 MHz, [D6]DMSO): 0,89 (m, C7, 4H), 1,26 (m, C5, 5', 8H;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ –, 6H), 1,72 (m,  $\text{CH}_2$ –Cy; C4, 2H; C6, 6', 4H), 3,46 (m,  $-\text{NH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2-$ , 4H), 4,25 (m,  $-\text{OOC}-\text{CH}-\text{NH}_2-$ , 2H;  $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{OOC}$ –, 4H), 10,09 ppm (m,  $\text{NH}_2^+$ , 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (50 MHz, [D6]DMSO): 14,1 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ –), 25,6 (**C7**), 25,6 (**C4**), 31,8 (**C6**), 33,4 (**C5**), 36,9 (**C3**), 57,3 (**C8**), 62,3 (**C2**;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOC}$ –), 169,3 ppm (**C1**). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu} = 2900\text{--}2500, 1739, 1450, 1215, 802 \text{ cm}^{-1}$ . Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): m/z (%):  $[\text{M}-2\text{HCl}+\text{H}]^+$  425 (45,00).

***O,O'*-di-*n*-propil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid – L4**

Dobijena je bela supstanca u prinosu od 0,76 g, 53,58%. Tačka topljenja: 216 °C. Elementalna analiza  $\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cl}_2 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ : Izračunato/nađeno: N – 5,28 / 5,19; C – 58,91 / 58,91; H – 9,60 / 9,89.  $^1\text{H}$  NMR spektar (200 MHz, [D6]DMSO): 0,93 (m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ –, 6H; C7, 4H), 1,16 (m, C5, 4H), 1,43 (m, C6, 4H), 1,63 (m,  $\text{CH}_2$ –Cy; C4, 2H; C5,6, 8H;  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ –, 4H), 3,58 (m,  $-\text{CH}_2-\text{OOC}$ –, 4H), 4,16 (s,  $-\text{OOC}-\text{CH}-\text{NH}_2-$ , 2H), 4,16 (m,  $-\text{NH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2-$ , 4H), 9,78 ppm (m,  $\text{NH}_2^+$ , 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR spektar (50 MHz, [D6]DMSO): 10,5 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOC}$ –), 21,6 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOC}$ –), 26,0 (**C6**), 26,0 (**C4**), 32,0 (**C7**), 33,5 (**C5**), 37,0 (**C3**), 57,5 (**C8**; **C2**), 67,7 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOC}$ –), 169,9 ppm (**C1**). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu} = 2900\text{--}2500, 1735, 1451, 1215, 829 \text{ cm}^{-1}$ . Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): m/z (%):  $[\text{M}-2\text{HCl}+\text{H}]^+$  453,27 (82,40).

***O,O'*-di-*n*-butil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid – L5**

Dobijena je bela supstanca u prinosu od 0,77 g, 51,13%. Tačka tpljenja: 218 °C.

Elementalna analiza  $C_{28}H_{54}O_4N_2Cl_2 \cdot 0,5H_2O$ : Izračunato/nađeno: N – 4,98 / 4,88; C – 59,77 / 59,50; H – 9,85 / 9,49.  $^1H$  NMR spektar (200 MHz, [D6]DMSO): 0,91 (m,  $CH_3CH_2-$ , 6H; C7, 4H), 1,16 (m,  $CH_3CH_2-$ , 4H), 1,38 (m, C5,6, 8H), 1,62 (m,  $-CH_2-$  Cy, 4H; Ch1, 2H; C5,6, 8H,  $CH_3CH_2CH_2CH_2-$ , 4H), 3,50 (m,  $-CH_2-OOC-$ , 4H), 4,20 (m,  $-OOC-CH-NH_2$ , 2H;  $-NH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ , 4H), 9,85 ppm (m,  $NH_2^+$ , 4H).  $^{13}C$ NMR spektar (50 MHz, [D6]DMSO): 13,7 ( $CH_3CH_2CH_2CH_2OOC-$ ), 18,8 ( $CH_3CH_2CH_2CH_2OOC-$ ), 25,6 (C6), 25,8 (C4), 30,2 ( $CH_3CH_2CH_2CH_2OOC-$ ), 32,0 (C7), 33,5 (C5), 37,0 (C3), 57,6 (C8; C2), 65,9 ( $CH_3CH_2CH_2CH_2OOC-$ ), 169,9 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu} = 2900-2500, 1738, 1451, 1215, 810\text{ cm}^{-1}$ . Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): m/z (%):  $[M-2HCl+H]^+$  481,41 (62,40).

***O,O'*-diizobutil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid – L6**

Dobijena je supstanca bele boje u prinosu od 0,81 g, 53,79%. Tačka topljenja: 220 °C.

Elementalna analiza  $C_{28}H_{54}Cl_2N_2O_4$ : Izračunato/nađeno: N – 5,06 / 4,81; C – 60,76 / 60,29; H – 9,76 / 9,87.  $^1H$  NMR spektar (500.26 MHz, TFA- $d_1$ ): 1,19 – 1,27 (m,  $(CH_3)_2CHCH_2-$ , 12H; C5, 4H), 1,38 – 1,52 (m, C6, 4H; C7, 2H), 1,77 (m, C4, 2H), 1,88 – 2,05 (m, C5,6, 8H; C7, 2H), 2,19 (m, C3, 4H; (m,  $(CH_3)_2CHCH_2-$ , 2H), 4,12 i 4,18 ( $-NH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ , 4H), 4,32 i 4,37 (m,  $-CH_2OOC-$ , 4H), 4,53 ppm (t,  $-OOCCHNH_2$ , 2H).  $^{13}C$ NMR spektar (125.79 MHz, TFA- $d_1$ ): 19,58 ( $(CH_3)_2CHCH_2-$ ), 27,51 i 27,63 (C7, C6), 29,71 ( $(CH_3)_2CHCH_2$ ), 35,0 (C4), 36,37 (C5), 39,69 (C3), 46,66 ( $-NH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ ), 62,81 ( $-OOCCHNH_2-$ ), 77,25 ( $-CH_2OOC-$ ), 172,92 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu} = 2928,8, 2844,6, 2592,0, 2592,9, 2415,4, 2356,4, 2216,6, 1742,7, 1540,6, 1471,9, 1219,4, 1180,2, 1066,5, 999,1, 807,1\text{ cm}^{-1}$ . Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): m/z (%):  $[M-2HCl+H]^+$  481,40 (26,83).



### ***O,O'*-diizopentil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid – L7**

Dobijena je supstanca bele boje u prinosu od 0,89 g, 56,34%. Tačka topljenja: 224 °C.

Elementalna analiza  $C_{30}H_{58}Cl_2N_2O_4$ : Izračunato/nađeno: N – 4,82 / 4,79, C – 61,94 / 61,54, H – 10,05 / 10,21.  $^1H$  NMR spektar (500,26 MHz, TFA- $d_1$ ): 1,16 – 1,28 (m,  $(CH_3)_2CHCH_2CH_2-$ , 12H; C5, 4H,  $(CH_3)_2CHCH_2CH_2-$ , 2H), 1,39 – 1,50 (m, C6, 4H; C7, 2H), 1,76 – 2,05 (m, C4, 2H, C5, C6, 8H, C7, 2H,  $(CH_3)_2CHCH_2CH_2-$ , 4H), 2,18 (m, C3, 4H), 4,14 i 4,19 (m,  $-NH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ , 4H), 4,53 i 4,58 (m,  $-CH_2OOC-$ , 4H), 4,67 ppm (m,  $-OOCCHNH_2-$ , 2H).  $^{13}C$  NMR spektar (125,79 MHz, TFA- $d_1$ ): 11,76 i 17,02 ( $(CH_3)_2CHCH_2CH_2-$ ), 22,92 ( $(CH_3)_2CHCH_2CH_2-$ ), 27,24 i 27,56 (C7, C6), 35,0 (C4), 36,30 (C5), 38,83 (C3), 46,63 ( $-NH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ ), 62,84 ( $-OOCCHNH_2-$ ), 70,00 ( $-CH_2OOC-$ ), 172,84 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2962,4, 2928,2, 2849,9, 2704,9, 2611,6, 2528,5, 2470,1, 2408,6, 2220,1, 1746,4, 1539,9, 1481,4, 1455,5, 1320,5, 1259,4, 1211,3, 1176,5, 1072,7, 998,1, 947,7, 805,0  $cm^{-1}$ . Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): m/z (%):  $[M-2HCl+H]^+$  509,43 (27,03 %).

### **3.2.3. Dihalogenido((*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(IV) kompleksi**

#### **Dihlorido((*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(IV) kompleks – K1**

Dobijena je supstanca žuto-narandžaste boje u prinosu od 0,12 g, 47,32%. Tačka topljenja: 256 °C. Elementalna analiza  $C_{20}H_{36}O_4N_2Cl_2Pt$ : izračunato/nađeno: N – 4,43 / 4,90; C – 37,98 / 37,72; H – 5,42 / 5,89.  $^1H$  NMR spektar (200 MHz,  $[D_6]DMSO$ ): 0,91 (m, C5,6, 4H), 1,15 (m, C6,7, 8H), 1,65 (m,  $-CH_2-Cy$ ; C4, 2H; C5, 4H), 3,40 (m,  $-NH-CH_2CH_2-NH-$ , 4H), 3,44 ppm (m,  $-OOC-CH-NH-$ , 2H).  $^{13}C$  NMR spektar (50MHz,  $[D_6]DMSO$ ): 22,0 (C6), 25,8 (C4), 27,9 (C7), 32,0 (C5), 33,6 (C3), 57,6 (C8), 66,2 (C2), 170,1 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2900–2500, 1675, 1451, 1204, 841  $cm^{-1}$ .

**Dibromido((*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(IV) kompleks – K1'**

Dobijena je narandžasta supstanca u prinosu od 0,082 g, 47,52%. Tačka topljenja: 266°C.

Elementalna analiza C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>Pt: izračunato/nađeno: N – 3,88 / 4,16; C – 33,30 / 33,44; H – 4,75 / 5,13. Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3442,1, 2932,9, 2851,1, 1667, 1448,4, 1261,4, 1071,7, 888,1 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR spektar (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ (ppm)) 0,89 (8H, m, C<sub>5,6</sub>), 1,17 (8H, m, C<sub>6,7</sub>), 1,65 (4H, m, CH<sub>2</sub>-Cy; 2H, m, C<sub>4</sub>; 4H, m, C<sub>5</sub>), 3,42 (4H, m, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3,46 (2H, m, OOC-CH-NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR spektar (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ (ppm)) 22,0 (C<sub>6</sub>), 25,6 (C<sub>4</sub>), 27,7 (C<sub>7</sub>), 31,6 (C<sub>5</sub>), 33,3 (C<sub>3</sub>), 57,6 (C<sub>8</sub>), 66,2 (C<sub>2</sub>), 170,2 (C<sub>1</sub>).

**3.2.4. Tetrahlorido(*O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(IV) kompleksi**

**Tetrahlorido(*O,O'*-dimetil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoato)platina(IV) kompleks – K2**

Dobijena je supstanca žuto-narandžaste boje u prinosu: 0,16 g, 53,70%. Tačka topljenja: 266 °C. Elementalna analiza C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>Pt: Izračunato/nađeno: N – 3,82 / 3,80; C – 36,03 / 35,94; H – 5,50 / 5,44. <sup>1</sup>H NMR spektar (200 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,89 (m, C<sub>7</sub>, 4H), 1,16 (C<sub>5,6</sub>, 8H), 1,63 (-CH<sub>2</sub>-Cy, 4H; C<sub>4</sub>, 2H; C<sub>5</sub>, 4H; C<sub>6</sub>, 4H), 3,46 (m, -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-, 4H), 3,68 (s, CH<sub>3</sub>-OOC-, 6H), 4,22 (m, -OOC-CH-NH-, 2H), 9,68 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 25,6 (C<sub>6</sub>), 25,0 (C<sub>4</sub>), 32,1 (C<sub>7</sub>), 33,2 (C<sub>5</sub>), 36,7 (C<sub>3</sub>), 41,9 (-OCH<sub>3</sub>), 53,2 (C<sub>8</sub>) 57,3 (C<sub>2</sub>), 170,8 ppm (C<sub>1</sub>). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2922, 2848, 1737, 1446, 1216, 831 cm<sup>-1</sup>. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%) [M-PtCl<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 397,31 (35,7), (negativan mod): m/z (%): [M-H]<sup>-</sup> 733,14 (28,94)

**Tetrahlorido(*O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(IV) kompleks – K3**

Dbijena je žuto-narandžasta supstanca u prinosu od 0,14 g, 45,42%. Tačka topljenja: 272 °C. Elementalna analiza C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>Pt·H<sub>2</sub>O: Izračunato/nađeno: N – 3,55 / 3,84; C – 36,58 / 37,00; H – 6,01 / 6,50. <sup>1</sup>H NMR spektar (200 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,92 (m, C7, 4H), 1,26 (m, C5,6, 8H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–, 6H), 1,63 (m, –CH<sub>2</sub>–Cy; 4H; C4, 2H; C5, 4H; C6, 4H), 3,73 (s, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–OOC–, 4H), 4,15 (m, –NH–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH–, 4H), 4,15 (m, –OOC–CH–NH–, 2H), 10,09 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 14,2 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 25,8 (C6), 25,8 (C4), 32,0 (C7), 33,5, 34,6 (C5), 37,0 (C3), 57,6 (C8), 62,4 (C2; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 170,5 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2900–2500, 1731, 1445, 1193, 850 cm<sup>-1</sup>. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%) [M–PtCl<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 425,34 (25,00), (negativan mod): m/z (%): [M–H]<sup>-</sup> 761,14 (39,47).

**Tetrahlorido(*O,O'*-di-*n*-propil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(IV) kompleks – K4**

Dobijena je supstanca žuto-narandžaste boje u prinosu od: 0,17 g, 53,58%. Tačka topljenja: 276 °C. Elementalna analiza C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>Pt: Izračunato/nađeno: N – 3,55 / 3,66; C – 39,55 / 40,04; H – 6,08 / 6,11. <sup>1</sup>H NMR spektar (200 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,92 (m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, 6H, C7, 4H), 1,16 (m, C5, 4H), 1,40 (m, C6, 4H), 1,64 (m, –CH<sub>2</sub>–Cy; C4, 2H; C5,6, 8H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, 4H), 3,50 (m, –CH<sub>2</sub>–OOC–, 4H), 4,16 (s, –OOC–CH–NH–, 2H), 4,16 (m, –NH–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH–, 4H), 9,78 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 10,62 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 21,51 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 25,68 (C6), 25,88 (C4), 31,8 (C7), 33,2 (C5), 34,44, 37,2 (C3), 57,4 (C8, C2), 67,6 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 170,7 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2900–2500, 1733, 1448, 1215, 846 cm<sup>-1</sup>. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%) [M–PtCl<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> 453,7 (35,00), (negativan mod): m/z (%): 789,19 (17,50) [M–H]<sup>-</sup>.

**Tetrahlorido(*O,O'*-di-*n*-butil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(IV) kompleks – K5**

Dobijena je žuto-narandžasta supstanca u prinosu od 0,22 g, 65,02%. Tačka topljenja: 282 °C. Elementalna analiza C<sub>28</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>Pt: Izračunato/nađeno: N – 3,43 / 3,48; C – 41,13 / 41,26; H – 6,36 / 6,55. <sup>1</sup>H NMR spektar (200 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,91 (m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, 6H; C7, 4H), 1,16 (m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, 4H), 1,38 (m, C5,6, 8H), 1,65 (m, CH<sub>2</sub>–Ch, 4H; C4, 2H; C5,6, 8H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–, 4H), 3,50 (m, –CH<sub>2</sub>–OOC–), 4,19 (m, OOC–CH–NH–, 2H; –NH–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH–, 4H; –OOC–CH–NH–, 2H), 9,56 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 13,7 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 18,9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 25,7 (C6), 25,9 (C4), 30,1 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 31,9 (C7), 33,2 (C5), 36,8 (C3), 57,4 (C8, C2), 65,9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 169,8 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2900, 1737, 1448, 1215, 841 cm<sup>-1</sup>. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%) 481,41 (39,50) [M–PtCl<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup>, (negativan mod): m/z (%): [M–H]<sup>-</sup> 817,23 (26,21), [M+HCOO]<sup>-</sup> 853,20 (25,20).

**3.2.5. Dihlorido(*O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleksi**

**Dihlorido(*O,O'*-dimetil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleks – K2a**

Dobijena je žuta supstanca u prinosu od 0,055g, 34,61%. Tačka topljenja: 184 °C. Elementalna analiza C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Pt: Izračunato/nađeno: N – 4,23 / 4,20; C – 39,88 / 39,49; H – 6,04 / 6,31. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,80 (m, C5, 8H), 1,20 (m, C7, 4H), 1,40 (m, C4, 2H), 1,60 (m, CH<sub>2</sub>–Cy, 4H), 1,80 (m, C6, 4H), 2,20 – 2,40 (m, –NH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH<sub>2</sub>–, 4H), 3,60 – 3,90 (m, CH<sub>3</sub>–OOC–, 6H), 4,35 i 3,20 (m, –OOC–CH–NH<sub>2</sub>–, 2H), 6,30 – 7,80 ppm (m, NH, 4H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 25,47 (C7), 26,04 (C6), 33,70 (C5), 34,40 (C4), 35,78 (C3), 46,58 (C8), 51,24 i 52,24 (–OCH<sub>3</sub>), 58,91 (C2), 170,25 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) = 2928,0, 2852,7, 1744,5, 1651, 1447,5, 1219,1, 850,7. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%): [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup> 679.23 (3.09).

**Dihlorido(*O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleks – K3a**

Dobijena je žuta supstanca u prinosu od 0,086 g, 51,93%. Tačka topljenja: 168 °C. Elementalna analiza C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Pt·H<sub>2</sub>O: Izračunato/nađeno: N – 4,00 / 4,22; C – 41,20 / 40,92; H – 6,44 / 6,27. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,80 – 1,80 (m, C<sub>5,6</sub>, 8H; –CH<sub>2</sub>–Cy; 4H; C<sub>4</sub>, 2H), 1,20 i 1,80 (m, C<sub>7</sub>, 4H), 1,22 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–, 6H); 2,60 – 3,0 (s, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–OOC–, 4H), 4,00 – 4,40 (m, –NH–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH–, 4H; –OOC–CH–NH–, 2H), 6,40 – 7,70 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 14,05 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 25,77 (C<sub>7</sub>), 30,70 (C<sub>6</sub>), 32,40 (C<sub>5</sub>), 33,40 (C<sub>4</sub>), 34,50 (C<sub>3</sub>), 49,03 (C<sub>8</sub>), 58,96 (C<sub>2</sub>); 61,03 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 169,74 ppm (C<sub>1</sub>). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2928,6, 2852,6, 1740,4, 1651,3, 1446,9, 1198,5, 840,9 cm<sup>-1</sup>.

Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%) [M +NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup> 707,27 (10,57).

**3.2.6. Dijodido(*O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleksi**

**Dijodido(*O,O'*-dimetil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleks – K2b**

Dobijena je žuta supstanca u prinosu od 0,096 g, 47,34%. Tačka topljenja: 172 °C. Elementalna analiza C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>I<sub>2</sub>Pt: Izračunato/nađeno: N – 3,31 / 3,68; C – 31,24 / 30,90; H – 4,73 / 5,12. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,80 – 2,20 (m, C<sub>7</sub>, 4H; C<sub>5,6</sub>, 8H; CH<sub>2</sub>–Cy, 4H; C<sub>4</sub>, 2H) 2,60 – 3,00 (m, –NH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH<sub>2</sub>–, 4H), 3,60 – 4,00 (m, CH<sub>3</sub>–OOC–, 6H), 4,20 – 4,80 (m, –OOC–CH–NH<sub>2</sub>–, 2H), 6,40 – 7,50 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 25,82 (C<sub>7</sub>), 26,17 (C<sub>6</sub>), 32,20 (C<sub>5</sub>), 33,07 (C<sub>4</sub>), 33,76 (C<sub>3</sub>), 46,24 (C<sub>8</sub>), 51,68 – 53,19 (C<sub>2</sub>), 58,24 (–OCH<sub>3</sub>), 170,08 i 171,38 ppm (C<sub>1</sub>). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2927,3, 2851,6, 1742,9, 1650,4, 1446,1, 1206,9, 847,5 cm<sup>-1</sup>. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%): [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup> 863,11 (4,28).

**Dijodido(*O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleks – K3b**

Dobijena je žuta supstanca u prinosu od 0,104 g, 62,80%. Tačka topljenja: 164 °C. Elementalna analiza C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>I<sub>2</sub>Pt: Izračunato/nađeno: N – 3,21 / 3,36; C – 33,00 / 33,43; H – 5,04 / 5,08. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,90 – 1,26 (m, C7,5,6, 12H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC– 6H) 1,60 – 2,30 (m, –CH<sub>2</sub>–Cy; 4H; C4, 2H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–OOC–, 4H), 2,77(m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–OOC–, 4H), 4,00 – 4,50 (m, –NH–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH–, 4H; –OOC–CH–NH–, 2H), 6,40 – 7,50 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 14,40 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 26,15 (C7), 32,38 (C6), 33,55 (C5), 34,32 (C4), 36,46 (C3), 48,85 i 49,03 (C8), 53,03 i 51,62 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OOC–) 61,43 (C2), 171,04 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3095,0, 2925,1, 2851,1, 1741,1, 1633,7, 1446,1, 1194,2, 848,0 cm<sup>-1</sup>. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%) [M +NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup>891,14 (4,86).

**Dijodido(*O,O'*-di-*n*-propil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil) propanoato)platina(II) kompleks - K4b**

Dobijena je supstanca žute boje u prinosu od: 0,117 g, 54,11%. Tačka topljenja: 152 °C. Elementalna analiza C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>I<sub>2</sub>Pt: Izračunato/nađeno: N – 3,11 / 3,15; C – 34,63 / 34,80; H – 5,33 / 5,23. <sup>1</sup>H NMR spektar (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 0,88 – 1,40 (m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, 6H; C7, 2H, C5,C6, 8H), 1,55 – 1,90 (m, C4, 1H; C7, 2H; C5,6, 8H; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, 4H), 1,90 – 2,15 (–CH<sub>2</sub>–Cy, 4H, C4, 1H) 2,60 – 3,00 (m, –CH<sub>2</sub>–OOC–, 4H), 4,00 – 4,80 (m, –OOC–CH–NH–, 2H, –NH–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–NH–, 4H), 6,50 – 7,50 ppm (m, NH, 2H). <sup>13</sup>C NMR spektar (50MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): 10,24 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 21,40 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 25,62 (C7), 31,86 (C6), 33,68 (C5), 33,30 – 34,56 (C4), 36,73 (C3), 49,14 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOC–), 60,28 (C8), 67,07(C2), 170,73 ppm (C1). Infracrveni spektar (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3155,7, 2926,1, 2852,5, 1740,8, 1648,5, 1448,0, 1189,9, 843,2 cm<sup>-1</sup>. Maseni spektar (LC/MS, 4000 V): (pozitivan mod): m/z (%) [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup> 919,17 (11,2).

### 3.3. Materijal i metode

#### 3.3.1. Supstance korišćene u sintezama

Polazni kompleksi  $K_2[PtCl_6]$  i  $K_2[PtCl_4]$  su sintetisani po već opisanim procedurama [67]. Polazna aminokiselina, (*S*)-2-amino-3-cikloheksil-propanska kiselina hidrohlorid, korišćena za sintezu opisanih liganada u ovoj disertaciji kupljena je od firme Senn Chemicals (Dielsdorf, Switzerland). Alkoholi su predestilovani i osušeni iznad zeolita. Korišćeni su komercijalno dostupni rastvarači bez daljeg prečišćavanja.

#### 3.3.2. Spektroskopske metode kojima su okarakterisana sintetisana jedinjenja

**Infracrvena spektroskopija.** Infracrveni spektri uzoraka snimljeni su pomoću uređaja Nicolet 6700 FT-IR spektrometra koristeći ATR tehniku snimanja.

**NMR spektroskopija.**  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR spektri, kao i  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC korelacioni NMR spektri snimljeni su koristeći Varian Gemini 200 i Bruker Avance III spektrometar. Uzorci su snimani u deuterisanom dimetilsulfoksidu, na 200, odnosno 500 MHz protonski, tj. na 50 MHz ugljenikovi NMR spektri.

**Masena spektrometrija.** LC/MS analize su rađene na masenom spektrometru 6210 Time-of-Flight LC-MS system (Agilent Technologies). Uzorci su u rastvoru u struji mobilne faze (0,2 % mravlja kiselina u vodi-acetonitril = 50:50) protoka 0,2 mL/min u maseni spektrometar unošeni pomoću Agilent Technologies 1200 Series HPLC instrumenta (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) sa binarnom pumpom, autosamplrom, kolonskim kompartmentom (sa ZDV ćelijom umesto kolone) i DAD detektorom. Maseni spektri su snimani u pozitivnom ili negativnom modu u sledećim uslovima: napon kapilare 4000 V, temperatura gasa 350 °C, protok gasa za sušenje 12 L/min, pritisak nebulajzera 45 psig, napon fragmentora 140 V, opseg masa 100–2500 m/z. Za sakupljanje i obradu podataka korišćen je MassHunter Workstation software.

### 3.3.3. Određivanje sadržaja platine u lizatima ćelija

Sadržaj platine u lizatima ćelija određen je induktivno kuplovanom plazma optičkom emisionom spektroskopijom, na 214,423 nm i 203,646 nm, koristeći iCAP 6500Duo ICP instrument (Thermo Scientific, UK).

### 3.3.4. Elementalna analiza

Elementalna analiza uzoraka urađena je na aparatu Elemental Vario EL III microanalyser.

### 3.3.5. Molekulsko-mehanički i DFT proračuni

Proračuni su urađeni pomoću 2007/PC verzije Consistent Force Field (CFF) konformacionog programa [68]. Komponente polja sile koje opisuju interakcije unutar ispitivanih kompleksa već su ranije objašnjene i korišćene. [69] Tačke naelektrisanja izračunate su kvantno-mehanički pomoću Gaussian 03 softvera. Optimizacija energije urađena je kombinacijom najveći-najmanji Davidon-Fletcher-Powell i Newton-Raphson metodom i izvedena je do energetskog gradijenta  $< 10^{-6}$  kJ/mol<sup>Å</sup> [70].

Geometrijska optimizacija izvedena je pomoću Gaussian 03 programa [68]. Sve strukture su optimizovane korišćenjem B3LYP funkcija [71-74]. SDD osnovni set za sve atome je iskorišćen u izračunavanju [75,76]. Svi sistemi su optimizovani bez simetrijskih ograničenja. Na kraju određena geometrija okarakterisana je kao prosečna struktura dobijena analizom konstanti sila normalnih vibracija.

### 3.3.6. Ispitivanja biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja na ćelijama i ćelijskim linijama *in vitro*

Ispitivanje biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja uključivalo je:

1. ispitivanje ćelijskog vijabiliteta na panelu ćelijskih linija upotrebom MTT i kristal violet metode, određivanjem aktivnosti endogene kisele fosfataze i LDH testom.



2. analizu parametara ćelijske smrti i produkcije ROS metodom protočne citometrije
3. ispitivanje koncentracije citokina u ćelijama primenom enzimskog imunoseja.

### 3.3.6.1. Ćelijske linije

U toku *in vitro* ispitivanja biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja korišćene su sledeće ćelijske linije:

1. Ćelije humanog glioma U251 i glioma pacova C6, fibrosarkoma miša L929 i mišjeg melanoma B16 – za ispitivanje citotoksičnosti liganada **L1** – **L5** i sintetisanih platina(IV) kompleksa. L929 i B16 ćelije kupljene su od European Collection of Animal Cell Cultures, dok su ćelije C6 i U251, dobijene od Dr Pedro Tranque (Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain).
2. Ćelije humanog melanoma A375, karcinoma debelog creva HCT116, humanog karcinoma pluća A549, adenokarcinoma dojke MCF7, normalne plućne fibroblastne ćelije MRC5 – za ispitivanje antikancerogene aktivnosti liganda **L6** i **L7**. Ćelije melanoma miša (B16) dobijene su iz laboratorije prof Siniše Radulovića Instituta za onkologiju i radiologiju u Beogradu, ćelije humanog melanoma A375 i karcinoma debelog creva HCT116 iz laboratorije prof. Ferdinando Nicolleti, Odseka za biomedicinske nauke, Katanija, Italija, a ćelije humanog karcinoma pluća A549, adenokarcinoma dojke MCF7 i normalne plućne fibroblastne ćelije MRC5 dobijene su iz ATCC (American tissue and Cell Culture Collection – Američka banka kultura ćelija i tkiva).
3. Humane ćelije tumora pluća H460, humanog glioma U251, humane promijelotske leukemične ćelije HL60, REH humane limfoblastoidne leukemične ćelije – za ispitivanje antikancerogene aktivnosti sintetisanih platina(II) kompleksa. Ćelije su nabavljene od proizvođača European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK).
4. Ćelije slezine (SPC) i limfnog čvora (LNC) C57BL/6 miševa i Dark Agouti pacova – za ispitivanje dejstva sintetisanih platina(IV) kompleksa na kompromitovanje funkcije ćelija imunskog sistema. Eksperimentalne životinje iz čijih organa su izolovane ove ćelije (C57BL/6 miševi i Dark Aguti pacovi)

dobijene su iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd. Svi eksperimenti su odobreni od strane Komiteta za brigu i upotrebu životinja.

Tumorske ćelijske linije su kultivisane na 37 °C u vlažnom medijumu sa 5% CO<sub>2</sub>, u medijumu RPMI 1640 puferovanom HEPES-om (2mM rastvor 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansufonske kiseline) ćelijske kulture obogaćenim sa 5% telećeg fetalnog seruma, 2mM L-glutaminom, 10mM natrijum-piruvatom i streptomycinom/penicilnom. Ćelije su pripremljene za eksperimente odvajanjem od podloge uobičajenom procedurom tripsinizacije i inkubirane u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunara (1·10<sup>4</sup> ćelija u jednom bunaru) za ispitivanje ćelijskog vijabiliteta, odnosno 24 bunara (5·10<sup>4</sup> ćelija u jednom bunaru) za citometrijske analize. Ćelije su tretirane ligandima i platinskim kompleksima 24 časa po zasejavanju. Osnovni (štok) rastvori svih ispitivanih jedinjenja napravljeni su u dimetilsulfoksidu (DMSO) kao rastvaraču, u koncentracijama 50 mM i čuvani na -20 °C.

**Izolacija primarnih ćelija iz slezine, limfnih čvorova i peritonealnih.** SPC su izolovane iz slezine dok su LNC dobijene iz vratnih limfnih čvorova C57BL/6 miševa i Dark Agouti pacova. Organi su mehanički usitnjeni i homogenizovani, provučeni kroz 40μM najlonsku mrežu filtera i konačna suspenzija sakupljena je centrifugiranjem. Crvene krvne ćelije u suspenziji ćelija slezine lizirane su koristeći pufer za liziranje eritrocita (RBC Lysisbufer). SPC i LNC su kultivisane u broju od 5·10<sup>6</sup>/ml/bunaru u ploču sa 24-bunara. Peritonealne ćelije (PC) su dobijene ispiranjem peritonealne šupljine ledenim PBS-om (fosfatnim puferom). PC (2·10<sup>6</sup>/ml/bunaru) su zasejane u ploču sa 24-bunara, inkubirane na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> tokom dva sata i zatim je supernatant ćelijske kulture uklonjen, a adherentne makrofage su ostale u kulturi. SPC i LNC su stimulisane sa 1μg/ml konkanavalina A (ConA), PC pacova sa 10 ng/ml LPS i mišji PC sa 10 ng/ml LPS i 10 ng/ml rekombinantnog mišjeg interferona-γ (IFN-γ).

### 3.3.6.2. Ispitivanja ćelijskog vijabiliteta

U svakom eksperimentu urađene su dve kontrole: netretirane ćelije i ćelije tretirane DMSO-om, čija finalna koncentracija nikada nije bila veća od 0,5%. U nekim od eksperimenata korišćeni su inhibitori autofagije, i to bafilomicin, protonska pumpa koja sprečava fuziju između autofagozima i lizozima, i vortmanin koji blokira autofagiju inhibirajući fosfatidilinozitol 3-kinazu.

**MTT – princip.** MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid) je boja koja se vezuje za mitohondrije i njeno vezivanje služi za procenu njihove aktivnosti, a time indirektno kao mera vijabiliteta. Princip ove metode je da se u mitohondrijama živih ćelija MTT, delovanjem mitohondrijalnih dehidrogenaza, redukuje u kristale formazana koji se zatim rastvaraju u dimetil-sulfoksidu (DMSO). Intenzitet dobijene ljubičaste boje je direktno proporcionalan aktivnosti mitohondrija, a to je proporcionalno broju živih ćelija.

**Kristal violet.** Princip ove metode je da se ćelijski vijabilitet procenjuje merenjem proteina u ćelijama u kulturi kojima je prethodno dodata ispitivana supstanca rastvorena u etanolu (18 mM rastvor). Ćelije se tretiraju u širokom opsegu koncentracija ispitivane supstance u toku 24 sata a zatim se inkubiraju u metanolu 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije ćelija obojene su 1% rastvorom kristal-violet 15 min, isprane, osušene i višak boje uklonjen 33% rastvorom sirćetne kiseline. Apsorbancija rastvorene boje merena je na 540 nm sa referentnom talasnom dužinom na 640 nm.

**Određivanje aktivnosti endogene kisele fosfataze.** Citotoksičnost kompleksa određivana je kolorimetrijskom metodom zasnovanom na merenju aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze po već opisanoj proceduri [77]. Ovaj test je zasnovan na hidrolizi *p*-nitrofenil-fosfata (PNPP) od strane unutarćelijskog enzima kisele fosfataze u živim ćelijama i posledične produkcije žutog *p*-nitrofenil-hromofora. Aktivnost kisele fosfataze je merena nakon 24 h tretmana. Tumorske ćelije su inkubirane sa različitim dvostruko opadajućim (100  $\mu$ M - 1,56  $\mu$ M) koncentracijama ispitivanih jedinjenja kao i sa DMSO u kome su organski ligandi i Pt(II) kompleksi

rastvarani. Nakon tretmana adherentnih ćelijskih kultura prvo je odstranjen medijum, a zatim dodato 100  $\mu$ L pufera sa supstratom (10 mM PNPP u 0,1M Na-acetata, pH=5,5; sa dodatkom 0,1% Triton-X). Ćelijama u suspenziji je odmah dodato 50  $\mu$ L pufera sa supstratom (15 mM PNPP u 0,3 M Na-acetata, pH=5,5 sa dodatkom 0,4% Triton-X). Reakcija je zaustavljena nakon 2 h inkubacije sa 1,3 M Na-hidroksida za adherentne i ćelijske linije u suspenziji. Apsorbance, koje su direktno proporcionalne broju živih ćelija, su merene na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na talasnoj dužini od 405 nm (Sunrise, TECAN, UK). Rezultati su predstavljeni u procentima vijabiliteta, tj. kao odnos apsorbanci tretiranih ćelija i netretiranih ćelija u kontroli (vijabilitet 100%). IC<sub>50</sub> vrednosti su izračunate pomoću računarskog programa GraphPad Prism 4 for Windows. One predstavljaju onu koncentraciju ispitivanih jedinjenja koja dovodi do smanjenja vijabiliteta tumorskih ćelija za 50% u odnosu na kontrolu.

**LDH test.** Intaktnost ćelijske membrane tj. narušavanje njenog integriteta kao pokazatelja ćelijske smrti po tipu nekroze, utvrđuje se primenom testa koji meri aktivnost citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u supernatantu ćelija u kulturi. Prilikom narušavanja integriteta ćelijske membrane, citosolni enzim LDH dospeva u vanćelijski odeljak, što u eksperimentalnim uslovima predstavlja medijum u kojem se ćelije nalaze. Princip LDH testa se zasniva na dve oksido-redukcije. U prvoj se laktat oksiduje u piruvat, pri čemu se  $\text{NAD}^+$  redukuje u  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . U narednoj reakciji fenazin-metosulfat posreduje u reoksidaciji  $\text{NADH} + \text{H}^+$  u  $\text{NAD}^+$  pri čemu se tetrazolijum hlorid redukuje u obojeni formazan. Aktivnost LDH se određuje tako što se 100  $\mu$ l supernatanta iz svakog tretmana tj. kontrole inkubira 15 min na sobnoj temperaturi sa 100  $\mu$ l substrata za LDH. Za potrebe testa je neophodno pored kontrole netretiranih ćelija (žive ćelije) obezbediti i pozitivnu kontrolu (100 % mrtve ćelije). Nju su činile ćelije lizirane 3 % nejonskim deterdžentom Triton X koje usled potpunog narušavanja integriteta ćelijske membrane maksimalno oslobađaju citosolnu LDH. Za pripremu supstrata za LDH korišćen je 54 mM L(+) laktat, 0,66 mM tetrazolijum hlorid, 0,28 mM fenazin-metosulfat i 1,3 mM  $\text{NAD}^+$  (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), koji su rastvoreni u 0,2 M Tris-puferu pH 8,2. Apsorbance su merene na talasnoj dužini od 570 nm na čitaču za mikrotitar ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Rezultati su predstavljeni u procentima (%) citotoksičnosti u odnosu na ćelije lizirane sa Triton X-

100 (pozitivna kontrola, 100% mrtve ćelije) koja je izračunata pomoću prikazane formule:

$\% C = [(E-S)/(M-S)] \times 100$ , gde je:

E – apsorbancija tretiranih ćelija

S – apsorbancija kontrolnih (netretiranih) ćelija

M – apsorbancija mrtvih ćelija dobijenih liziranjem sa Triton X-100

C – citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

Rezultati su prikazani kao procenat (%) živih ćelija.

### **3.3.6.3. Analiza parametara ćelijske smrti i produkcije ROS metodom protočne citometrije**

Analiza ćelijskog ciklusa određena je pomoću protočne citometrijske analize sadržaja DNK ćelijske nakon bojenja propidijum-jodidom, koji inerkalira u dvostruki DNK heliks i emituje crvenu fluorescenciju (FL2 kanal). Procenat ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa određen je koristeći BD Cell Quest Pro softver.

Aktivacija kaspaza merena je protočnom citometrijom nakon obeležavanja ćelija ćelijski-propustljivim, pan-kaspaznim inhibitorom konjugovanim fluorescentnom bojom FITC. Intenzitet zelene fluorescencije (FL1) je srazmeran sveukupnoj kaspaznoj aktivnosti u ćeliji.

Unutarćelijska produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) određena je koristeći redoks-senzitivnu boju dihidrorodamin (DHR). DHR je dodavan ćelijskim kulturama (5 $\mu$ M) na početku tretmana. Na kraju inkubacije, ćelije su tripsinizovane, oprane u PBS-u, i porast zelene fluorescencije (FL1) analiziran je kao mera produkcije ROS, koristeći FACS Calibur protočni citometar.

Zastupljenost kiselih autofagolizozoma je određena protočnom citometrijskom analizom ćelija obojenih pH-zavisnom bojom (akridin-narandžastom), koja boji citoplazmatične autofagolizozome narandžasto-crveno, dok jedra i citosol, koji su neutralnog pH, ostaju zeleno obojeni. Dakle, autofagija se detektuje kao porast u odnosu crveno/zeleno fluorescencije (FL3/FL1). Nakon inkubacije ćelije su isprane PBS-om i obojene akridin-narandžastom bojom (1 $\mu$ M) 15 min na 37 °C. Ćelije su zatim tripsinizovane, oprane i analizirane FACSCalibur protočnim citometrom, koristeći BD Cell Quest Pro softver.

