

Kompleksni spojevi prijelaznih metala: lijekovi i otrovi

Stojić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:123390>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Martina Stojić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kompleksni spojevi prijelaznih metala: lijekovi i otrovi

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Cindrić

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

23. siječnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

6. rujna 2019.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Cindrić

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. IONI PRIJELAZNIH METALA U STANICI.....	4
2.1 Uvod.....	4
2.2 Bakar(I) u citoplazmi kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.3 Prenosnje bakra kroz <i>mitochondrij</i>	6
2.4 Homeostaza bakra u <i>Escherichiji Coli</i>	7
2.5 Homeostaza cinka u <i>Escherichiji Coli</i>	9
§ 3. KOMPLEKSI PRIJELAZNIH METALA KAO ANTITUMORSKI I ANTIVIRUSNI AGENSI.....	11
3.1 Uvod.....	11
3.2 Kompleksi platine(II)	11
3.3 Kompleksi rutenija.....	16
3.4 Kompleksi željeza	20
3.5 Kompleksi vanadija.....	22
3.6 Kompleksi zlata	23
3.6.1 Strukturne formule lijekova zlata	24
3.6.2 Druge terapijske primjene lijekova zlata	26
3.6.3 Pretpostavljeni mehanizam djelovanja lijekova zlata	26
3.6.4 Interakcija zlata(I) s albuminom	27
3.6.5 Toksičnost lijekova zlata	29
3.6.6 Interakcija zlata (III) s peptidima.....	30
§ 4. STRATEGIJE U DIZAJNIRANJU LIJEKOVA	32
4.1 Farmakokinetika: Termodinamička stabilnost i kinetička labilnost.....	32
4.2 Razvoj lijekova	33
4.2.1 Preklinički razvoj lijeka	33
4.2.2 Klinički razvoj lijeka	34
§ 5. LITERATURNI IZVORI.....	35

§ SAŽETAK

Kemijski i biološki učinak lijekova na organizam, koji može biti željen i neželjen, ovisi o njegovim značajkama kao što su struktura i fizičko-kemijska svojstva. Oni su jedan od najvažnijih dodirnih točaka biokemije i medicine. Sukladno strukturi lijekovi mogu biti građeni od organskih molekula ili prijelaznih metala. Najvažnija prednost lijekova baziranih na metalima kao anorganskim spojevima u odnosu na lijekove izvedene iz organskih molekula leži u njihovoj sposobnosti variranja koordinacijskog broja, geometrije i redoks stanja. Prijelazni metali mogu biti kordinirani s organskim ili biološkim molekulama stvarajući komplekse izmijenjenih farmakoloških svojstava. Farmakologija je znanost koja se bavi otkrivanjem, kemijskim sastavom, utvrđivanjem građe, biološkim učincima, primjenom i proizvodnjom lijekova. Među poznatim prijelaznim metalima u lijekovima ističu se: bakar(Cu), cink(Zn), zlato(Au), platina(Pt), rutenij(Ru), željezo(Fe) i vanadij(V). Metalni kompleksi pokazali su se aktivnima u liječenju različitih bolesti, uzrokovanih virusima kao i u liječenju karcinoma. Najčešće djeluju putem vezanja na proteine ili specifične enzime inhibirajući ih ili modulirajući njihovu aktivnost na neki drugi način. Kao anorganski spojevi se moraju moći na jednostavan način primijeniti na bolesnoj osobi i moraju u organizmu ostati nepromijenjeni dovoljno dugo kako bi dospjeli do ciljnih mjesta. Uz to, važno je u kojoj mjeri anorganski spojevi mogu biti dostupni u organizmu. Oni ne smiju osim djelovanja na svoje ciljne biološke molekule utjecati na svojstva drugih molekula u organizmu da ne izazovu oštećenje, pa je potrebno poznavati njihova toksikološka svojstva. Toksikologija je grana kemije koja se bavi različitim oblicima djelovanja štetnih tvari na žive organizme ili pak djelovanjem tih organizama na tvari koji u njih dospijevaju. Da bi se provjerilo da potencijalni lijek nije toksičan, nužna su skupa i dugotrajna istraživanja i testiranja na životinjama i ljudima.

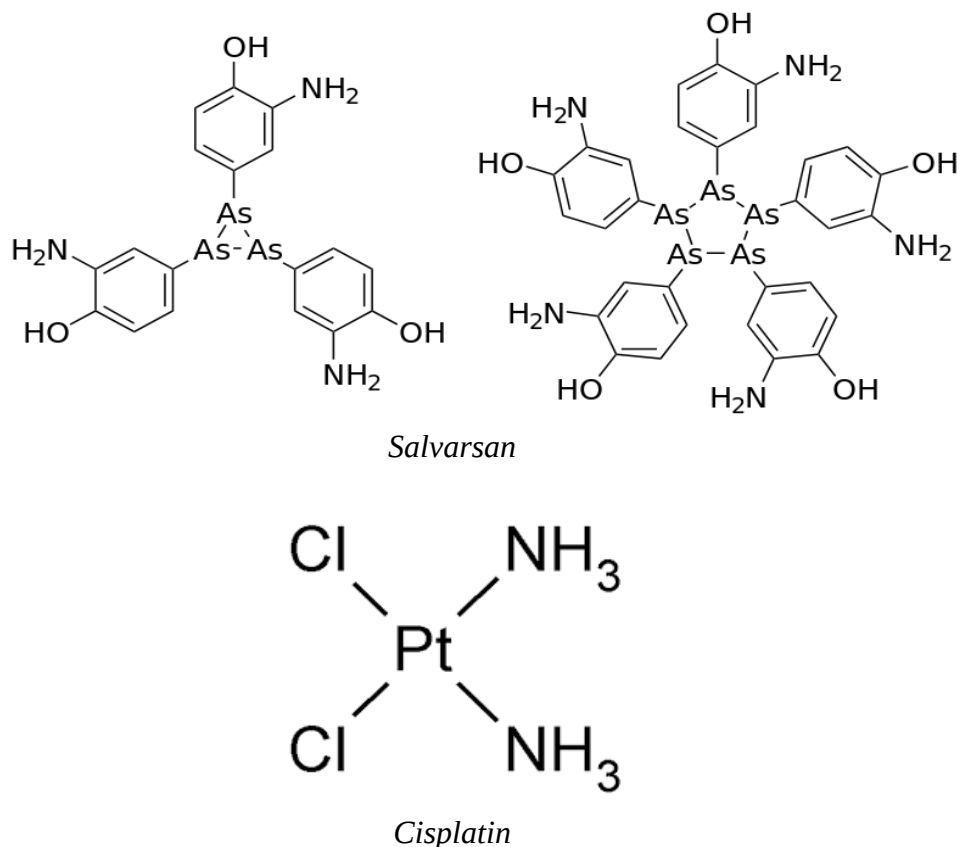
§ 1. UVOD

Kompleksni spojevi su najčešće ionski spojevi odnosno kompleksne soli, građene od središnjeg iona(kationa) koji je okružen određenim brojem molekula ili iona koje nazivamo ligandima.¹ Središnji ioni su često prijelazni metali kao što su zlato(Au), platina(Pt), rutenij(Ru), željezo(Fe), vanadij(V), dok su ligandi najčešće anioni: fluoridni(F⁻), kloridni(Cl⁻), cijanidni(CN⁻), hidroksidni(OH⁻), nitritni(NO₂⁻).

Glavna karakteristika metala je da lako gube elektrone, stvarajući pozitivan naboj što ih čini topljivim u biološkim tekućinama, s obzirom na to da su većina bioloških molekula kao što su proteini i DNA bogate elektronima.² To dovodi do nastanka veze između metalnih iona i bioloških molekula. Isti princip vrijedi i za afinitet metalnih iona prema malim molekulama i ionima koje su od životne važnosti, kao što je kisik.² Metali imaju različite funkcije:³

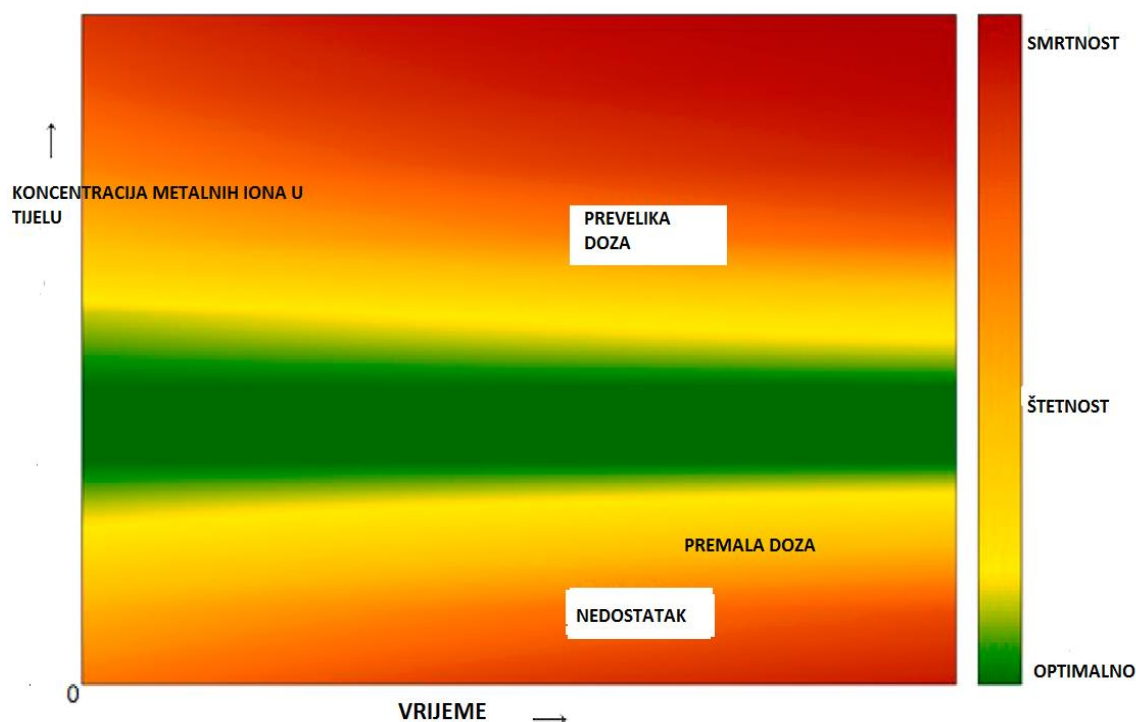
1. Prisutni su u staničnim strukturama uključujući membrane, mitohondrije, endoplazmatski retikulum (ER), citoplazmu.
2. Sudjeluju u staničnim procesima (proizvodnji energije kroz prijenos elektrona, detoksikaciju).
3. Igraju važnu ulogu u vitalnim biokemijskim reakcijama proteina, enzima, nukleinskih kiselina. Najbolji primjeri su: hemoglobin, protein vezan na Fe koji veže kisik prenoseći ga do drugih tkiva ili Cu koji je vezan na proteine kao metaloenzim čime su olakšane mnoge reakcije važne za život.
4. Metalni ioni se na stanične komponente vežu koordiniranjem ili ionskim vezama, čime mogu mijenjati strukturu vезnog mjesta.
5. Vezanjem metala na DNA i proteine dolazi do nastanka lezija, kidanja lanaca i modifikacije baza čime metal utječe na stanični odgovor.

Uz svu tu široku upotrebu metala koju je omogućila priroda, glavno pitanje je: mogu li se metalni ioni ugraditi u lijekove? Jesu li koordinacijski spojevi potencijalni membranski agensi? Na to pitanje pokušava odgovoriti medicinska anorganska kemija.² To je disciplina koja se razvila posljednjih trideset godina, od otkrića antitumorskog djelovanja cisplatina, *cis*-[Pt(NH₂)₂Cl₂], koja nastoji proširiti spektre znanja u otkrivanju novih lijekova koji sadrže metalne ione koji bi bili učinkovitiji, te imali manje popratnih neželjenih pojava.



Slika 1. Primjeri anorganskih spojeva koji se koriste u dijagnostici i kao terapeutici ^{4 5}

Prvi terapijski anorganski spoj bio je *Salvarsan* (slika 1.). To je arsenov antimikrobiološki reagens. Otkrio ga je Paul Ehrlich pod imenom 606, a radi se o smjesi 3-amino-4-hidroksifenil-arsenovih(III) spojeva koja je bila uspješan lijek protiv sifilisa.⁶ P. Ehrlich je tako dobio Nobelovu nagradu 1908. godine za otkriće u području imunokemije.² Nakon otkrića *Salvarsana*, uslijedio je razvoj niza drugih specifičnih anorganskih spojeva u liječenju određene vrste bolesti. Glavna karakteristika svih anorganskih spojeva je njihova doza koja ima dvojako djelovanje u organizmu, a to najbolje predodžuje Bertrandov dijagram (slika 2.).



Slika 2. Bertrand dijagram prikazuje ovisnost koncentracije metalnih iona u tijelu ovisnosti o vremenu ⁶

Područje optimalnog fiziološkog unosa lijeka varira sukladno vrsti metalnih elemenata i njihovom oksidacijskom stanju. Prekomjernom dozom unosa metala, tijelo može reagirati burno, ovisno o dozi unosa metala.²

Stoga je cilj ovog rada prikazati spojeve s dobrim i lošim toksikološkim i farmakološkim svojstvima i djelovanjima na organizam čovjeka.

§ 2. IONI PRIJELAZNIH METALA U STANICI

2.1 Uvod

Ioni prijelaznih metala nakupljeni u stanici obavljaju dvije važne uloge: koriste se kao potrebni kofaktori i mogu katalizirati citotoksične reakcije.⁷ Kofaktori su neproteinske komponente koje služe u biološkim transformacijama, i mogu biti anorganskog podrijetla, Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} .⁸ Među njima je najvažniji bakrov ion (Cu^{2+}) ključan kod aktivnosti enzima citokroma oksidaze, te cinkov ion (Zn^{2+}) važan za aktivnost enzima ugljikove anhidraze, alkoholne dehidrogenaze i karboksipeptidaze A i B. Osim toga, mogu biti i organskog podrijetla kao što su proteini koji kontroliraju aktivnost intrastaničnih metalnih iona i pomažu im u vezanju na ciljne stanice.⁷

2.2 Bakar(I) u citoplazmi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

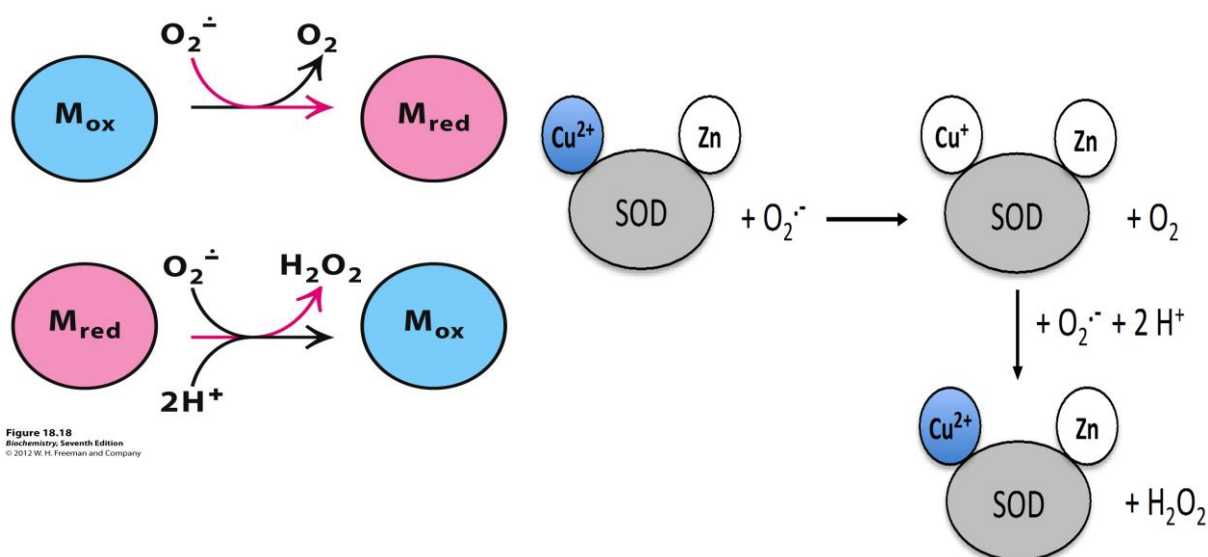
Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je jednostanični eukariot koji ima relativno malen i dobro istražen genom, zbog čega je uz bakteriju *Escherichiju Coli* najpoznatiji modelni organizam. Koristio se za fermentaciju napitaka od antičkih vremena.⁹



Slika 3. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰

Kvasac je poznat po metabolizmu bakra(I). Bakar je prijelazni metal koji se nalazi u 11. skupini Periodnog sustava elemenata, elektronske konfiguracije $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$. On je mekan, crvenkasto-smeđe boje, žilav i rastezljiv.¹¹

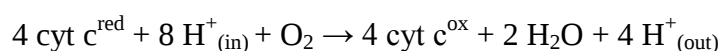
On se u organizam unosi prehranom, namirnicama bogatim bakrom kao što su primjerice: goveđe srce, vino, jastog, masline, školjke, orasi, bademi, lješnjaci, kakao i žitarice. Bakar u organizmu omogućava normalan metabolički proces zajedno s aminokiselinama i proteinima. Može postojati u dva oksidacijska stanja: +1 ili +2.¹² Nakupljanje bakra u tkivima može dovesti do ozbiljnih posljedica i uzrokovati različite poremećaje poput Wilsonove bolesti. Bakar ima ključnu ulogu u razvoju živaca, kostiju, kolagena, i melanina. Normalno, bakar se apsorbira iz hrane, a višak se izlučuje putem žuči, no kod osoba s Wilsonovom bolesti bakar se ne eliminira ispravno, a njegova akumulacija može dovesti do poremećaja u govoru, otežanog gutanja i slično.¹³ Enzim superoksid dismutaza sadrži bakar i nalazi se u citoplazmi kvasca. Katalizira reakciju dismutacije u kojoj se jedan jedini reaktant prevede u dva različita oblika. Na primjer: oksidirani oblik superoksid-dismutaze reagira s jednim ionom superoksida; nastaju kisik i reducirani oblik enzima, dalje reducirani enzim reagira s drugim ionom superoksida i s dvama protonima; dajući vodikov peroksid i regenerirani oblik enzima.¹⁴



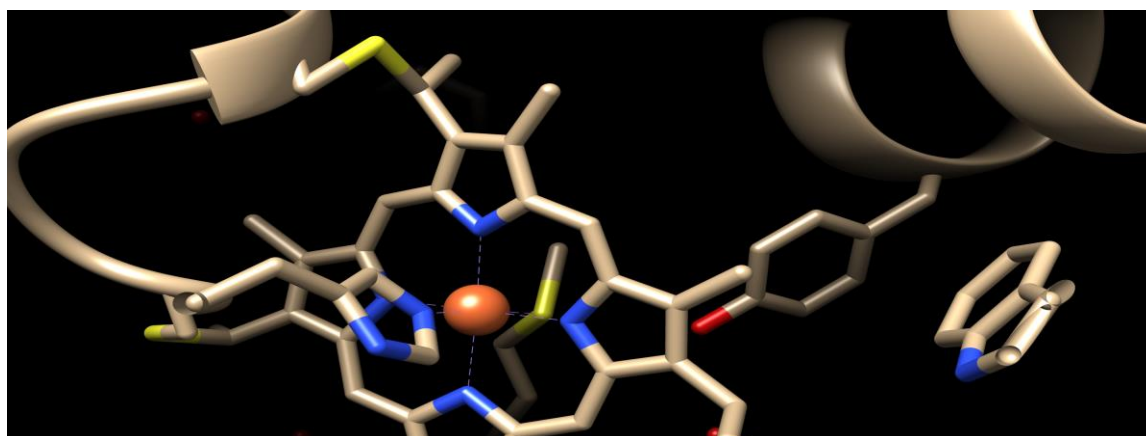
Slika 4. Mehanizam superoksid-dismutaze (*SOD eng. superoxide dismutaza*)¹⁴

2.3 Prenosnje bakra kroz *mitohondrij*

Mitohondrij je stanični organel eukariotskih stanica koji služi kao izvor stanične energije.¹⁵ U njemu važnu ulogu ima enzim *citokrom oksigenaza*. To je terminalni enzim u respiratornim lancima mitohondrija i aerobnih bakterija.³ Katalizira prijenos elektrona s reduciranog *citokroma c* na kisik reducirajući ga u vodu:

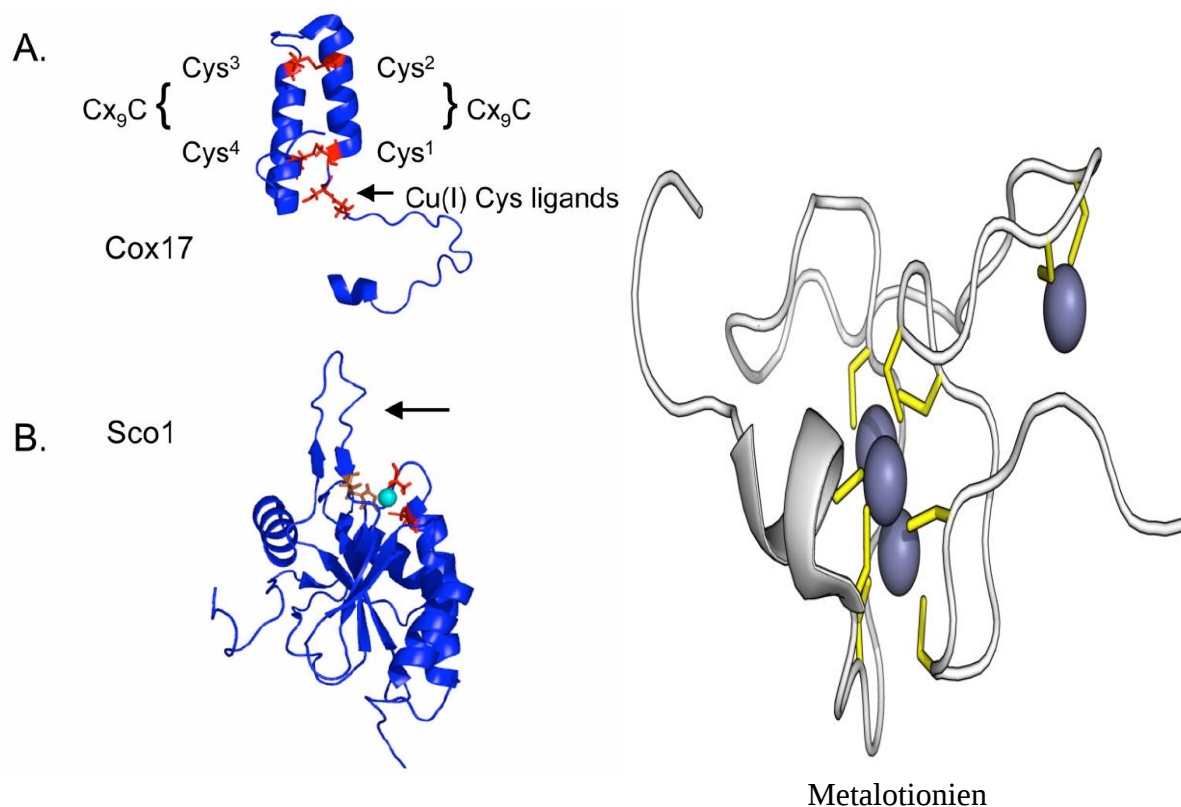


Enzim sadrži dvije hem skupine i tri iona bakra.