#### **3.3.6.4. Ispitivanje koncentracije citokina u ćelijama primenom enzimskog imunoeseja**

Koncentracija citokina (mišji/pacovski IL-17 i mišji IFN- $\gamma$ ) u supernatantu ćelijskog supstrata određena je „sendvič“ ELISA testom. Princip enzimskog imunoeseja (ELISA test) je da „hvatajuća“ („capture“) antitela kojima je presvučena mikrotitarska ploča, reaguju sa citokinom, za koji se potom vezuju i detektujuća antitela konjugovana biotinom, za koji se velikim afinitetom vezuje streptavidin za koji je vezana peroksidaza iz rena (HRP). Nakon dodavanja supstrata u tetrametilbenzidin (TMB), razvija se boja čiji se intenzitet očitava u čitaču za mikrotitarske ploče, i koncentracija citokina u uzorku je proporcionala intenzitetu boje. Uzorci su analizirani u duplikatu za mišji/pacovski IL-17 i mišji IFN- $\gamma$ . Rezultati su izračunati kristeći standardne krive napravljene na osnovu poznatih koncentracija odgovarajućeg rekombinantnog citokina [77].

#### **3.3.6.5. Statistička obrada rezultata**

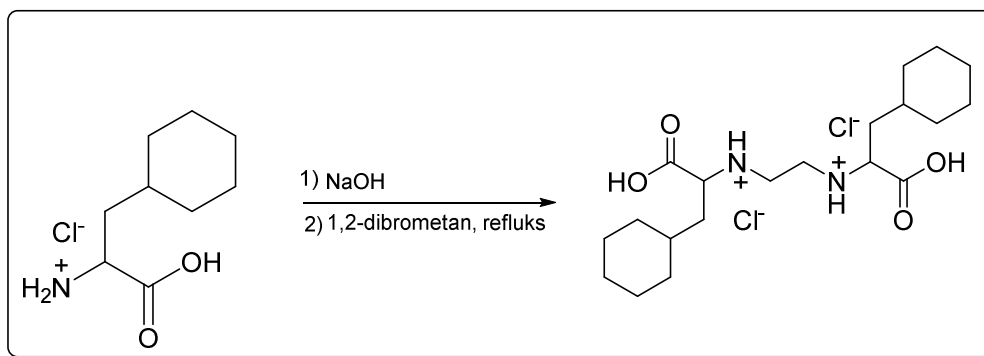
U statističkoj obradi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Za procenu značajnosti razlike nezavisnih uzoraka korišćen je parametarski test, Studentov test. Vrednost  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.

## 4. Rezultati i diskusija

### 4.1. Sinteza liganada i kompleksa

Polazna supstanca u sintezi liganada bila je neesencijalna aminokiselina *S*-2-amino-3-cikloheksilpropanska kiselina u obliku hidrohlorida. Prvi korak u sintezi bio je dehidrohlorovanje ove kiseline i njena neutralizacija pomoću vodenog rastvora natrijum-hidroksida. Ovako pripremljena reakciona smeša zagrevana je do temperature refluksa a zatim je dodat 1,2-dibrometan (molski odnos aminokiselina:1,2-dibrometana = 2:1) kako bi došlo do formiranja etilendiaminskog mosta između dva aminokiselinska ostatka. Nakon refluksa reakciona smeša je ohlađena i talog proceden, a višak neizreagovane kiseline neutralisan razblaženom hlorovodoničnom kiselinom.

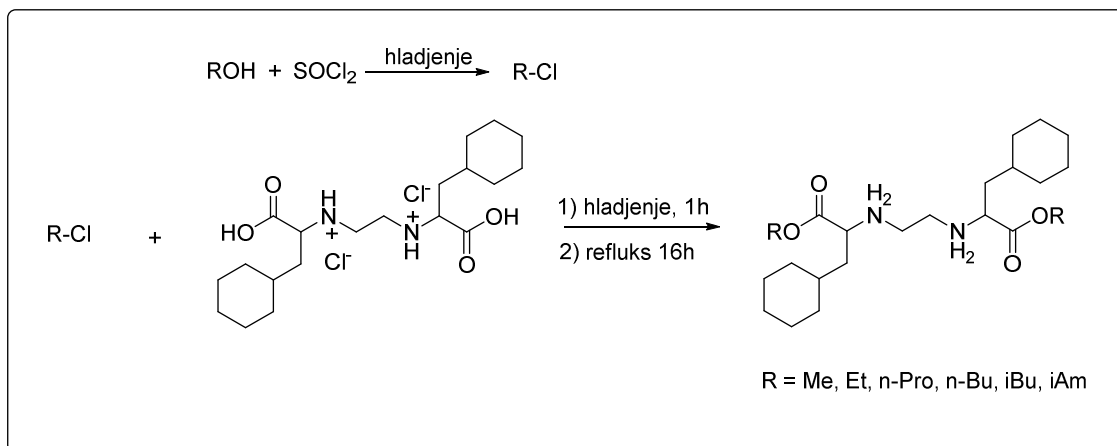
Dobijen je beli proizvod *S,S*-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid (Šema 11).



Šema 11. Reakciona šema sinteze (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline dihidrohlorida.

Ovako dobijena kiselina predstavljala je polaznu supstancu u sintezi estara normalnog i razgranatog niza. Esterifikacija je izvršena jednom od standardnih metoda esterifikacije pomoću tionil-hlorida. Odgovarajući alkohol je preveden u alkil-hlorid pomoću tionil-hlorida, hlađenjem reakcione smeše u ledenom kupatilu. Reakcionoj smeši je dodata *S,S*-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina dihidrohlorid i smeša je refluktovana šesnaest časova. Dobijeni rastvor proceden je još dok je vruć, da se odstrani višak polazne kiseline. Hlađenjem filtrata, nastaje beli talog estera u obliku dihidrohlorida. Talog je proceden i ostavljen da se suši (Šema

12).

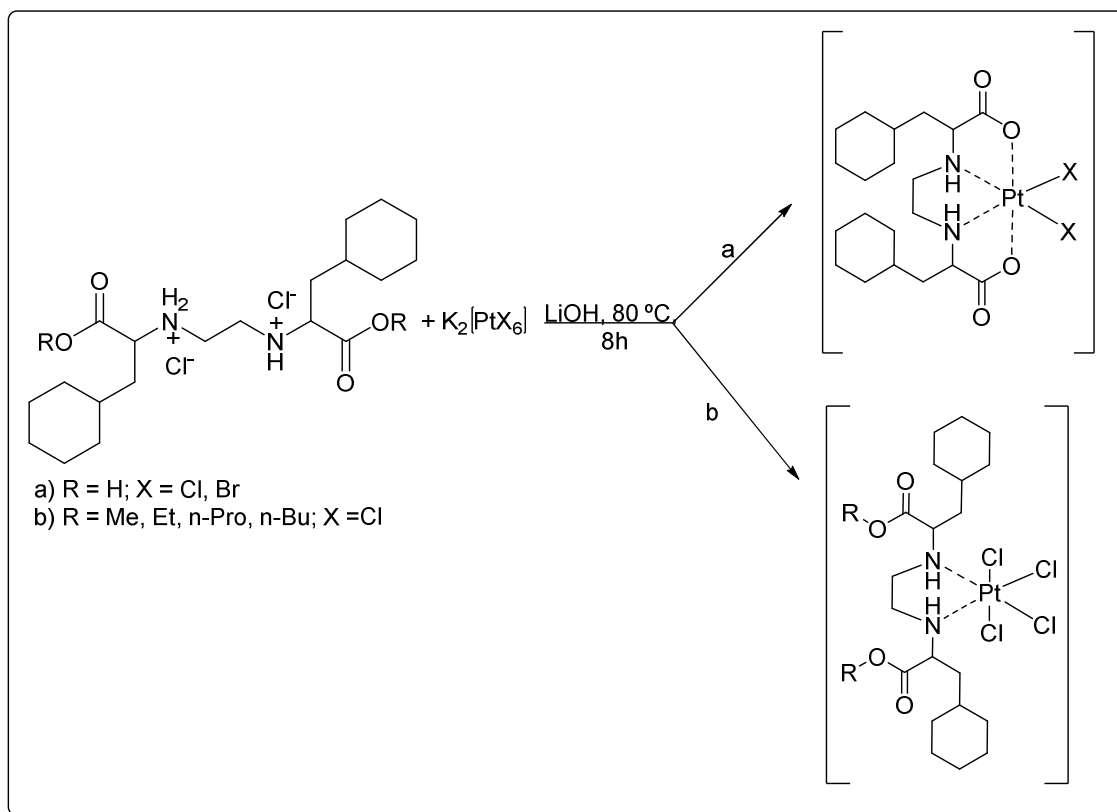


Šema 12. Reakciona šema sinteze estara (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline.

Polazne supstance u sintezi kompleksa platine(II) i platine(IV) bile su kalijum-tetrahloridoplatinat(II) ili kalijum-heksahloridoplatinat(IV) i odgovarajući ligandi. Treći polazni kompleks je sintetisan polazeći od kalijum-tetrahloridoplatinata(II) i kalijum-jodida kada nastaje kompleks kalijum-tetrajodidoplatinat(II).

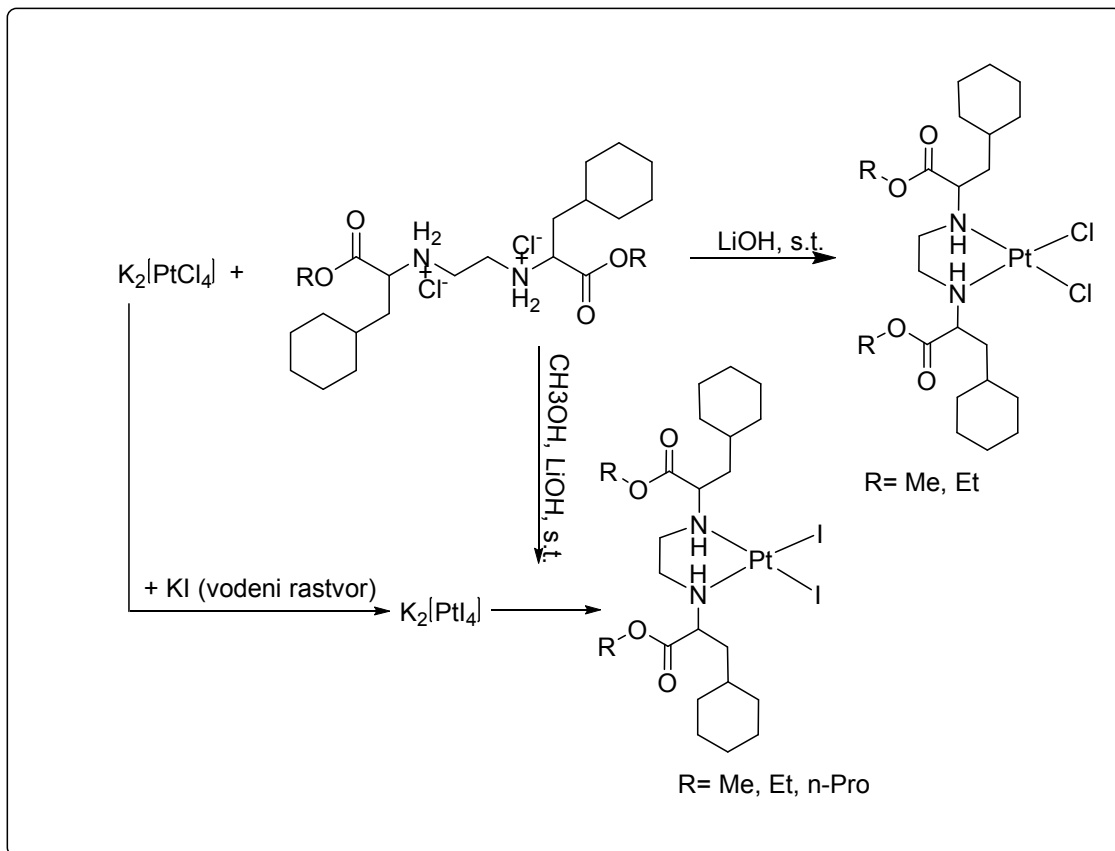
Prilikom sinteze kompleksa platine(IV) napravljena je suspenzija kalijum-heksahloridoplatinata(IV) i odgovarajućeg liganda, dodavan rastvor litijum-hidroksida kojim je ligand *in situ* dehidrohlorovan i preveden u oblik pogodan za koordinaciju za metalni jon. Reakcija traje oko devet časova i u svim slučajevima dobija se žuto-narandžasti talog kompleksa.





Šema 13. Reakciona šema sinteze kompleksa platine(IV) sa (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanskom kiselinom i njenim *n*-alkil estrima.

U sintezi jodido i hlorido kompleksa platine(II), ligand je prvo dehidrochlorovan pomoću litijum-hidroksida, a zatim dodavan u rastvor kalijum-tetrahloridoplatinata(II), odnosno kalijum-tetraiodidoplatinata(II). Mešanjem rastvora na sobnoj temperaturi nastaje žuti talog kompleksa (Šema 14).



Šema 14. Reakciona šema sinteze dihlrido i dijodido Pt(II) kompleksa sa estrima (S,S)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline.

Sintetisana jedinjenja okarakterisana su standardnim spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom, NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom. Urađeni su DFT i MM proračuni radi pretpostavljanja najstabilnijih geometrijskih izomera oktaedarskih platina(IV) kompleksa. S obzirom na to da su sintetisana jedinjenja nova u literaturi, ispitana je i njihova *in vitro* citotoksična aktivnost na velikom broju tumorskih ćelija.

## 4.2. Spektroskopija

### 4.2.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija je metoda kojom se potvrđuje prisustvo određenih funkcionalnih grupa kod molekula. U jedinjenjima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji najznačajniji su signali koji potiču od vibracije karbonilne grupe kao i apsorpcije sekundarnog amina u zavisnosti od oblika.

U spektrima svih sintetisanih liganada, **L1** – **L7**, postoje karakteristične oštre vibracione trake na oko  $2900\text{ cm}^{-1}$  i nešto šire na oko  $2500\text{ cm}^{-1}$ . Ove trake odgovaraju standardnim N–H vibracijama kod sekundarnih amina u obliku soli ( $-\text{NH}_2^+-$ ). U ovoj oblasti se nalaze i simetrične C–H vibracije. U infracrvenim spektrima kompleksa i Pt(II) i Pt(IV), ove su trake slabijeg intenziteta, a pored njih javljaju se i široke trake na oko  $3400\text{ cm}^{-1}$ , koje odgovaraju N–H vibracijama sekundarnih amina ( $-\text{NH}-$ ). Slabiji intenzitet traka na oko  $2900\text{ cm}^{-1}$  i pojava novih traka na oko  $3400\text{ cm}^{-1}$  ukazuje da je došlo do koordinacije liganada preko azotovih atoma u sintetisanim kompleksima platine(II) i platine(IV). Karakteristična apsorpciona traka C=O grupe za alifatične estre na oko  $1730\text{ cm}^{-1}$  pojavljuje se u infracrvenim spektrima svih liganada. U kompleksima **K1** i **K1'** ove su trake pomerene ka nižim vrednostima na oko  $1675\text{ cm}^{-1}$  usled koordinacije preko susednog kiseonikovog atoma iz karboksilne grupe. U infracrvenim spektrima ostalih sintetisanih kompleksa nema značajnijih pomeranja ovih traka što ukazuje na izostanak koordinacije ovog dela molekula liganda za metalni jon. Apсорpcioni maksimumi u spektrima liganada i kompleksa u oblasti  $1400\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju C–H valencionim vibracijama alkil grupa u ovim molekulima. Karakteristične trake za asimetrične C–N vibracije nalaze se na oko  $880\text{ cm}^{-1}$  i u spektrima kompleksa pomerene su ka nižim vrednostima usled koordinacije liganada za metal preko azotovih atoma [78].

Koristeći infracrvene spektre kompleksa **K1** i **K1'**, uz DFT proračune i NMR spektre, može se pretpostaviti koji je najstabilniji geometrijski izomer ovih kompleksa. Oblik apсорpcionih traka karakterističnih za karbonilnu grupu je različit kod tri moguća izomera. *Trans* izomer ima dve jake trake, *unsym-cis* ima jednu široku dok *sym-cis* ima jednu oštru traku u oblasti  $1600\text{ do }1700\text{ cm}^{-1}$  [79,80]. U infracrvenim spektrima kompleksa **K1** i **K1'** uočava se jedna oštra traka na  $1660\text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje da je najverovatnija geometrija ovih kompleksa *sym-cis* [81] (Tabela 6).

Tabela 6. Vrednosti predviđenih i pravih frekvencija u infracrvenom spektru za *sym-cis* geometrijski izomer kompleksa **K1** i **K1'**.

trake	<i>sym-cis</i> proračunato ( $\nu / \text{cm}^{-1}$ )		Izmerene vrednosti ( $\nu / \text{cm}^{-1}$ )
	nekorigovano	korigovano	
C–O–O st	1093	1071,71	1071,7
C–O as	1228	1261,42	1261,4
C–N st	1489	1448,42	1448,4
C=O	1750	1667,03	1667,0
C–H as	2983	2851,19	2851,1
–NH– st	3010	2923,99	2923,9
–NH– st	3487	3442,22	3442,1

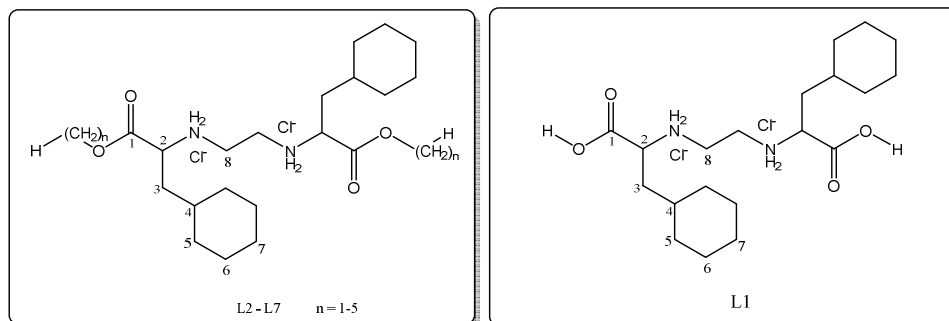
$$\nu_{\text{korigovano}} = \nu_{\text{snimljeno}} / (1 - 0,00000001 * \nu_{\text{izracunato}}) \text{ [82]}$$

## 4.2.2. NMR spektroskopija

### 4.2.2.1. NMR spektroskopija liganada

Sintetisani ligandi su (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina (**L1**) i *n*-alkil i razgranati estri ove kiseline (**L2-L7**). NMR spektri liganda **L1-L5** snimljeni su u deuterisanom DMSO-u dok su **L6** i **L7**, zbog slabe rastvoljivosti u dimetilsulfoksidu, snimani u deuterisanoj trifluorsirćetnoj kiselini. U  $^1\text{H}$  NMR spektrima sintetisanih jedinjenja uočavamo nekoliko grupa signala. Protoni iz alkil grupa i cikloheksil grupe daju signale u oblasti od 0,80 – 2,25 ppm. Zbog induktivnog uticaja susednih heteroatoma (N,O) ostali protoni daju signale na: oko 3,60 ppm (– $\text{CH}_n\text{–OOC–}$ ) i na oko 4,20 ppm **C2** i **C8**. U dihidrochloridima liganada javljaju se i signali na oko 9,70 ppm koji odgovaraju vodonikovim atomima iz – $\text{NH}_2^+$ – grupe. Hemijska pomeranja u spektrima **L6** i **L7** su na gotovo istim vrednostima uz izostanak signala za protoni – $\text{NH}_2^+$ – grupe zbog njihove brze izmene sa protonima rastvarača (TFA- $d_1$ ). U  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima liganada **L1 – L7** signali na nižim pomeranjima od 40,00 ppm su signali koji odgovaraju ugljenikovim atomima sa alkil i cikloheksil grupe. Signali koji odgovaraju ugljenikovim atomima **C8**, **C2**, – $\text{CH}_2\text{–OOC–}$  i **C1**, nalaze se na

oko 50, 57-60 i 170 ppm, redom. U spektrima snimljenim sa TFA-d<sub>1</sub> rastvaračem redosled signala je isti ali su pomerenja nešto viša (Slika 22).



Slika 22. Numeracija liganada, L1-L7.

#### 4.2.2.2. NMR spektroskopija kompleksa platine(II) i platine(IV)

Kompleksi **K1–K5** i **K1'** su kompleksi Pt(IV), oktaedarske geometrije u kojima je odgovarajući ligand tetradentatno (**K1**, **K1'**) odnosno bidentatno (**K2–K5**) koordinovan. Donorski atomi su O i N (**K1**, **K1'**), odnosno samo N (**K2–K5**). U skladu sa ovim, detektovana hemijska pomerenja nešto su promenjena u odnosu na pomerenja kod slobodnih liganada. U <sup>1</sup>H NMR spektrima kompleksa **K1** i **K1'** signali za protone na ugljenikovim atomima **C2** i **C8** pomereni su ka nižim vrednostima, sa 3,78 ppm na 3,40 ppm i sa 3,80 ppm na 3,44 ppm redom. Oblik signala na ovim vrednostima hemijskog pomerenja može ukazati na geometriju oktaedarskih kompleksa **K1** i **K1'**. Za *trans* geometrijski izomer karakteristična su dva singleta u oblasti od 2,6 do 3,6 ppm, dok je kod *cis* geometrijskih izomera ovaj signal u obliku širokog singleta [83,84]. U <sup>1</sup>H NMR spektrima ova dva kompleksa prisutan je upravo široki singlet što ukazuje na prisustvo *cis* geometrije. Ova se traka pojavljuje kao široka traka zbog kuplovanja metinskih protona **C2** atoma i metilenskih **C3** atoma. Takođe se u spektru kompleksa uočava i izostanak signala za proton iz karboksilne grupe. U <sup>13</sup>C NMR spektru signali koji odgovaraju **C2**, odnosno **C8** ugljenikovim atomima pomereni su ka višim vrednostima. U kompleksima **K2–K5** uočena je mala promena u hemijskim pomerenjima za protone na ugljenikovim atomima **C2** i **C8** u <sup>1</sup>H spektrima, odnosno u <sup>13</sup>C NMR spektru za iste ugljenikove atome. Jednostavan <sup>13</sup>C NMR spektar ukazuje na veliku simetriju kompleksa **K1** i **K1'**, odnosno verovatnu *sym-cis* geometriju [51]. Teorijska

izračunavanja pokazuju da bi kompleks *unsym-cis* geometrije imao dva signala za ugljenikov atom karboksilne grupe. U spektrima kompleksa **K1** i **K1'** prisutna je jedna traka što dodatno ukazuje da je geometrija ovih kompleksa *sym-cis* [79-82] (Tabela 7).

Tabela 7. Predviđene i stvarne vrednosti  $^{13}\text{C}$  NMR pomeranja za sva tri geometrijska izomera kompleksa. K1'

$^{13}\text{C}$ NMR	nađeno (ppm)	Izračunato (ppm)		
		<i>sym-cis</i>	<i>uns-cis</i>	<i>trans</i>
	[Pt(L)Br <sub>2</sub> ]			
<b>C1</b>	170,2	180,0	182,2; 178,1	177,9
<b>C2</b>	66,2	62,1	69,2; 64,8;	62,1
<b>C3</b>	33,3	41,8	42,8; 41,0	38,2
<b>C4</b>	25,6	37,0	41,0; 37,4	35,1
<b>C5</b>	31,6	38,4 ; 33,7(31.05)	38,0; 37,8; 34,3; 34,0	36,8; 34,8 (35.80)
<b>C6</b>	22,0	29,7; 28.8 (29.25)	30,0; 29,7; 29,5; 28,8	29,0; 28,9 (29,95)
<b>C7</b>	27,8	29,2	29,1; 283	29,8
<b>C8</b>	57,6	47,3	52,1; 51,6	51,9

Kompleksi **K2a**, **K3a**, **K2b**, **K3b** i **K4b** predstavljaju hlorido (a) i jodido (b) platina(II) komplekse pretpostavljene kvadratno-planarne geometrije u kojima su ligandi bidentatno vezani za metalni jon. U  $^1\text{H}$  NMR spektru ovih kompleksa uočavamo male promene ka višim hemijskim pomeranjima za protone sa **C2**, **C8** i  $-\text{CH}_2-\text{OOC}-$  ugljenikovih atoma. Za prethodno pomenute ugljenikove atome uočene su male promene i u  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima u smislu pomeranja ka višim vrednostima hemijskih pomeranja (Tabela 8).

Tabela 8. Vrednosti  $^{13}\text{C}$  NMR pomeranja liganada **L1-L7** i njima odgovarajućih kompleksa.

	Cy grupa, protoni alkil grupa, -CH <sub>2</sub> -Cy	RCH <sub>2</sub> -OOC-	-OOC-CH(Cy)-NH-	-NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH-	-NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> kod kompleksa NH
<b>L1</b>	0,8 – 2,25 ppm	3,5 -3,70 ppm	4,20 ppm	4,10 – 4,25 ppm	9,78 ppm
<b>L2</b>					
<b>L3</b>					
<b>L4</b>					
<b>L5</b>					
<b>L6</b>					
<b>L7</b>					
<b>K1</b>	0,90 – 1,70 ppm	3,50 – 3,70 ppm	4,16 – 4,22 ppm	4,20 ppm	9,50 ppm
<b>K1'</b>					
<b>K2</b>					
<b>K3</b>					
<b>K4</b>					
<b>K5</b>					
<b>K2a</b>	0,80 – 2,20	3,70 ppm	4,00 - 4,40 ppm	4,00 – 4,40 ppm	6,50 – 7,50 ppm
<b>K3a</b>		2,70 ppm	ppm	ppm	
<b>K2b</b>		3,70 ppm	4,00 – 4,80 ppm	2,60 – 3,00 ppm	
<b>K3b</b>		2,60 -3,00 ppm	ppm	ppm	
<b>K4b</b>					

#### 4.2.3. Masena spektrometrija

Maseni spektri liganada sadrže  $[\text{M}-2\text{HCl}+\text{H}]^+$  jon. Osnovni jon u svakom od spektara liganada potiče od fragmentacije liganada i javlja se na vrednosti 157. Maseni spektri kompleksa platine(IV) snimani su u pozitivnom i negativnom modu. Prilikom snimanja u pozitivnom modu dobijeni spektri pokazuju prisustvo  $[\text{M}-\text{PtCl}_4+\text{H}]^+$  jona, što nije

dovoljan dokaz da se ligand zaista koordinovao. Zbog toga su kompleksi platine(IV) snimljeni i u negativnom modu. U ovim spektrima jasno se vidi  $[M-H]^-$  jon, kao i odgovarajući fragmentacioni joni. Osnovni jon se u svim kompleksima javlja na vrednosti 197. Maseni spektri kompleksa platine(II) snimani su u pozitivnom modu i uočeni su odgovarajući molekularni joni  $[M+NH_4]^+$ , slabog intenziteta, kao i osnovni jon na 133 (Tabele 9, 10, 11, 12).

Tabela 9. Fragmentacioni joni u masenim spektrima liganda **L1** – **L7**.

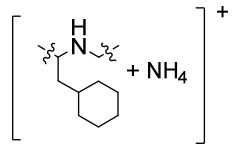
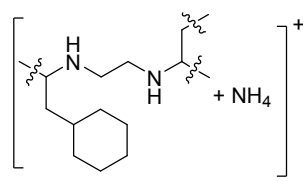
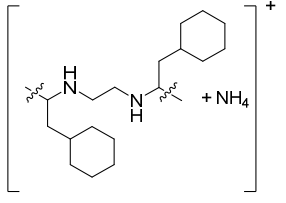
Ligand	Osnovni jon $m/z = 157$	Fragmentacioni jon $m/z = 214$	Fragmentacioni jon $m/z = 292$	Molekularni jon $[M-2HCl+H]^+$
L1				367,02
L2				397,31
L3				425,00
L4				453,27
L5				481,41
L6				481,40
L7				509,43

Tabela 10. Fragmentacioni joni u masenim spektrima kompleksa **K1** – **K5**, pozitivan mod snimanja.

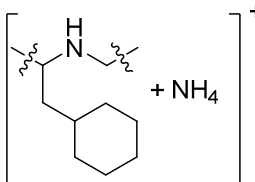
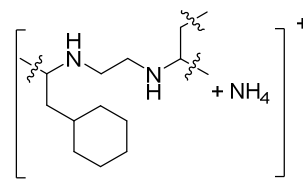
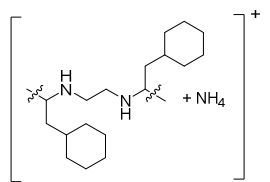
Kompleks	Osnovni jon $m/z = 157$	Fragmentacioni jon $m/z = 214$	Fragmentacioni jon $m/z = 292$	Molekularni jon $[M-PtCl_4+H]^+$
K1				367,02
K2				397,31
K3				425,00
K4				453,27
K5				481,41



Tabela 11. Fragmentacioni joni u masenim spektrima kompleksa **K1** – **K5**, negativan mod snimanja.

Kompleks	K1	K2	K3	K4	K5
Osnovni jon m/z = 212					
Fragmentacioni jon m/z = 197					
Fragmentacioni jon m/z = 335	[PtCl <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup>				
Molekulski jon [M-H] <sup>-</sup>	634	729,14	759,17	785,19	813,23
[M+HCOO] <sup>-</sup>	-	-	-	-	858,20

Tabela 12. Fragmentacioni joni u masenim spektrima kompleksa **K2a** – **K4b**.

Kompleks	Osnovni jon m/z = 133	Fragmentacioni jon m/z = 214	Molekulski jon [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
K2a			679,23
K2b			863,11
K3a			707,27
K3b			891,14
K4b			919,17

### 4.3. Molekulsko-mehanički i DFT proračuni

Koristeći metode molekulske-mehaničkog modelovanja računa se energetska minimuma za svaki od moguća tri geometrijska izomera kompleksa **K1** i **K1'**. Rezultati ranijih molekulske-mehaničkih proračuna za slične kristalne strukture pokazali su da je u slučaju koordinacije edda tipa liganda kao tetradentatnog liganda najstabilniji *sym-cis* geometrijski izomer [69]. DFT i molekulske-mehanički proračuni pokazali su da je u slučaju oktaedarskih kompleksa **K1** i **K1'**, najstabilniji izomer *sym-cis*. Podaci, prikazani u Tabeli 13 pokazuju da je redosled stabilnosti izomera: *sym-cis* > *uns-cis* > *trans* [17].

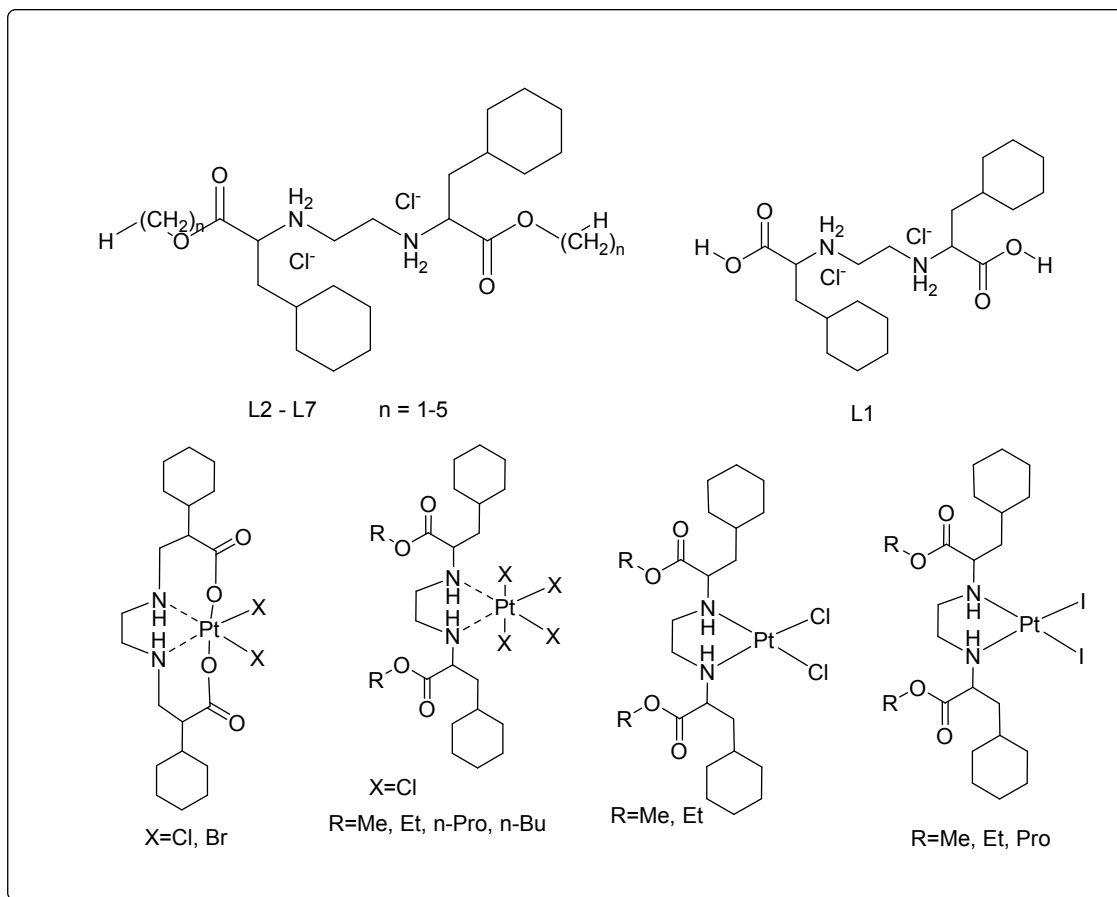
Tabela 13. Relativne energije ( $\Delta E$ ) i pojedine enrgije svakog geometrijskog izomera kompleksa **K1** i **K1'** čije su energije optimizovane.

Izomer	MM							DFT
Izomer	$\Delta E$	$E_{\text{tot}}$	$E_{\text{bond}}$	$E_{\text{angle}}$	$E_{\text{torsion}}$	$E_{\text{vdw}}$	$E_c$	$\Delta E$
<b>K1</b>								
<i>sym-cis</i>	0,00	6,24	3,07	15,90	0,79	2,40	-15,92	0,00
<i>uns-cis</i>	6,18	12,42	4,63	19,49	1,10	3,61	-16,41	1,39
<i>trans</i>	21,55	27,79	7,83	30,76	1,08	3,86	-15,74	15,61
<b>K1'</b>								
<i>sym-cis</i>	0,00	12,03	3,07	15,86	0,78	2,72	-10,42	0,00
<i>uns-cis</i>	7,20	19,23	4,63	20,01	1,14	4,27	-10,82	7,28
<i>trans</i>	23,74	35,77	7,85	32,00	1,15	5,03	-10,26	17,77

### 4.4. Pretpostavljene strukture sintetisanih jedinjenja

Na osnovu dobijenih rezultata upotrebljenih spektroskopskih metoda, MM i DFT proračuna i elementalne analize, potvrđene su molekulske formule, strukture i geometrija sintetisanih jedinjenja. Svi ligandi dobijeni su obliku dihidrohlorida. Svi kompleksi platine(IV) su oktaedarske strukture, dok je za komplekse **K1** i **K1'** proračunima predviđena i favorizovana geometrija – *sym-cis* geometrija. Svi sintetisani

kompleksi platine(II) i platine(IV) su neutralni, a pretpostavljena molekulska formula i masa potvrđene su elementalnom analizom i masenom spektrometrijom. Podaci dobijeni NMR i infracrvenom spektroskopijom potvrđuju pretpostavljenu koordinaciju liganada, **L1** – *ONNO*, odnosno **L2** - **L5** – *N,N* koordinacija (Slika 23).



Slika 23. Strukture sintetisanih liganada i kompleksa.

#### 4.5. *In vitro* antitumorska aktivnost dihalogenido(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato)platina(IV) i tetrahalogenido(*O,O'*-dialkil-((*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanato) platina(IV) kompleksa

Ispitivano je *in vitro* dejstvo sintetisanih kompleksa platine(IV) na četiri ćelijske linije: humanom (U251) i gliomu pacova (C6), ćelijama fibrosarkoma miša L929 i melanoma miša B16. Dobijeni rezultati su upoređeni sa dejstvom odgovarajućih liganada, polaznog kompleksa – kalijum-heksahloridoplatinata(IV) i tipičnog citotoksičnog leka –

cisplatine, na ovaj set ćelijskih linija. Kompleksi **K2** – **K5**, pokazali su bolju antitumorsku aktivnost od polaznog kompleksa platine, kao i od odgovarajućih liganada. Posebno nisku aktivnost pokazali su (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanska kiselina i njeni odgovarajući halogenido kompleksi platine(IV). Ovakvi rezultati se slažu sa literaturnim podacima o brzini redukciji kompleksa platine(IV) u ćelijama. Naime, izbor aksijalnih liganada u oktaedarskom Pt(IV) kompleksu utiče na lipofilnost i redoks svojstva ovih kompleksa. Pogodnim izborom ovih liganada, Pt(IV) kompleks se ponaša kao prolek, stiže nepromenjen do ciljne ćelije, kao lipofilan prolazi ćelijsku membranu i redukuje se u hipoksičnoj sredini tumorskog tkiva do Pt(II) aktivne ćelijske vrste. Dosadašnja ispitivanja pokazala su da se platina(IV) kompleksi sa hlorido aksijalnim ligandima brže redukuju nego odgovarajući karboksilato kompleksi [34]. Rezultati citotoksičnosti kompleksa **K1** i **K1'** slažu se sa ovim literaturnim podacima, s obzirom da bi se ovi kompleksi mogli svrstati u grupu kompleksa platine(IV) sa karboksilato aksijalnim ligandima.

Rezultati antitumorske aktivnosti ukazuju i na to da povećanje dužine alkil niza u estarskom delu liganda nema uticaja na poboljšanje ove aktivnosti. Naime, baš suprotno, povećanjem niza (od metil do *n*-butil estra) aktivnost ovih kompleksa se smanjivala. Pretpostavljeno je i da ovakvi rezultati imaju veze sa količinom platine koja je akumulirana u ćeliji. Rezultati optičke emisijne spektrometrije ukazali su da je najviši procenat platine u ćelijskom lizatu upravo bio kod najaktivnijeg kompleksa **K3** (Tabela 14) [17].

Tabela 14. *In vitro* citotoksičnost kompleksa Pt(IV) i liganada **L1-L5**, izražena kao  $IC_{50}$  vrednost.

Jedinjenje	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )			
	U251	C6	L929	B16
<b>cisplatina</b>	11,5 $\pm$ 3,3	10,9 $\pm$ 3,1	11,2 $\pm$ 3,4	67,0 $\pm$ 4,9
<b>K1</b>	>100	>100	>100	>100
<b>K2</b>	2,5 $\pm$ 1,1	2,9 $\pm$ 1,0	4,5 $\pm$ 0,7	4,5 $\pm$ 0,3
<b>K3</b>	1,9 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 1,1	3,4 $\pm$ 0,1
<b>K4</b>	2,2 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 0,4
<b>K5</b>	7,4 $\pm$ 1,7	6,8 $\pm$ 1,9	6,7 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 1,7
<b>L1·2HCl</b>	>100	>100	>100	>100
<b>L2·2HCl</b>	29,4 $\pm$ 9,1	28,4 $\pm$ 4,0	23,7 $\pm$ 1,8	36,9 $\pm$ 5,0
<b>L3·2HCl</b>	11,6 $\pm$ 2,8	11,5 $\pm$ 1,8	11,0 $\pm$ 1,2	15,6 $\pm$ 4,1
<b>L4·2HCl</b>	34,9 $\pm$ 10,8	33,6 $\pm$ 5,5	28,5 $\pm$ 1,4	46,4 $\pm$ 11,2
<b>L5·2HCl</b>	24,7 $\pm$ 3,6	23,7 $\pm$ 1,7	28,7 $\pm$ 2,7	63,4 $\pm$ 19,0
<b>K<sub>2</sub>[PtCl]<sub>6</sub></b>	>100	>100	>100	>100

Ispitivanjem citotoksičnosti **L6** i **L7** liganada na ćelijskim linijama: humanog melanoma A375, karcinoma debelog creva HCT116, humanog karcinoma pluća A549, adenokarcinoma dojke MCF7 i normalne plućne fibroblastne ćelije MRC5 pokazano je da je njihova citotoksična aktivnost značajno niža od cisplatine ( $IC_{50} > 120 \mu M$ ). Ovi rezultati pokazuju da ova dva liganda nisu interesantna za dalja biološka ispitivanja. Nije bilo moguće sintetisati komplekse platine(II) i platine(IV) ali su paralelno sintetisani kompleksi rutenijuma(II) sa ovim ligandima. Ovi kompleksi su pokazali značajnu biološku aktivnost [18].

*In vitro* citotoksičnost kompleksa platine(II) (**K2a**, **K3a**, **K2b**, **K3b**, **K4b**) ispitivana je prema ćelijskim linijama: humanih ćelija tumora pluća H460, humanog glioma U251, humanih promijelotskih leukemičnih ćelija HL60, humane limfoblastoidne leukemične ćelije REH. Analiza rezultata testa aktivnosti kisele fosfataze nakon 24 h tretmana tumorskih ćelija različitim koncentracijama liganada (**L2**, **L3**, **L4**) i odgovarajućim Pt(II) kompleksima hlorido i jodido tipa, ukazala je da svi oni, osim **L2**, imaju

antitumorsku aktivnost. Ligand **L2**, naime, nije uspeo da smanji broj živih H460 ćelija ni primenjen u 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji. Literaturni podaci pokazuju da neki dijodido kompleksi platine(II) pokazuju bolju citotoksičnost od svojih hlorido analoga [61]. Tako se i u ovom radu pokazalo da su sintetisani jodido kompleksi platine(II) **K2b** i **K3b** aktivniji od njihovih hlorido analoga. Svi analizirani Pt(II) kompleksi su pokazali antitumorsku efikasnost poredivu sa cisplatinom nakon dvadeset četvoročasovnog tretmana. Novi **K3b** kompleks se izdvojio kao najefikasniji sa  $\text{IC}_{50}$  vrednošću  $\approx 3 \mu\text{M}$  na svim ispitivanim humanim tumorskim ćelijskim linijama. Pored toga, **K3** kompleks je imao  $\text{IC}_{50}$  vrednost  $17,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$  na HL-60 ćelijskoj liniji humane promijelocitne leukemije, što ukazuje na 4 puta manju efikasnost u odnosu na korespondentni **K3a** kompleks. Dobijeni rezultati su izdvojili Pt(II) komplekse sa **L3** ligandom kao najefikasnije u antitumorskom delovanju, dok se HL-60 ćelijska linija pokazala kao najosetljivija na njihovo dejstvo (Tabela 15).

Rezultati LDH- testa, su pokazali da 6 h tretmana sa 6  $\mu\text{M}$  koncentracijom **K3a** kompleksa i 3  $\mu\text{M}$  koncentracijom **K3b** kompleksa nisu uzrokovali redukciju broja živih HL-60 ćelija. Pored toga, produženje tretmana na 24 h, dovelo je do smanjenja broja živih HL-60 ćelija za  $20,04 \pm 2,2 \%$  (hlorido kompleks) i  $25,26 \pm 2,4 \%$  (jodido kompleks) sugerišući da nekroza nije dominantan tip ćelijske smrti u tretmanu sa ovim novim cisplatinskim Pt(II) analogima.

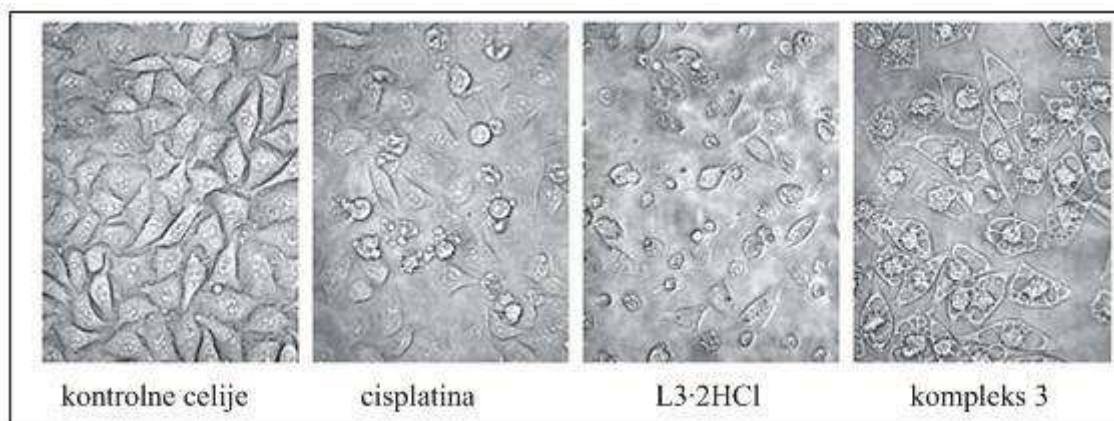
Tabela 15. *In vitro* citotoksičnost kompleksa platine(II) i liganada **L2** - **L4**, izražena kao  $\text{IC}_{50}$  vrednost.

	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) 24 h			
	H460	U251	HL60	REH
<b>L2</b>	>100	$40,2 \pm 4,0$	$19,8 \pm 1,3$	$73,6 \pm 2,0$
<b>L3</b>	$66,3 \pm 2,7$	$26,6 \pm 4,0$	$10,7 \pm 5,5$	$44,4 \pm 10,0$
<b>L4</b>	$49,7 \pm 6,4$	$41,8 \pm 8,2$	$80,8 \pm 2,8$	$92,7 \pm 0,7$
<b>K2a</b>	$30,2 \pm 3,2$	$6,9 \pm 0,6$	$6,7 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,2$
<b>K3a</b>	$16,4 \pm 1,1$	$4,1 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,7$
<b>K2b</b>	$6,9 \pm 0,5$	$4,5 \pm 1,3$	$3,6 \pm 0,2$	$6,5 \pm 0,3$
<b>K3b</b>	$3,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,0$	$2,7 \pm 0,3$
<b>K4b</b>	$8,6 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,2$
<b>cisplatina</b>	$10,4 \pm 1,3$	$20,2 \pm 2,9$	$17,5 \pm 2,4$	$17,1 \pm 1,6$

#### 4.5.1. Pretpostavljeni mehanizam delovanja kompleksa platine(IV) u ćeliji

Za dalja ispitivanja mehanizma delovanja kompleksa u ćeliji, odabrana je ćelijska linija U251, humanog glioma, i kompleks **K3**, najaktivniji u seriji sintetisanih Pt(IV) kompleksa ( $IC_{50}$  vrednost kompleksa **K3** =  $1,9 \pm 0,8$  a cisplatina =  $11,5 \pm 3,3$   $\mu$ M).

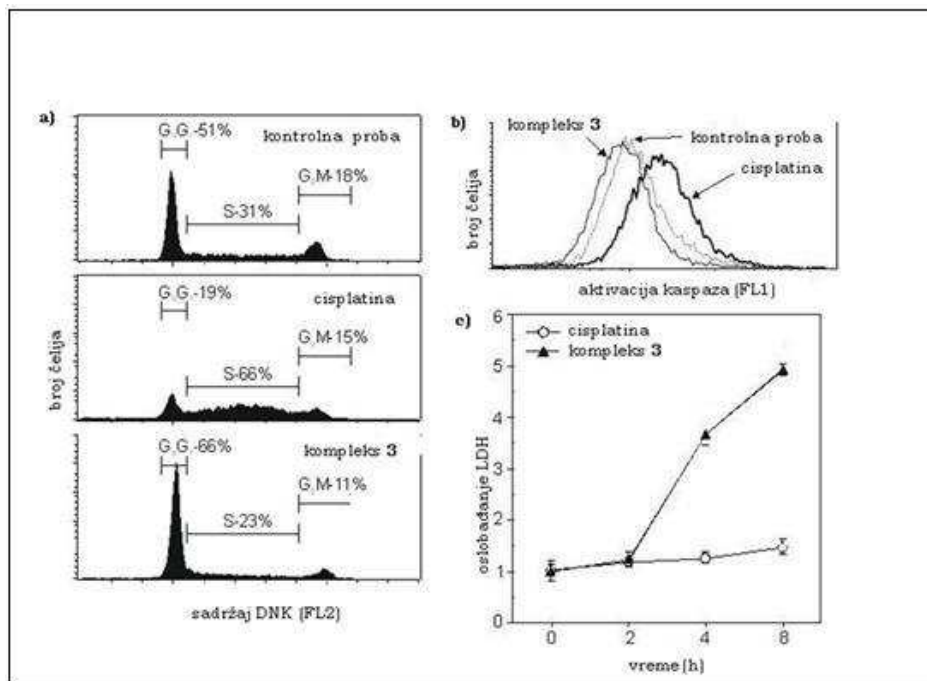
Morfološke promene na ispitivanim ćelijama praćene su invertnim fazno-kontrastnim mikroskopom. Uočene su značajno različite promene na ćelijama u odnosu na dejstvo cisplatine ili odgovarajućeg liganda. Dok su ćelije tretirane ligandom postale manje i okruglastije od uobičajenih, tretiranje kompleksom **K3**, dovelo je do povećanja veličine ćelije, citoplazmatične vakuole su se uvećale, izdužile i ispunile čitav unutarćelijski prostor. Utvrđeno je i da čitava serija sintetisanih kompleksa Pt(IV) ima isto dejstvo na ove ćelije, a definitivno potpuno različito u odnosu na cisplatinu (Slika 24).



Slika 24. Slika morfoloških promena u tumorskim ćelijama pod uticajem cisplatine, **L3-2HCl** i kompleksa **K3**. U251 ćelije su inkubirane sa cisplatinom (20  $\mu$ M), **L3-2HCl** (20  $\mu$ M) i kompleksom **K3** (5  $\mu$ M) 24 sata a morfologija ćelija ispitivana je invertnim fazno-kontrastnim mikroskopom.

S obzirom na činjenicu da cisplatina ubija ćelije tumora putem apoptoze, a da je prikazana morfologija ćelija tretiranih kompleksom **K3** značajno različita od tretiranih cisplatinom, ispitivani su i drugi parametri koji bi ukazali na mogući mehanizam dejstva ovog kompleksa. Upoređeno je dejstvo cisplatine i kompleksa **K3** na ćelijski ciklus i apoptozu posredovanu aktivacijom cistein proteaza (kaspaza) koje su odgovorne za ćelijsku smrt apoptozom. Ćelije U251 su podvrgnute dejstvu cisplatine i kompleksa **K3**, tokom 18 časova. Utvrđeno je da kompleks **K3** zaustavlja ćelijski ciklus u fazi  $G_0/G_1$  i ne dovodi do povećanja sveukupne aktivnosti kaspaza u ćelijama. Dejstvom cisplatine na iste ćelije ćelijski ciklus je zaustavljen u S fazi, a aktivnost kaspaza se povećava.

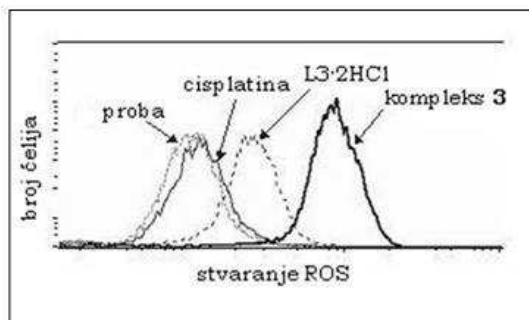
Određivanjem oslobađanja unutarćelijske laktat dehidrogenaze utvrđeno je da pod dejstvom kompleksa **K3** već posle 4 sata dolazi do oštećenja ćelijske membrane ispitivanih ćelija, što je karakteristično za nekrozu (Slika 25).



Slika 25. Efekat cisplatine i kompleksa **K3** na ćelijski ciklus i apoptoza tumorskih ćelija. (a,b) U 251 ćelije inkubirane su cisplatinom (20  $\mu$ M) i kompleksom **K3** (5  $\mu$ M) 18 sati i nakon toga: a) ćelijski ciklus, b) aktivacija kaspaza posmatrani su protočnom citometrijom c) U 251 ćelije tretirane su cisplatinom (20  $\mu$ M) i kompleksom **K3** (5  $\mu$ M) i praćena je količina oslobođenog LDH.

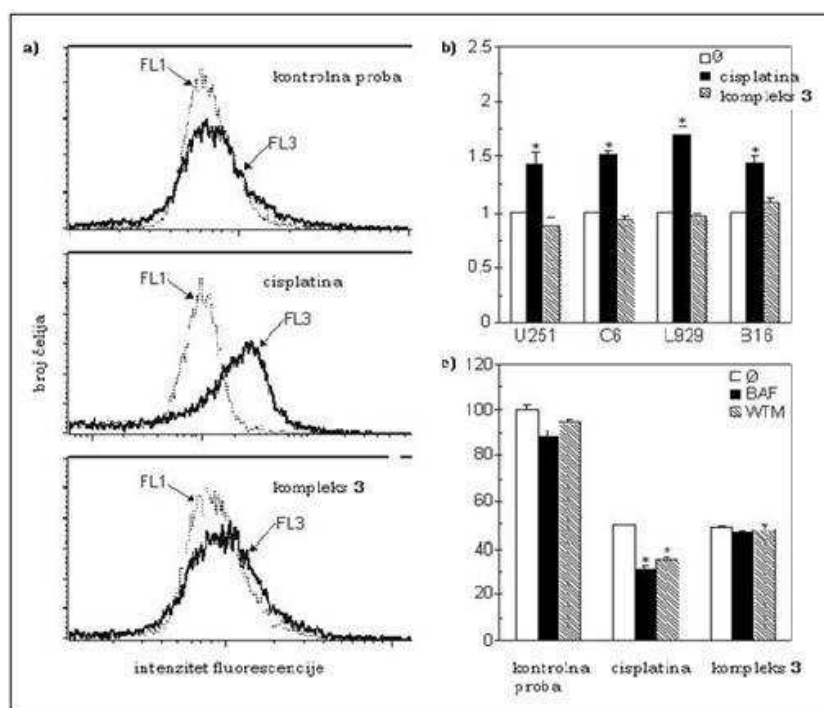
Ispitivan je i uticaj kompleksa na indukovanje oksidativnog stresa u ćeliji, tj. povećanje količine reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u njoj, čime se ubrzava ćelijska smrt. Rezultati eksperimenata su pokazali da se pod dejstvom kompleksa **K3** stvara velika količina ROS što takođe doprinosi dobroj antitumorskoj aktivnosti ovog jedinjenja. Trend u aktivnostima ostalih kompleksa iz sintetisane serije pokazuje pozitivnu korelaciju sa njihovom mogućnošću da u ćeliji uzrokuju stvaranje ROS vrsta (**K2** = **K3** = **K4** > **K5** > **K1**). Takođe treba naglasiti da sam ligand **L3·2HCl** značajno povećava količinu ROS u ćeliji, te da je verovatno da u značajnoj meri utiče i na svojstva kompleksa u ovom smislu (Slika 26).





Slika 26. Uticaj oksidativnog stresa na ćelijsku smrt ćelija tretiranih kompleksom **K3** (20  $\mu$ M), cisplatinom (20  $\mu$ M), ili **L3·2HCl** (20  $\mu$ M) tokom 3 sata (unutarćelijska proizvodnja ROS tokom ovog tretmana).

Proces autofagije, odnosno samouništavanje unutarćelijskih proteina ili organela, može biti ili još jedan način ćelijske smrti ili može sprečiti dejstvo nekog agensa da izazove apoptozu ili nekrozu. Ispitivanjem zastupljenosti vezikula kiselog sadržaja, lizozoma i autofagolizozoma, protočnom citometrijom nakon bojenja akridin-narandžastom, utvrdili smo da cisplatina dovodi do indukcije autofagije, dok ispitivani kompleks **K3** nije aktivan u ovom smislu. Slični rezultati dobijeni su i za ostale komplekse iz ove serije, tj. svi imaju dobru antitumorsku aktivnost ali i ne izazivaju autofagiju (Slika 27).



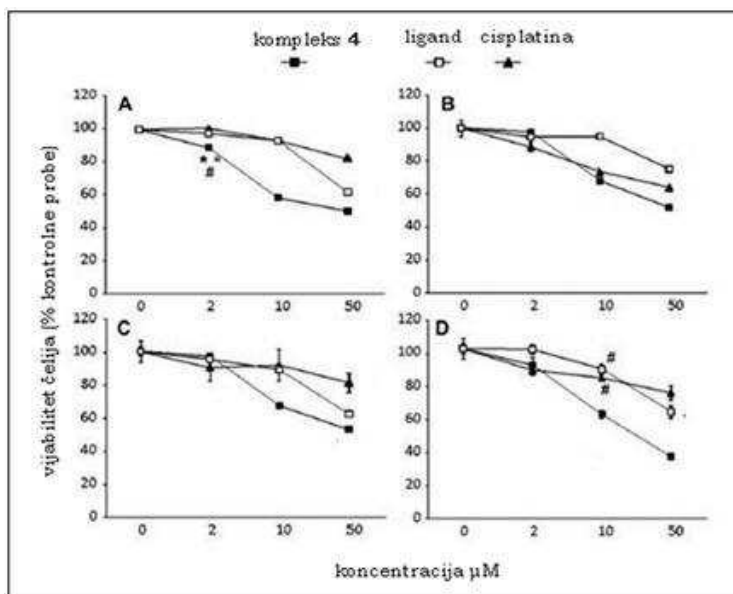
Slika 27. Prisustvo autofagije (porast FL3/FL1 odnosa) u ćelijskoj smrti prouzrokovanoj dejstvom cisplatinom (20  $\mu$ M) i kompleksa **K3** (5  $\mu$ M) tokom 18 sati na a) U251 ćelije, b) razne ćelijske linije c) Vijabilnost ćelija U251 nakon 24 h po MTT testu, kada su tretirane cisplatinom (20  $\mu$ M) i kompleksom **K3** (5  $\mu$ M), u odsustvu ili prisustvu inhibitora autofagije bafilomicina A1 (BAF; 100 nm) ili vortmanina (WTM; 100nm).

Kada se uzmu u obzir svi ovi rezultati, možemo zaključiti da sintetisana serija kompleksa platine(IV) sa estrima (*S,S*-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline, izaziva oksidativni stres i ćelijsku smrt sličnu nekrozi, ali ne i autofagiju niti porast aktivnosti kaspaza u ćeliji [17].

#### 4.5.2. Ispitivanje dejstva sintetisanih kompleksa platine(IV) na ćelije imunog sistema

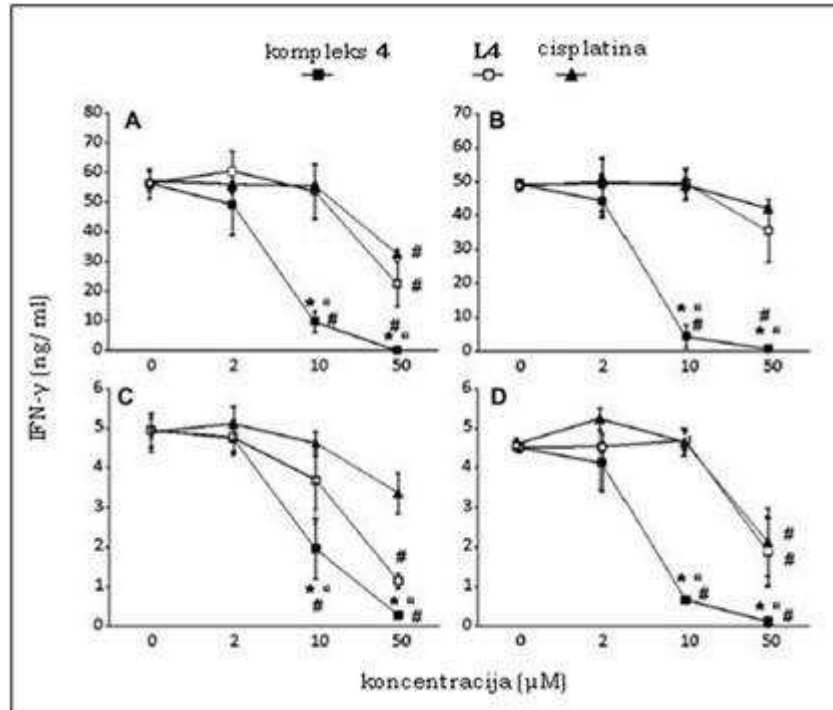
S obzirom da je mijelosupresija i leukopenija sporedni efekat cisplatine, ispitivali smo uticaj kompleksa **K4** i liganda **L4** na funkciju ćelija imunskog sistema (SPC – spleen periferal cells, i ćelije limfnog čvora LND – lymph node cells), kao i na proizvodnju imunomedijatora interferona (IFN)- $\gamma$  i interleukina (IL)-17, u prisustvu ovih kompleksa. Značajno je uporediti dejstvo ovih kompleksa kao antitumorskih agenasa i njihov uticaj na ćelije imunskog sistema, tj. ispitivano je da li ovi agensi u značajnijoj meri kompromituju funkciju ćelija imunskog sistema, što je inače čest neželjeni efekat primene antitumorskih agenasa. Kao predstavnik svih kompleksa uzet je kompleks **K4**. Ćelije imunskog sistema stimulisane su konkanavalinom A (Con A) i tretirane su tokom 24 sata, kompleksom **K4**, *n*-propil ligandom (**L4**) i cisplatinom. Dobijene vrednosti ukazuju na to da i ligand i kompleks imaju ograničen uticaj na izabrane ćelije, tj. ne dovode do njihove smrti u značajnoj meri.

Kako bi se odredio vijabilitet imunskih ćelija, ćelija slezine (SPC) i ćelija limfnog čvora (LND), izolovanih iz tkiva miševa C57BL/6 i Dark Aguti pacova, stimulisane su konkanavalinom A (ConA) i različitim koncentracijama kompleksa **K4**, tokom 24 sata. Paralelno sa ovim eksperimentom, ove ćelije su tretirane pod istim uslovima i ligandom **L4**, kako bi se eventualno utvrdilo učešće baš tog liganda u aktivnosti kompleksa **K4**. Naravno, isti eksperiment je postavljen i za cisplatinu, kako bi se uporedili efekti ova dva platinska kompleksa. Vijabiliteti SPC i LNC ćelija, određeni MTT testom bili su značajno smanjeni u koncentracijama kompleksa od 10 $\mu$ M i 50 $\mu$ M i liganda 50 $\mu$ M. Takođe je utvrđeno i da kompleks **K4** više snižava vijabilitet ovih ćelija od cisplatine. Vrednosti IC<sub>50</sub> za panel tumorskih ćelija, ranije prikazane [17], pokazuju još i da kompleks **K4** i njegov odgovarajući ligand imaju lošiji citotoksični efekat na na ćelije imunskog sistema, za razliku od veoma dobrog uticaja na ćelije tumora (Slika 28).

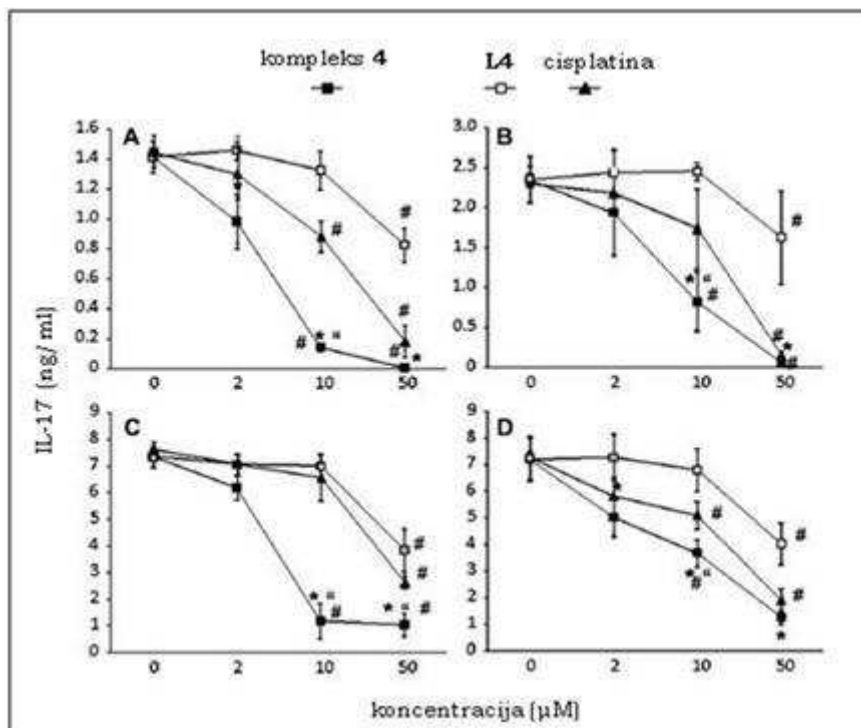


Slika 28. Uticaj kompleksa **K4** i liganda **L4** na vijabilitet LNC i SPC ćelija (A, B – SPC ćelija izolovane iz miševa C57BL/6; C, D – LNC ćelije izolovane iz Dark Aguti pacova).

Sledeći cilj bio je da se ispita uticaj kompleksa **K4** i liganda **L4**, na efektorske funkcije ćelija imunskog sistema. U ovom eksperimentu određivana je količina oslobođenih citokina IFN- $\gamma$  i IL-17 iz SPC i LNC ćelija stimulisanih konkanavalinom A i tretiranih različitim koncentracijama kompleksa **K4**, liganda **L4** i cisplatine tokom 24 sata. Utvrđeno je da kompleks **K4** efikasnije snižava sintezu ovih citokina od liganda i cisplatine. Zanimljivo je i da kompleks **K4** ima bolji efekat na IL-17 nego na IFN- $\gamma$  citokine. Ovi rezultati su pokazali i da kompleks **K4** jače inhibira mogućnost ovih imunskih ćelija da stvaraju pomenute citokine nego što utiče na njihov vijabilitet (Slika 29, 30).



Slika 29. Poređenje uticaja kompleksa **K4**, liganda **L4** i cisplatine na oslobađanje IFN- $\gamma$  citokina iz LNC i SPC.



Slika 30. Poređenje uticaja kompleksa **K4**, liganda **L4** i cisplatine na oslobađanje IL-17 citokina iz LNC i SPC.

Dakle, pokazano je da kompleks **K4**, u dozama u kojima ima snažno dejstvo na tumorske ćelije, ima znatno slabiji efekat na ćelije imunskog sistema. Međutim, pokazano je takođe da ovaj kompleks inhibitorno deluje na sintezu IFN- $\gamma$  i IL-17.

S obzirom da ova dva agensa nisu pokazala značajnu aktivnost prema odabranim ćelijama imunskog sistema, u koncentracijama u kojima ubijaju tumorske ćelije, može se pretpostaviti da pri primenjenim koncentracijama ovi agensi ne bi u značajnijoj meri kompromitovali funkciju ćelija imunskog sistema, što je inače čest neželjeni efekat primene antitumorskih agenasa.

## 5. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je sinteza (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanske kiseline (**L1**), njenih alkil estara (**L2-L7**) i kompleksa platine(IV) i platine(II) u kojima su ligandi sintetisana kiselina i njeni estri. Sintetisano je šest kompleksa platine(IV) (**K1'**, **K1-K5**) i pet kompleksa platine(II) (**K2a**, **K3a**, **K2b**, **K3b**, **K4b**). Ligandi i kompleksi su okarakterisani standardnim spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom, NMR spektroskopijom ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC tehnikama) i masenom spektrometrijom. Molekulska-mehaničkim i DFT proračunima pretpostavljena je najstabilnija moguća geometrija kompleksa platine(IV). Na osnovu rezultata dobijenih ovim spektroskopskim metodama zaključeno je:

- ✓ Elementalni sastav sintetisanih jedinjenja odgovara pretpostavljenim molekulskim formulama
- ✓ Signali u NMR spektrima nedvosmisleno potvrđuju pretpostavljenu strukturu liganda i kompleksa, što je dodatno potvrđeno asignacijom svih protona na osnovu vodonik-ugljenik korelacije u 2D NMR spektrima
- ✓ Molekulski i fragmentni joni u masenim spektrima sintetisanih jedinjenja dodatno potvrđuju njihovu strukturu. U slučaju platina(IV) kompleksa, zbog nemogućnosti detekcije molekulskog jona u masenom spektru snimljenom u uobičajenom pozitivnom modu, ovi spektri su snimljeni i u negativnom modu. Na taj način dobijeni su maseni spektri u kojima su detektovani molekulski joni i struktura ovih kompleksa potvrđena.
- ✓ Najintenzivnije trake u IC spektrima odgovaraju vibracijama karakterističnim za ovu klasu proučavanih jedinjenja.
- ✓ MM i DFT proračunima pokazano je da je favorizovana geometrija kompleksa **K1** i **K1'**, sym-cis geometrija. Ovi rezultati su u skladu sa vrednostima hemijskih pomeranja u NMR i infracrvenim spektrima.

Pretpostavljeno je da je uvođenjem cikloheksil grupe u strukturu liganada povećana lipofilnost u odnosu na analoge edda-tipa sintetisane ranijih godina. Ove strukturne promene su, najverovatnije, uzrok značajnije boljoj antitumorskoj aktivnosti liganada i kompleksa od njihovih analoga, do sada opisanih u literaturi.

Antitumorska *in vitro* ispitivanja pokazala su:

- ✓ Kompleksi **K3**, **K3a** i **K3b** i odgovarajući ligand **L3** značajno su aktivniji od cisplatine prema nekoliko ćelijskih linija, posebno na U251 ćelijskoj liniji.
- ✓ Ispitivanjem mogućeg mehanizma ćelijske smrti rezultati su pokazali da je mehanizam delovanja **K3** potpuno drugačiji od mehanizma kojim cisplatina ubija tumorske ćelije i da ne odgovara u potpunosti nijednom tipu ćelijske smrti, ali je najbliži nekrozi.
- ✓ Na izabranoj ćelijskoj liniji U251, upoređeno je dejstvo sintetisanih platina(IV) i platina(II) kompleksa (**K3** prema **K3a** i **K3b**). Zaključeno je da je kompleks platine(IV) manje aktivan od kompleksa platine(II), i da je kompleks **K3b** (jodido kompleks platine(II)) aktivniji od kompleksa **K3a** (hlorido kompleks platine(II)).
- ✓ Ispitivanjem dejstva kompleksa **K4**, na ćelije imunog sistema utvrđeno je da ovaj kompleks nema imunosupresivno dejstvo i da ne kompromituje funkciju ćelija imunskog sistema.

Najaktivnije jedinjenje među ligandima **L3**, *O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-amino-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid, čija je citotoksična aktivnost i neobičan mehanizam delovanja detaljno ispitan na Medicinskom fakultetu, danas se ispituje i u *in vivo* eksperimentima.

## 6. Literatura:

- [1] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature* **222** (1969) 385.
- [2] I. Kostova, *Recent Pat. Anti-Canc.* **1** (2006) 1.
- [3] I. Romero-Canelo, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* **52** (2013) 12276.
- [4] Y. Jung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* **107** (2007) 1387.
- [5] R.B. Weiss, M.C. Christian, *Drugs* **46** (1993) 360.
- [6] D. Lebwohl, R. Canetta, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 1522.
- [7] G.N. Kaluđerović, H. Schmidt, S. Schwieger, C. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Muller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* **361** (2008) 1395.
- [8] T.J. Sabo, S.R. Grgurić-Šipka, S. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met.* **32** (2002) 1661.
- [9] T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, D. Poleti, Lj. Karanović, A. Boccarelli, F. Cannito, G. Natile, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 1378.
- [10] T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, S.R. Grgurić-Šipka, F.W. Heinemann, S.R. Trifunović, *Inorg. Chem. Comm.* **7** (2004) 241.
- [11] B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žižak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z.D. Juranić, T.J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3452.
- [12] A. Savić, M. Dulović, J.M. Poljarević, S. Misirlić-Denčić, M. Jovanović, A. Bogdanović, V. Trajković, T.J. Sabo, S. Grgurić-Šipka, I. Marković, *ChemMedChem.* **6** (2011) 1884.
- [13] N. Pantelić, B.B. Zmejkovski, J. Trifunović-Macedoljan, A. Savić, D. Stanković, A. Damjanović, Z. Juranić, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **128** (2013) 146.



- [14] G.N. Kaluđerović, N. Pantelić, T. Eichhorn, M. Bette, C. Wagner, B.B. Zmejkovski, H. Schmidt, *Polyhedron* **80** (2014) 53.
- [15] B.B. Zmejkovski, A. Savić, J. Poljarević, S. Arandžević, S. Radulović, S. Grgurić-Šipka, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, *Polyhedron* **80** (2014) 106.
- [16] Lj.E. Mihajlović, A. Savić, J. Poljarević, I. Vučković, M. Mojić, M. Bulatović, D. Maksimović-Ivanić, S. Mijatović, G.N. Kaluđerović, S. Stošić-Grujičić, Đ. Miljković, S. Grgurić-Šipka, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **109** (2012) 40.
- [17] J.M. Lazić, Lj. Vučićević, S. Grgurić-Šipka, K. Janjetović, G.N. Kaluđerović, M. Misirlić, M. Gruden-Pavlović, D. Popadić, R. Paschke, V. Trajković, T.J. Sabo, *ChemMedChem* **5** (2010) 881.
- [18] M. Mojić, A. Savić, V.B. Arion, M. Bulatović, J.M. Poljarević, Đ. Miljković, T.J. Sabo, S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, S. Grgurić-Šipka, *J. Organomet. Chem.* **749** (2014) 142-149.
- [19] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* **7** (2007) 573.
- [20] R. A. Alderden, M. D. Hall, T. W. Hambley, *J. Chem. Educ.* **83** (2006) 728.
- [21] J.J. Wilson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* **114** (2014) 4470.
- [22] R.C. Todd, S.J. Lippard, *Metallomics* **1** (2009) 280.
- [23] R.C. Todd, S. Lippard, *J. Inorg. Biochem.* **104** (2010) 902.
- [24] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.* **39** (2010) 8113.
- [25] D. Gibson, *Dalton Trans.* (2009) 10681.
- [26] G. Daugaard, U. Abildgaard *Cancer Chemoth.. Pharm.*, **1** (1989) 25.
- [27] D. Scerenci, M.J. McKeage *J. Inorg. Biochem.*, **77** (1999) 105.
- [28] H.P. Varbanov, M.A. Jakupec, A. Roller, F. Jensen, M. Galanski, B. Keppler, *J. Med. Chem.*, **56** (2013) 330.

- [29] M.A. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, *Rev. Physiol. Bioch. P.* **146** (2003) 1.
- [30] B. Spingler, D.A. Whittington, S.J. Lippard, *Inorg. Chem.* **40** (2001) 5596.
- [31] A.P. Silverman, W. Bu, S.M. Cohen, S.J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 49743.
- [32] A.M. Di Francesco, A. Ruggiero, R. Riccardi, *Cell. Mol. Life Sci.* **59** (2002) 1914.
- [33] M.D. Hall, H.R. Mellor, R. Callaghan, T.W. Hambley, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 3403.
- [34] P. Gramatica, E. Papa, M. Luini, E. Monti, M.B. Garibaldi, M. Ravera, E. Gabano, L. Gaviglio, D. Osella, *J. Biol. Inorg. Chem.* **15** (2010) 1157.
- [35] M.R. Reithofer, A.K. Bytzek, S.M. Valiahdi, C.R. Kowol, M. Groessler, C.G. Hartinger, M.A. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 46.
- [36] M.R. Reithofer, S.M. Valiahdi, M.A. Jakupec, V.B. Arion, A. Egger, M. Galanski, B.K. Keppler, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 6692.
- [37] J.J. Wilson, S.J. Lippard, *Inorg. Chem.* **50** (2011) 3103.
- [38] H.Y. Zhang, Y.R. Liu, C. Ji, S.X. Dou, P. Xie, W. C. Wang, L. Y. Zhang, P.Y. Wang, *Plos One* **8** (2013) e71556.
- [39] M.J. Cleare, J.D. Hoeschele, *Platin. Met. Rev.* **17** (1973) 2.
- [40] E. Gabano, M. Ravera, D. Osella *Dalton Trans.* **43** (2014) 9813.
- [41] H. Choy, C. Park, M. Yao, *Clin. Cancer. Res.* **14** (2008) 1633.
- [42] G. Doshi, G. Sonpavde, C.N. Sternberg, *Expert Opin. Drug Met.* **8** (2012) 103.
- [43] A. Bhargava, U.N. Vaishampayan, *Expert Opin. Inv. Drugs* **18** (2009) 1787

- [44] E. Estrada, E. Uriarte, A. Montero, M. Teijeira, L. Santana, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 1975.
- [45] S. Chabarek Jr., A.E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* **74** (1952) 6228.
- [46] D.B. Haydock, T.P.C. Mulholland, *J. Chem. Soc. (C)*, (1971) 2389.
- [47] L.N. Schoenberg, D.W. Ckooke, C.F. Liu, *Inorg. Chem.* **7** (1968) 2386.
- [48] S. Misirlić-Denčić, Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2012.
- [49] S. Misirlić Denčić, J. Poljarević, U. Vilimanovich, A. Bogdanović, A.J. Isaković, T. Kravic Stević, M. Dulović, N. Zogović, A.M. Isaković, S. Grgurić-Šipka, V. Bumbaširević, T.J. Sabo, V. Trajković, I. Marković, *Chem. Res. Toxicol.* **25** (2012) 931.
- [50] C.F. Liu, *Inorg. Chem.* (1963) 680.
- [51] V.M. Đinović, V.V. Glodović, G.P. Vasić, V. Trajković, O. Klisurić, S. Stanković, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, *Polyhedron* **29** (2010) 1933.
- [52] V.M. Đinović, G.A. Bgdanović, S. Novaković, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **57** (2004) 535.
- [53] B.B. Krajčinović, G.N. Kaluđerović, D. Steinborn, H. Schmidt, C. Wagner, Ž. Žižak, Z.D. Juranić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 892.
- [54] G.N. Kaluđerović, H. Kommera, S. Schwieger, A. Paethanm, M. Kunze, H. Schmidt, R. Paschke, D. Steinborn, *Dalton Trans.* (2009) 10720
- [55] S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, J. Radović, Đ. Miljković, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, V. Trajković, *Cell. Mol. Life Sci.* **62** (2005) 1275.
- [56] G.N. Kaluđerović, Đ. Miljković, M. Momčilović, V.M. Đinović, M.M. Stojković, T.J. Sabo, V. Trajković, *Int. J. Canc.* **116** (2005) 479.