Slika 5. *Citokrom c oksidaza* koja sadrži jedan ion bakra (narančasta kugla)¹⁶

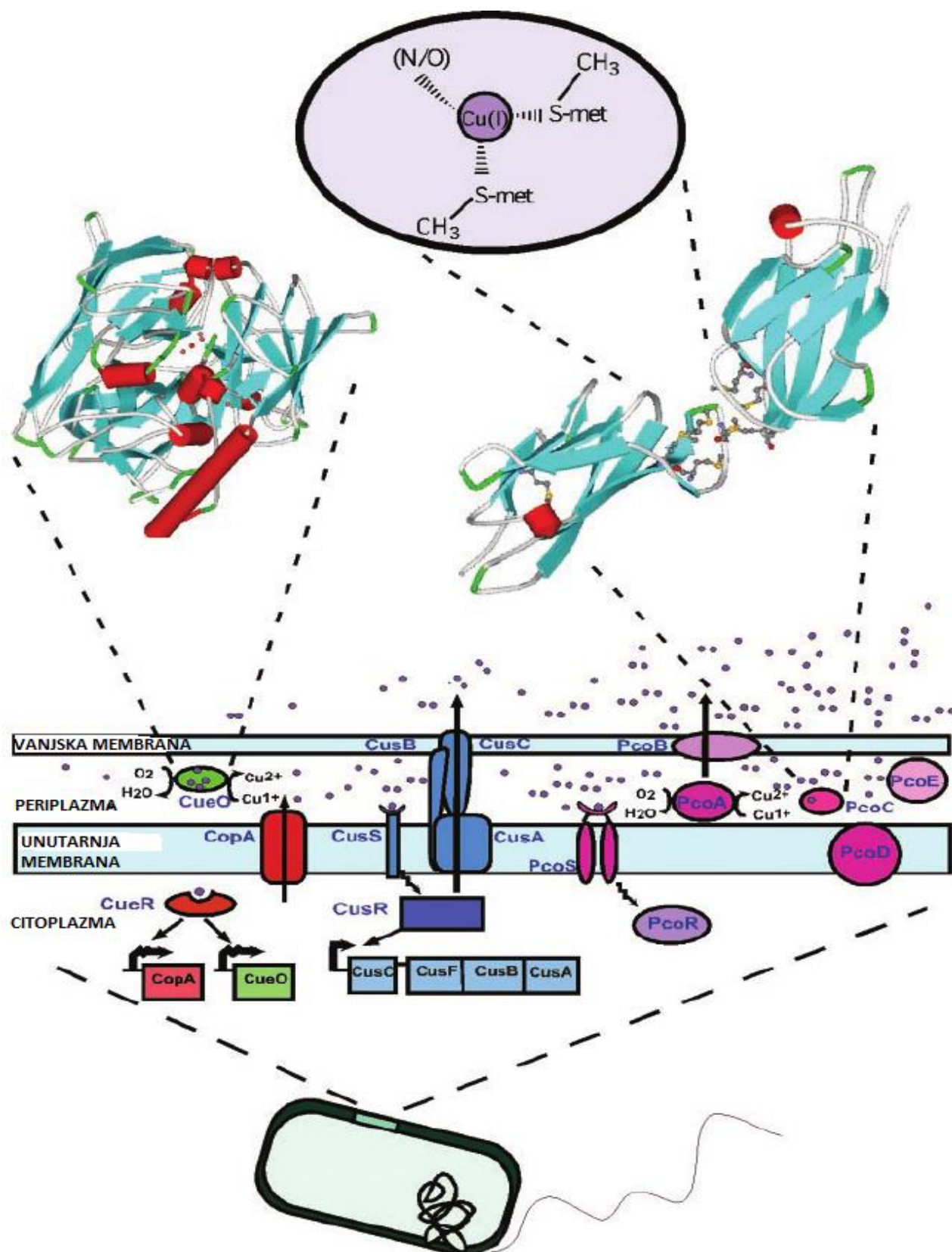
Za djelovanje ovog enzima odgovoran je protein koji sadrži trigonsko koordinirani bakar u heksanuklearnim klasterima Cu(I). Bakar se veže na tiolnu skupinu cisteinskih ostataka.⁷



Slika 6. Usporedba vezanja Cu u eukariotskim (Cox17 i Sco1) i prokariotskim (metalotionien) mehanizmima ^{17 18}

2.4 Homeostaza bakra u *Escherichiji Coli*

Homeostaza je održavanje stalnih životnih uvjeta u organizmu. U stanicama eukariotskih organizama bakar je koordiniran cisteinskim jedinicama u proteinu, dok kod prokariotskih organizama kao što je *Escherichia Coli* bakar(I) je koordiniran s metioninom (Met) (slika 7.) u periplazmi.⁷ *Escherichia Coli* je prokariotski organizam zbog toga što nema jezgru, a periplazma je prostor između bioloških membrana poput unutarnje citoplazmatske membrane i bakterijske vanjske membrane i predstavlja mjesto pohrane bakra (slika 7.).

Slika 7. Prenošenje bakra(I) u *Escherichiji Coli* ⁷

Stanično propuštanje bakra je u *E. Coli* kontrolirano pomoću operona, skupa gena pod kontrolom zajedničkog promotora, regulatorne sekvence u DNA molekuli. Geni smješteni u unutarnjoj membrani povećavaju koncentraciju bakra u periplazmi. Prvi takav gen je CueO (multi-Cu oksidaza) kontrolirana pomoću proteina koji unose bakar iz citoplazme u periplazmu.⁷ Poremećaj rada ovog mehanizma može dovesti do Menkesove bolesti, a to je recesivni poremećaj na X-kromosomu uzrokovan nedostatkom bakra (niski rast i mentalni poremećaj).¹⁹ Uloga operona je da prevode Cu(I) i manje toksičan Cu(II) koji se eliminira iz stanice, a promjena oksidacijskog stanja bakra praćena je i promjenom njegove koordinacije.

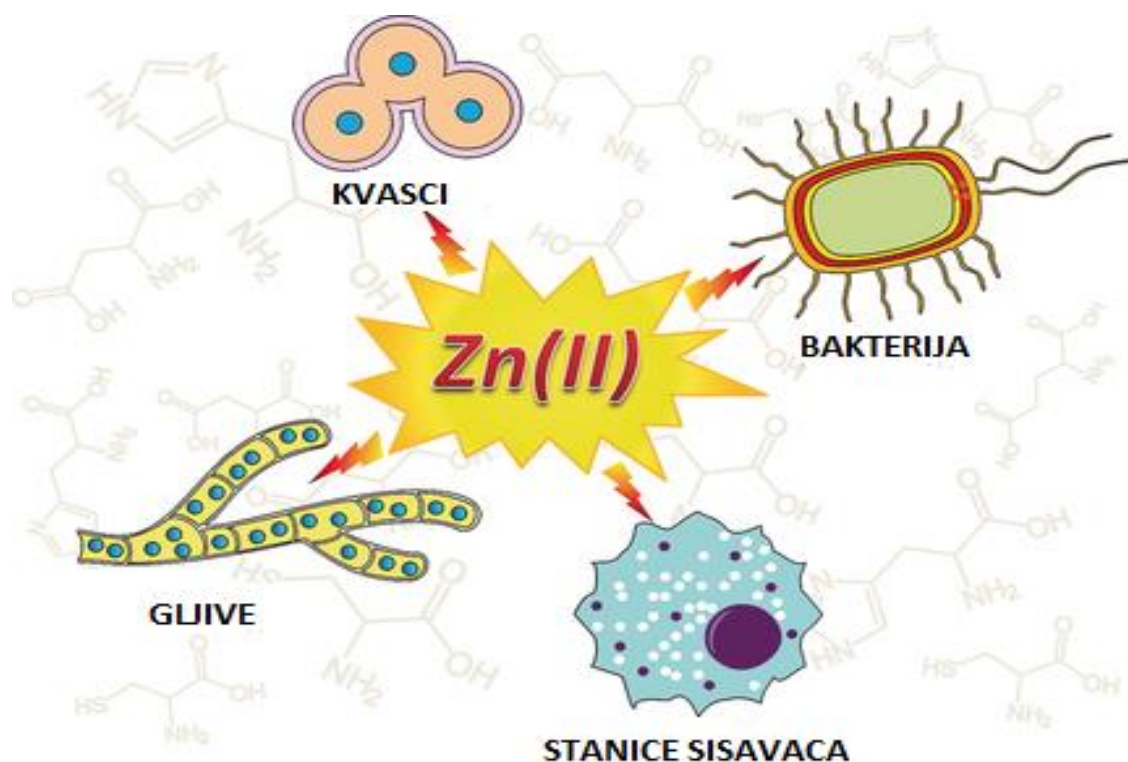
2.5 Homeostaza cinka u *Escherichiji Coli*

Cink je prijelazni metal koji se nalazi u 12. skupini Periodnog sustava elemenata, elektronske konfiguracije $[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$. On je plavkasto-bijela sjajna kovina. Pri sobnoj temperaturi je krhak i lomljiv.²⁰



Slika 4. Cink²¹

U prehrani ga najviše ima u: orašastim plodovima, morskim plodovima i mesu (teletina). Cink je važni esencijalni element. Osim u *E. Coli* nalazimo ga i u: kvascu, stanicama sisavaca, gljivama (slika 9.).



Slika 5. Slikoviti prikaz prisutnosti cinka u organizmu²²

Homeostaza cinka u bakteriji *E. Coli* drugačija je od homeostaze bakra(I), jer cink nije koordiniran metioninom (Met), ali mu je koordinacijska sfera slična onoj bakra(II) budući da je vezan na aspartat (Asp).⁷

§ 3. KOMPLEKSI PRIJELAZNIH METALA KAO ANTITUMORSKI I ANTIVIRUSNI AGENSI

3.1 Uvod

Jedinstvena svojstva metalnih iona kao što su: redoks reakcije, prijenos elektrona i raznolikost koordinacije koja proizlazi iz različitog oksidacijskog stanja, omogućuje primjenu metalnih iona u medicinske svrhe, posebice u lijekovima.²³ Jedan od najpoznatijih je svakako *cisplatin*. Neželjene nuspojave kod spoja *cisplatina* za liječenje karcinoma, potaknule su interes među kemičarima k istraživanju novih metalnih kompleksa kao modernih terapeutika i dijagnostičkih agensa.²³ Najviše istraživani metalni kompleksi su kompleksi srebra(I) koji su se koristili kao anti-mikrobiološki agensi, kompleksi zlata(I) kao lijekovi za artritis kao i kompleksi željeza(III), rutenija(II) i vanadija(IV) za liječenje karcinoma.²³

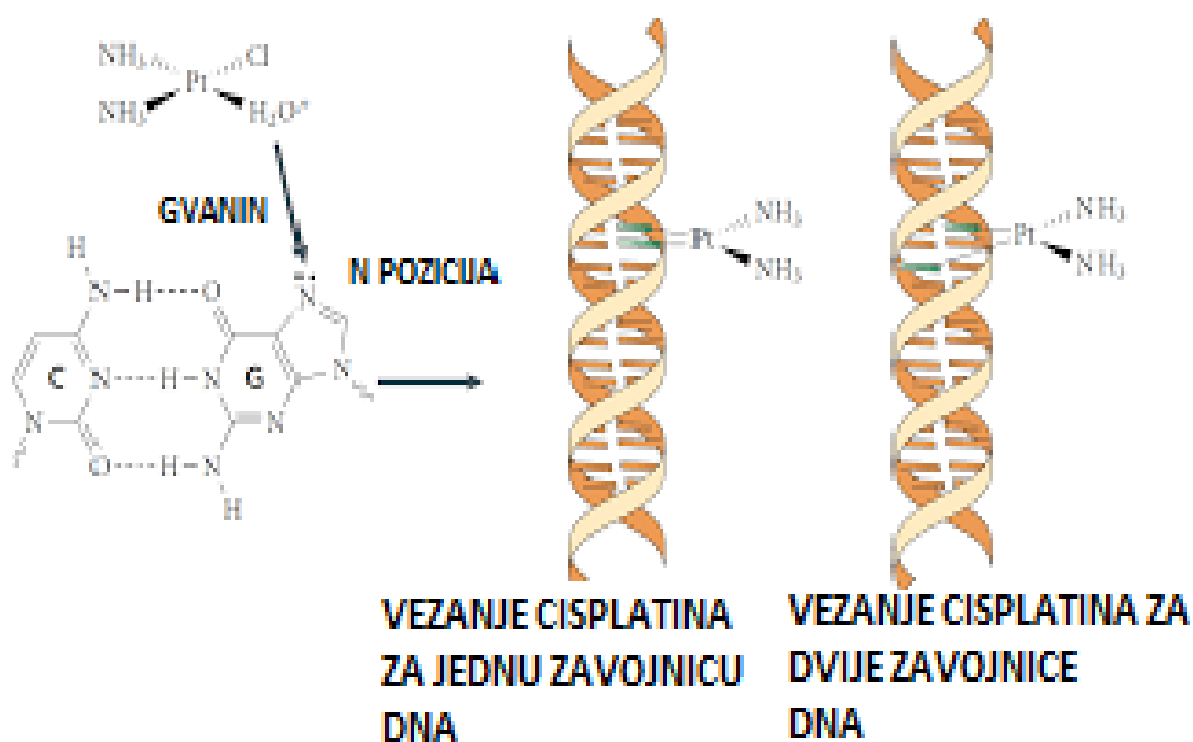
3.2 Kompleksi platine(II)

Platina je prijelazni metal koji se nalazi u 10. skupini Periodnog sustava elemenata, elektronske konfiguracije $[\text{Xe}]4f^{14}5d^96s^1$. U čistom stanju je srebrno-bijele boje, sjajna i rastezljiva kovna.²⁴



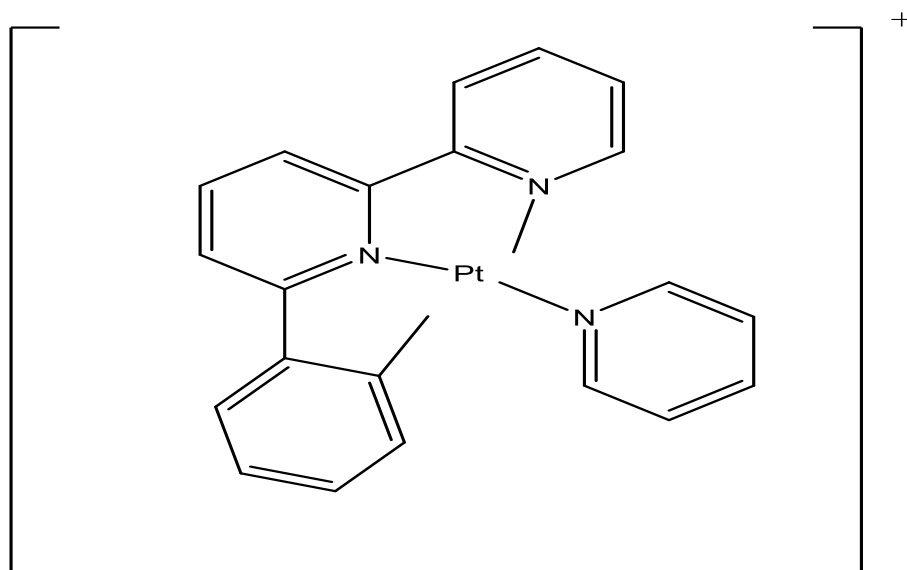
Slika 6. Platina²⁵

Platina može imati oksidacijska stanja: +2, +4, +6.²⁶ U lijekovima je najzastupljenije oksidacijsko stanje +2. Primjer takvog lijeka je *cisplatin* (slika 1.). Istraživanja su pokazala da *cisplatin* djeluje kao prolijek. Prolijek je tvar čija se struktura može promijeniti kemijskim ili metaboličkim reakcijama biotransformacije kako bi iskazala terapijski učinak.²⁷ U ovom slučaju *cisplatin* može hidrolizirati u vodenom mediju, pri čemu nastaju akvaplatinove(II) vrste koje se kovalentno vežu na DNA.²³



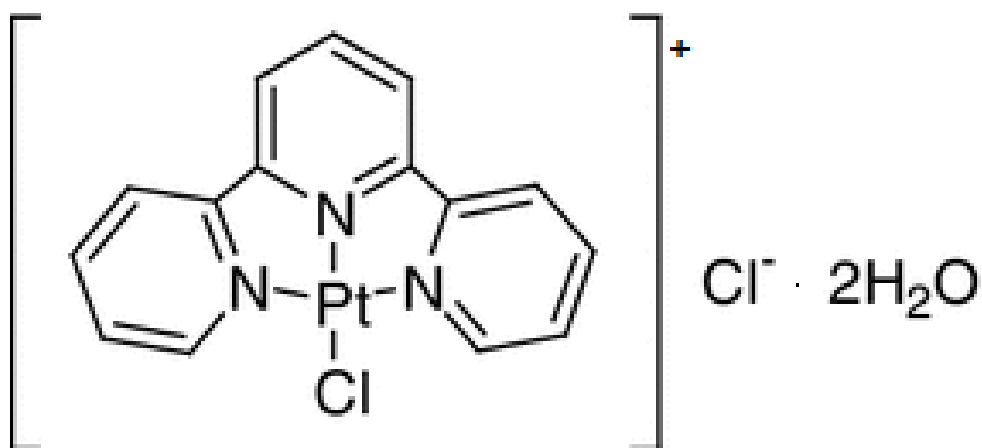
Slika 11. Kovalentno vezanje *cisplatina* na DNA molekulu²⁸

Osim kovalentnog načina vezanja razvijeni su i ciklometilirani kompleksi platine(II) kod kojih nalazimo elektrostatske i hidrofobne interakcije kao i nastajanje interkalata s biomolekulama. Primjeri takvih ciklometiliranih spojeva vezanih za DNA su: 6-fenil-2,2-bipiridinplatinov(II) ion ($[Pt^{II}(C\wedge N\wedge N)]^+$) i terpiridinglikozilirani arilacetilid platinov(II) ion ($[Pt(terpy)glikoziliraniarilacetilid]$) i dipirido [3-a:2,3-c] fenazin(dppz) platinov(II) ion.



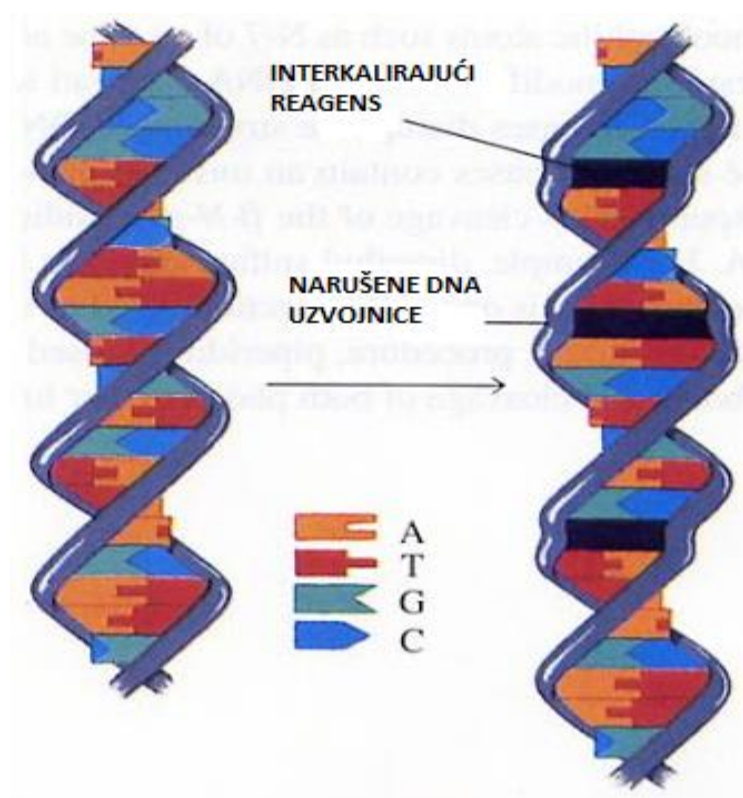
Slika 12. $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{C}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{L}]^{n+}$ ($\text{HC}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N}$ =6-fenil-2,2'-bipiridinplatinov(II) ion; L=ligand) ²³

Kompleks na slici 12. je strukturni analog kompleksa kloroterpiridinplatinovog(II) iona ($[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{terpy})\text{Cl}]^{+}$).