- [57] G.N. Kaluđerović, H.Schmidt, D. Steinborn, T.J. Sabo, *Inorganic Biochemistry*, Research progress, 1<sup>st</sup> Edn, Nova Science Publisher, Inc, New York, 2008, p 305.
- [58] G.N. Kaluđerović, V.M. Đinović, Z.D. Juranić, T.P. Stanojković, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 488.
- [59] G.N. Kaluđerović, S.A. Mijatović, B.B. Zmejkovski, M.Z. Bulatović, S. Gómez-Ruiz, M.K. Mojić, D. Steinborn, Ć.M. Miljković, H. Schmidt, S.D. Stošić-Grujičić, T.J. Sabo, D.D. Maksimović-Ivanić, *Metallomics* **4** (2012) 979.
- [60] M.J. Cleare, J.D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.* **2** (1973) 187.
- [61] L. Messori, L. Cubo, C. Gabbiani, A. Álvarez-Valdés, E. Michelucci, G. Pieraccini, C. Rís-Luci, L.G. León, J.M. Padorn, C. Navarro-Ranninger, A. Cassini, A.G. Quiroga, *Inorg. Chem.* **51** (2012) 1717.
- [62] A. Savić, L. Filipović, A. Arancelović, B. Dojčinović, S. Radulović, T.J. Sabo, S. Grgurić-Šipka, *Eur. J. Med. Chem.* **82** (2014) 372.
- [63] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Baehrecke, M.V. Blagosklunny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, *Cell Death Differ.* **16** (2009) 3.
- [64] P. Golstein, G. Kroemer, *Trends Biochem. Sci.* **32** (2006) 37.
- [65] <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/>
- [66] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al. *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> ed., Garland Science, New York, (2002).
- 67 G. Koellensperger, Z. Stefanka, K. Meelich, M. Galanski, B.K. Keppler, G. Stingeder, S. Hann, *J. Anal. At. Spectrom.* **23** (2008) 29.
- [68] S.R. Niketić, K. Rasmussen, *Lecture Notes in Chemistry*, Vol. 3, Springer, Berlin, (1977).

- [69] S. Grubišić, M. Gruden-Pavlović, D.D. Radanović, M. Perić, S.R. Niketić, *J. Mol. Struct.* **919** (2009) 54.
- [70] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, C. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.W.M. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [71] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648.
- [72] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B*, **37** (1988) 785.
- [73] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.* **58** (1980) 1200.
- [74] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **98** (1994) 11623.
- [75] T.H. Dunning Jr., P. J. Hay, *Modern Theoretical Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., Vol. 3, Plenum, New York, (1976), pp. 1.
- [76] D. Andrae, U. Häußermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuß, *Theor. Chem. Acc.* **77** (1990) 123.
- [77] T.T. Yang, P. Sinai, S.R. Kain, *Anal. Biochem.* **241** (1996) 103.
- [78] Đ. Miljković, J.M. Poljarević, F. Petković, J. Blaževski, M. Momčilović, I. Nikolić, T. Saksida, S. Stošić-Grujičić, S. Grgurić-Šipka, T.J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* **47** (2012) 194.

- [79] K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and Coordination Compounds*, 4<sup>th</sup> ed., Wiley-Interscience, New York (1986).
- [80] D.J. Radanović, B.V. Prelesnik, D.D. Radanović, Z.D. Matović, B.E. Douglas, *Inorg. Chim. Acta* **262** (1998) 203.
- [81] D.J. Radanović, V.Č. Matović, Z.D. Matović, L.P. Battaglia, G. Ponticelli *Inorg. Chim. Acta*. **237** (1995) 151.
- [81] J.M. Poljarević, S. Grgurić-Šipka, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **64** (2011) 1016.
- [82] J.L. Sudmeier, G. Occupati, *Inorg. Chem.* **7** (1968) 2524.
- [83] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, *Inorg. Chem.* **7** (1968) 2386.
- [84] H. Yoshida, K. Takeda, J. Okamura, A. Ehara, H. Matsuura, *J. Phys. Chem. A* **106** (2002) 3580.

## 7. Prilog

**Slika P1.**  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L1**, sniman u DMSO-u

**Slika P2.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L1**, sniman u DMSO-u

**Slika P3.** IC spektar liganda **L1**

**Slika P4.** Maseni spektar liganda **L1**

**Slika P5.**  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L2**, sniman u DMSO-u

**Slika P6.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L2**, sniman u DMSO-u

**Slika P7.** IC spektar liganda **L2**

**Slika P8.** Maseni spektar liganda **L2**

**Slika P9.**  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L3**, sniman u DMSO-u

**Slika P10.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L3**, sniman u DMSO-u

**Slika P11.** IC spektar liganda **L3**.

**Slika P12.** Maseni spektar liganda **L3**.

**Slika P13.**  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L4**, sniman u DMSO-u.

**Slika P14.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L4**, sniman u DMSO-u.

**Slika P15.** IC spektar liganda **L4**.

**Slika P16.** Maseni spektar liganda **L4**.

**Slika P17.**  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L5**, sniman u DMSO-u.

**Slika P18.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L5**, sniman u DMSO-u.

**Slika P19.** IC spektar liganda **L5**.

**Slika P20.** Maseni spektar liganda **L5**.

**Slika P21.**  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L6**, sniman u TFA.

**Slika P22.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L6**, sniman u TFA.

**Slika P23.** HSQC NMR spektar liganda **L6**, sniman u TFA.

**Slika P24.** IC spektar liganda **L6**.

- Slika P25.** Maseni spektar liganda **L6**.
- Slika P27.**  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L7**, sniman u TFA.
- Slika P28.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L7**, sniman u TFA.
- Slika P29.** HSQC NMR spektar liganda **L6**, sniman u TFA.
- Slika P30.** IC spektar liganda **L7**.
- Slika P31.** Maseni spektar liganda **L7**.
- Slika P32.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u DMSO-u.
- Slika P33.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u DMSO-u.
- Slika P34.** IC spektar kompleksa **K1**.
- Slika P35.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K1'**, sniman u DMSO-u.
- Slika P36.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K1'**, sniman u DMSO-u.
- Slika P37.** IC spektar kompleksa **K1'**.
- Slika P38.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u DMSO-u.
- Slika P39.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u DMSO-u.
- Slika P40.** IC spektar kompleksa **K2**.
- Slika P41.** Maseni spektar kompleksa **K2**, sniman u pozitivnom modu.
- Slika P42.** Maseni spektar kompleksa **K2**, sniman u negativnom modu.
- Slika P43.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u DMSO-u.
- Slika P44.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u DMSO-u.
- Slika P45.** IC spektar kompleksa **K3**.
- Slika P46.** Maseni spektar kompleksa **K3**, sniman u pozitivnom modu.
- Slika P47.** Maseni spektar kompleksa **K3**, sniman u negativnom modu.
- Slika P48.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO-u.
- Slika P49.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO-u.
- Slika P50.** IC spektar kompleksa **K4**.
- Slika P51.** Maseni spektar kompleksa **K4**, sniman u pozitivnom modu.



**Slika P52.** Maseni spektar kompleksa **K4**, sniman u negativnom modu.

**Slika P53.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO-u.

**Slika P54.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO-u.

**Slika P55.** IC spektar kompleksa **K5**.

**Slika P56.** Maseni spektar kompleksa **K5**, sniman u pozitivnom modu.

**Slika P57.** Maseni spektar kompleksa **K5**, sniman u negativnom modu.

**Slika P58.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K2a**, sniman u DMSO-u.

**Slika P59.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K2a**, sniman u DMSO-u.

**Slika P60.** HSQC NMR spektar kompleksa **K2a**, sniman u DMSO-u.

**Slika P61.** IC spektar kompleksa **K2a**.

**Slika P62.** Maseni spektar kompleksa **K2a**.

**Slika P63.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K3a**, sniman u DMSO-u.

**Slika P64.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K3a**, sniman u DMSO-u.

**Slika P65.** HSQC NMR spektar kompleksa **K3a**, sniman u DMSO-u.

**Slika P66.** IC spektar kompleksa **K3a**.

**Slika P67.** Maseni spektar kompleksa **K3a**.

**Slika P68.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K2b**, sniman u DMSO-u.

**Slika P69.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K2b**, sniman u DMSO-u.

**Slika P70.** HSQC NMR spektar kompleksa **K2b**, sniman u DMSO-u.

**Slika P71.** IC spektar kompleksa **K2b**.

**Slika P72.** Maseni spektar kompleksa **K2b**.

**Slika P73.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K3b**, sniman u DMSO-u.

**Slika P74.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K3b**, sniman u DMSO-u.

**Slika P75.** HSQC NMR spektar kompleksa **K3b**, sniman u DMSO-u.

**Slika P76.** IC spektar kompleksa **K3b**.

**Slika P77.** Maseni spektar kompleksa **K3b**.

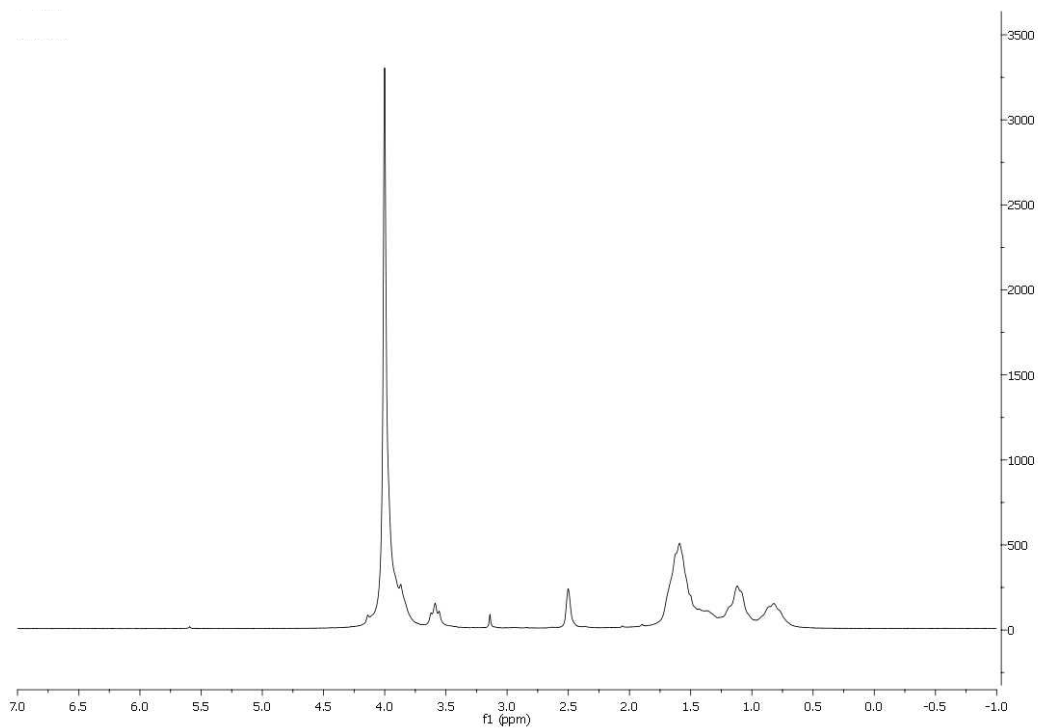
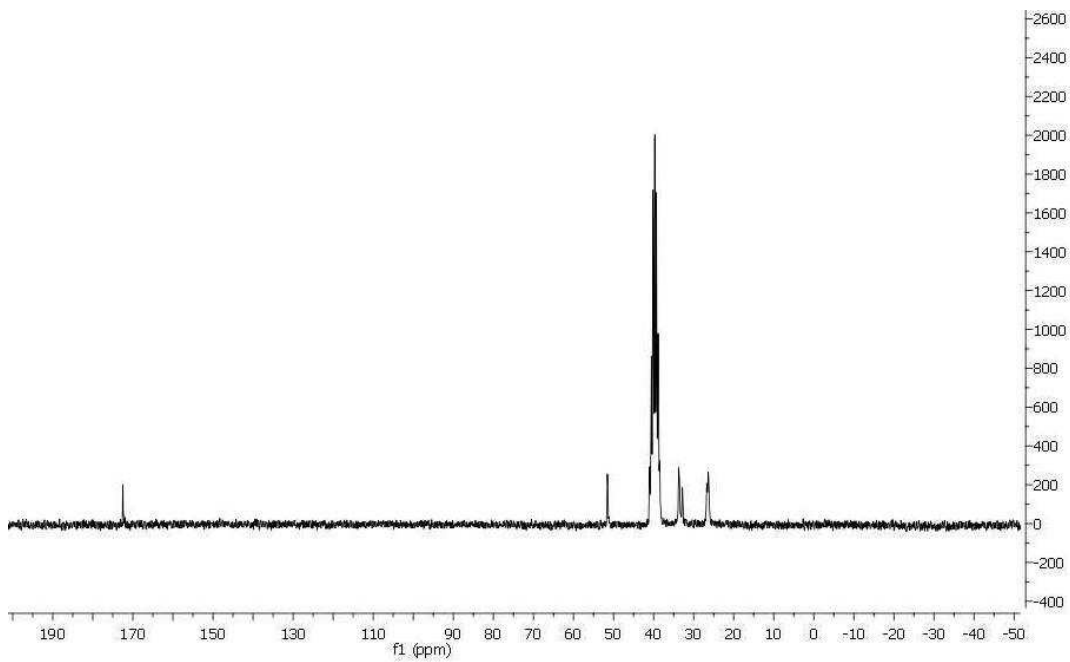
**Slika P78.**  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K4b**, sniman u DMSO-u.

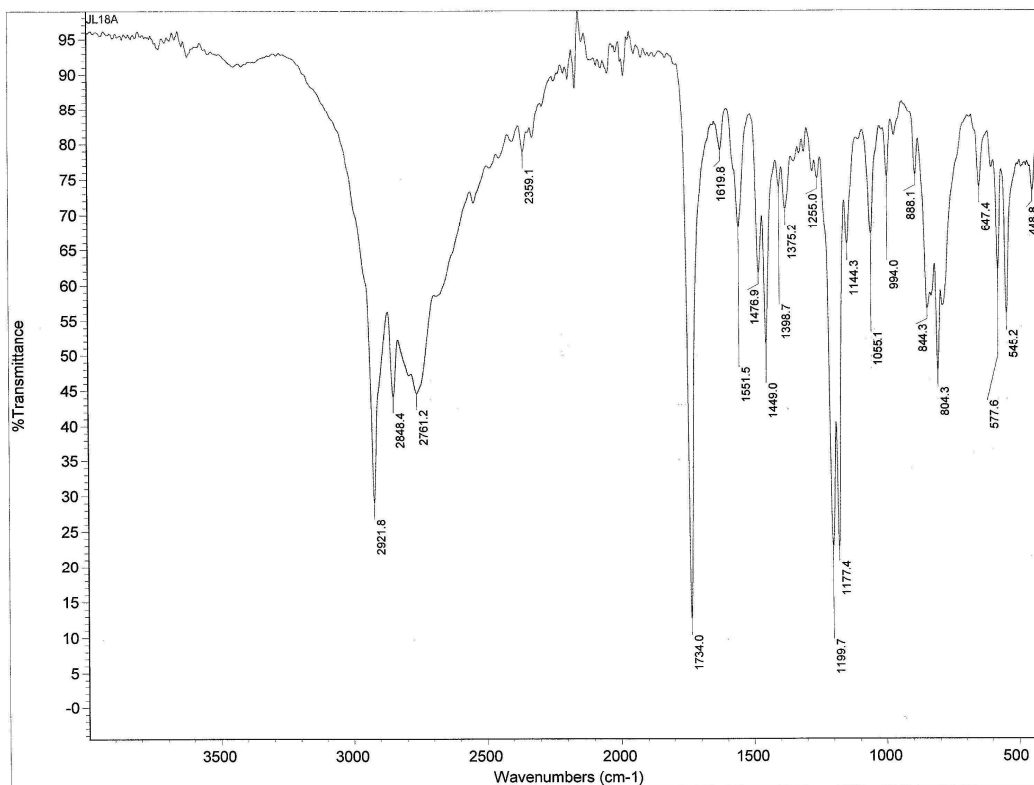
**Slika P79.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K4b**, sniman u DMSO-u.

**Slika P80.** HSQC NMR spektar kompleksa **K4b**, sniman u DMSO-u.

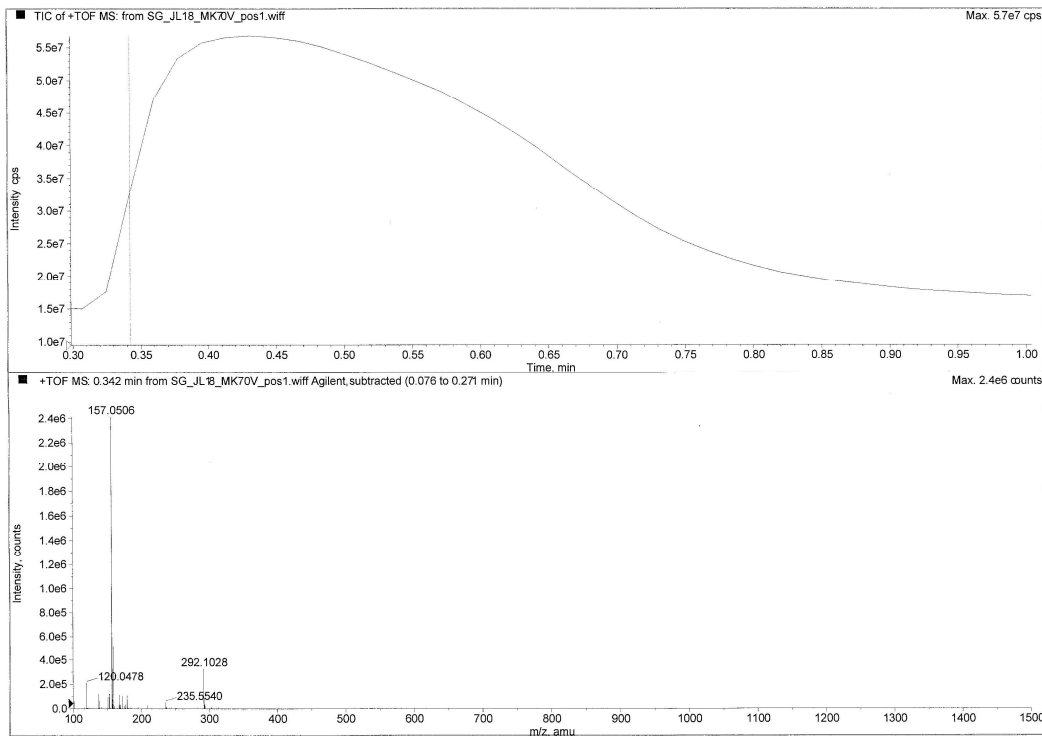
**Slika P81.** IC spektar kompleksa **K4b**.

**Slika P82.** Maseni spektar kompleksa **K4b**.

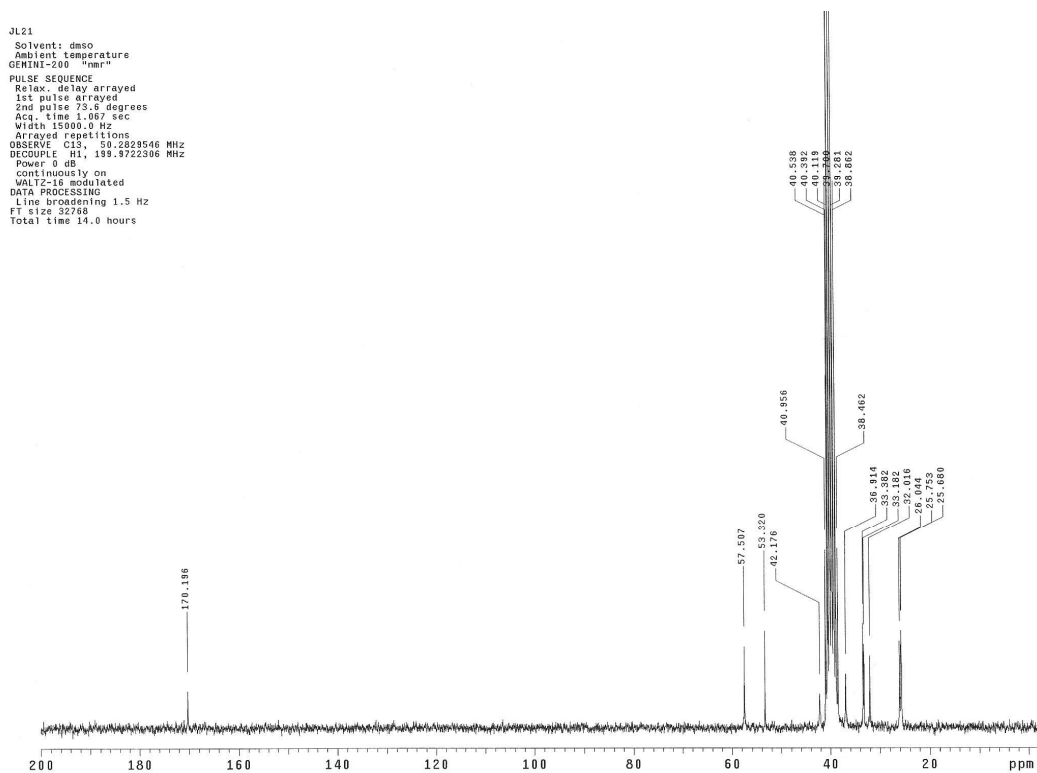
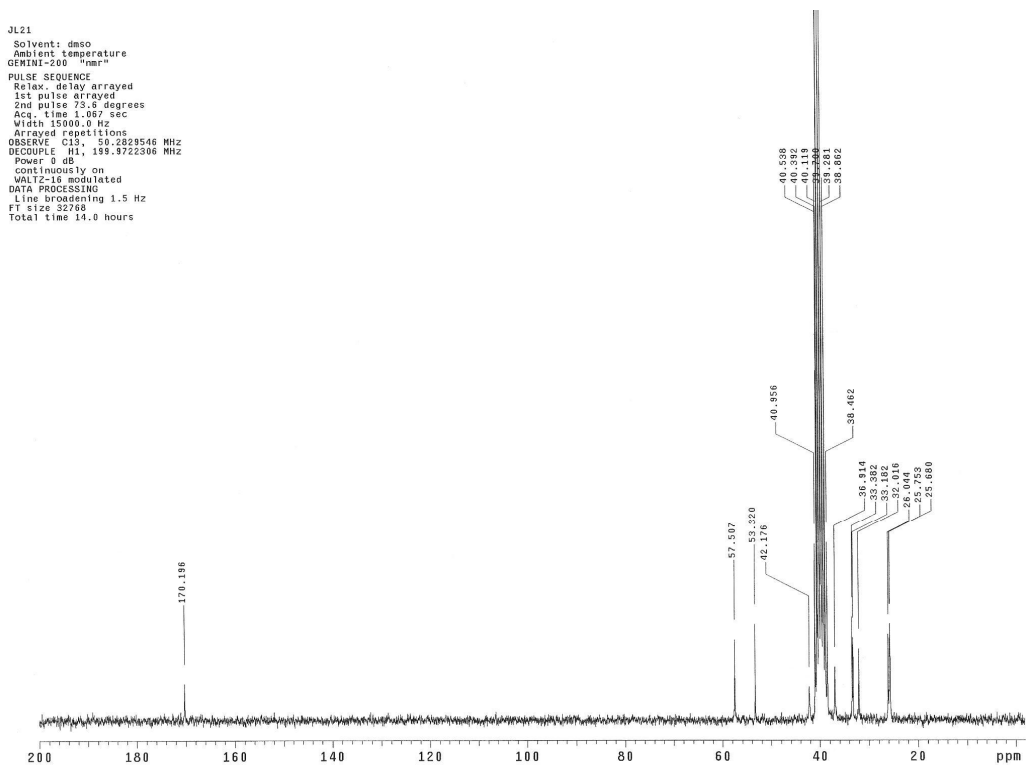
Slika P1.  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda L1, sniman u DMSO-u.Slika P2.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda L1, sniman u DMSO-u.

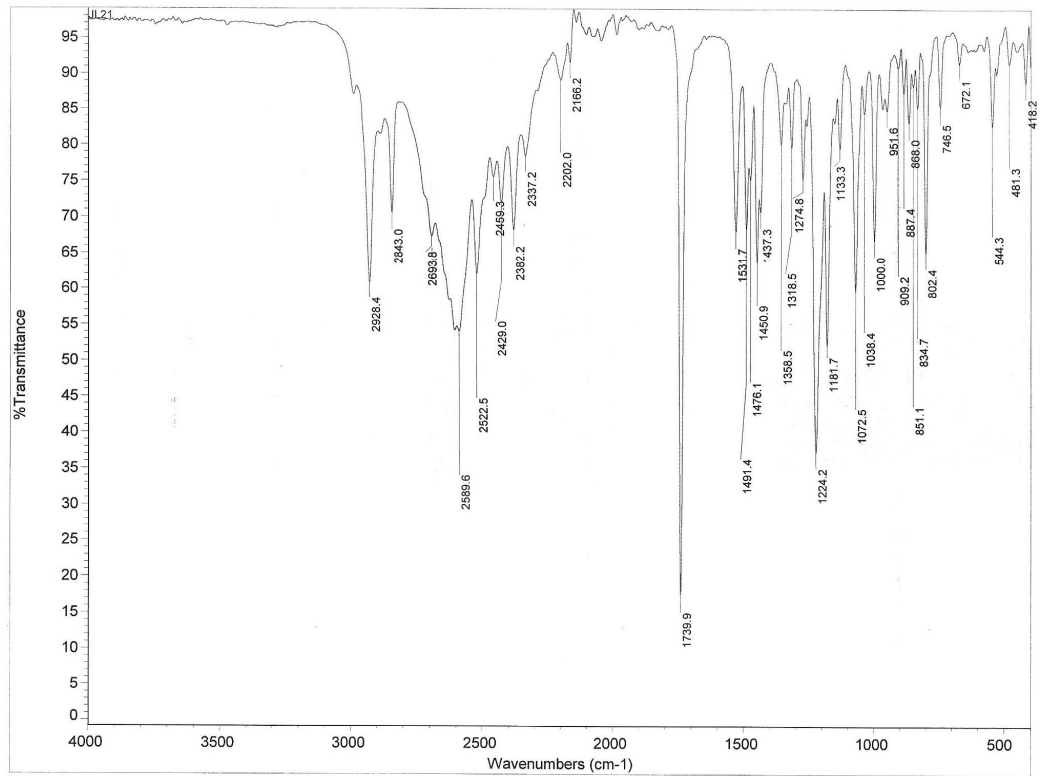
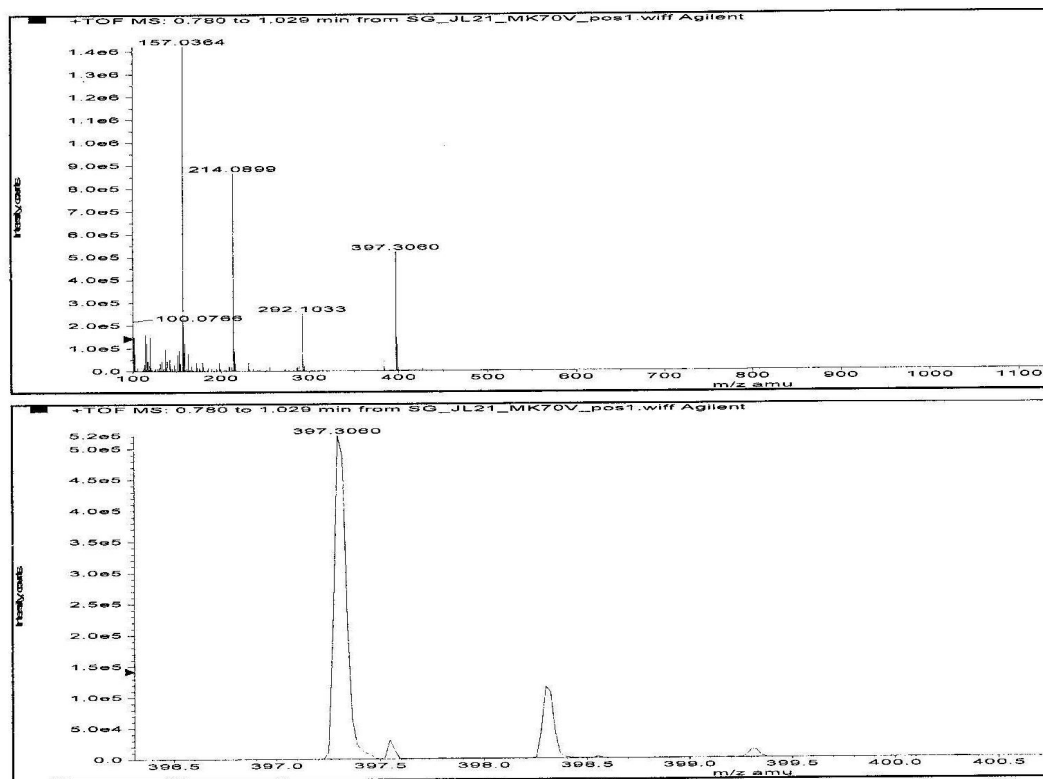


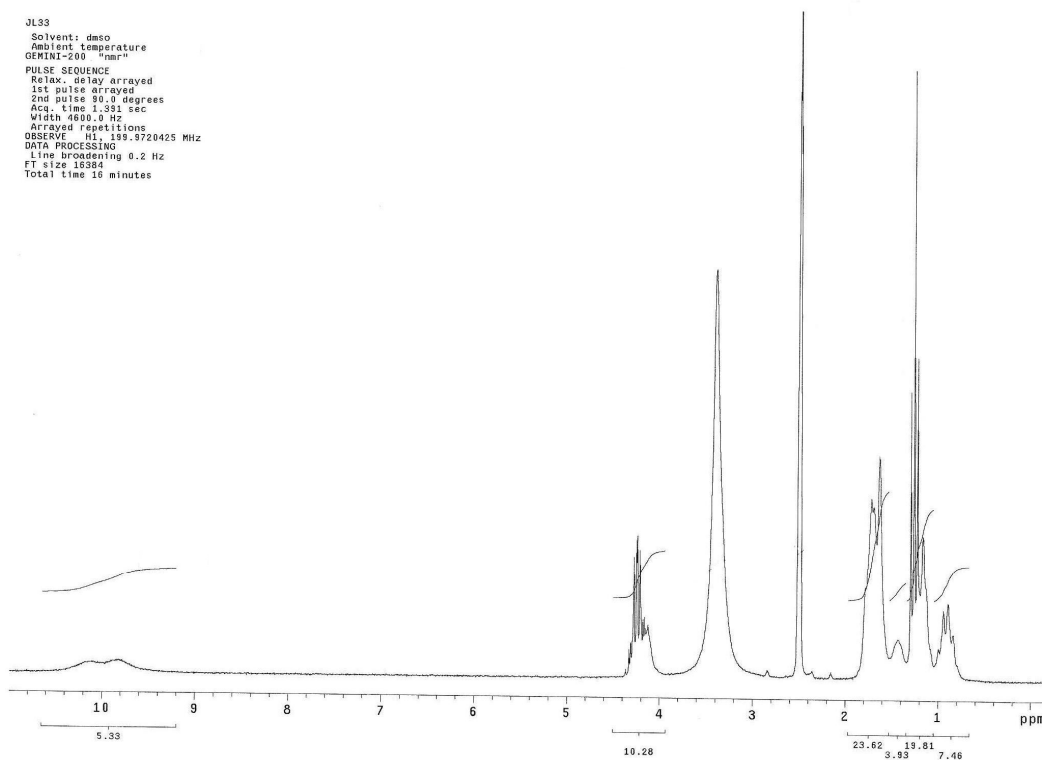
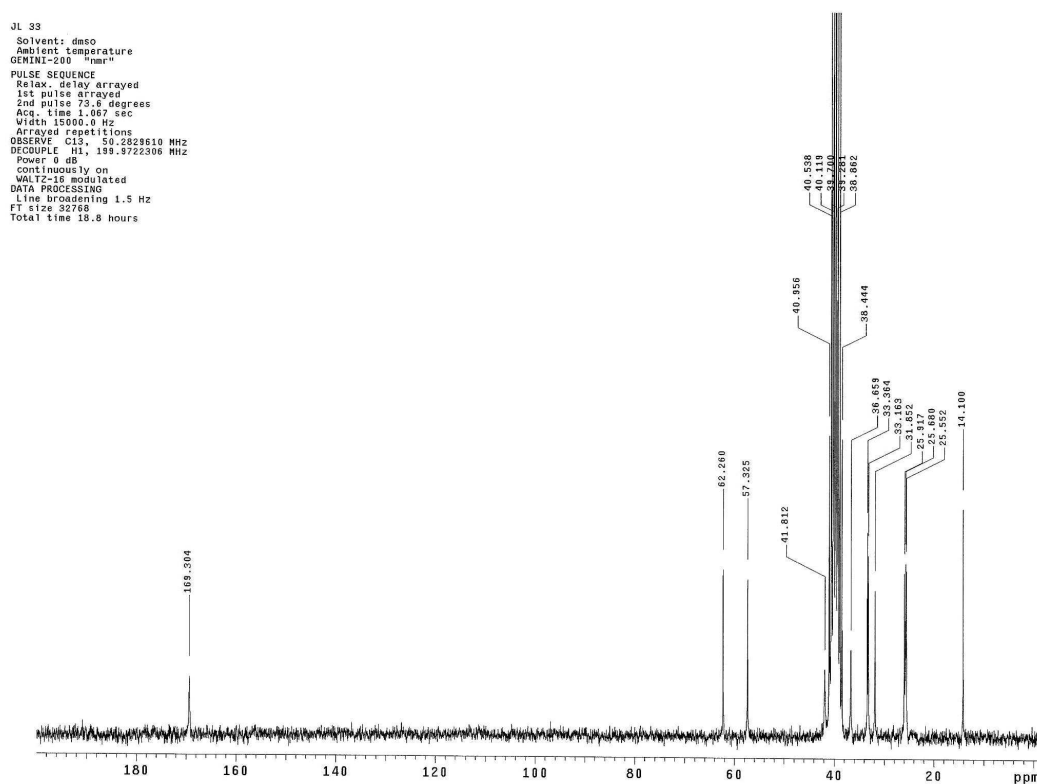
Slika P3. IC spektar liganda L1.

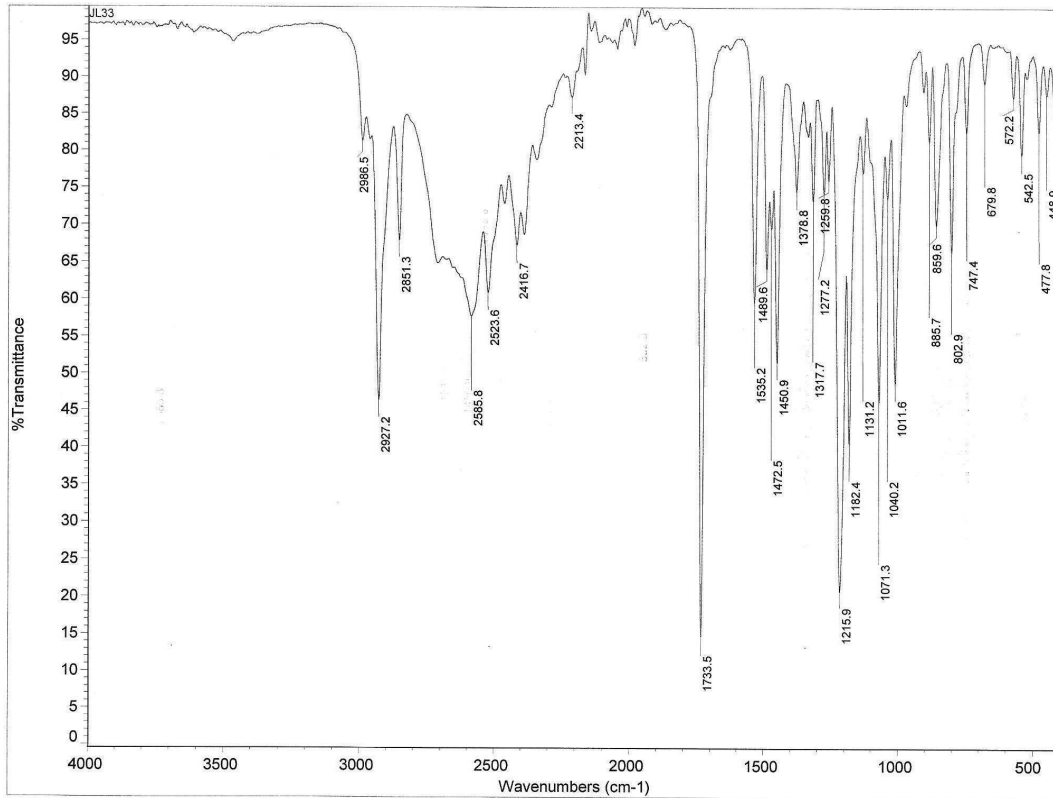


Slika P4. Maseni spektar liganda L1

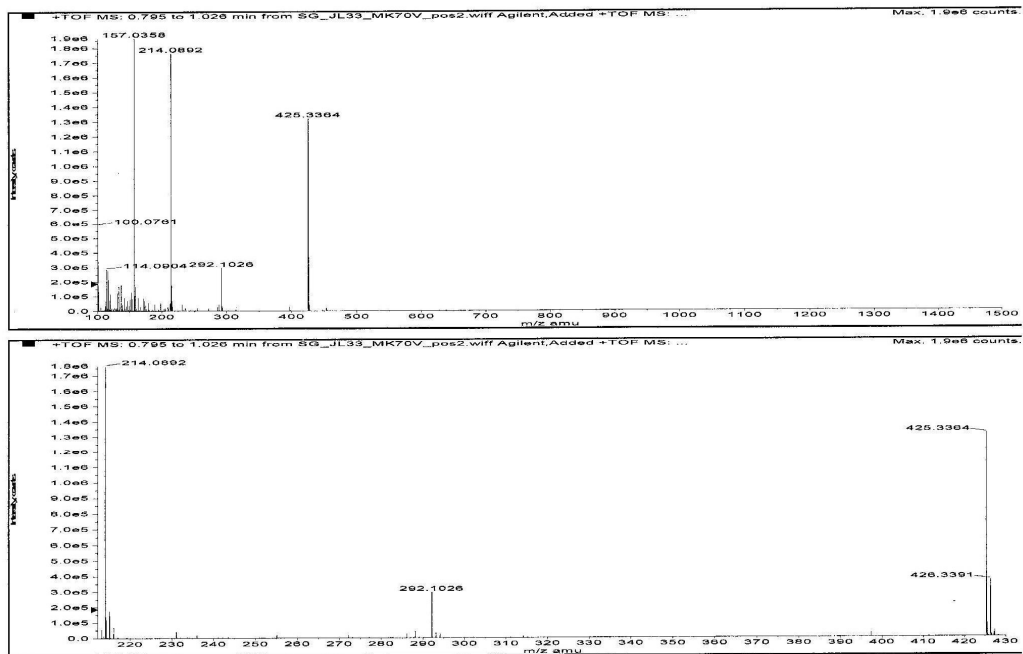
Slika P5.  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda L2, sniman u DMSO-u.Slika P6.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda L2, sniman u DMSO-u.