Slika 13. Kloroterpiridinplatinov(II) kompleks ²⁹

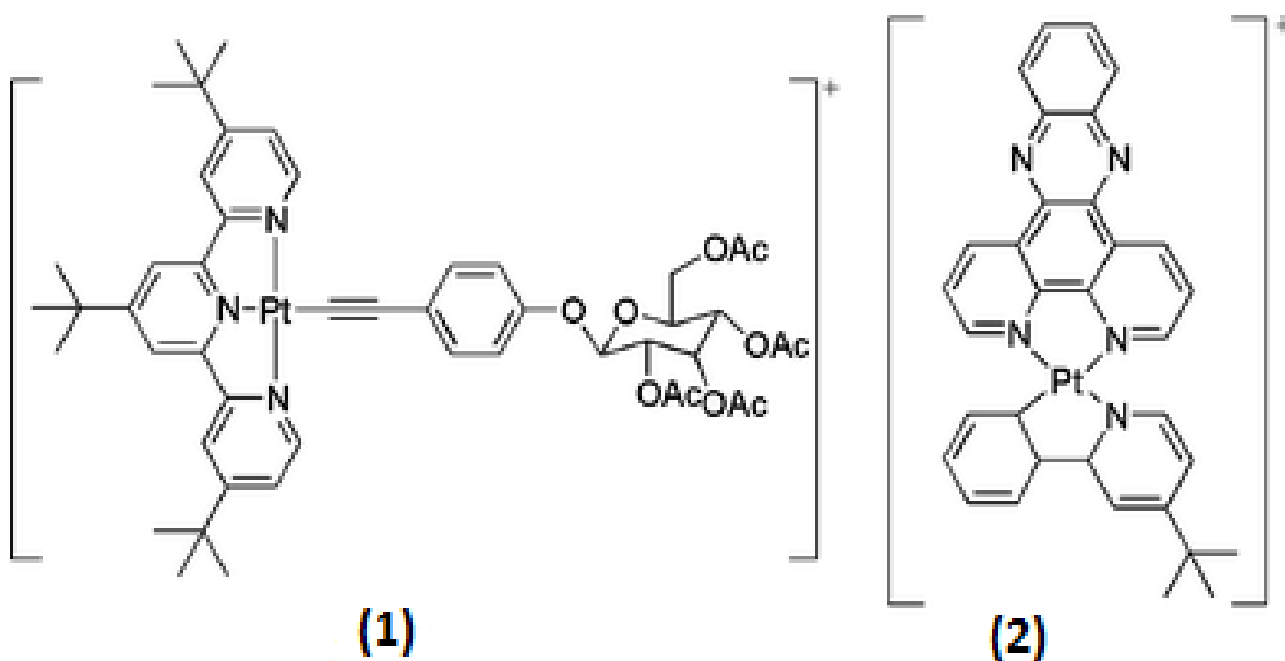
Eksperimentalno je ustanovljeno da se kompleks (slika 13.) veže na DNA kovalentnom vezom za razliku od spoja (slika 12.) koji s DNA stvara interkalacijski spoj. **Error! Bookmark not defined.**²³ Interkalacija je reverzibilno umetanje molekule planarnog 6-fenil-2,2-bipiridinplatinovog(II) iona u prostor između dva susjedna bazna para dvolančane molekule DNA.



Slika 14. Prikaz interkaliranja anorganskog agensa na DNA³⁰

Zbog takvog načina vezanja, platinov(II) kompleks (slika 12.) pokazuje potencijalno antitumorsko djelovanje u slučaju nazofaringealnog karcinoma (CNE3-koji pogađa glavu i vrat), epidermalnog karcinoma (KB-3-1) kao i karcinoma jetrenih stanica (HepG2).²³

Platinov(II) kompleks koji sadrži terpiridinglikozilirani arilacetilid ([Pt(terpy)(glycozilirani arilacetilid)]) (slika 15. (1)) se veže na DNA neinterkalirajući, preko svojih tercbutilnih supstituenata, smještenih na terpiridinu.²³ Postupak vezanja se zove restrikcijsko-endonukleazna fragmentacija. To je cijepanje fosfodiesterske veze u polinukleotidnom lancu DNA. Kompleks ima visoku citotoksičnost protiv stanica karcinoma. Njegov IC₅₀, što je kvalitativna mjera koja pokazuje koliko određenog lijeka je potrebno da se inhibira određeni karcinom iznosi (0,06-0,2) $\mu\text{mol dm}^{-3}$.²³ Za razliku od navedenog kompleksa, platinov(II) kompleks koji sadrži dipirido[3,-a:2,3-c]fenazin(dppz) (slika 15. (2)), veže se na DNA i njegov IC₅₀ iznosi 1,7-1,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.²³



Slika 15. Ciklometilirani kompleksi platine(II) koji se vežu na DNA ²³

3.3 Kompleksi rutenija

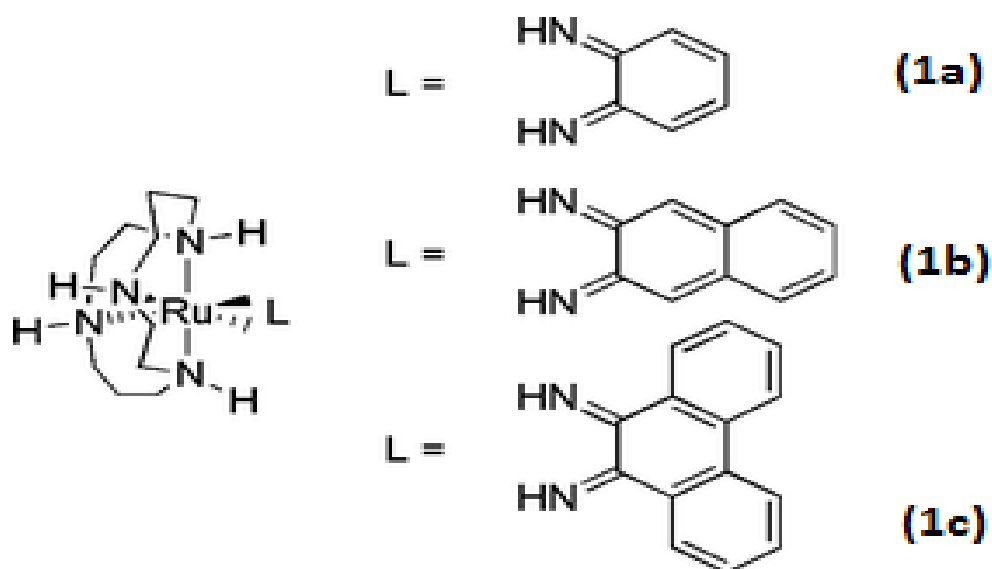
Rutenij je prijelazni metal koji se nalazi u 8. skupini Periodnog sustava elemenata, elektronske konfiguracije $[\text{Kr}]4d^75s^2$. On je tvrd, sive boje, krt i teško se tali.³¹ Radi spojeve s oksidacijskim brojevima od 0 do +8. Najbrojniji i najstabilniji su spojevi u kojima je oksidacijski broj rutenija +3 i +4.³²



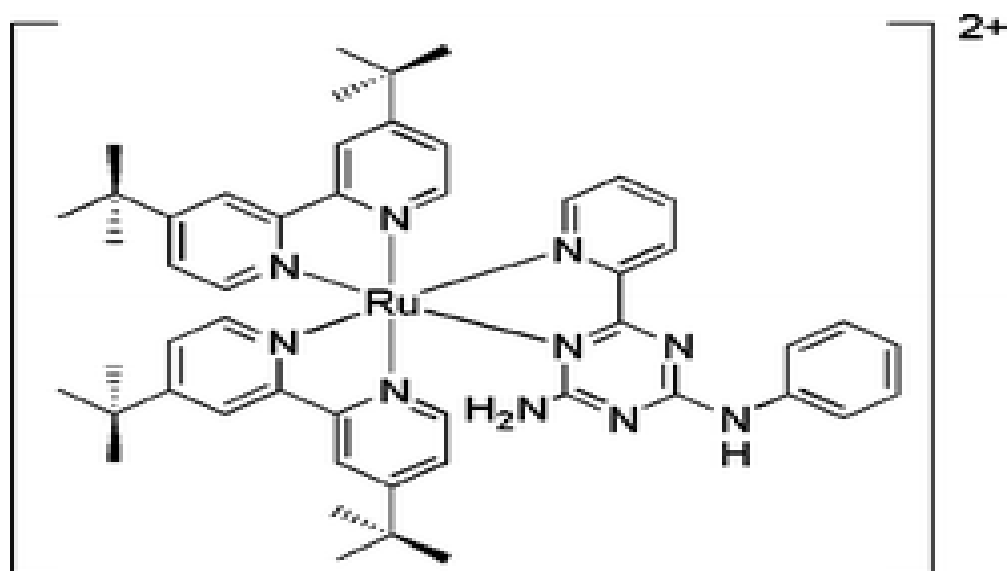
Slika 16. Rutenij³³

Mnogi kompleksi rutenija se koriste kao antitumorski agensi. Među njima su najznačajniji kompleksi rutenija koji sadrže: 1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan, 4,4-di-terc-butil-2,2-bipiridin, 2-amino-4-fenilamino-6-(2-piridil)-1,3,5-triazin i oksalatni klaster.

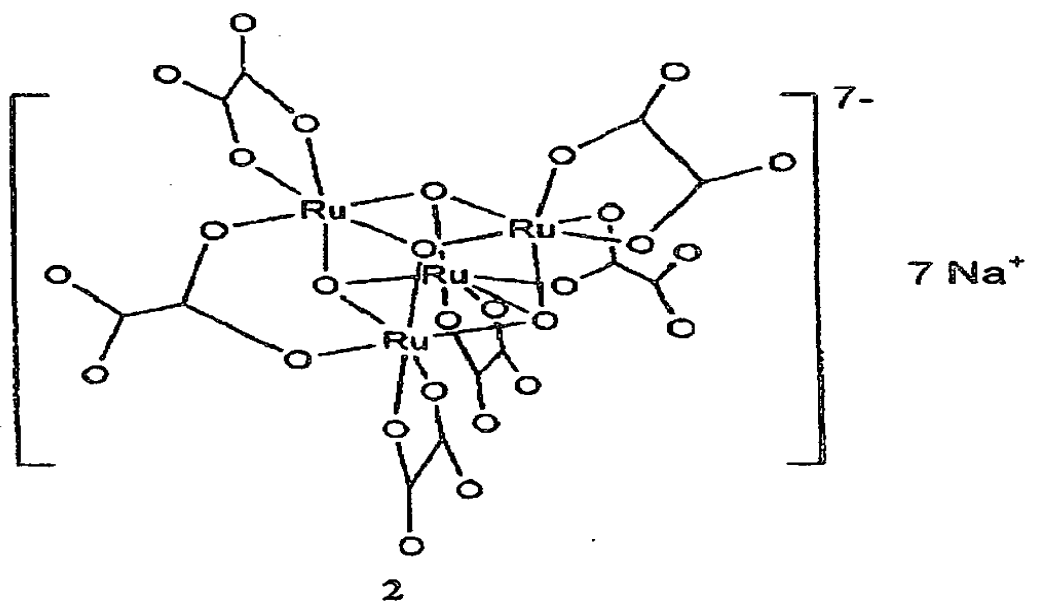
Kompleks rutenija s 1,4,8,11-tetraazaciklotetradekanom koji se veže na DNA restrikcijsko-endonukleaznom fragmentacijom se cijepa na tri fragmenta (slika 17; 1a, 1b, 1c): (1a) benzendiimin, (1b) naftalen diimin, (1c) 9,10-fenantrenkinon diimin. Redoslijed tih fragmenata po afinitetu vezanja na DNA je: $1c > 1b > 1a$ (slika 17).²³ Fragment (1c) (slika 17.) ima najveći afinitet vezanja na DNA zbog svoje ravne i velike površine koja se preklapa s parovima baza u DNA.²³ Kompleks pokazuje blagu citotoksičnost s IC_{50} vrijednosti $\sim 200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ u slučaju epidermalnih stanica karcinoma: KB-3-1 i KB-V-1.²³

Slika 17. Kompleks rutenija(II) s 1,4,8,11-tetraazaciklotetradekanom²³

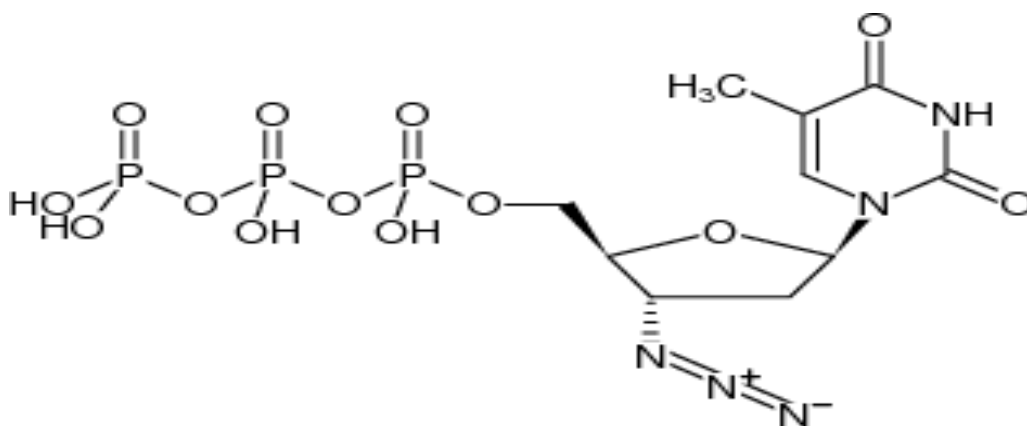
Drugi kompleks rutenija s 4,4-di-terc-butil-2,2-bipiridin; 2-appt=2-amino-4-fenilamino-6-(2-piridil)-1,3,5-triazinom (slika 18.) se veže na glavni utor DNA molekule. To vezanje je slabo te je tako kompleks slabije otporan na stanice karcinoma.²³

Slika 18. Kompleks rutenija 4,4-di-terc-butil-2,2'-bipiridin; 2-appt=2-amino-4-fenilamino-6-(2-piridil)-1,3,5-triazin [Ru(Bu₂bpy)₂(2-appt)]²⁺²³

Posljednji kompleks rutenija je natrijev oksalatni klaster ($\text{Na}_4[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)]$) (slika 19; 1)). To je kompleks koji ima jako antivirusno djelovanje.²³ Dovoljna mjera doze (IC_{50}) tog spoja protiv virusa HIV-1 reverzne transkriptaze (RT) iznosi $1,9 \text{ nmol dm}^{-3}$, što je znatno niže nego kada bi dodali inhibitor virusa 3-azid-3-deoksitimidin-5-trifosfat (ATZ-TP) (slika 19; 2)) za koje je potrebna veća doza ($\text{IC}_{50}=68 \text{ nmol dm}^{-3}$).²³



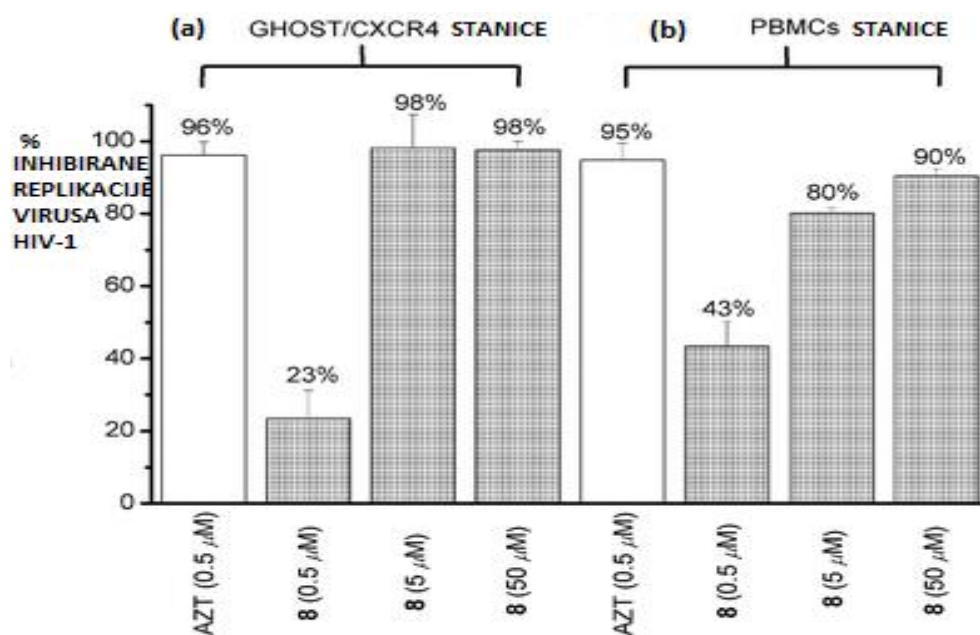
1)



2)

Slika 19. Rutenijev-okso oksalatni klaster **1**) i inhibitor AZT **2**)²³

U svrhu ispitivanja antivirusnog djelovanja kompleksa rutenija i inhibitora AZT (slika 19; 1,2)) napravljen je eksperiment u kojem su spojevi dodani u određenim koncentracijama na pokazne stanice virusa (GHOST/CXCR4) i perifernim mononuklearnim krvnim stanicama (PBMCs). Rezultat prikazuje graf (slika 20).²³



Slika 20. Postotak inhibirane replikacije virusa HIV-1 RT u pokaznim stanicama virusa (GHOST/CXCR4) i krvnim mononuklearnim stanicama (PBMCs) u ovisnosti o koncentraciji kompleksa rutenija i inhibitora AZT.²³

Iz grafa se vidi da kompleks rutenija i inhibitor AZT pokazuju puno veći postotak inhibicije (96% i 98%) u repliciranju virusa, nego u mononuklearnim krvnim stanicama (PBMCs).

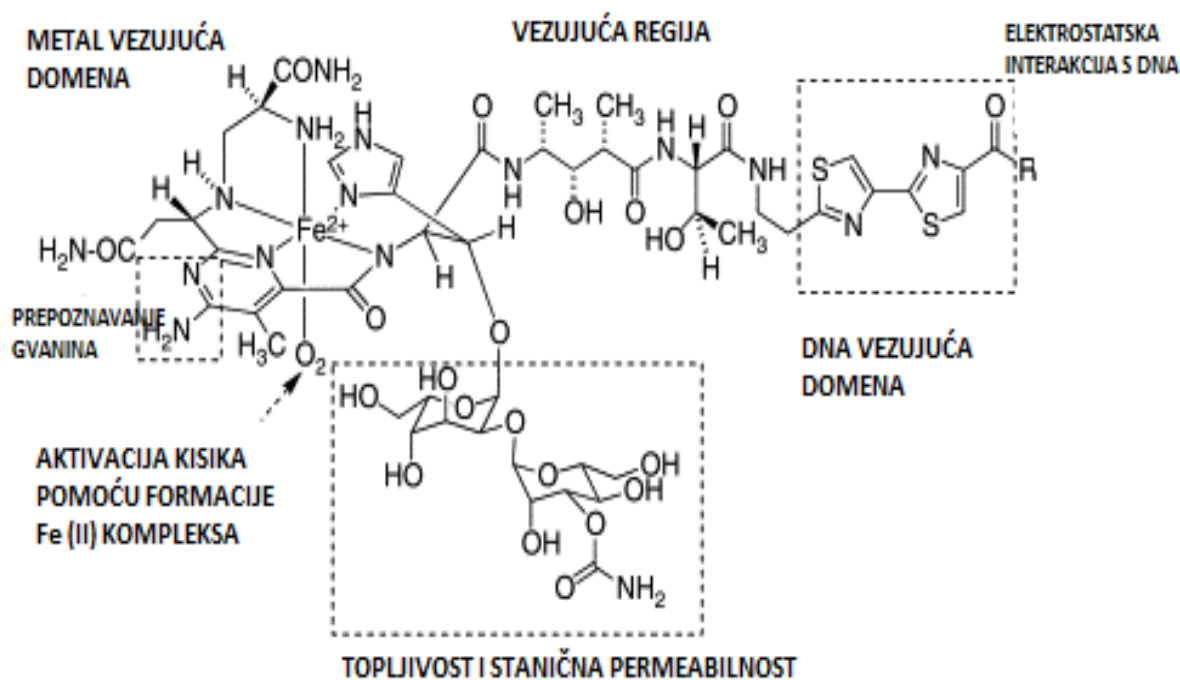
3.4 Kompleksi željeza

Željezo je prijelazni metal koji se nalazi u 8. skupini Periodnog sustava elemenata, elektronske konfiguracije $[\text{Ar}]3d^64s^2$. U elementarnom stanju je mekan, srebrnkaste, sjajne boje. On je esencijalni element koji u organizmu sudjeluje u prijenosu kisika.³⁴ Stvara spojeve u kojima ima oksidacijski broj: +2, +3 i +6.³⁵ Spojevi oksidacijskog broja +2 koriste se kao lijekovi.

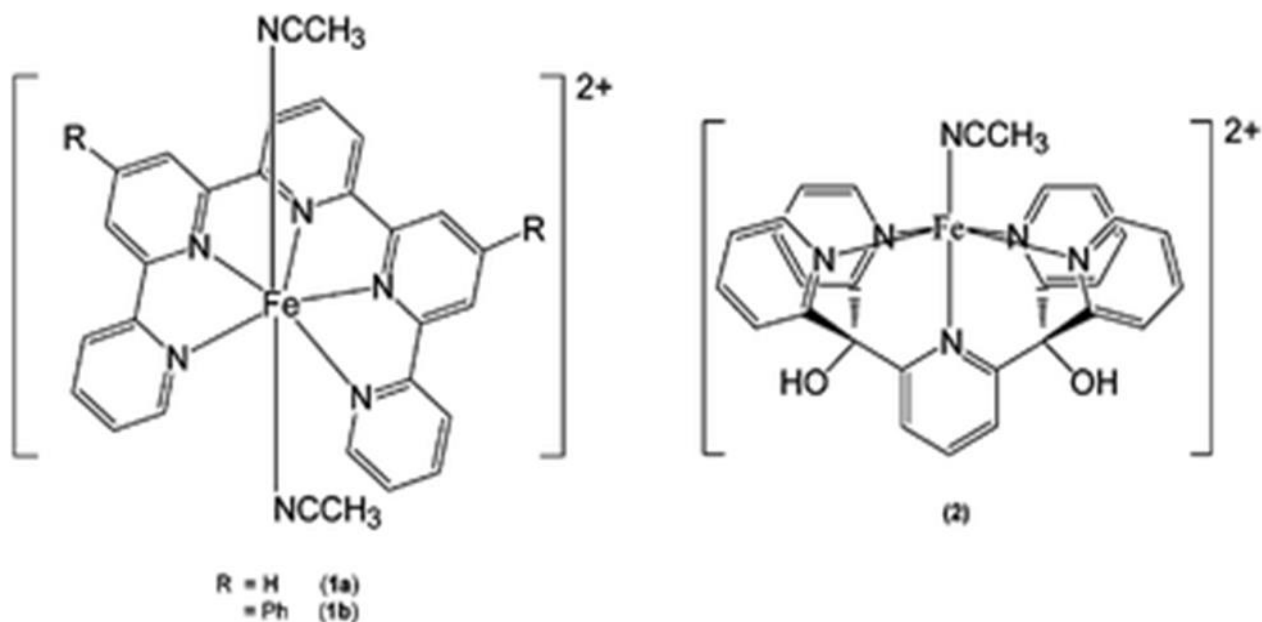


Slika 7. Željezo³⁶

Ligandi s kojima željezo radi poznate komplekse su: bleomicin i pentadentatni piridili. Oba lijeka posjeduju antitumorsko djelovanje. Željezov bleomicin je značajan lijek koji uzrokuje oksidativno oštećenje DNA tumorske stanice u prisutnosti kisika i vodikova peroksida i to putem elektrostatske interakcije (slika 22.).²³