Slika P7. IC spektar liganda **L2**.Slika P8. Maseni spektar liganda **L2**.

Slika P9.  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L3**, sniman u DMSO-u.Slika P10.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L3**, sniman u DMSO-u.

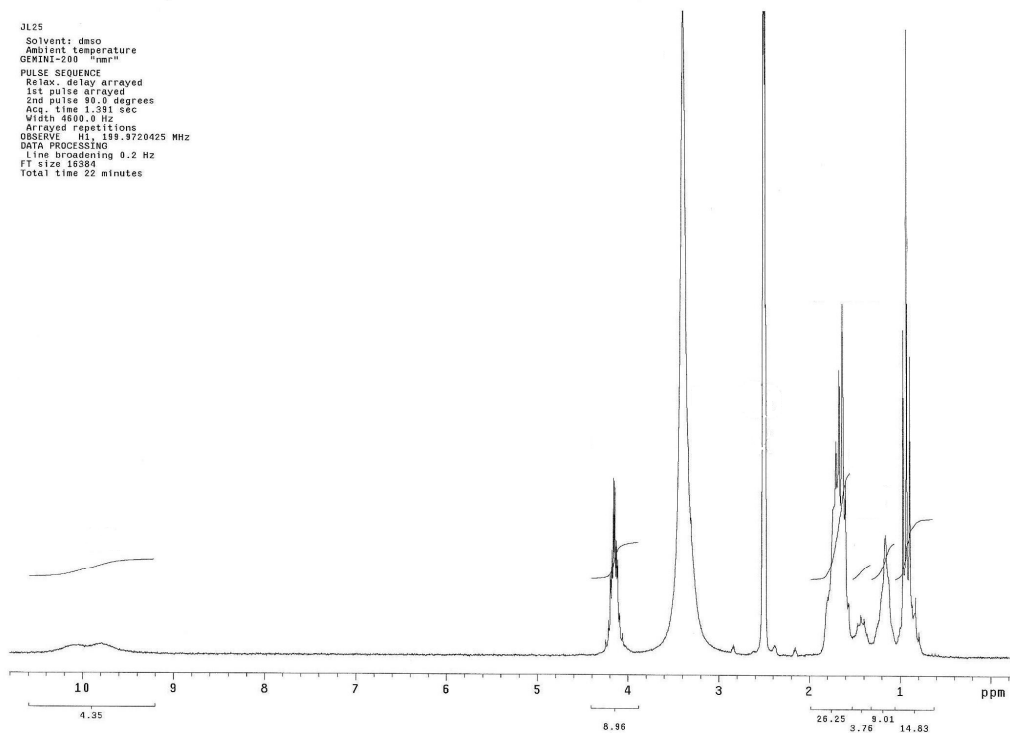
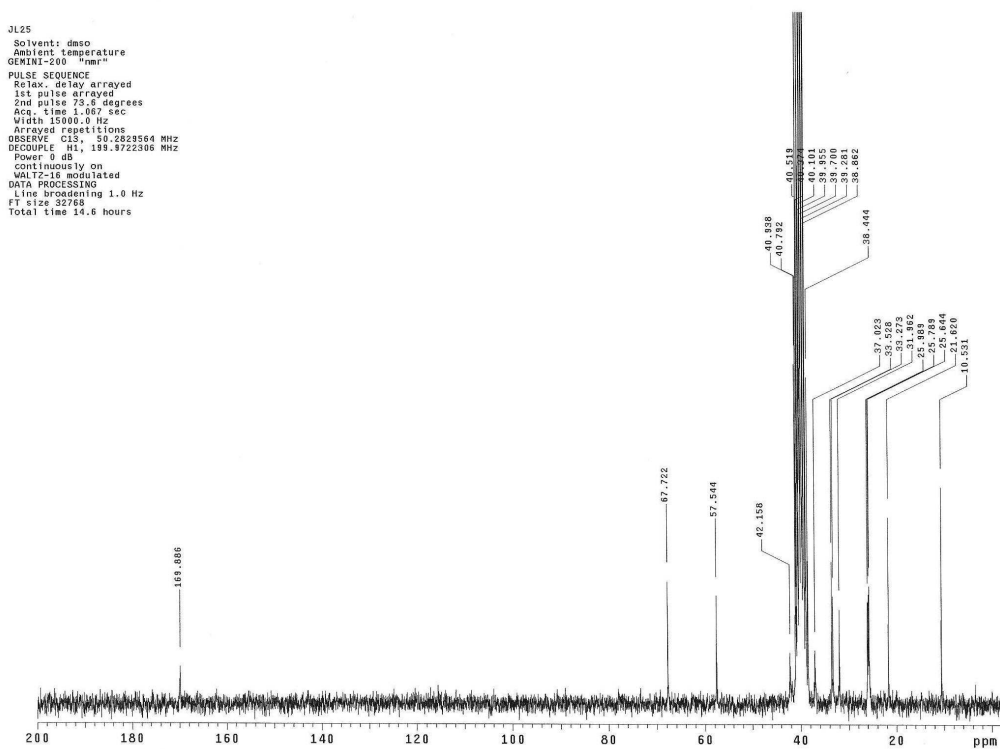


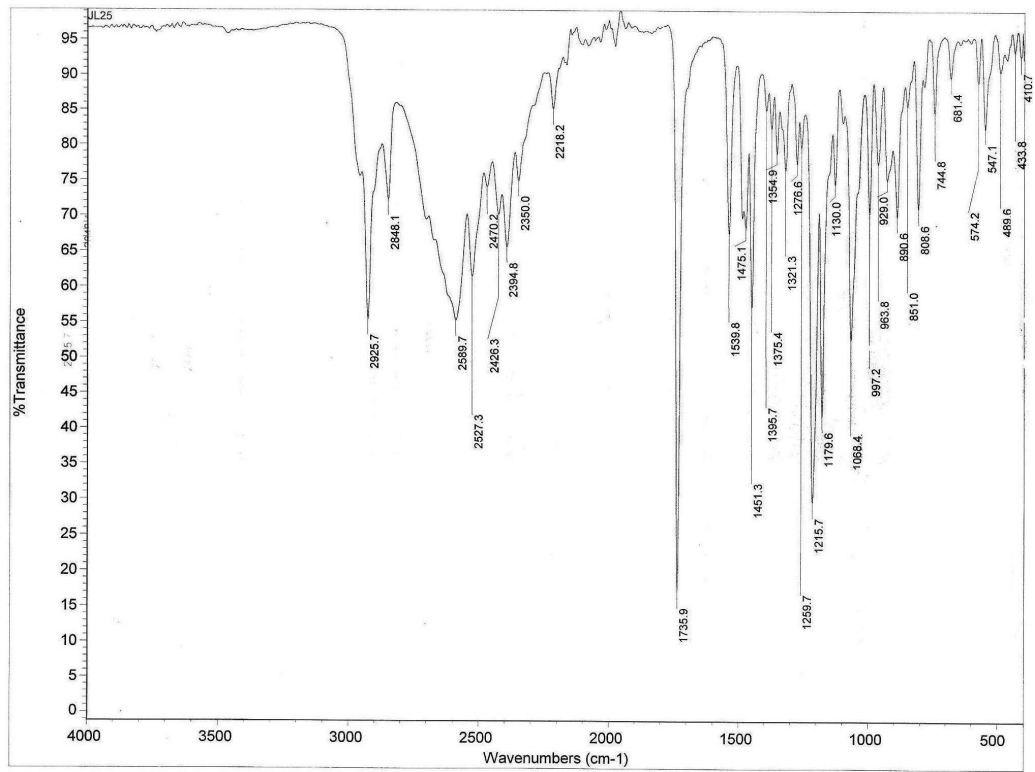
Slika P11. IC spektar liganda L3.



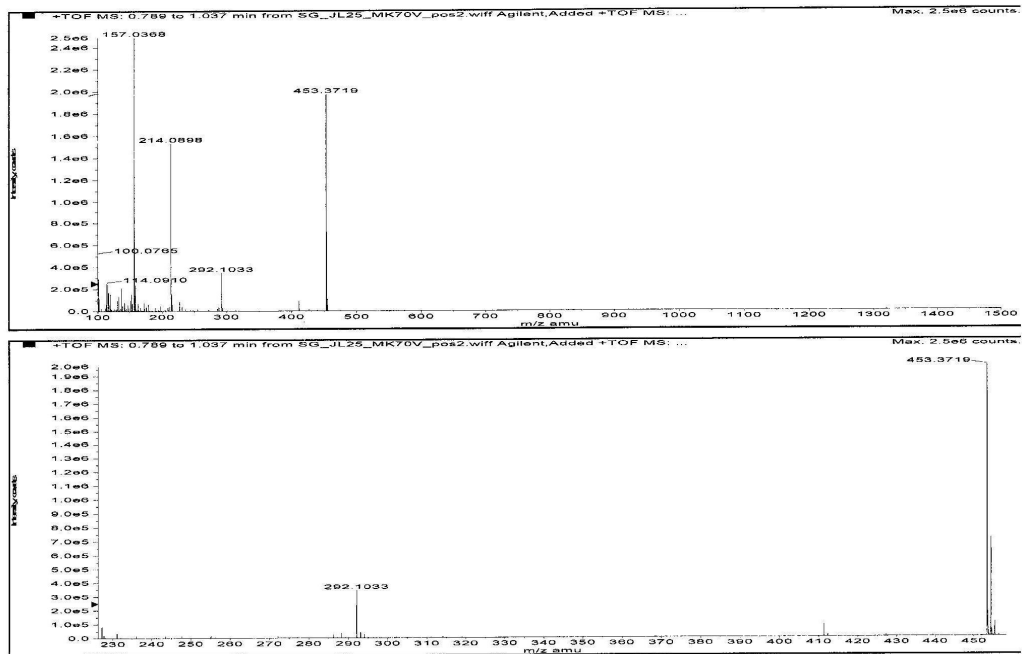
Slika P12. Maseni spektar liganda L3.



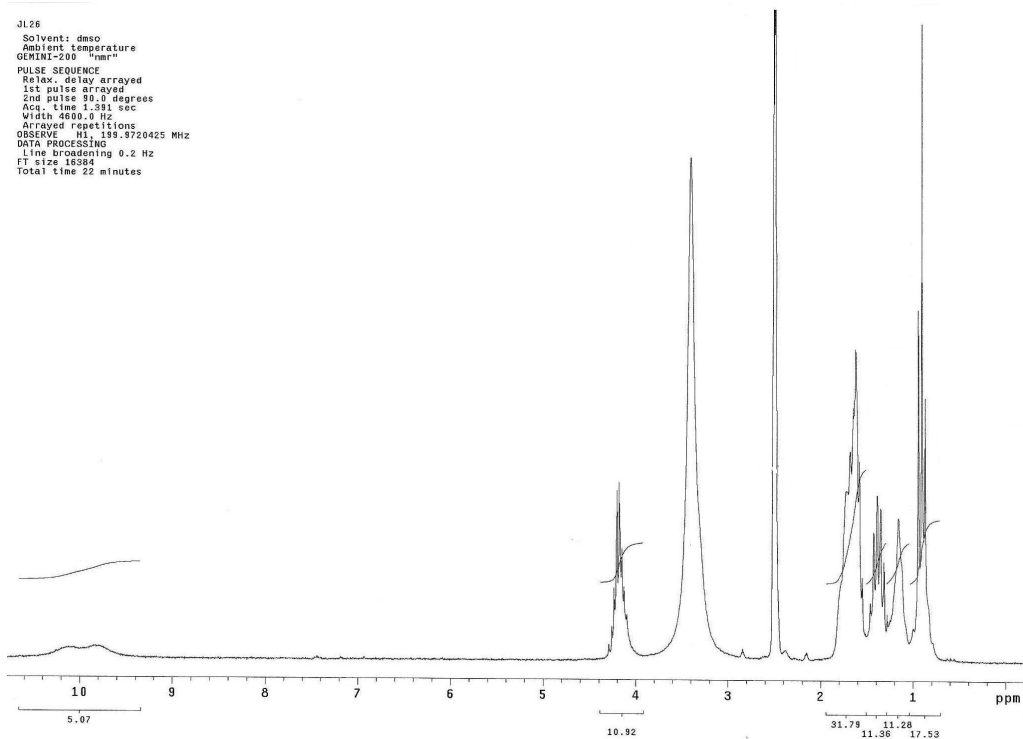
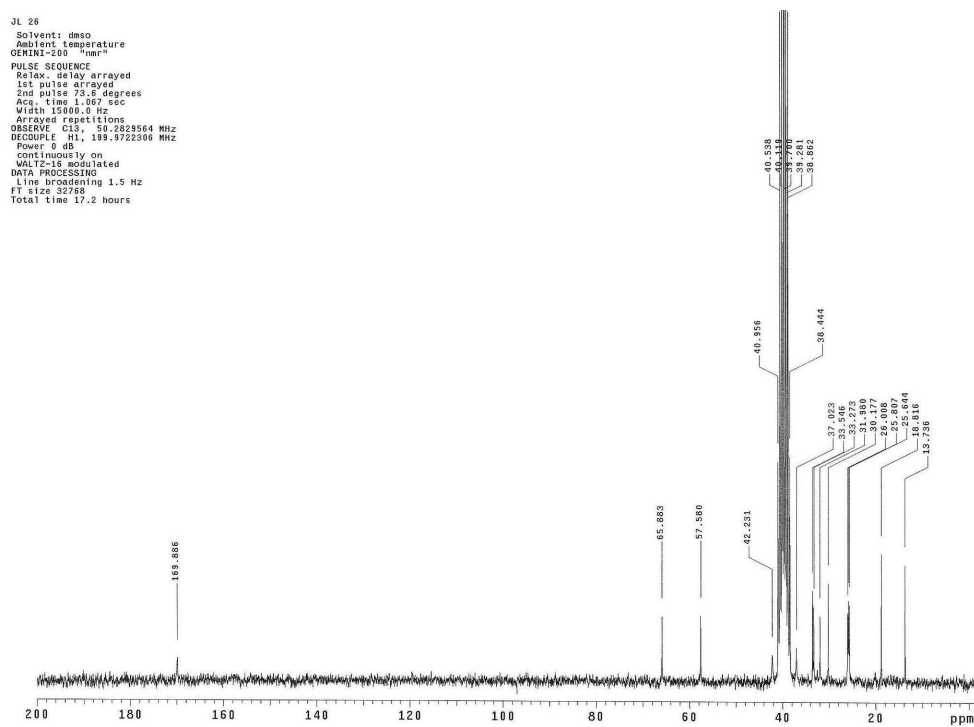
Slika P13.  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L4**, sniman u DMSO-u.Slika P14.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L4**, sniman u DMSO-u.

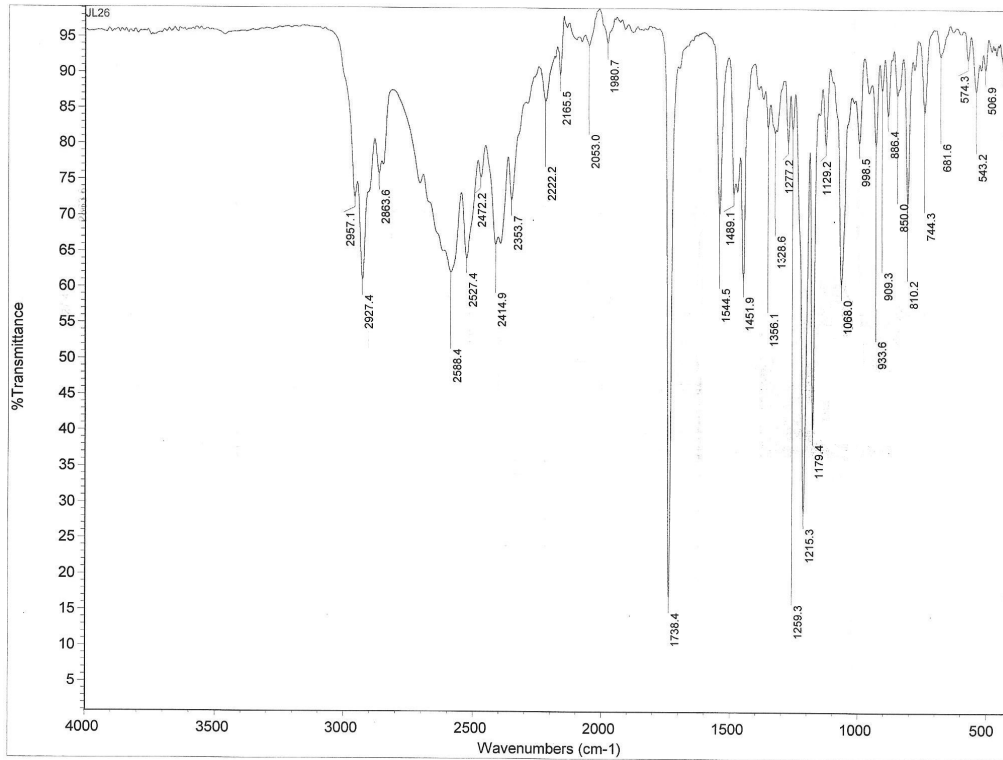


Slika P15. IC spektar liganda L4.

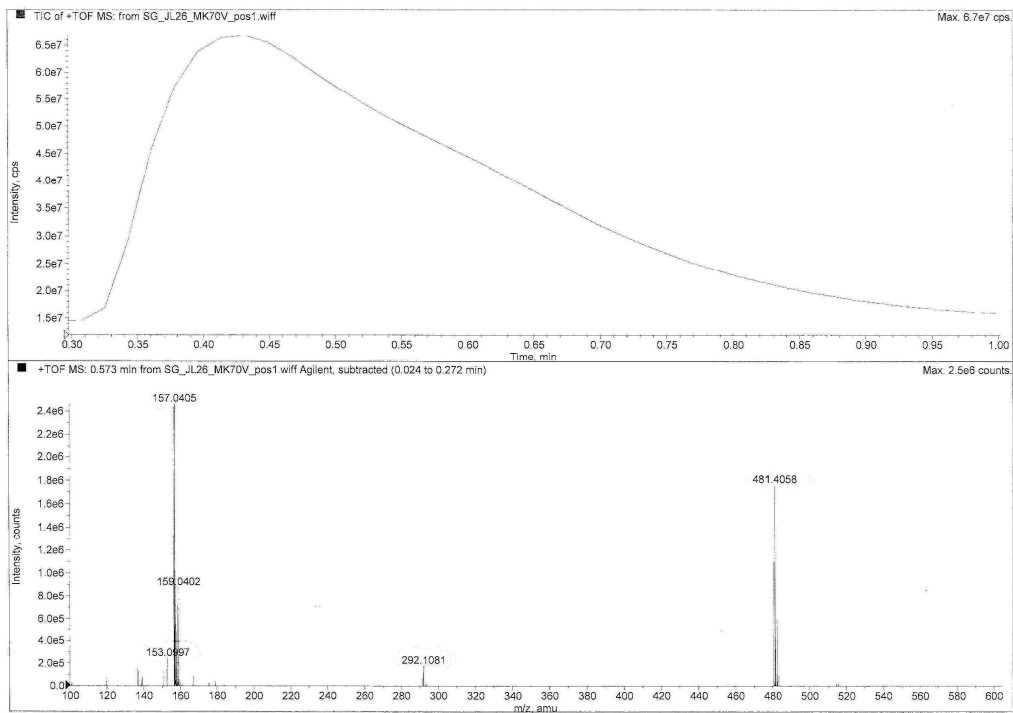


Slika P16. Maseni spektar liganda L4.

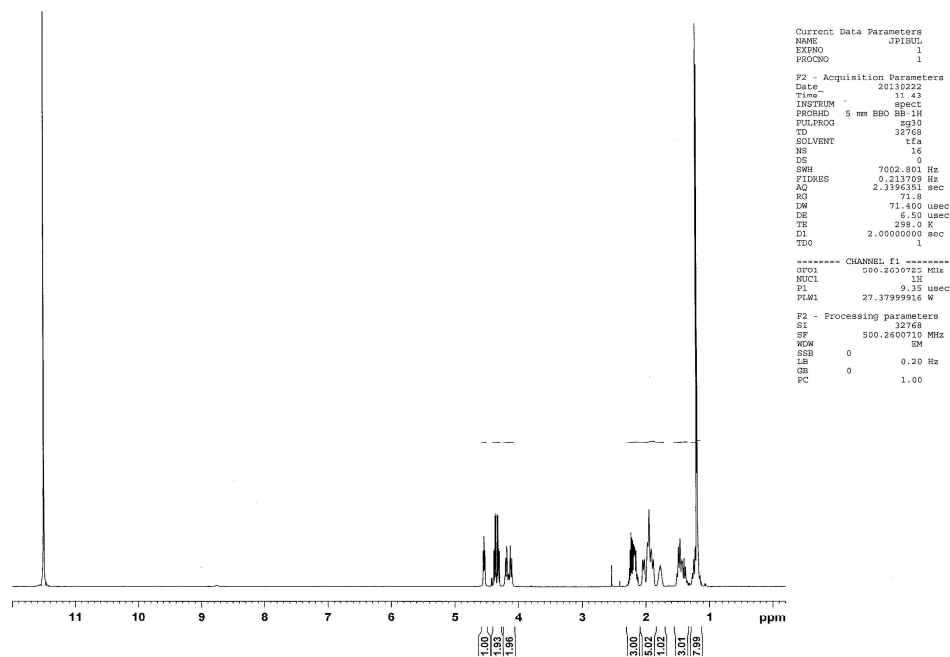
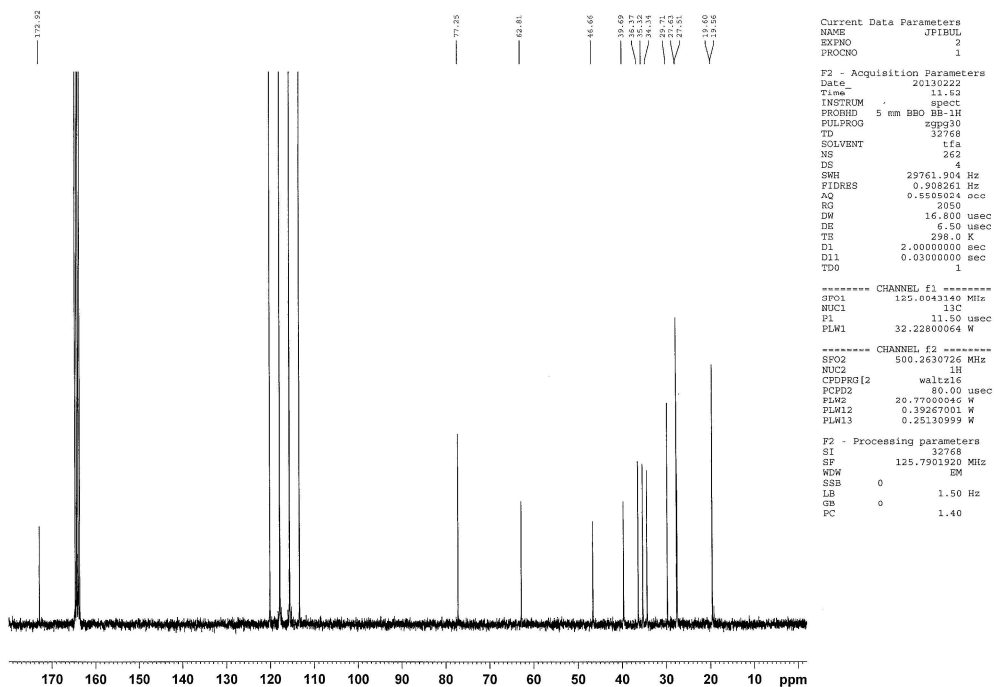
Slika P17.  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L5**, sniman u DMSO-u.Slika P18.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L5**, sniman u DMSO-u.

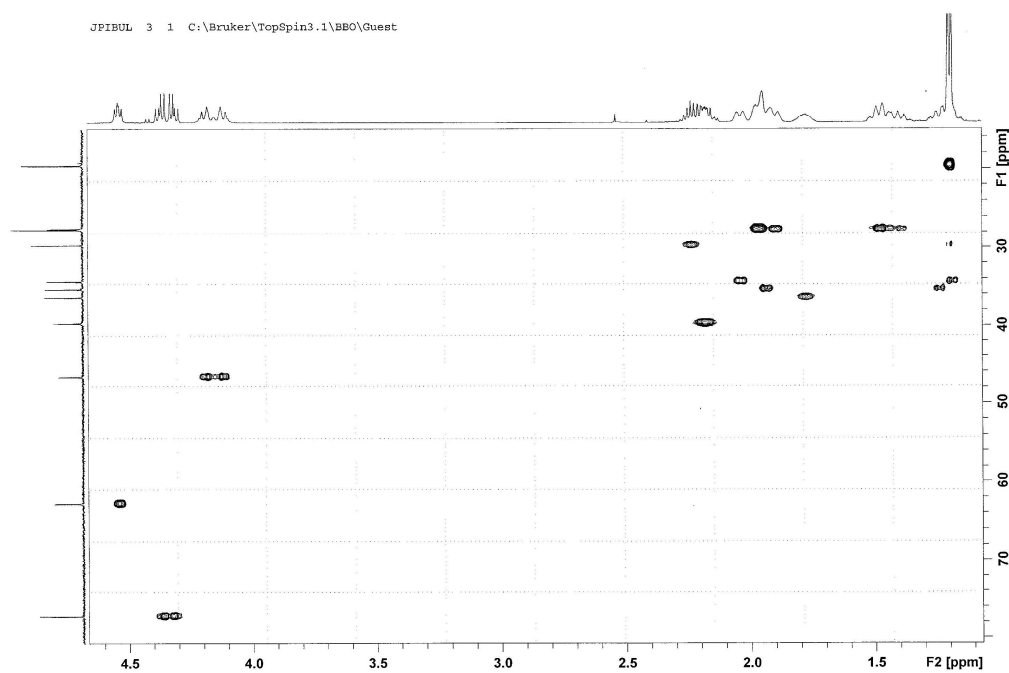
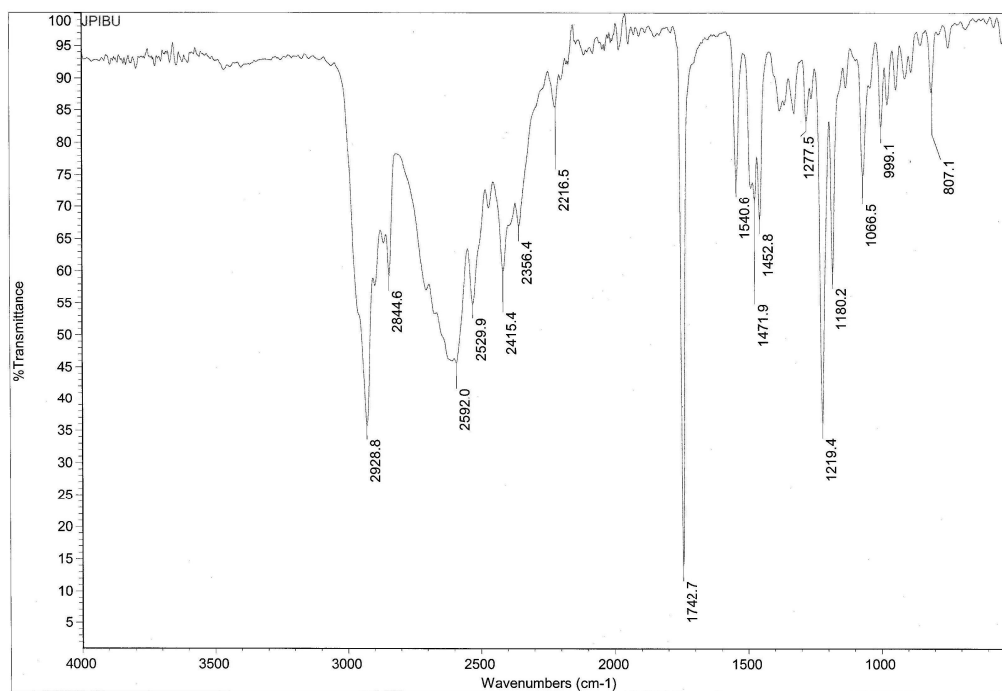


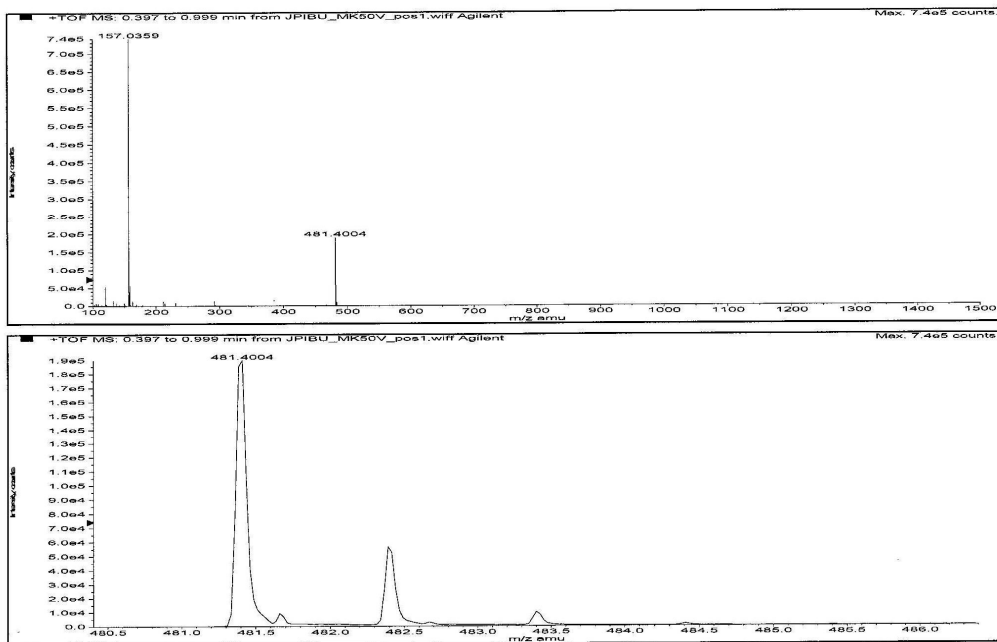
Slika P19. IC spektar liganda L5.



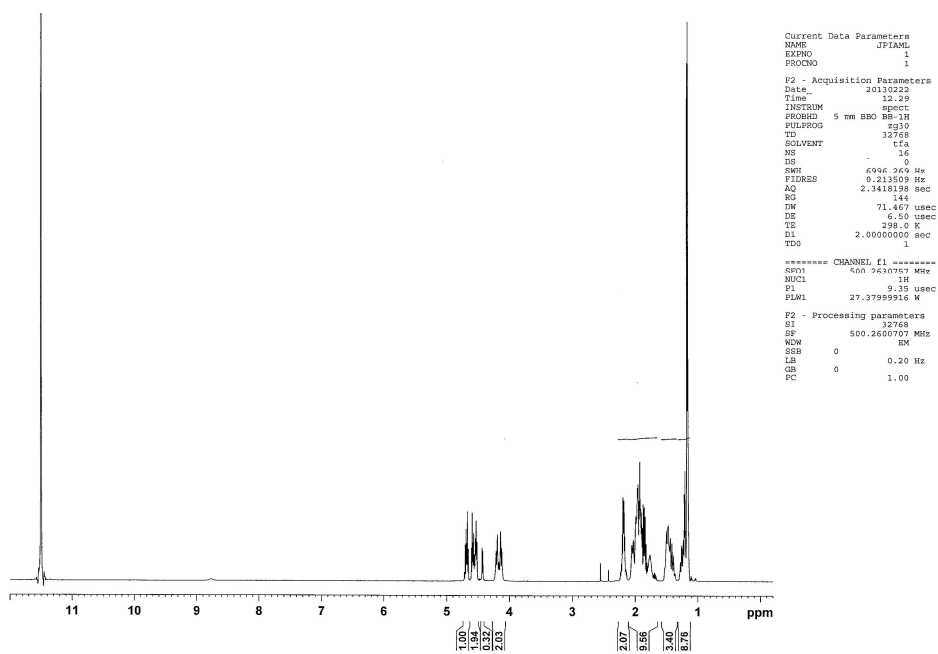
Slika P20. Maseni spektar liganda L5.

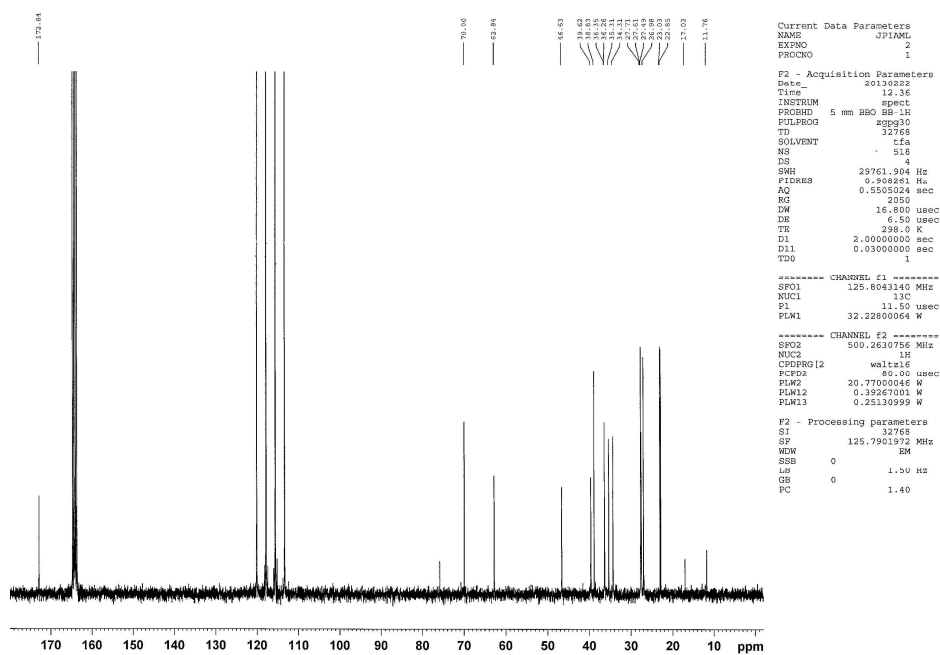
Slika P21.  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda **L6**, sniman u TFA.Slika P22.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar liganda **L6**, sniman u TFA.

Slika P23. HSQC NMR spektar liganda **L6**, sniman u TFA.Slika P24. IC spektar liganda **L6**.

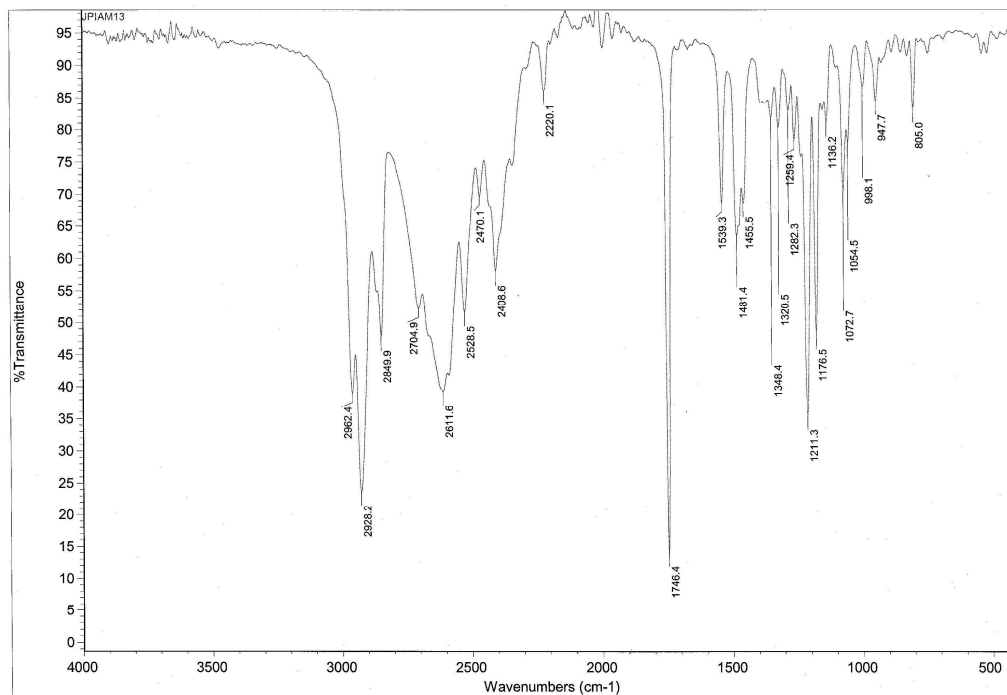


Slika P25. Maseni spektar liganda L6.

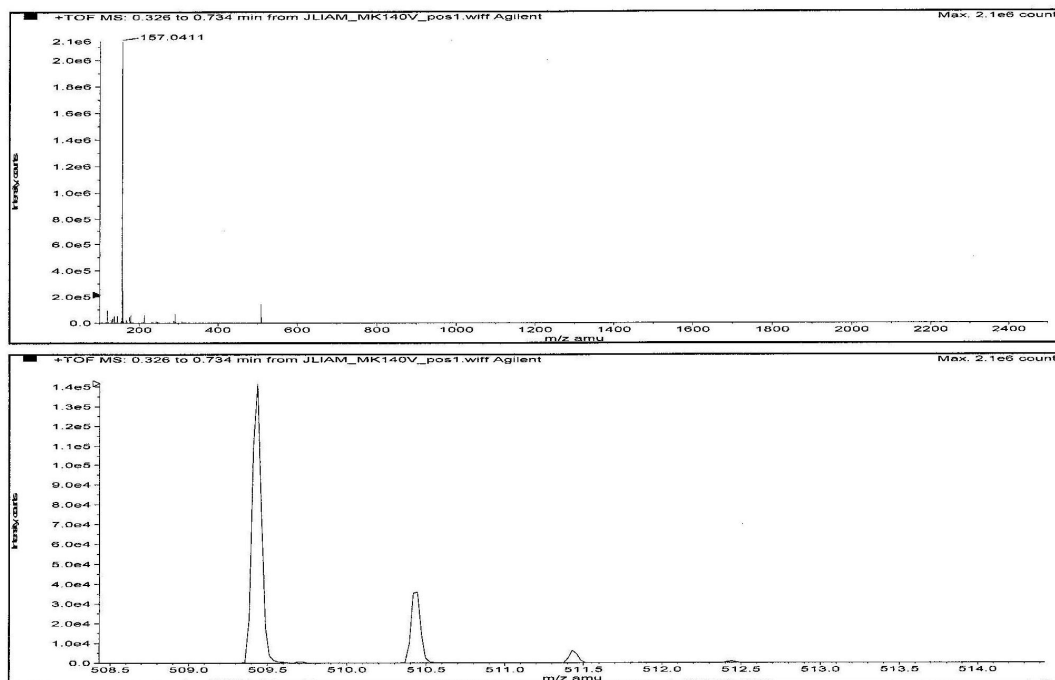
Slika P27.  $^1\text{H}$  NMR spektar liganda L7, sniman u TFA.



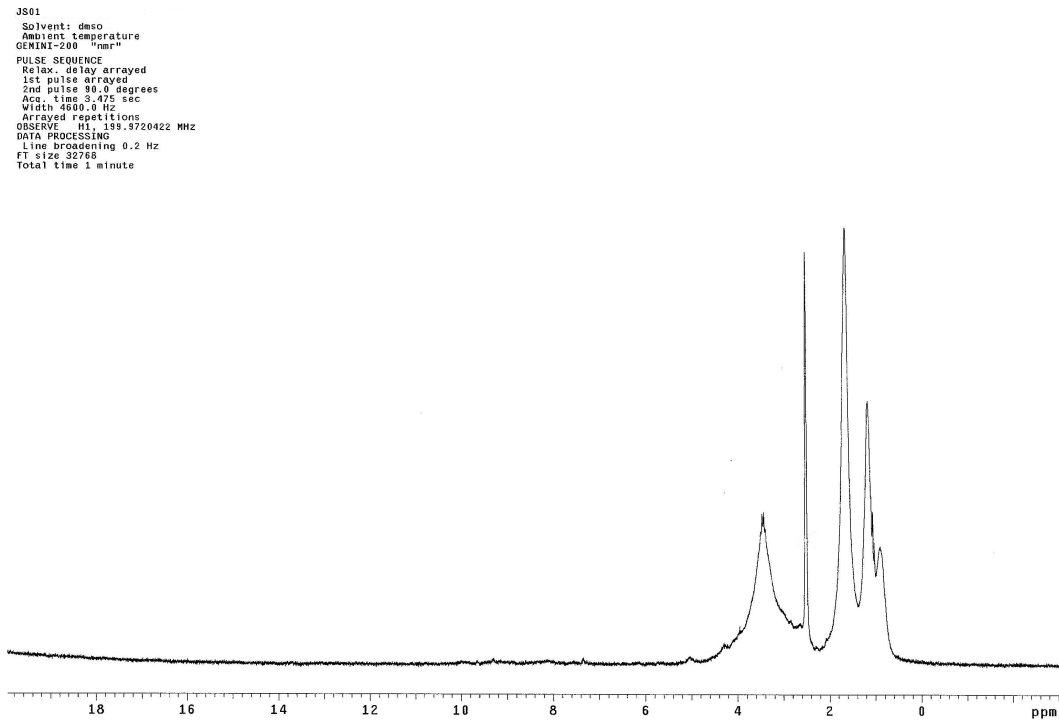
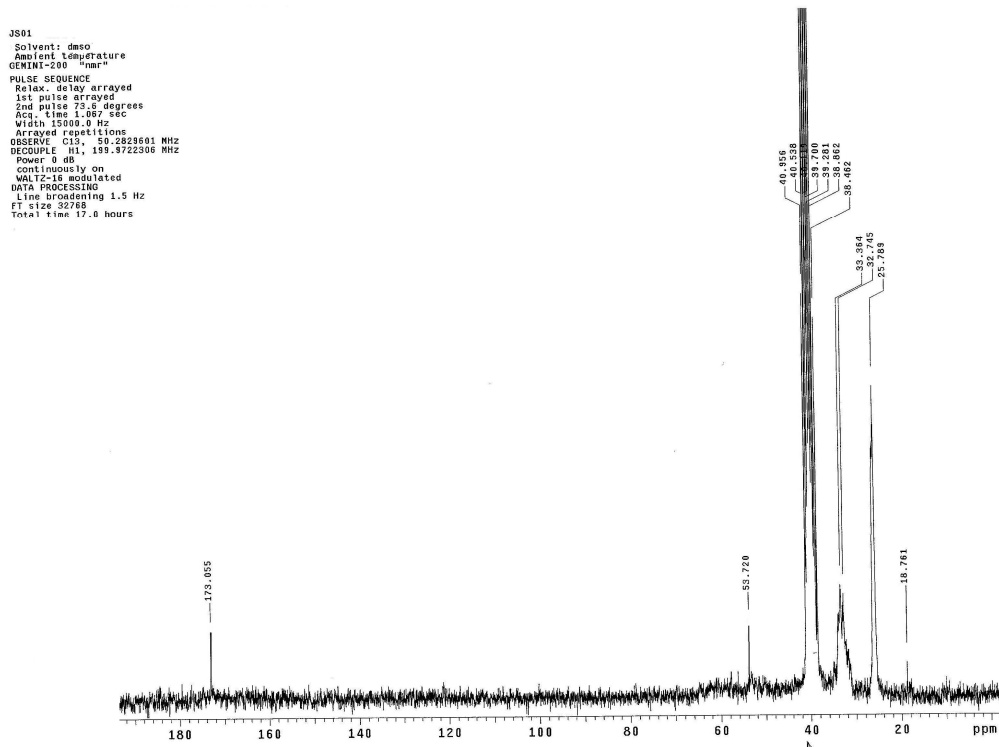


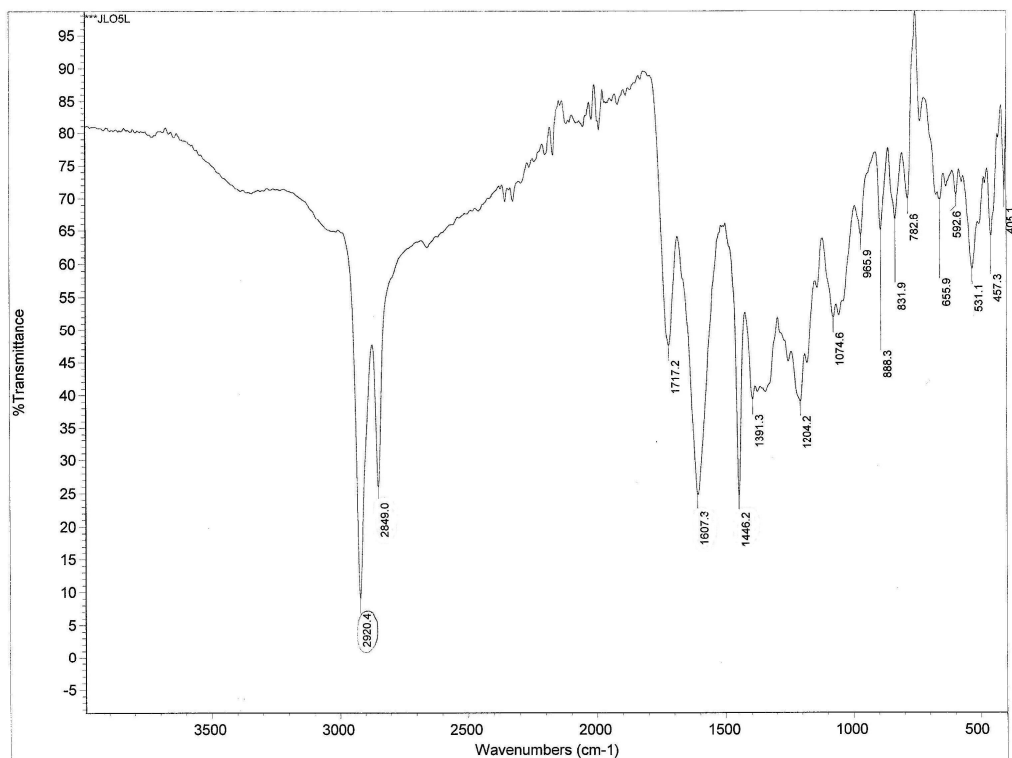
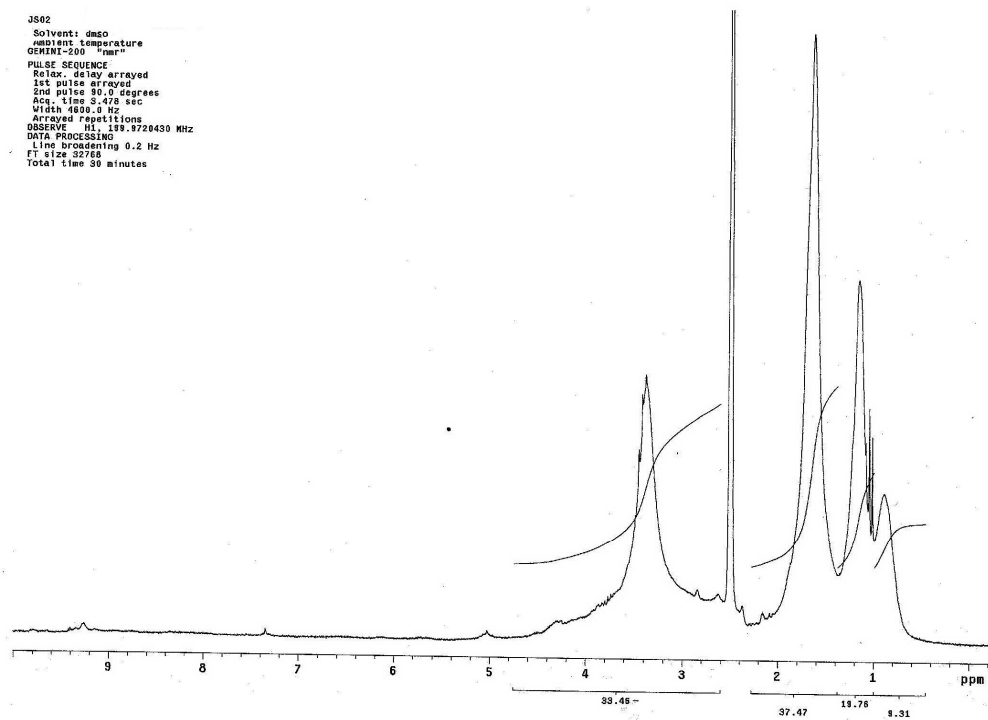


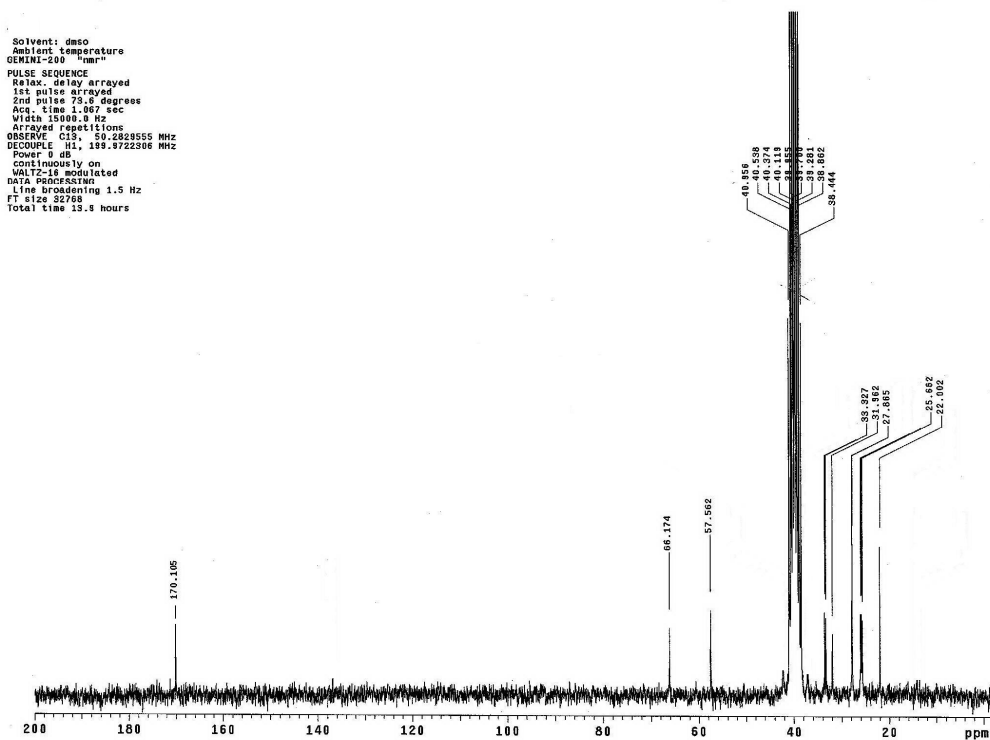
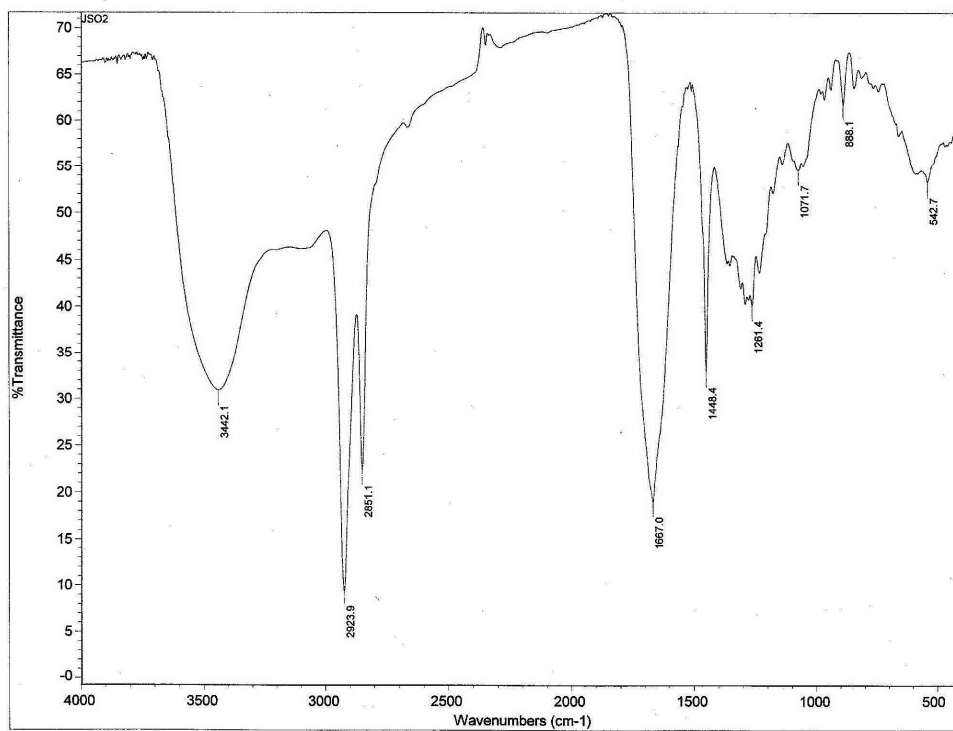
Slika P30. IC spektar liganda L7.

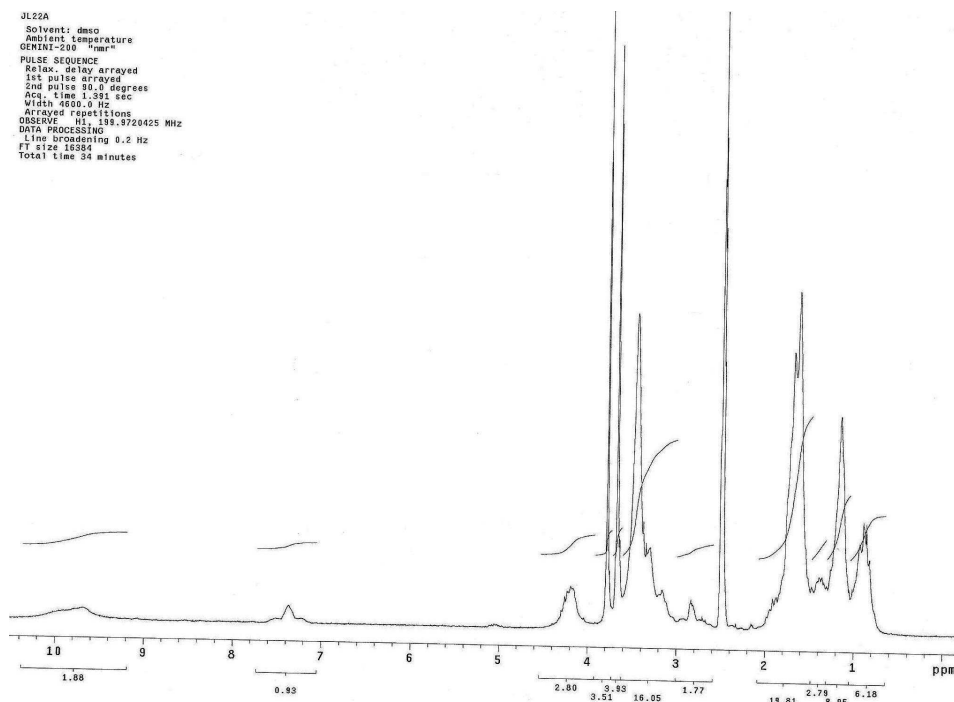
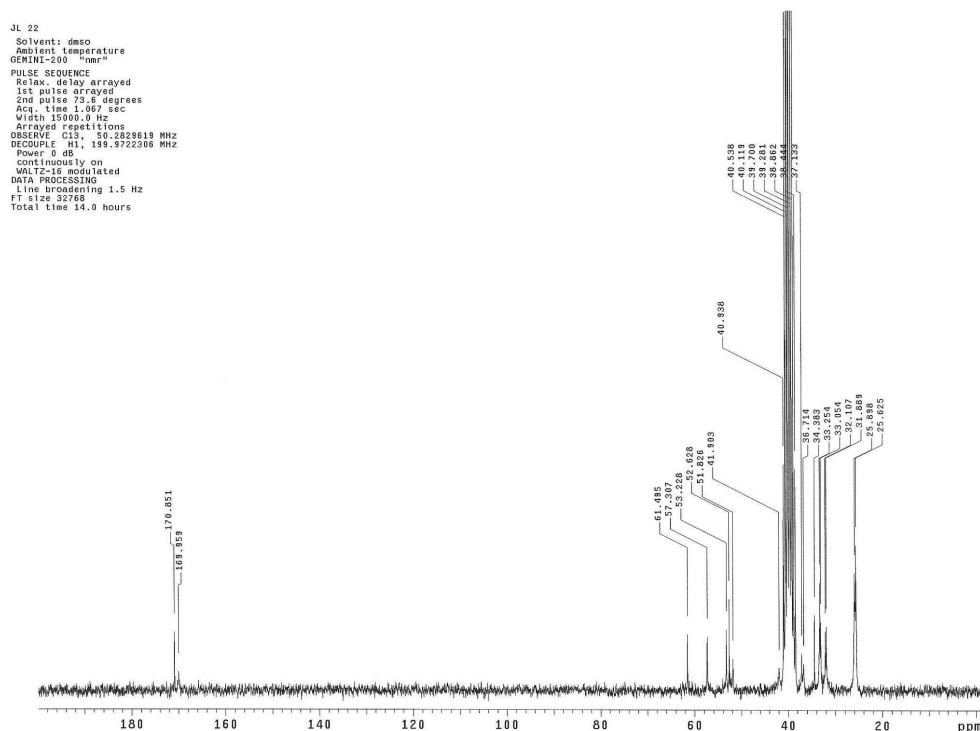


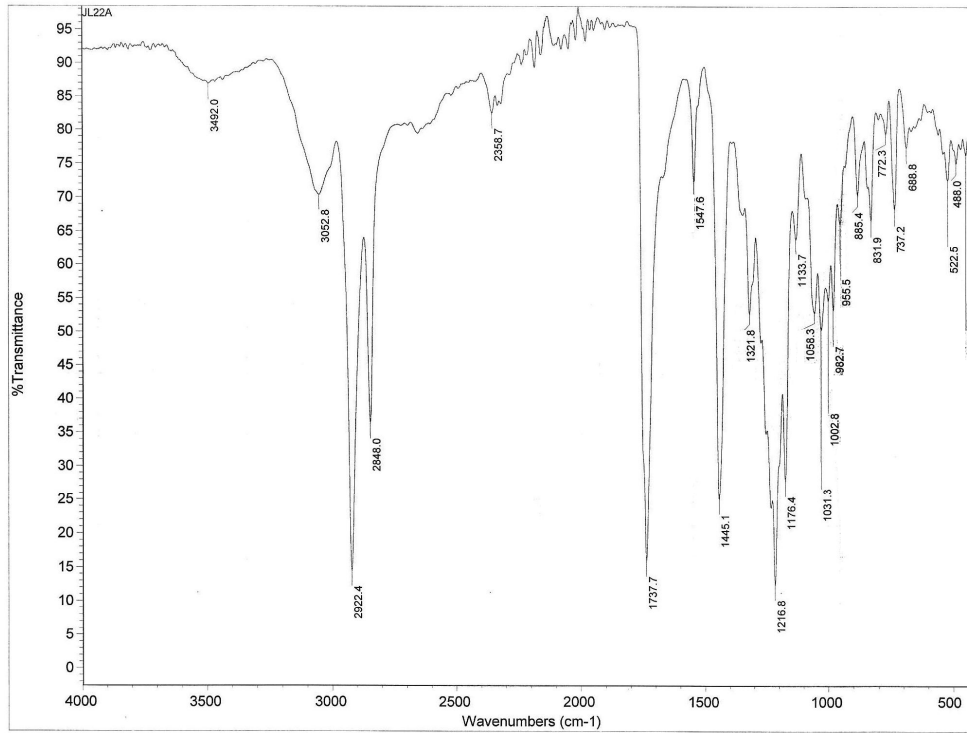
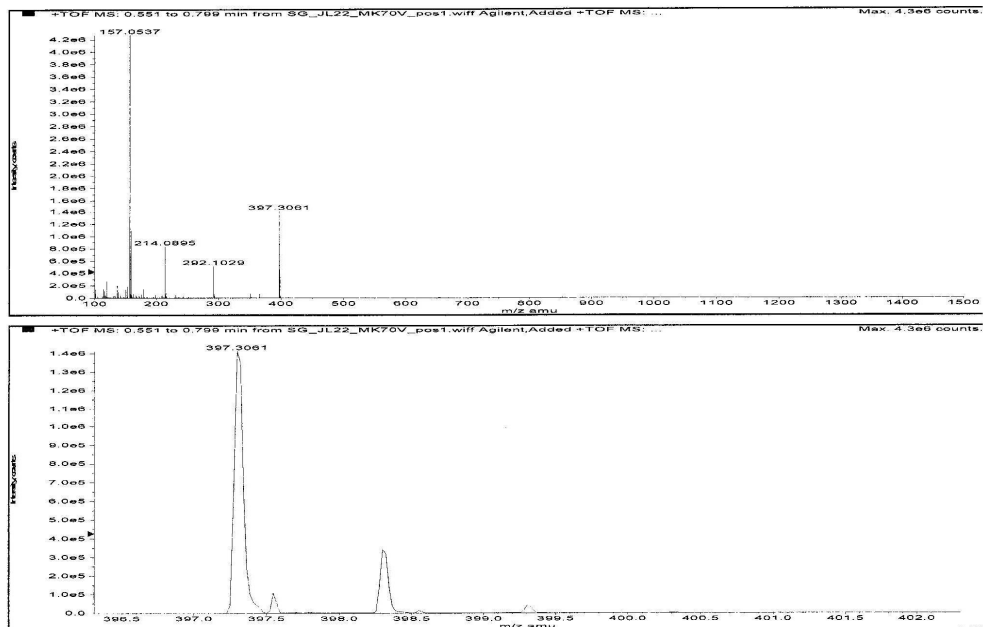
Slika P31. Maseni spektar liganda L7.

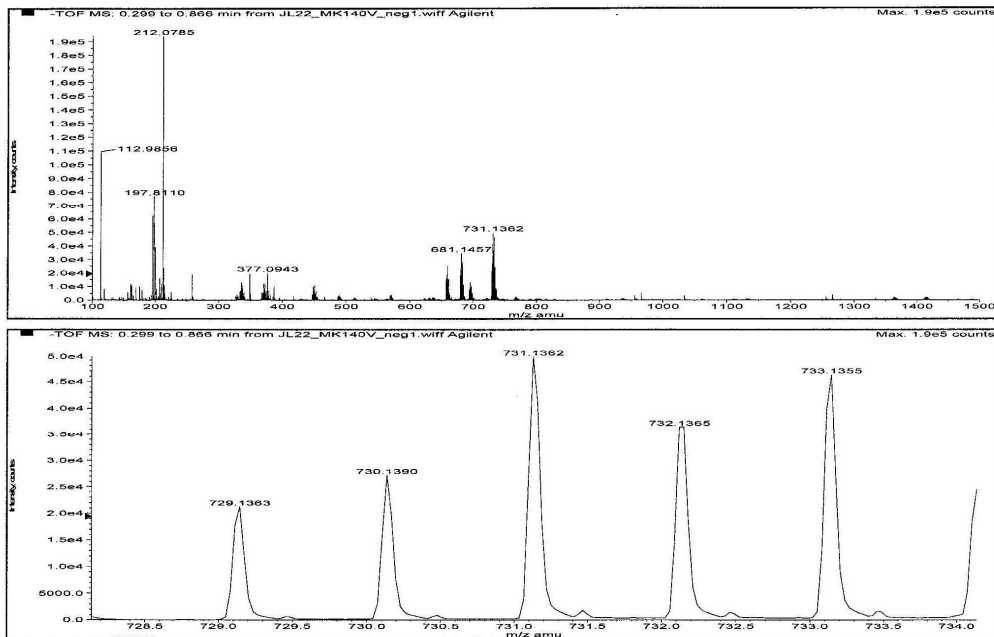
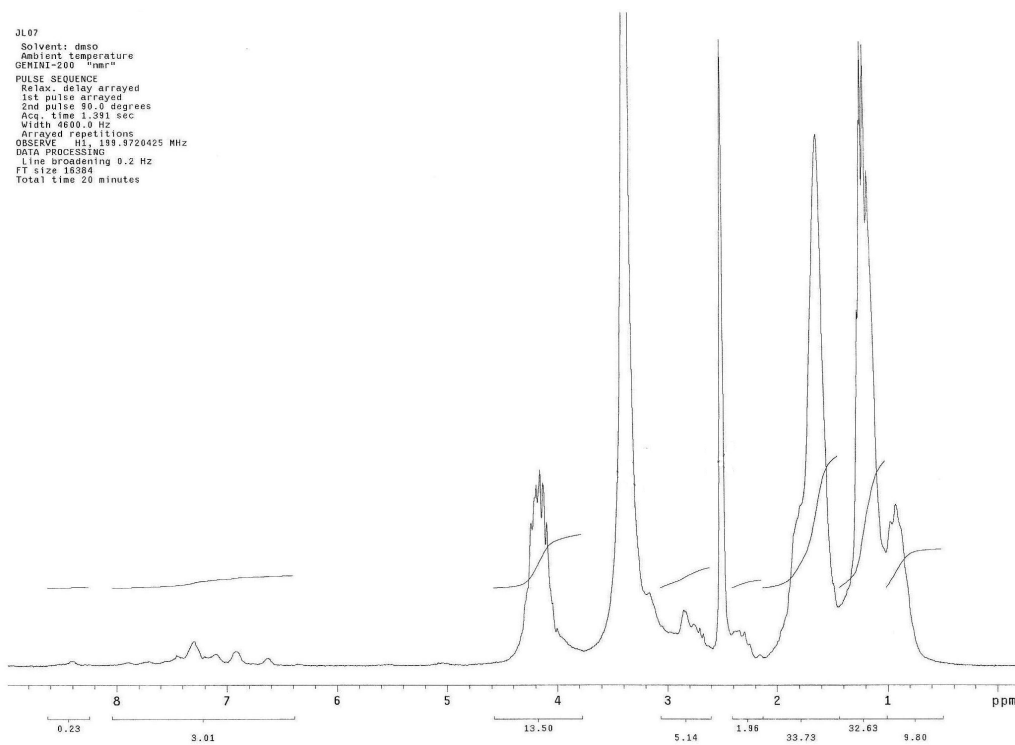
Slika P32.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u DMSO-u.Slika P33.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u DMSO-u.

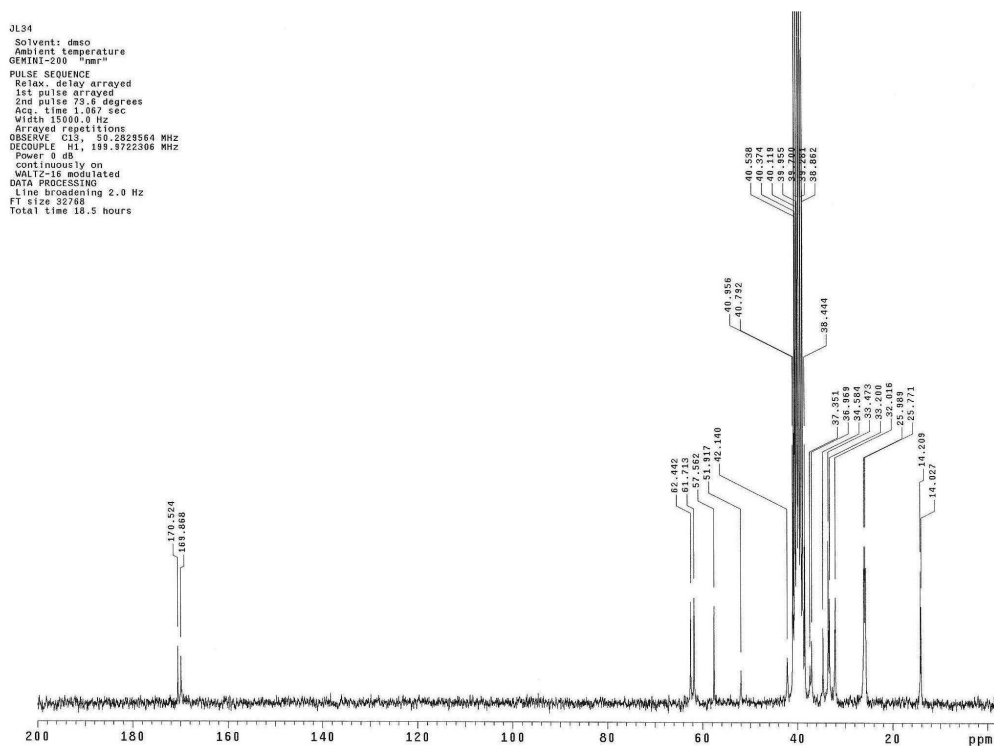
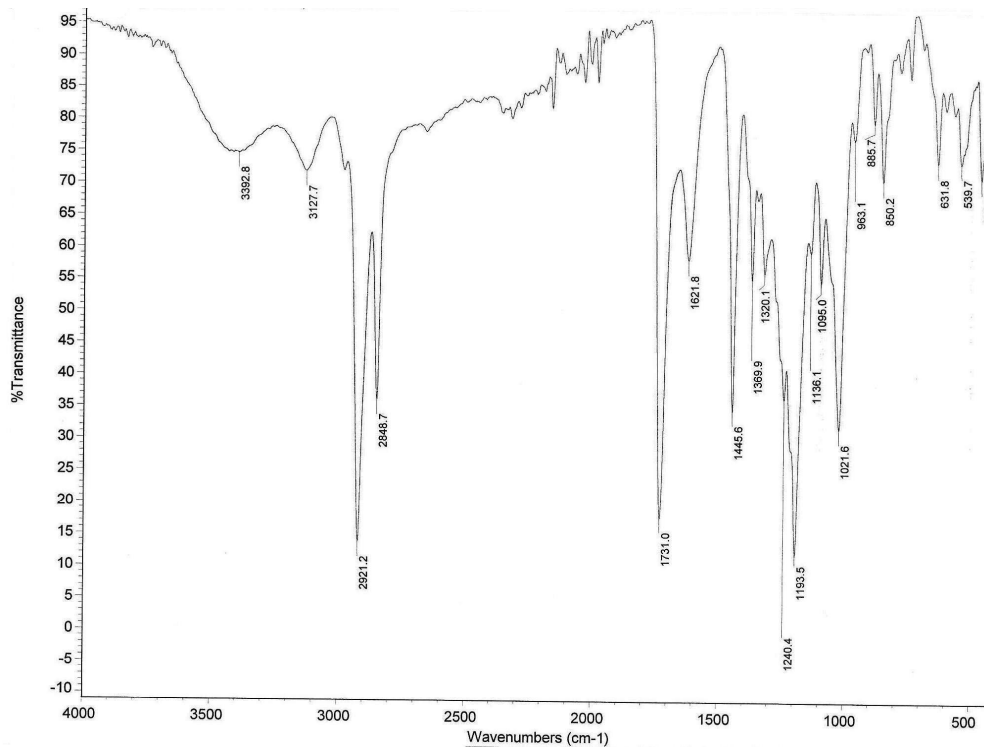
Slika P34. IC spektar kompleksa **K1**.Slika P35. <sup>1</sup>H NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u DMSO-u.

Slika P36.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K1'**, sniman u DMSO-u.Slika P37. IC spektar kompleksa **K1'**.

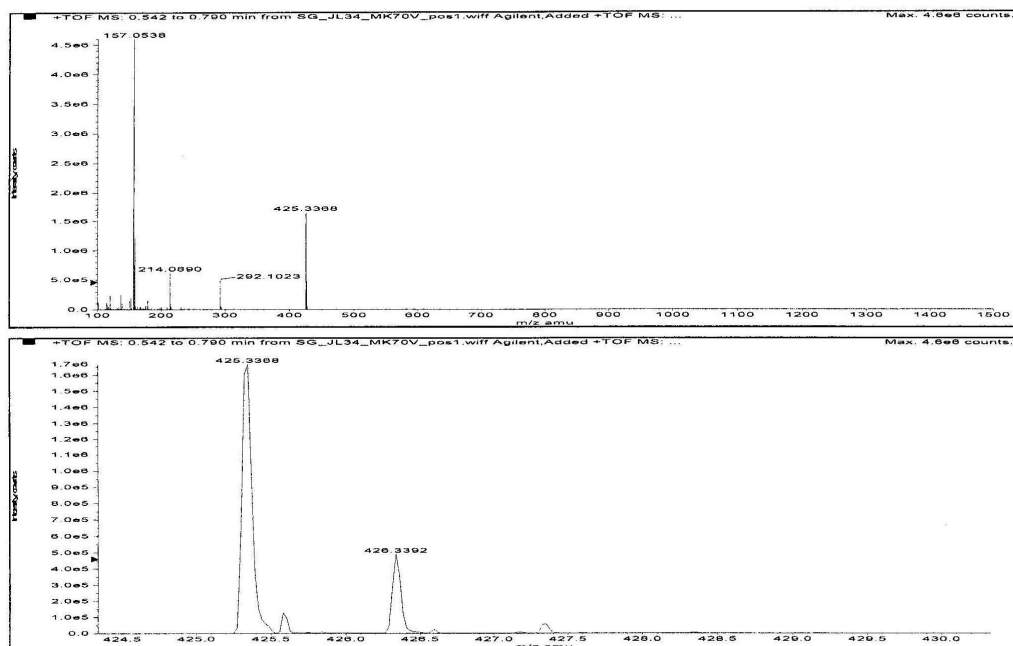
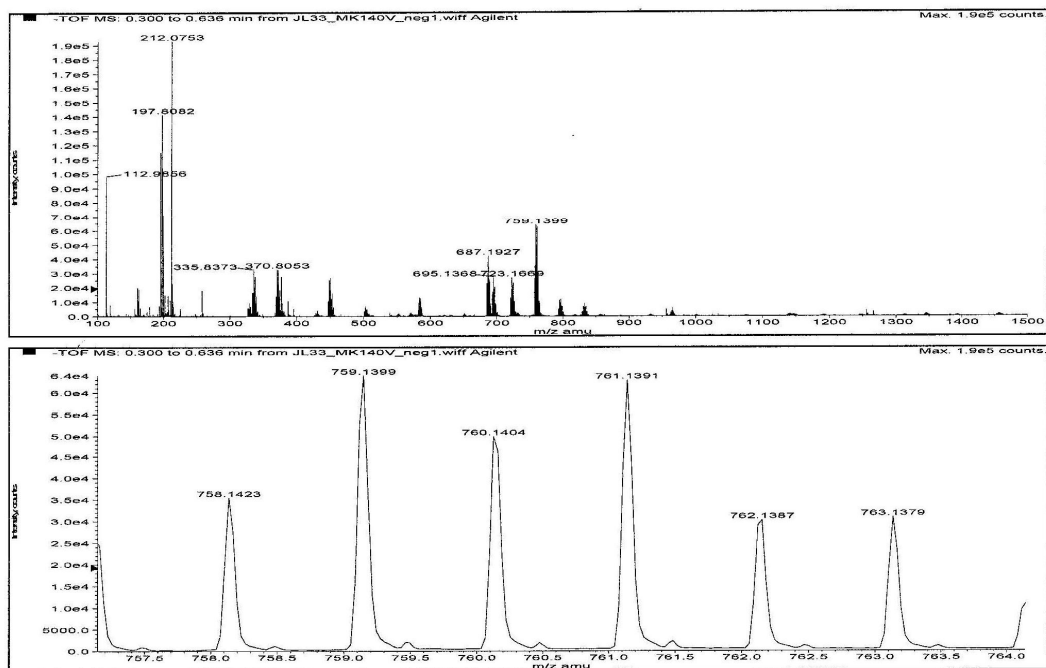
Slika P38.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u DMSO-u.Slika P39.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u DMSO-u.

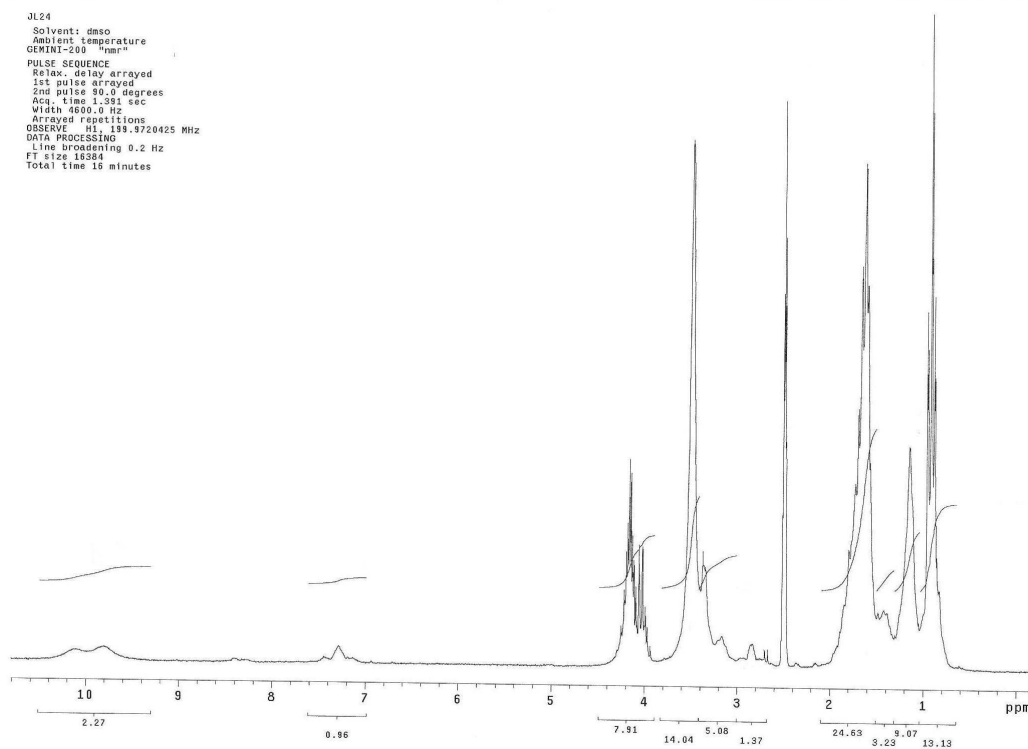
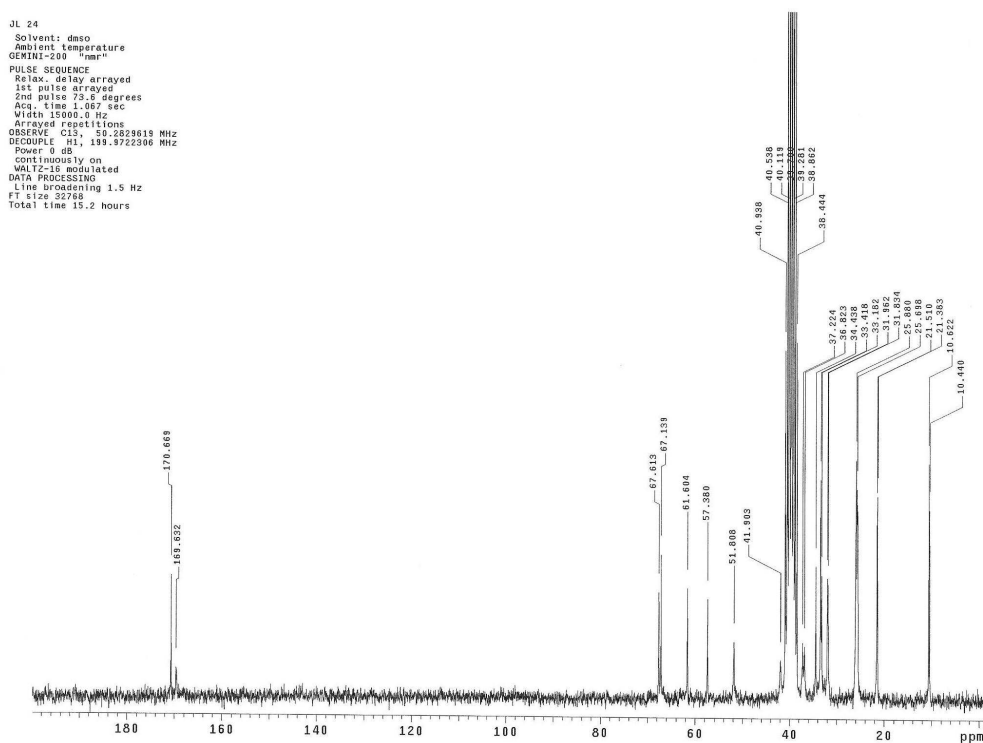
Slika P40. IC spektar kompleksa **K2**.Slika P41. Maseni spektar kompleksa **K2**, sniman u pozitivnom modu.