Slika 22. Željezov(II) bleomicin³⁷

Kompleksi željeza(II) s pentapiridilskim ligandima (slika 23.) pokazuju veću toksičnost prema svim tipovima karcinoma nego željezov(II) bleomicin ($\text{IC}_{50}=0,13\text{-}68,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$).²³

Slika 23. Kompleksi željeza(II) s pentapiridilskim ligandima: (1a), (1b) i (2)²³

3.5 Kompleksi vanadija

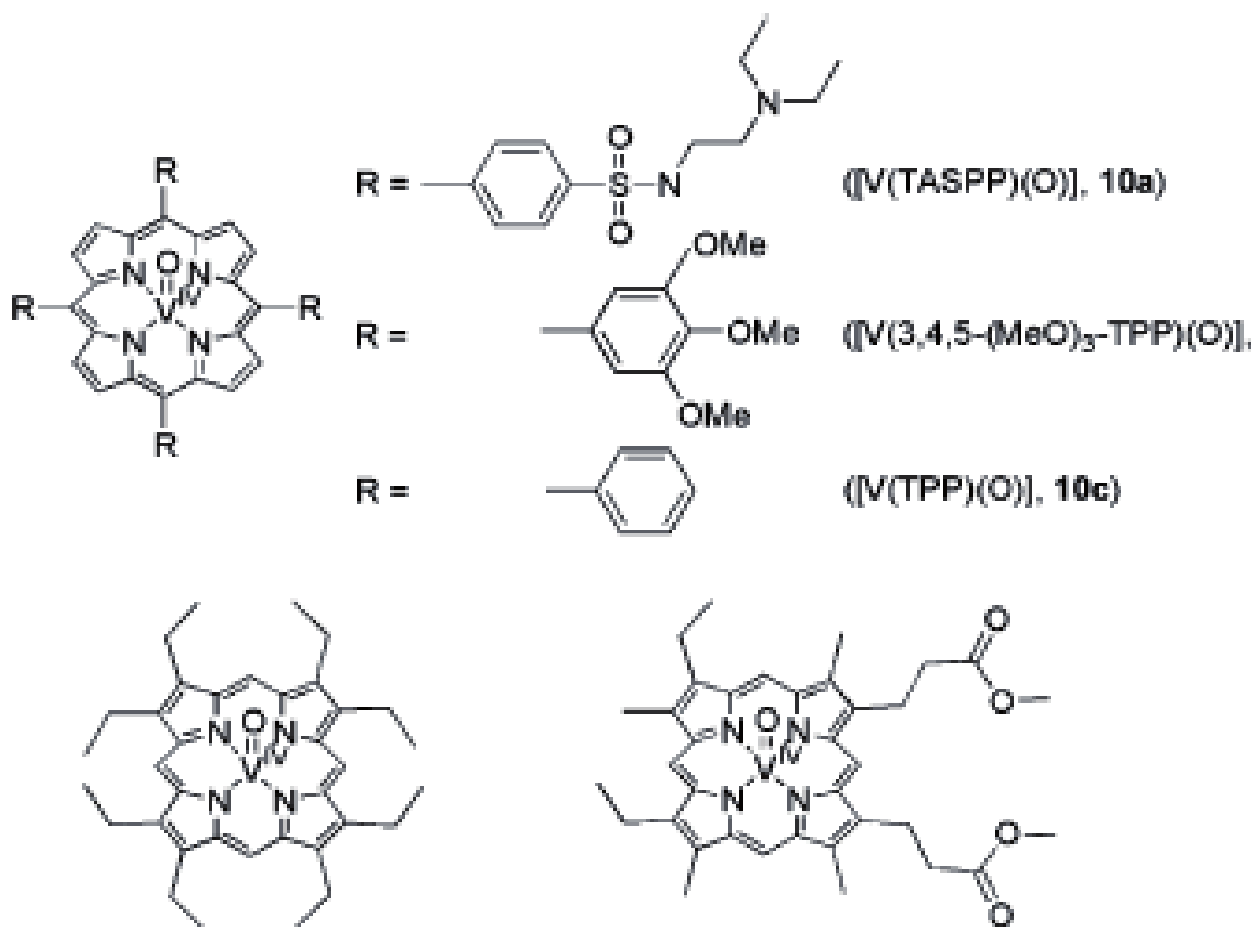
Vanadij je prijelazni metal koji se nalazi u 5. skupini Periodnog sustava elemenata, elektronske konfiguracije $[\text{Ar}]3d^34s^2$. Radi se o metalu sive boje i relativno velike tvrdoće (slika 24.).³⁸



Slika 24. Vanadij³⁹

Pravi spojeve s oksidacijskim brojevima: -1, 0, +1, +2, +3, +4 i +5.⁴⁰ Svi su karakteristično obojeni, a oni s nižim oksidacijskim brojem jaka su redukcijska sredstva. U oksidacijskom stanju (+4), vanadij radi čitav niz kompleksa (slika 25.) koji sadrže porfirine kao ligande koji stabiliziraju vanadil kation (VO^{2+}). Radi se o planarnim strukturama kod kojih ne dolazi do demetilacije spoja.²³

Također pokazuju jako antivirusno djelovanje ($\text{IC}_{50}=5 \mu\text{mol dm}^{-3}$), tako da sprečavaju ulazak virusa na ciljanu stanicu domaćina.²³

Slika 25. Porfirinski kompleksi oksovanadija(IV)²³

3.6 Kompleksi zlata

Zlato je prijelazni metal koji se nalazi u 11. skupini Periodnog sustava elemenata, elektronske konfiguracije $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$. Odlikuje se visokom vodljivošću topline i električne struje.⁴¹ Pravi spojeve u kojima može imati oksidacijske brojeve: +1, +2, +3 ili +5 od kojih je najstabilnije +1 i u kojem može postojati u vodenim otopinama.⁴²

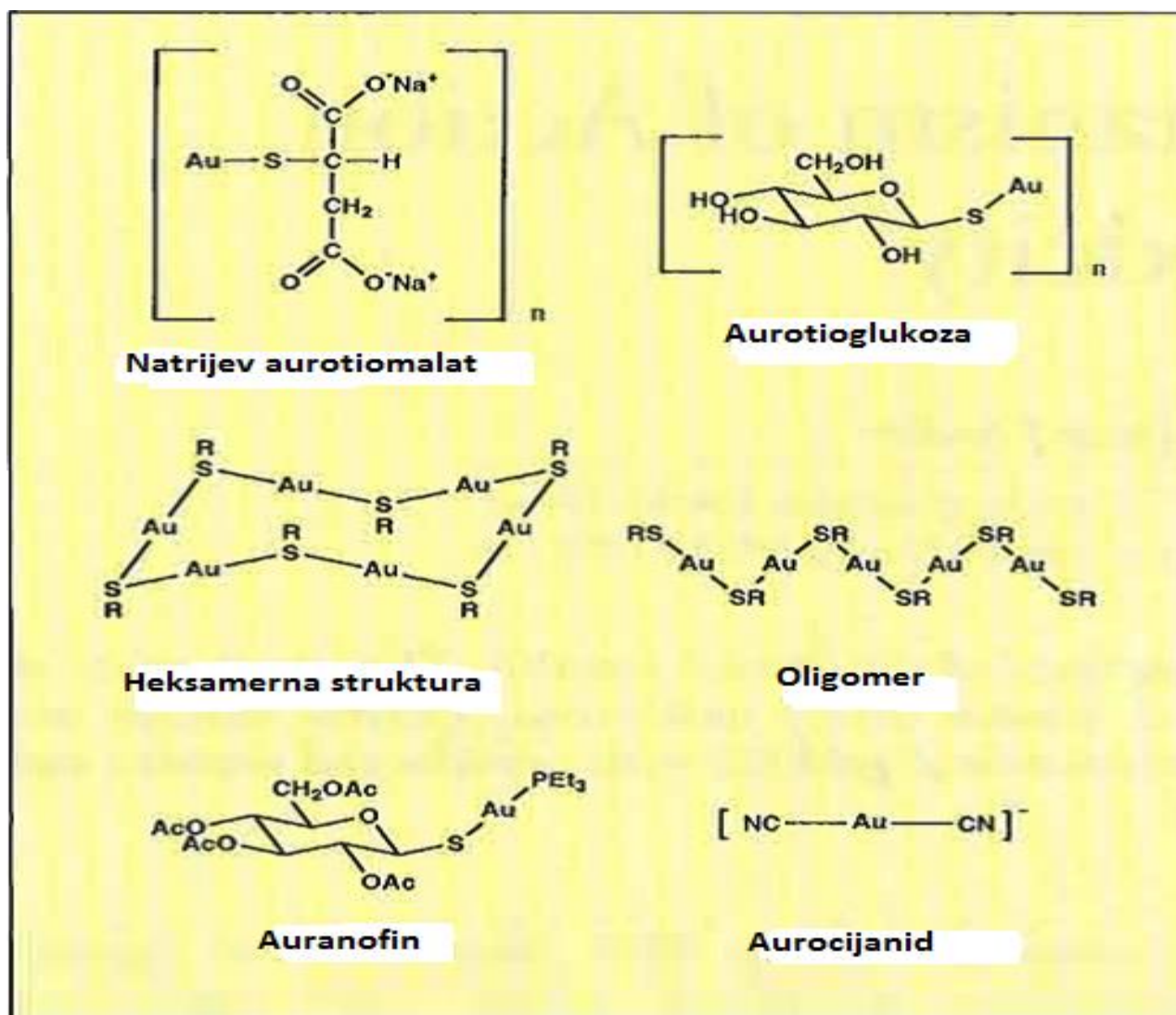
Slika 26. Zlato⁴³

Radi komplekse i s organskim i biološkim molekulama, poput DNA i proteina. Svi lijekovi koji sadrže zlato se primjenjuju za liječenje reumatskog artritisa. Jedan od glavnih problema lijekova zlata su nuspojave koje izazivaju. Glavna nuspojava koju ovi lijekovi izazivaju je preosjetljivost koja dovodi do alergija i autoimunih bolesti.⁴⁴

3.6.1 Strukturne formule lijekova zlata

Zlato kao jednovalentni ion ima veliki afinitet prema ligandima koji sadrže sumpor i fosfor poput tiolata i fosfata, a mali afinitet prema kisiku ili dušiku nekog liganda.⁴⁴ Najčešća geometrija je linearna s koordinacijskim brojem 2, ali moguća su trigonska i tetraedarska koordinacija. Postoje dvije glavne skupine lijekova koji sadrže zlato (slika 27.):⁴⁴

1. Zlato(I) tiolati kao što su: aurotiomalat, aurotioglukoza i aurotiopropanol sulfonat. Svi oni su amorfne krutine koje sadrže prstenaste strukture, tiolatne oligomere premoštene sumporom.
2. Kompleks: 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glukopiranozid-S trietilfosfinzlato(I) (auranofin), ima dobro definiranu linearnu strukturu jednovalentnog zlata (koordinacijskog broja 2).