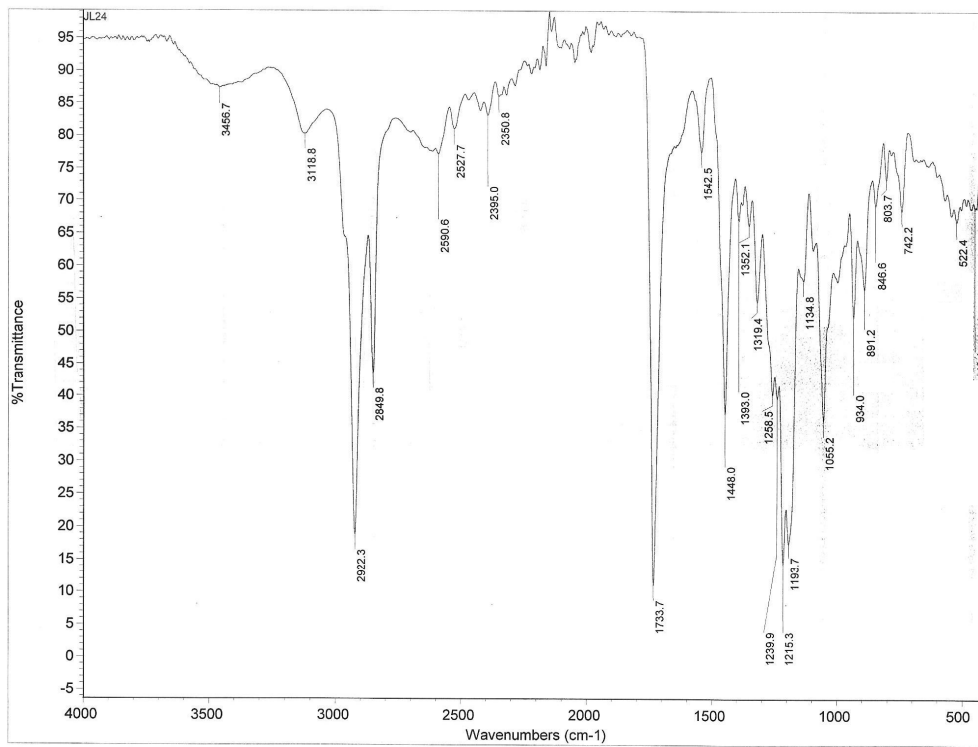
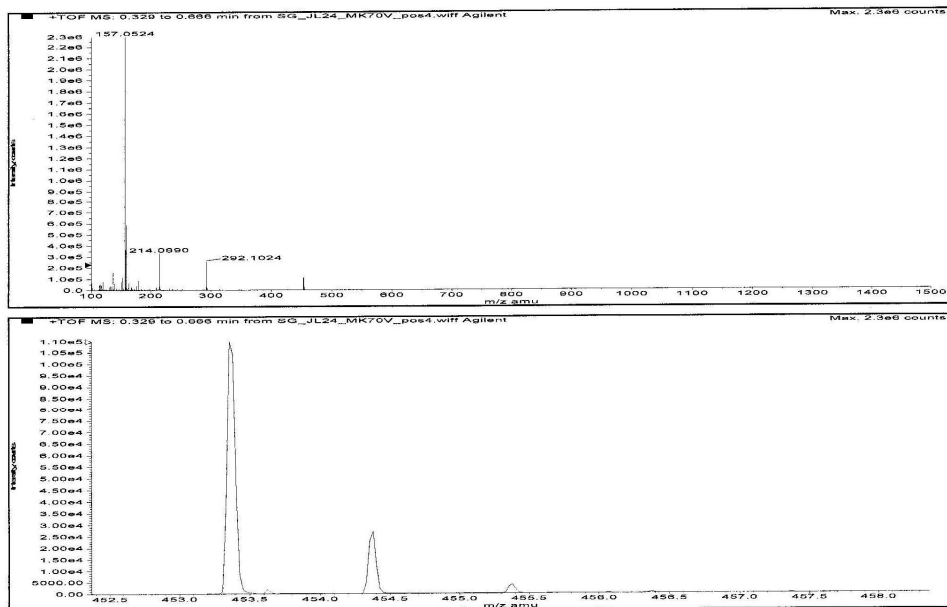
Slika P42. Maseni spektar kompleksa **K2**, sniman u negativnom modu.Slika P43.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u DMSO-u.

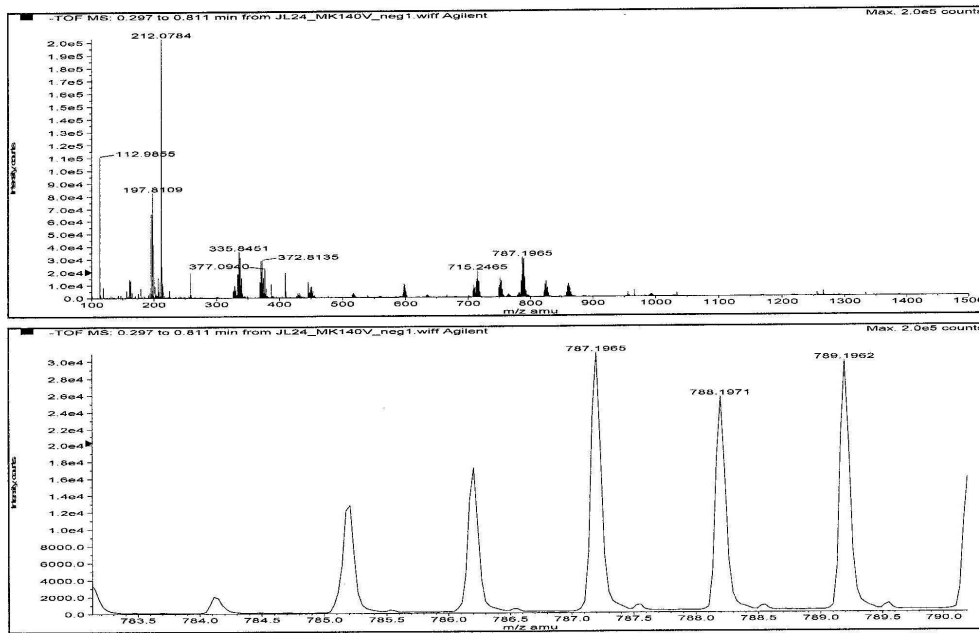
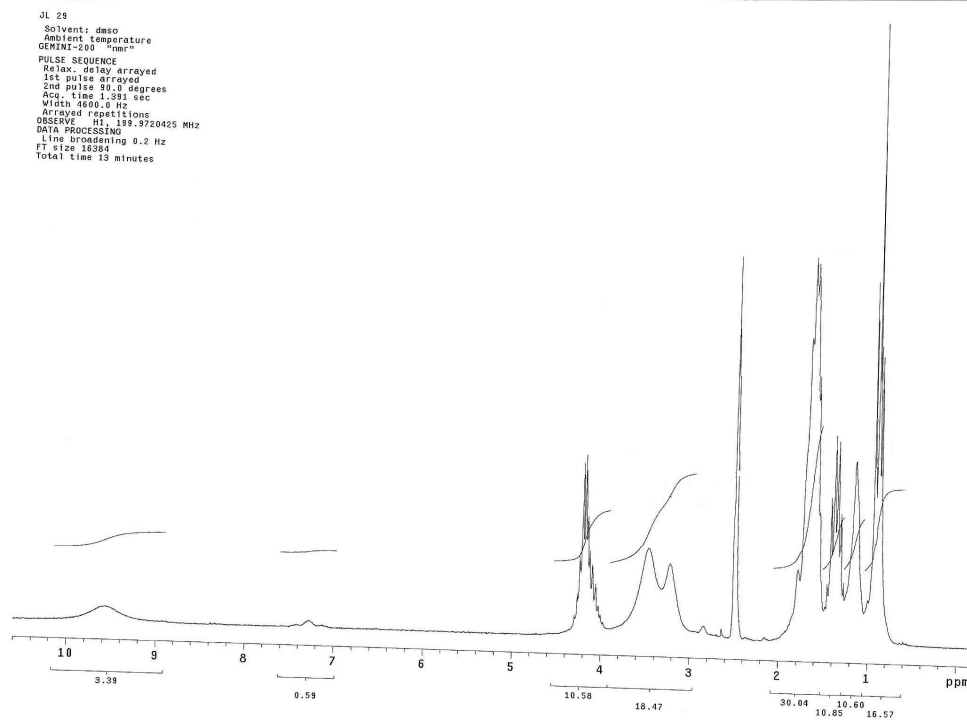
Slika P44.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u DMSO-u.Slika P45. IC spektar kompleksa **K3**.

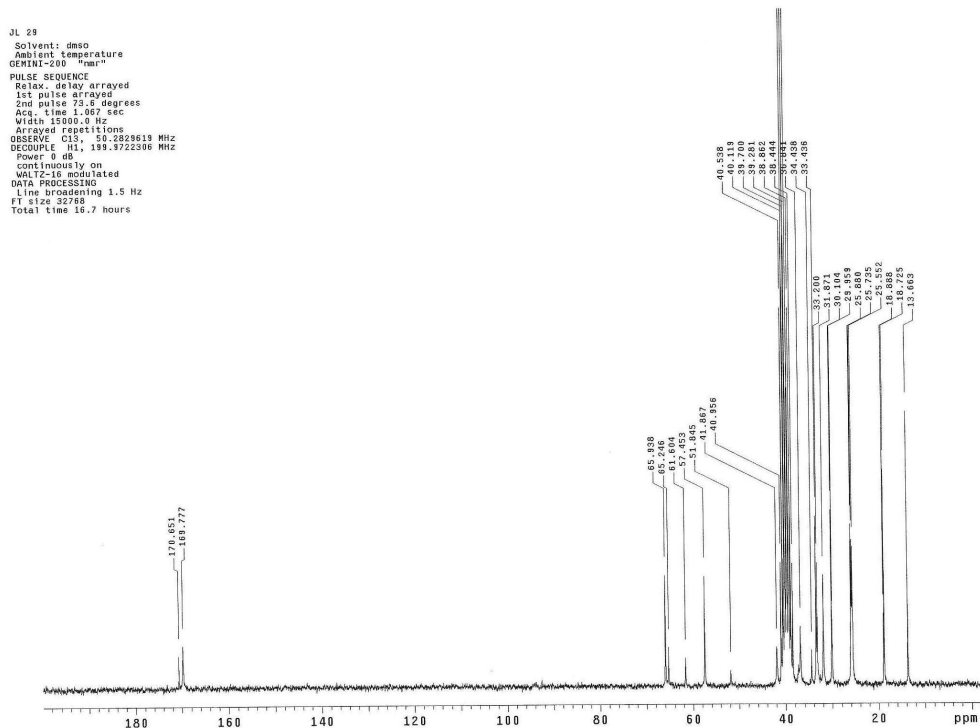
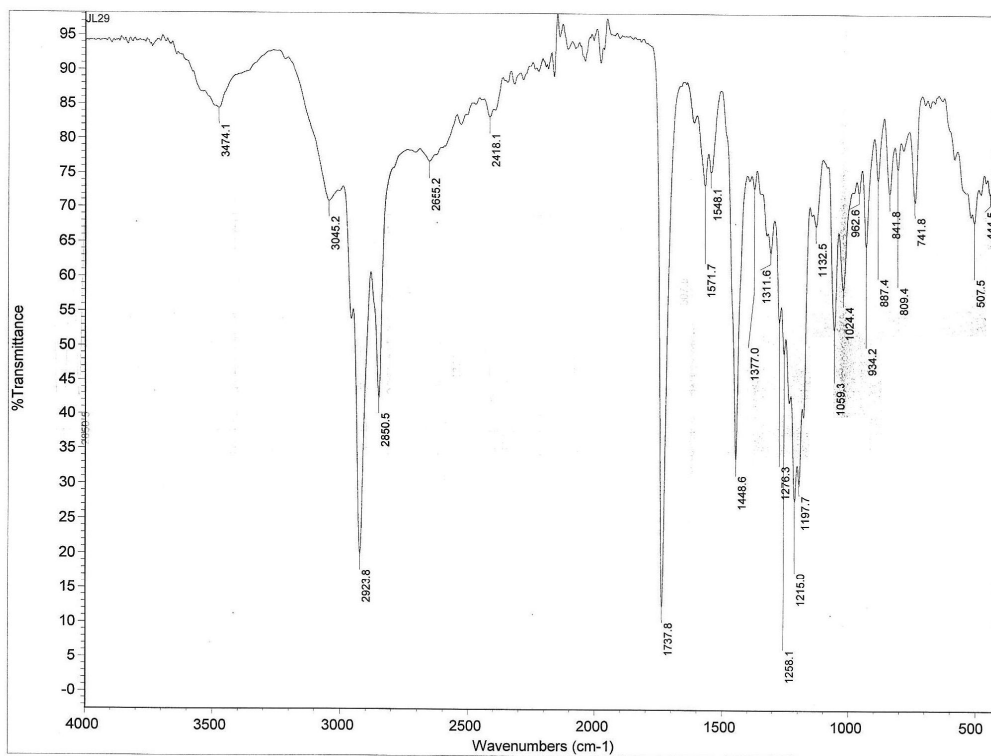


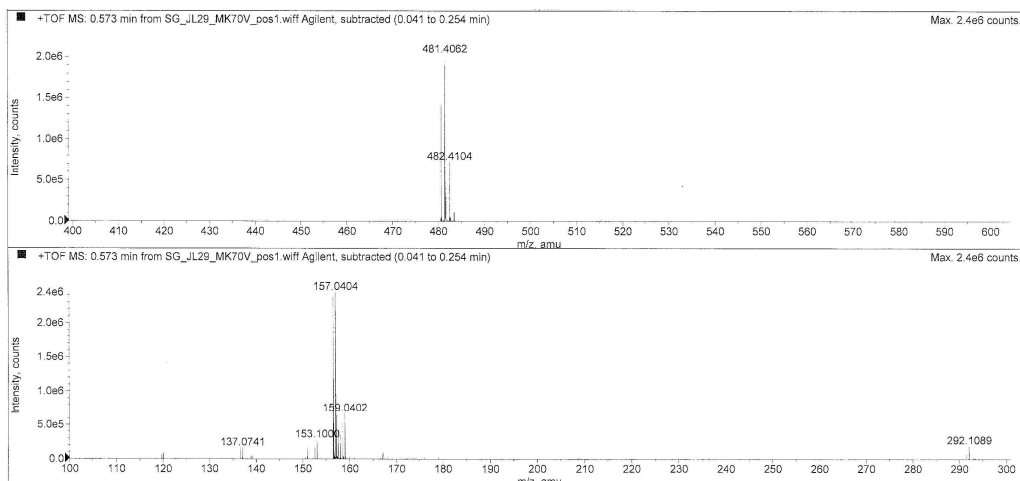
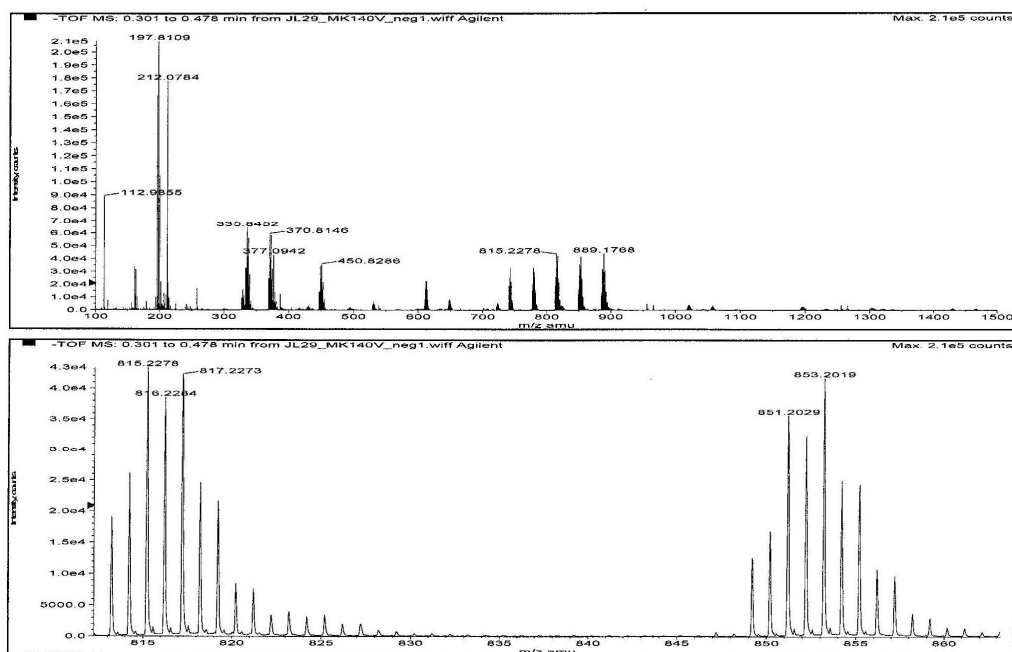
Slika P46. Maseni spektar kompleksa **K3**, sniman u pozitivnom modu.Slika P47. Maseni spektar kompleksa **K3**, sniman u negativnom modu.

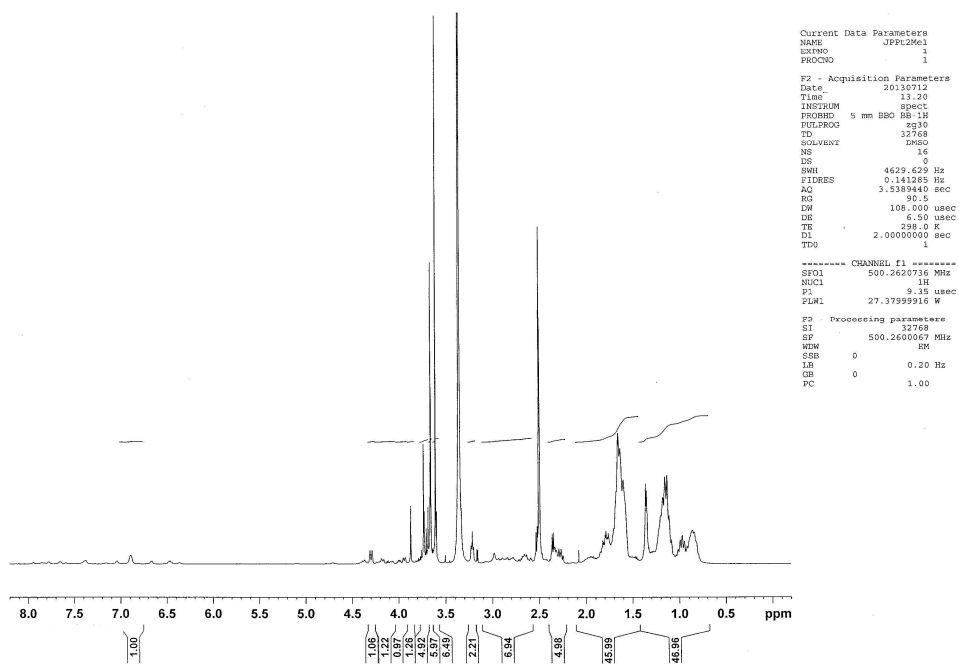
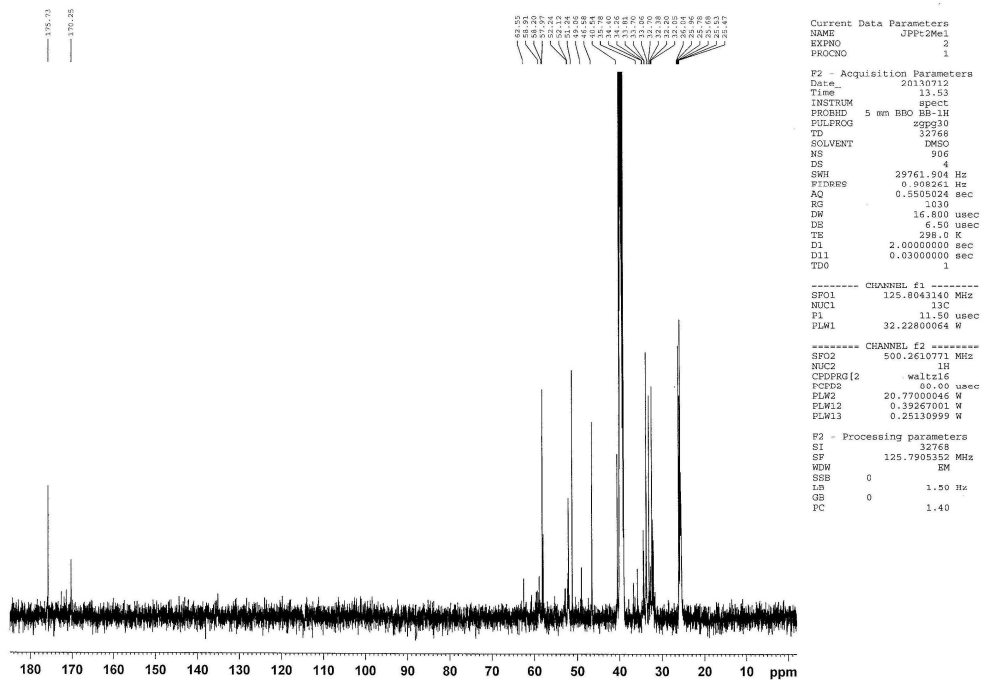
Slika P48.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO-u.Slika P49.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO-u.

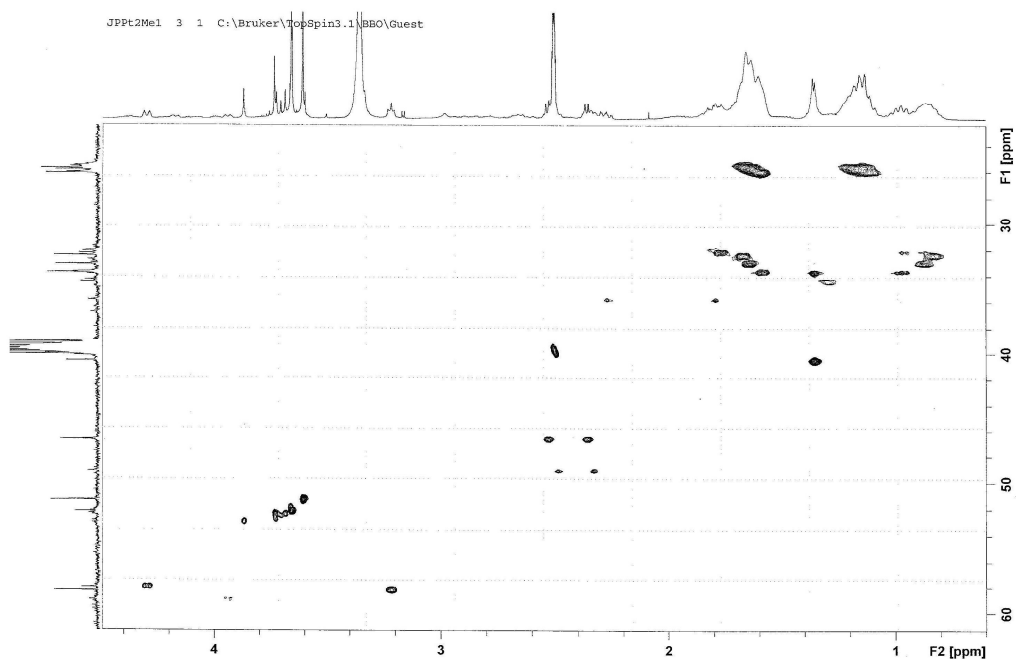
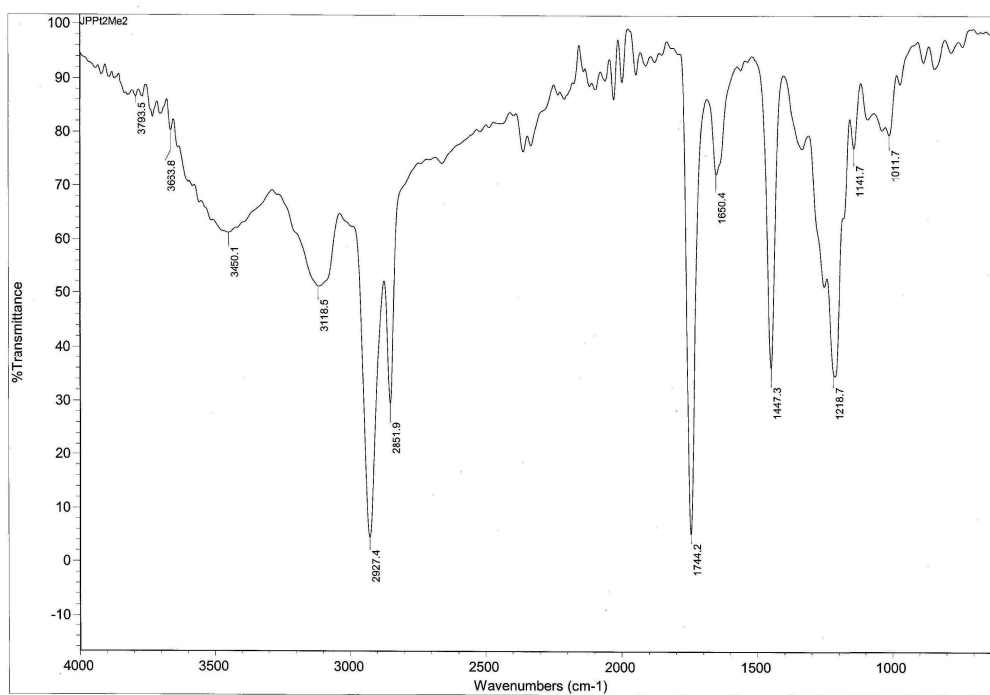
Slika P50. IC spektar kompleksa **K4**.Slika P51. Maseni spektar kompleksa **K4**, sniman u pozitivnom modu.

Slika P52. Maseni spektar kompleksa **K4**, sniman u negativnom modu.Slika P53. <sup>1</sup>H NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO-u.

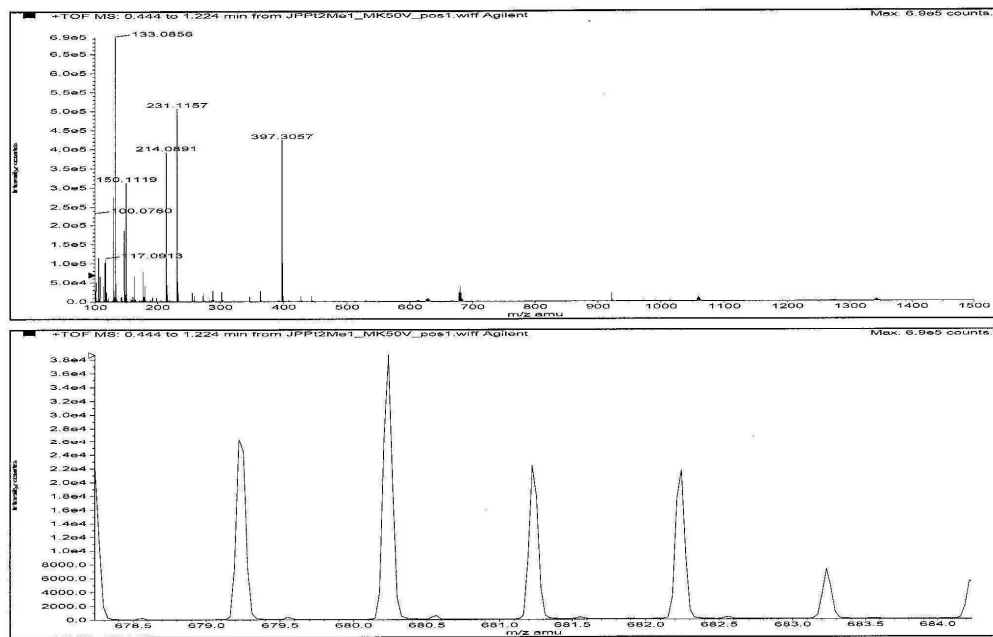
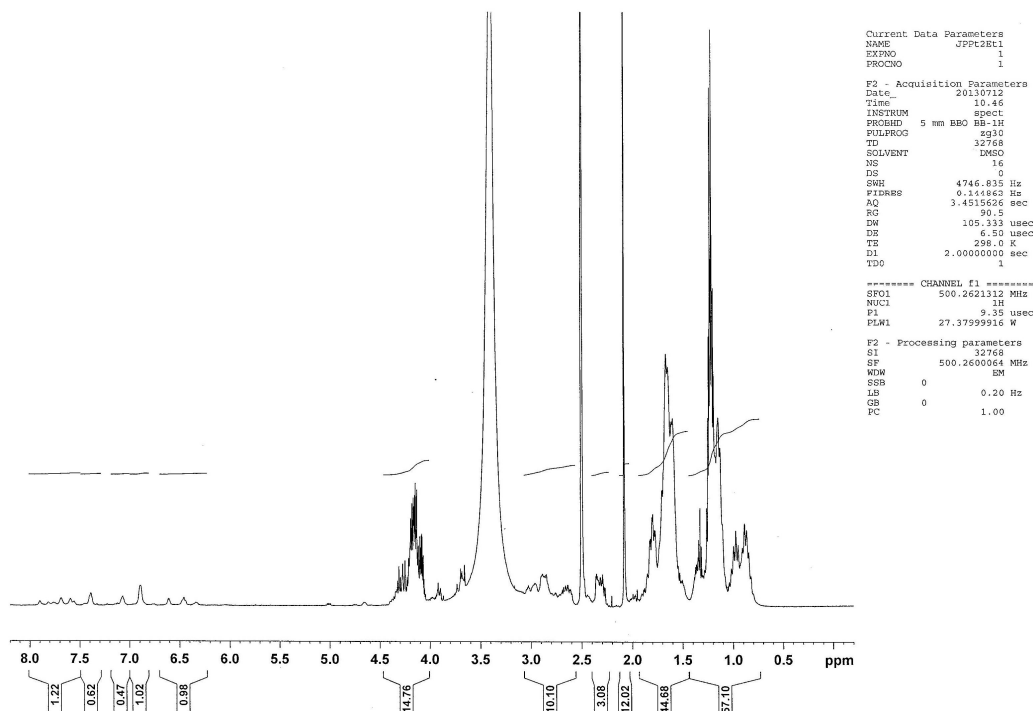
Slika P54.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO-u.Slika P55. IC spektar kompleksa **K5**.

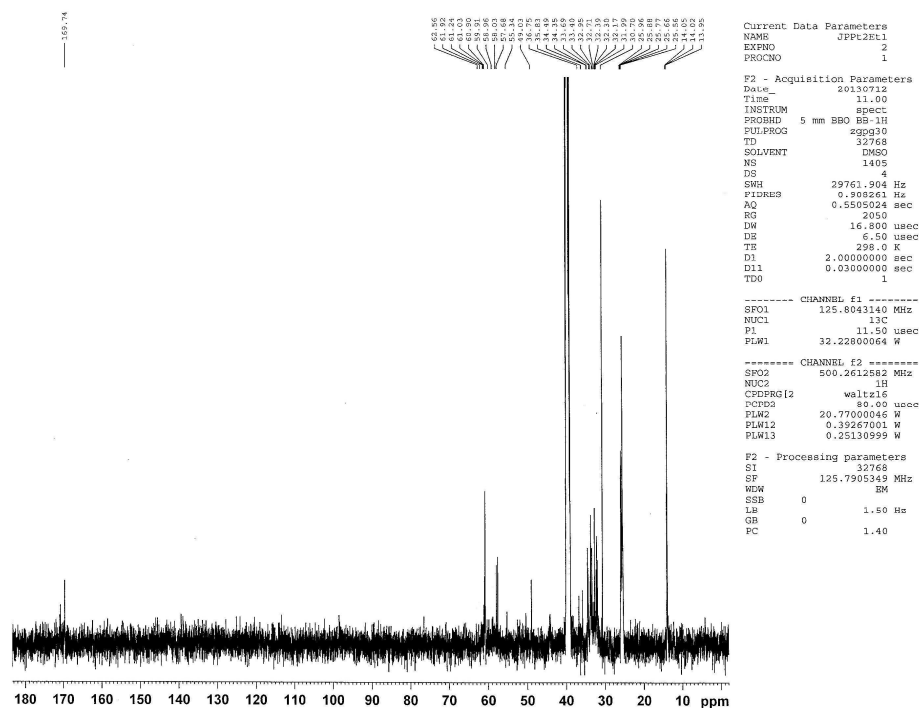
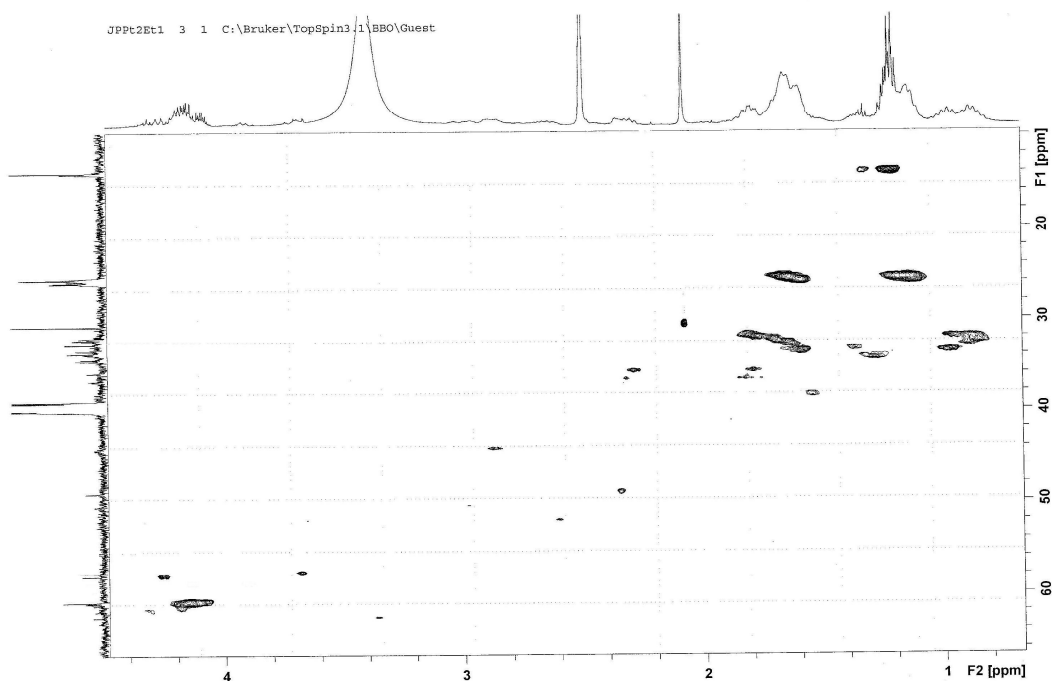
Slika P56. Maseni spektar kompleksa **K5**, sniman u pozitivnom modu.Slika P57. Maseni spektar kompleksa **K5**, sniman u negativnom modu.

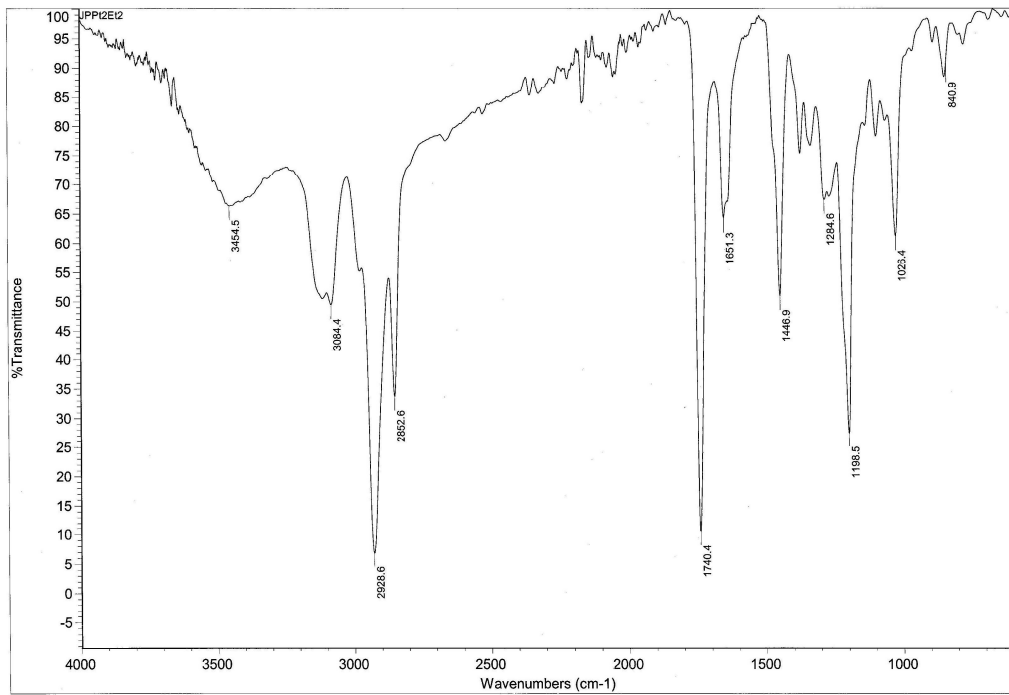
Slika P58.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K2a**, sniman u DMSO-u.Slika P59.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K2a**, sniman u DMSO-u.

Slika P60. HSQC NMR spektar kompleksa **K2a**, sniman u DMSO-u.Slika P61. IC spektar kompleksa **K2a**.

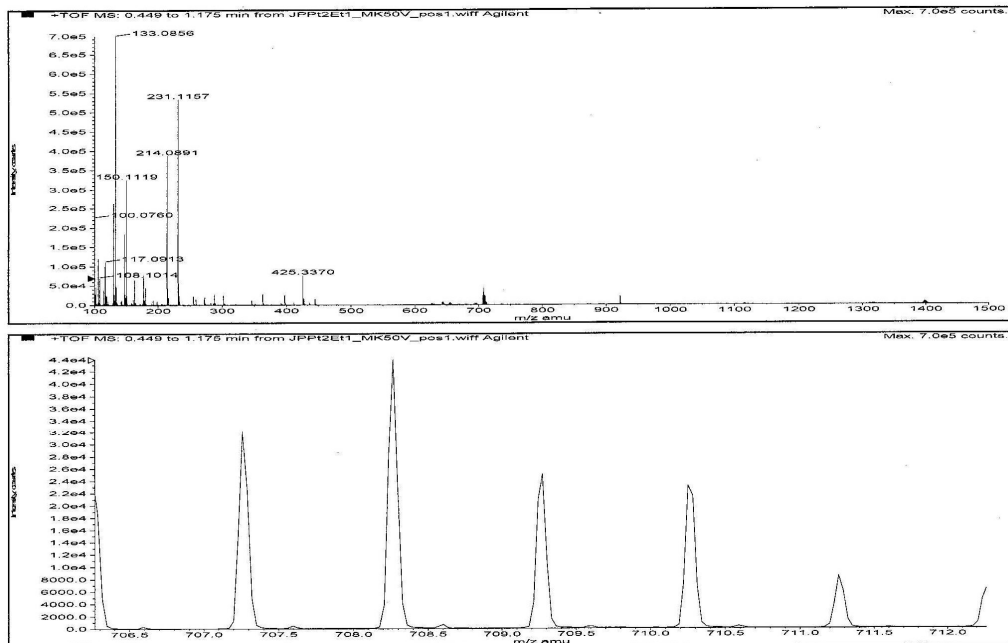


Slika P62. Maseni spektar kompleksa **K2a**.Slika P63.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K3a**, sniman u DMSO-u.

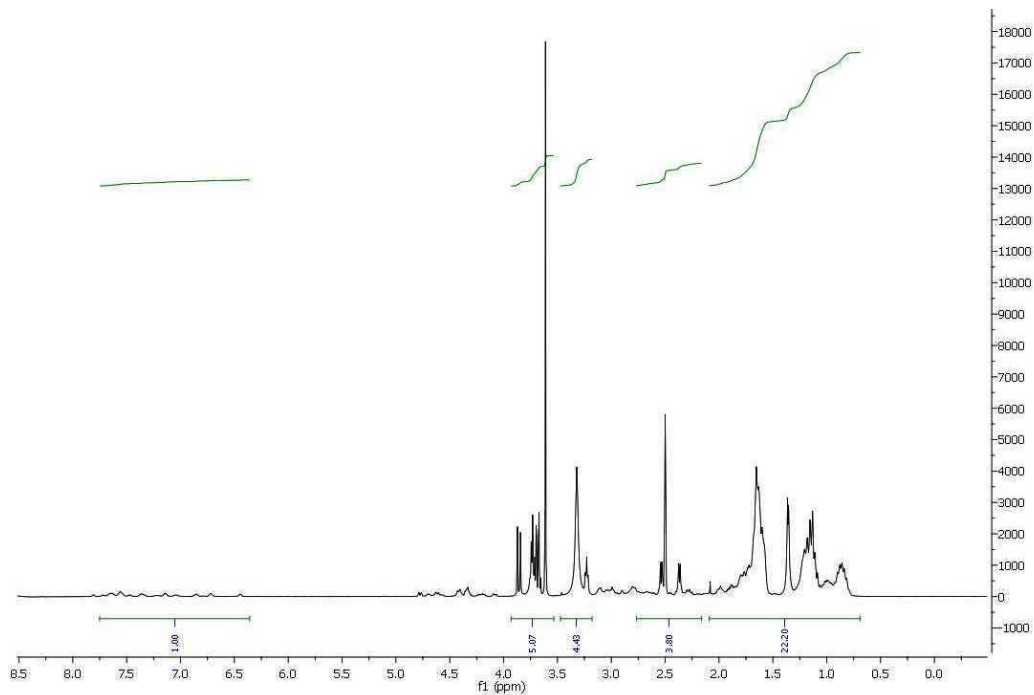
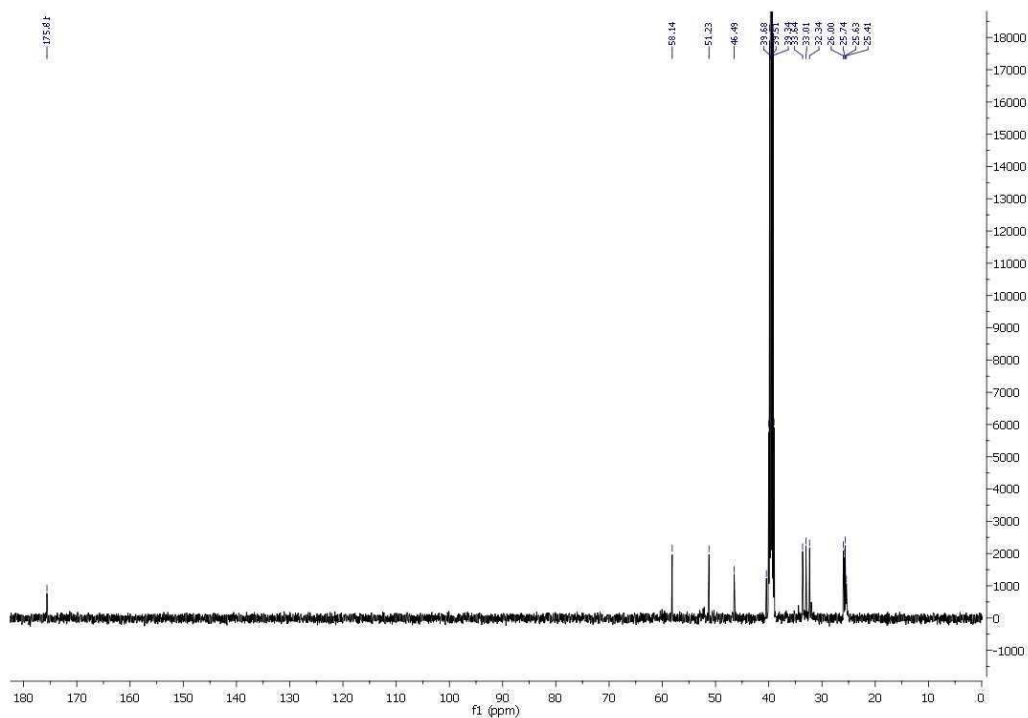
Slika P64.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K3a**, sniman u DMSO-u.Slika P65. HSQC NMR spektar kompleksa **K3a**, sniman u DMSO-u.

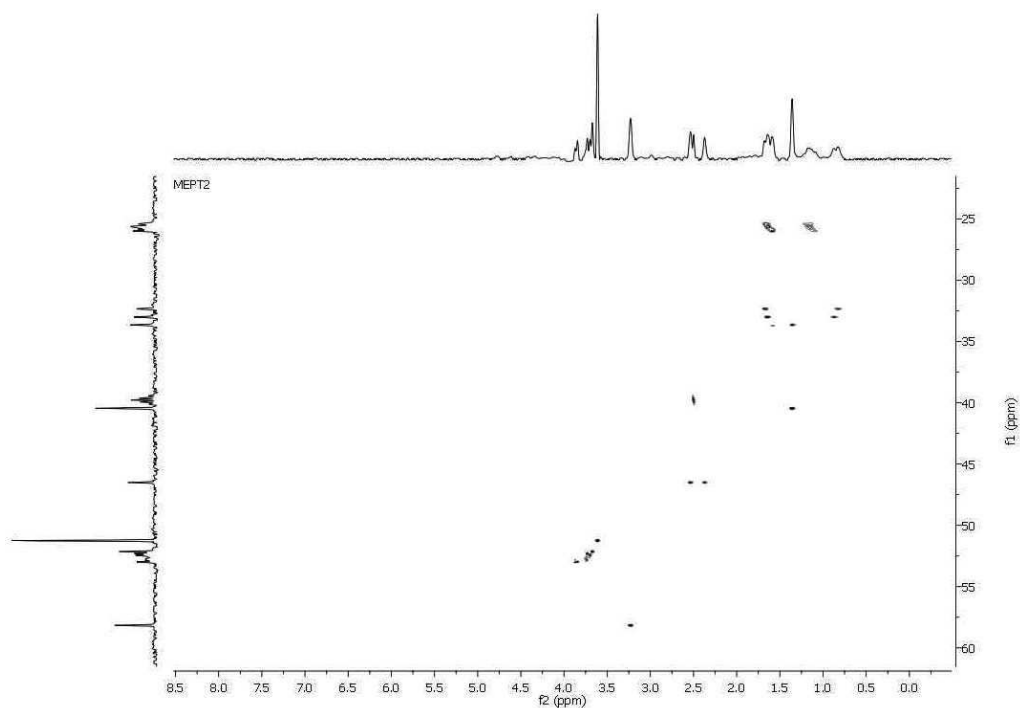
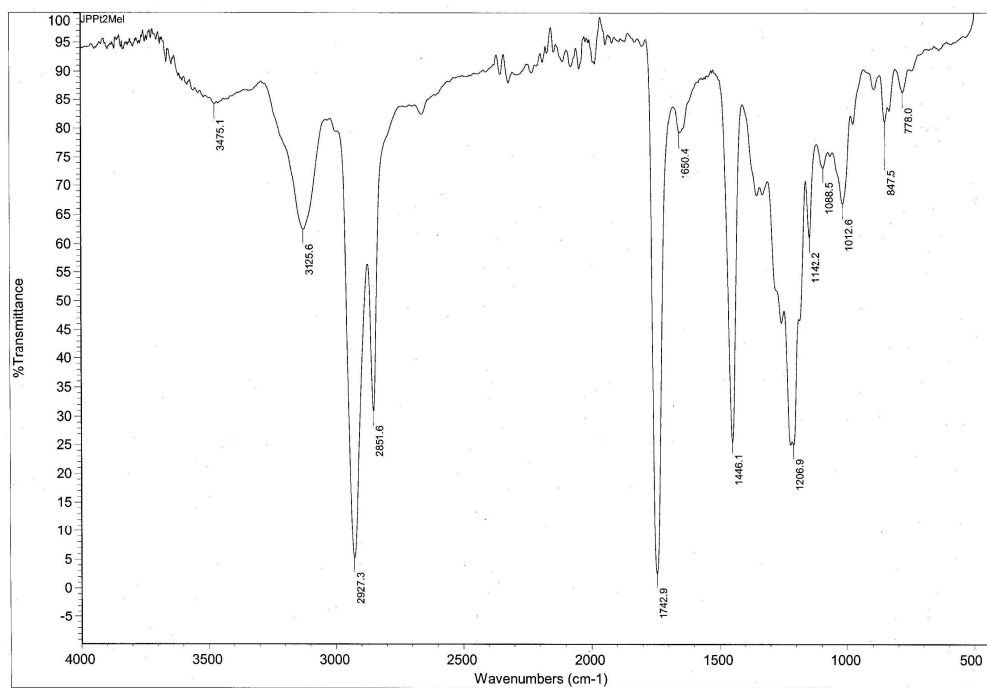


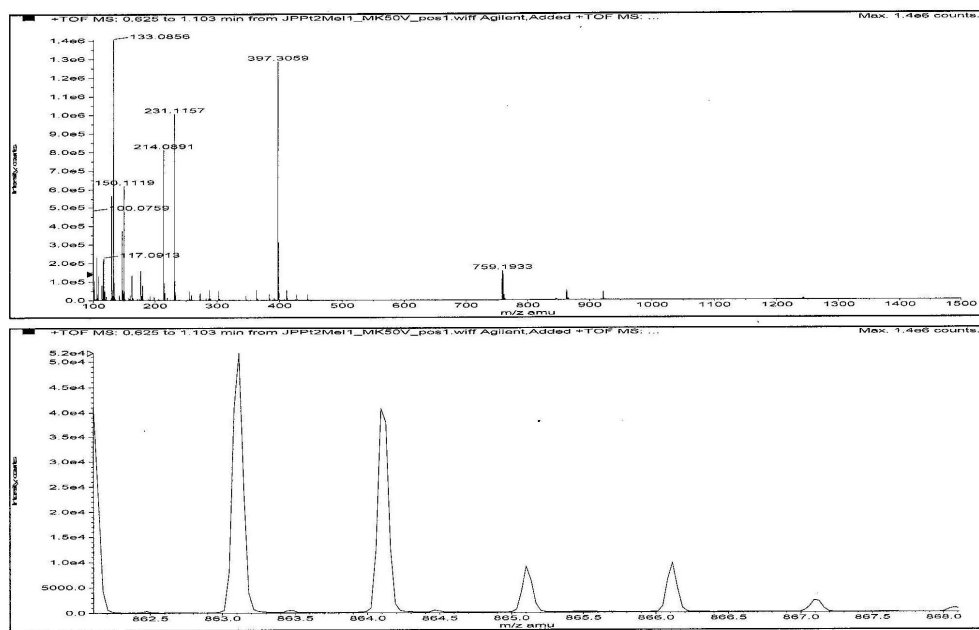
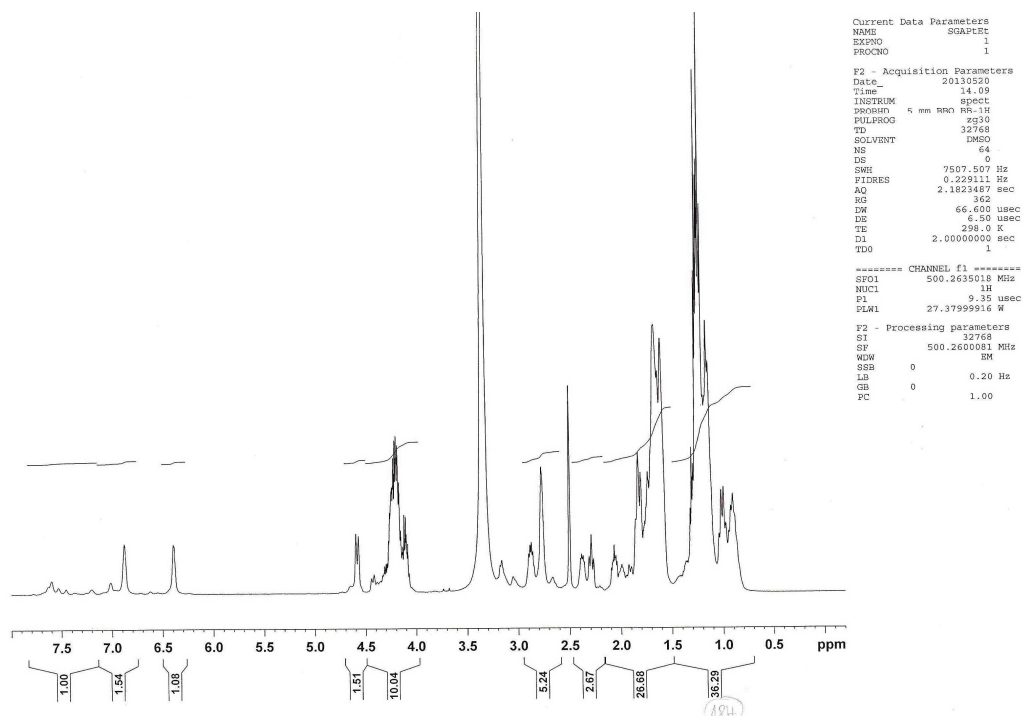
Slika P66. IC spektar kompleksa K3a.

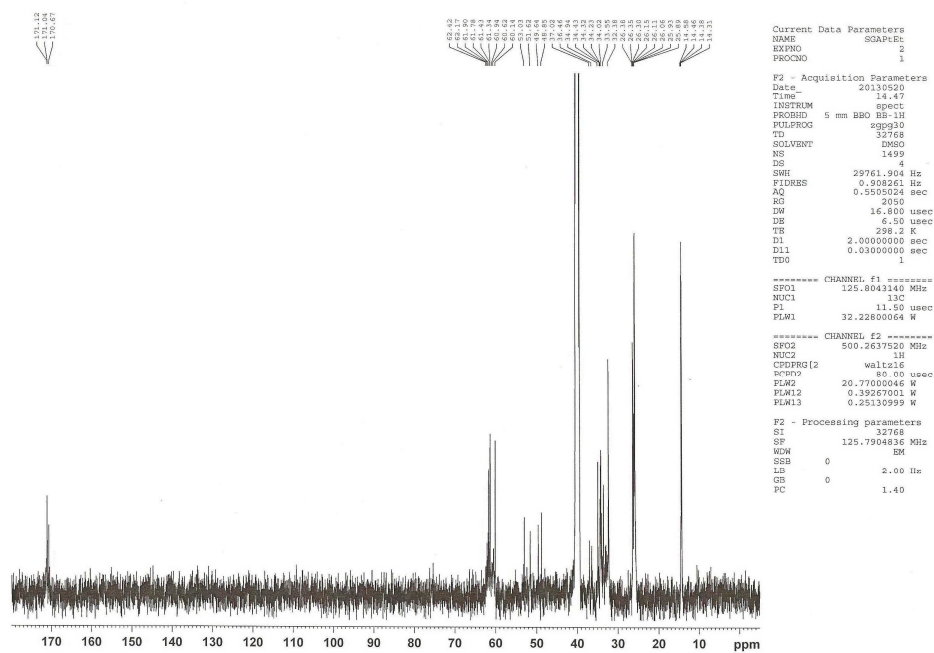
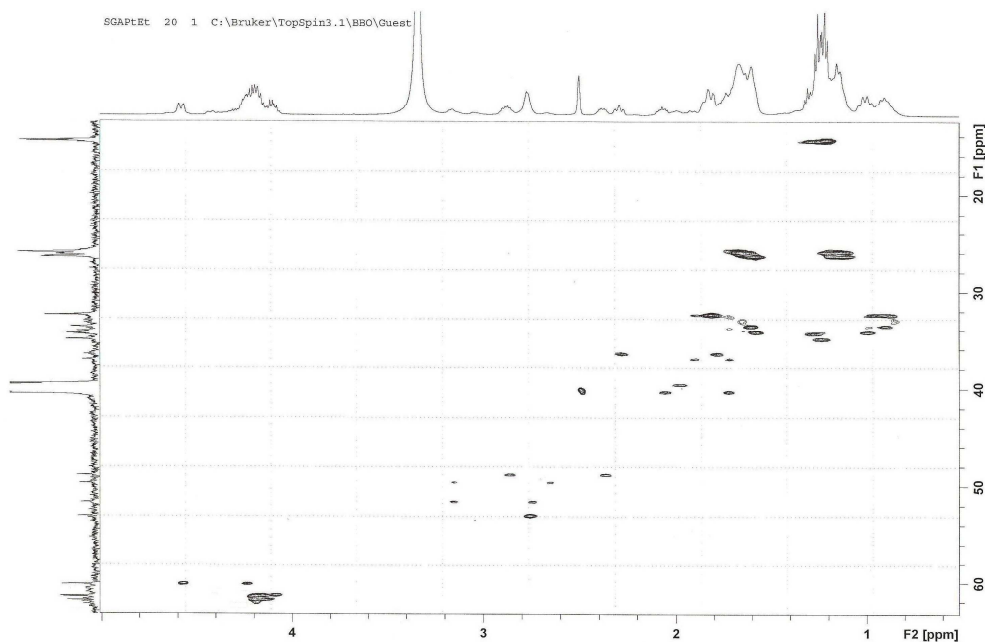


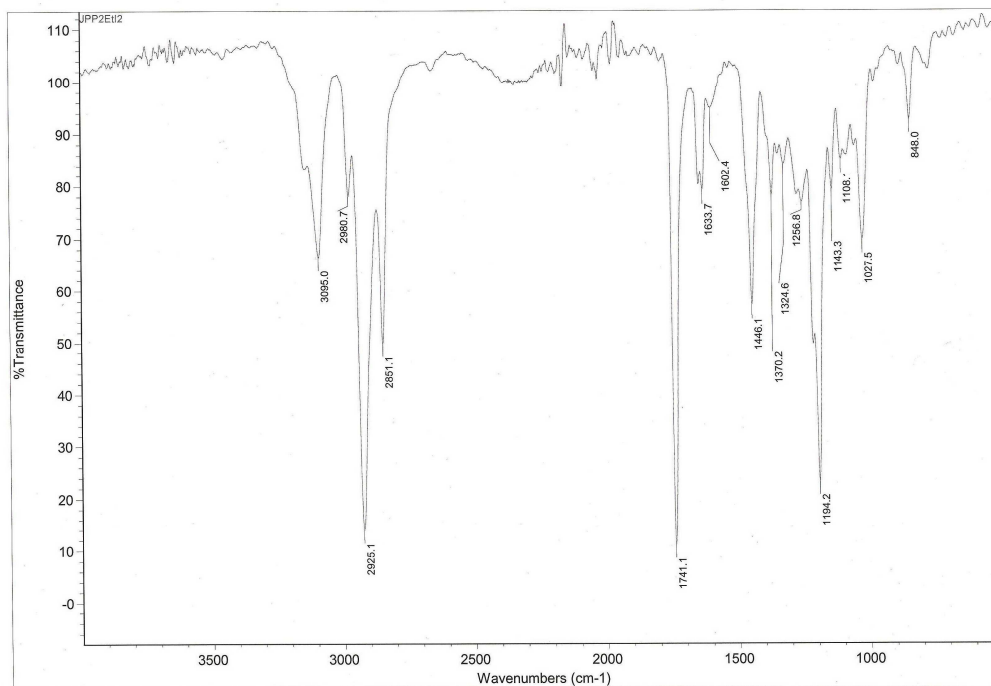
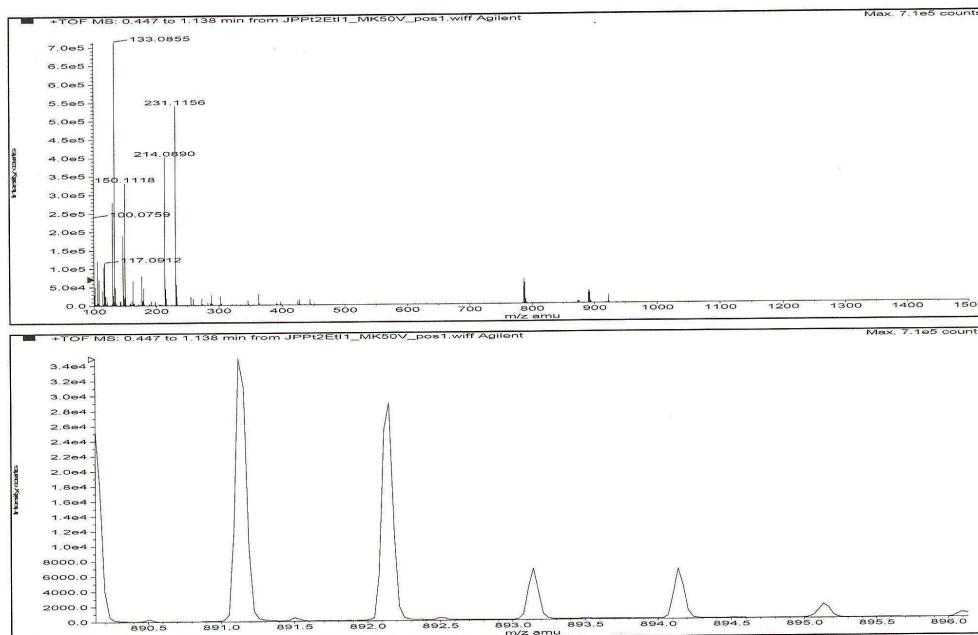
Slika P67. Maseni spektar kompleksa K3a.

Slika P68.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K2b**, sniman u DMSO-u.Slika P69.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K2b**, sniman u DMSO-u.

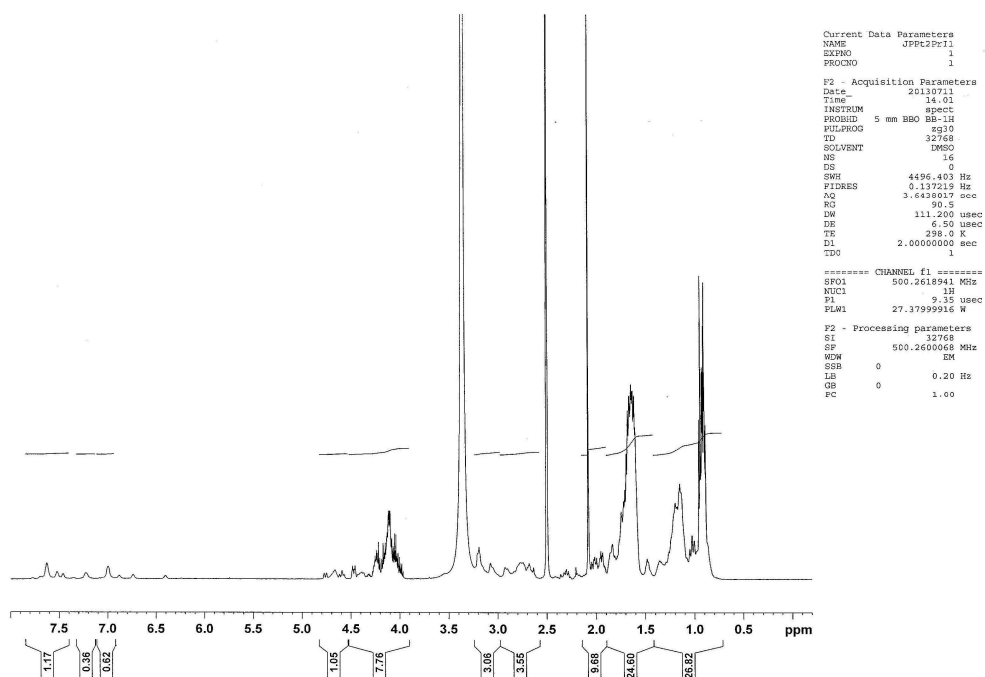
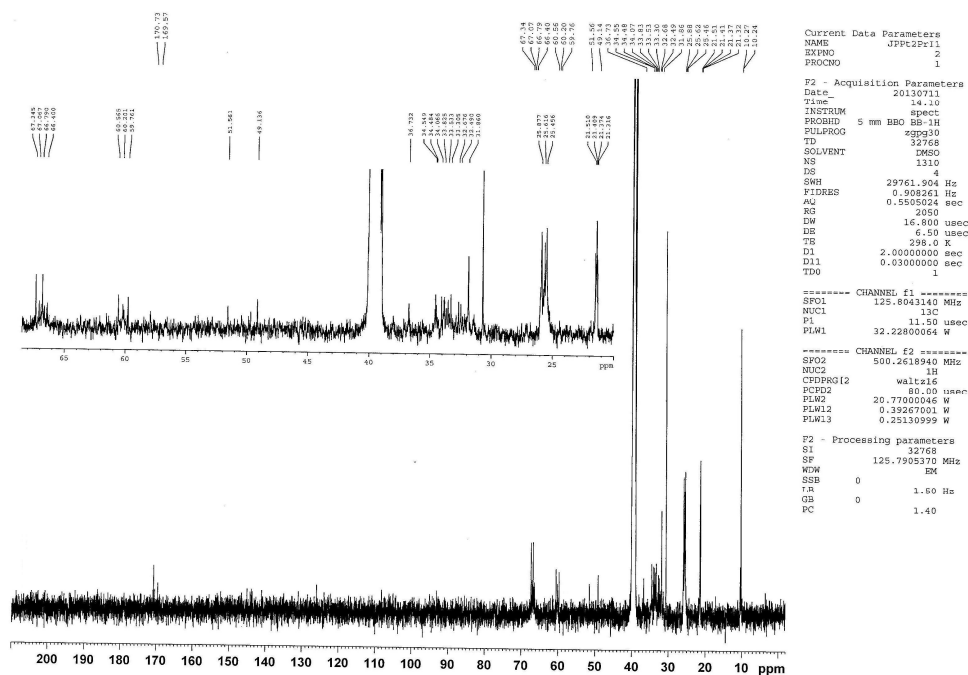
Slika P70. HSQC NMR spektar kompleksa **K2b**, sniman u DMSO-u.Slika P71. IC spektar kompleksa **K2b**.

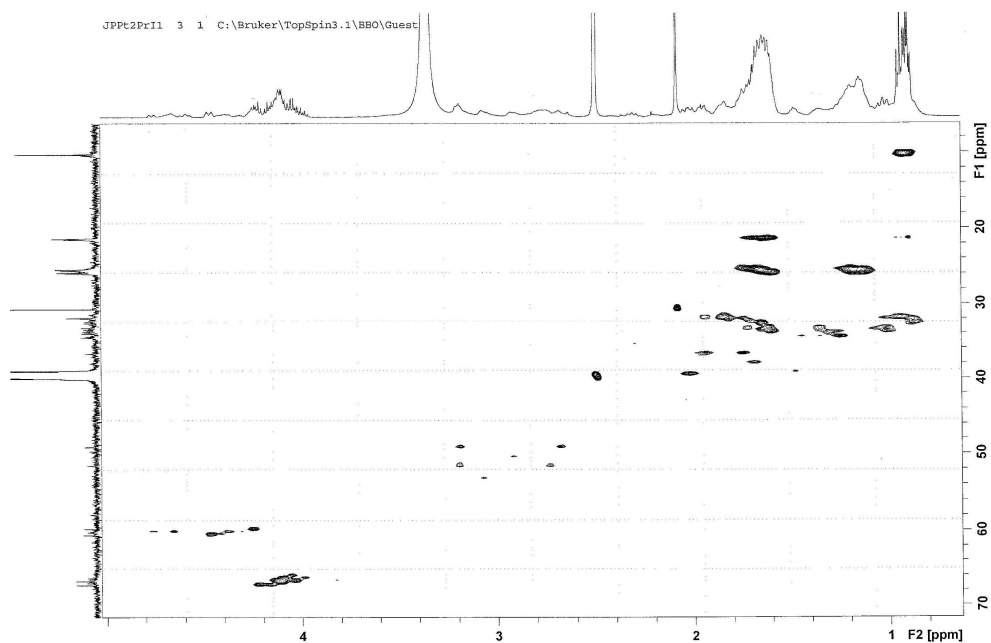
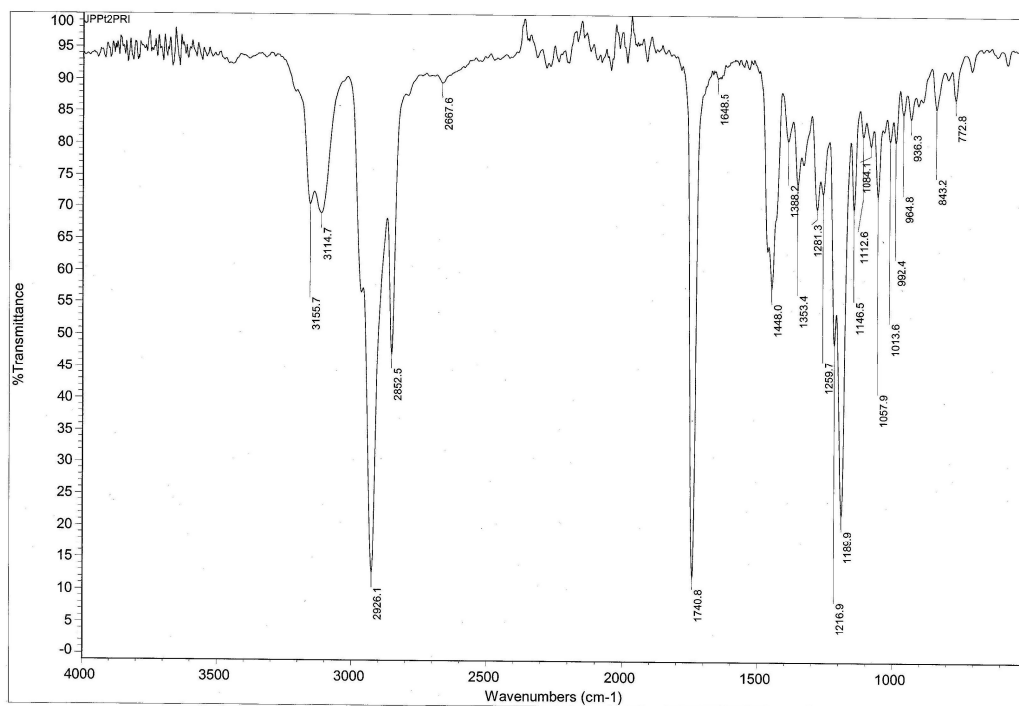
Slika P72. Maseni spektar kompleksa **K2b**.Slika P73.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K3b**, sniman u DMSO-u.

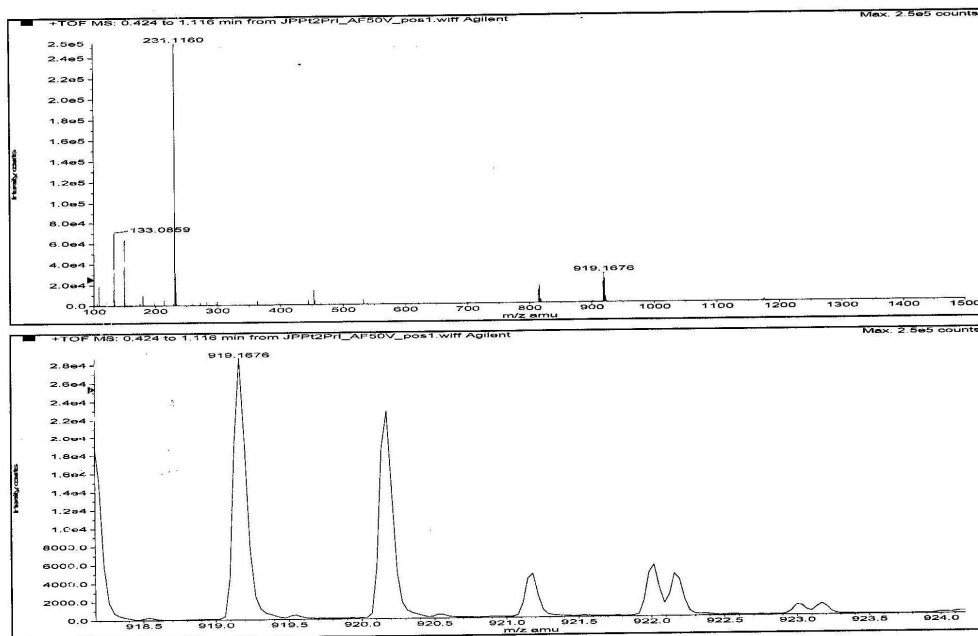
Slika P74.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K3b**, sniman u DMSO-u.Slika P75. HSQC NMR spektar kompleksa **K3b**, sniman u DMSO-u.

Slika P76. IC spektar kompleksa **K3b**.Slika P77. Maseni spektar kompleksa **K3b**.



Slika P78.  $^1\text{H}$  NMR spektar kompleksa **K4b**, sniman u DMSO-u.Slika P79.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar kompleksa **K4b**, sniman u DMSO-u.

Slika P80. HSQC NMR spektar kompleksa **K4b**, sniman u DMSO-u.Slika P81. IC spektar kompleksa **K4b**.

Slika P82. Maseni spektar kompleksa **K4b**.

## **Biografija autora**

**Jelena M. Poljarević (rođ. Lazić)** rođena je 19.12.1983. godine u Kruševcu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa diplomirani hemičar) upisala se 2002. godine. Diplomirala je na Katedri za Opštu i neorgansku hemiju 18.07.2007. godine sa prosečnom ocenom 8,80. Diplomski rad radila je pod rukovodstvom dr Sanje Grgurić-Šipka i odbranila ga ocenom 10. Doktorske studije, na Katedri za opštu i neorgansku hemiju, upisala je školske 2007/2008. godine pod rukovodstvom dr Tibora Saboa i dr Sanje Grgurić-Šipka.

Od 2008. godine zaposlena je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, najpre u zvanju saradnik u nastavi, a od 2010. godine u zvanju asistenta pri Katedri za opštu i neorgansku hemiju.

Član je Srpskog hemijskog društva od 2008. godine, a 2009. i 2010. godine bila je član Komisije za republičko takmičenje iz hemije za đake osnovnih škola.

**Objavljeni naučni radovi koji su direktno proistekli iz teze:**

1. J.M. Lazić, Lj. Vučićević, S. Grgurić-Šipka, K. Janjetović, G.N. Kaluđerović, M. Misirlić, M. Gruden-Pavlović, D. Popadić, R. Paschke, V. Trajković, T.J. Sabo, Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-*N,N'*-diacetate-type ligands, *ChemMedChem.*, **5**, 2010, 881-889. IF(2010) = 3,469, 8/54, *Chemistry, Medicinal*, ISSN 1860-7179.
2. J.M. Poljarević, S. Grgurić-Šipka, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Dibromido[(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoato] platinum(IV). Synthesis, characterization, and DFT calculations, *J. Coord. Chem.*, **64(6)**, 2011, 1016-1022. IF(2011) = 1,143, 31/44, *Chemistry, Inorganic and Nuclear*, ISSN 0095-8972.
3. Đ. Miljković, J.M. Poljarević, F. Petković, J. Blaževski, M. Momčilović, I. Nikolić, T. Saksida, S. Stošić-Grujičić, S. Grgurić-Šipka, T.J. Sabo, Novel octahedral Pt(IV) complex with di-*n*-propyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoato ligand exerts potent immunomodulatory effects, *Eur. J. Med. Chem.*, **47**, 2012, 194-201. IF(2012) = 3,849, 9/59, *Chemistry, Medicinal*, ISSN 0223-5234.

**Saopštenja :**

1. S. Misirlić-Denčić, J. Lazić, A.J. Isaković, T. Živanović-Radnić, M. Dulović, V. Bumbaširević, V. Trajković, A. M. Isaković, T. Sabo, I. Marković, Antileukemic action of novel cyclohexyl analogue of ethilenediamine dipropanoic acid, Eight international conference on mechanisms of cell death and disease: advances in therapeutic intervention and drug development, 14-17 october, 2010, Cascais, Portugal
2. J. M. Lazić, S. Grgurić-Šipka, Lj. Vučićević, V. Trajković, T.J. Sabo, Platinum(IV) complexes with cyclohexyl functionalized edda-type ligands as potential cytotoxic agents, PO-91, Eurobic10, 2010, Thessaloniki, Greece,

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписана Јелена М. Пољаревић

број индекса ДХ20/2007

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Комплекси Pt(II) и Pt(IV) са новим диаминским лигандима: синтеза,  
карактеризација и антитуморска активност

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 9.04.2015.

---

## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена М. Пољаревић

Број индекса ДХ20/2007

Студијски програм Доктор хемијских наука

Наслов рада Комплекси Pt(II) и Pt(IV) са новим диаминским лигандима: синтеза, карактеризација и антитуморска активност

Ментори др Тибор Сабо и др Сања Гргурић-Шипка

Потписана Јелена М. Пољаревић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 9.04.2015.

---



### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

Комплекси Pt(II) и Pt(IV) са новим диаминским лигандима: синтеза,  
карактеризација и антитуморска активност

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 9.04.2015.

---