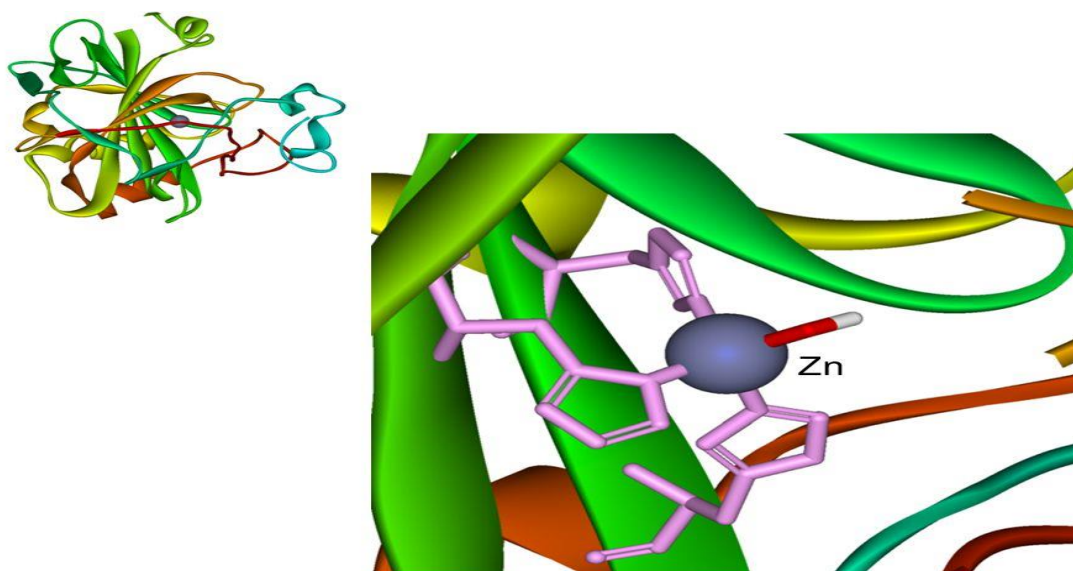
Slika 27. Strukturne formule najčešće korištenih lijekova zlata ⁴⁴

3.6.2 Druge terapijske primjene lijekova zlata

Osim liječenja reumatidnog artritisa, kompleksi zlata se koriste i za liječenje drugih vrsta bolesti. Primjerice, aurotiomalat pokazuje djelovanje anti-lišmanijaze (infekcija uzrokovana parazitom), auranofin može biti namijenjen za liječenje psorijaze (kožna bolest), dicijanoaurat(I) se koristi za liječenje AIDS-a zbog svoje sposobnosti brzog prodiranja u stanicu i niske toksičnosti, te *bis*(tioglukoza)zlato(I) je namijenjen za djelovanje protiv virusa HIV-a, tako da inhibira replikaciju virusa, zbog interakcije zlata(I) s aminokiselinom cisteinom (Cys) na površini proteinske virusne ovojnice.⁴⁴

3.6.3 Pretpostavljeni mehanizam djelovanja lijekova zlata

Nije poznat mehanizam djelovanja svih lijekova zlata, ali za lijekove kao što su (slika 27.): aurotiomalat, aurotioglukoza i auranofin je poznat. Zajedničko im je da inhibiraju protein kinazu C. To je metaloenzim koji sadrži cink(II) koji se veže na cisteinske (Cys) i histidinske (Hys) ostatke enzima i igra važnu ulogu u fosforiliranju serinskih (Ser) ili treoninskih (Thr) ostataka u proteinu.⁴⁴

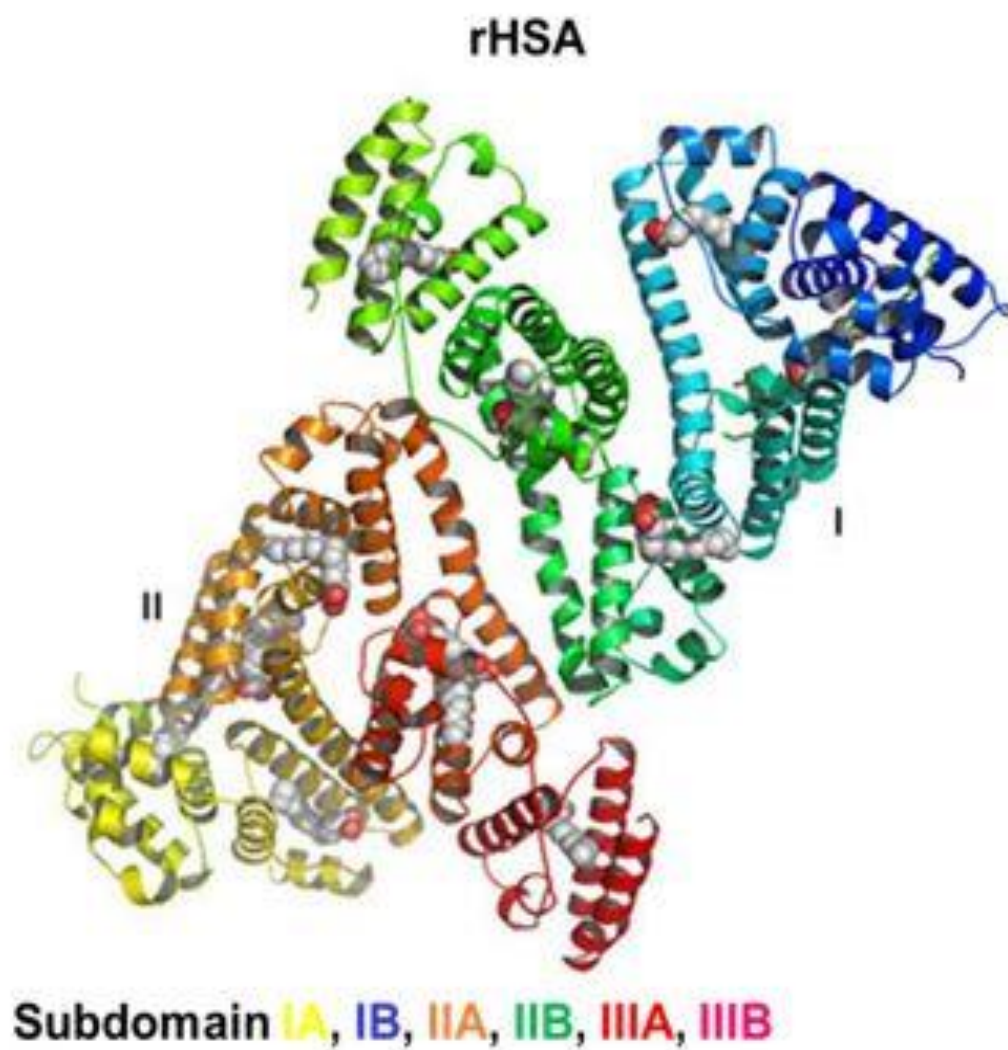


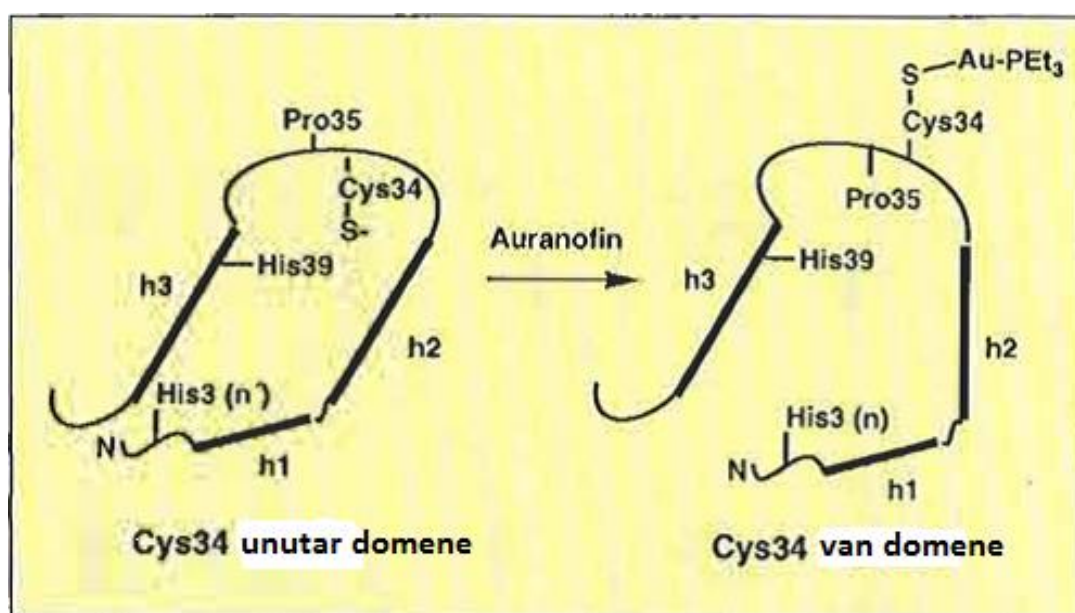
Slika 28. Kristalna struktura metaloproteina koji sadrži cink i na koji je vezan lijek (crveno-siva boja)⁴⁵

Zlato koje se veže za tiolne skupine proteina prisutnih u membrani krvnih stanica, može promijeniti metabolizam glukoze i tako utjecati na aktivnost živih stanica.⁴⁴ Aurotiomalat može biti aktiviran kroz interakciju s cijanidima koji nastaju aktivacijom polimorfonuklearnih leukocita. Cijanid može brzo zamijeniti tiomalatni ligand iz aurotiomalata i tako stvoriti metabolički zlatni lijek aurocijanid ($[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ slika 27.).⁴⁴ Zanimljivo je da krv pušača sadrži visoku razinu tiocijanida i zlata unešenog pomoću crvenih krvnih stanica. Aurocijanid inhibira različite funkcije i djeluje kao terapijski agens.⁴⁴ Proizvodnja superoksidnog radikala pomoću stanica tijekom oksidativnog raspada je bitan imuno odgovor prema ulasku bakterija, te pojava tih radikala može biti povezana s kroničnim reumatidnim artritisom. Aurotiomalat i auranofin (slika 27.) mogu inhibirati stanice tumora, pobuđujući širenje T limfocita.⁴⁴

3.6.4 Interakcija zlata(I) s albuminom

Albumin je glavni protein u krvnoj plazmi (slika 29.). Prisutan je u koncentraciji $0,63 \text{ mmol dm}^{-3}$.⁴⁴ Sastoji se od jednog polipeptidnog lanca koji ima 585 aminokiselina raspoređenih u tri velike helikalne domene. U svakoj domeni se nalazi šest disulfidnih mostova, osim u domeni I u kojoj nedostaje, pa u njoj cistein (Cys) ostaje sa slobodnom tiolnom skupinom (RSH) na poziciji 34. Vezanje zlata(I) iz auranofina na slobodnu tiolnu skupinu pozicije 34 (slika 30.), može izazvati strukturnu promjenu u kojoj cistein-34 prelazi iz unutrašnjosti domene na vanjsku stranu, dok susjedna aminokiselina prolin (Pro) na poziciji 35, prelazi iz vanjske strane domene u unutrašnjost.⁴⁴ Kinetička su istraživanja pokazala da reakcija albumina s auranofinom u plazmi, pokazuje reakciju prvog reda u odnosu na albumin i nultog reda u odnosu na auranofin. Reakcija se brzo odvija tako da auranofin ima kratko vrijeme poluživota u plazmi.⁴⁴

Slika 29. Kristalna struktura albumina ⁴⁶



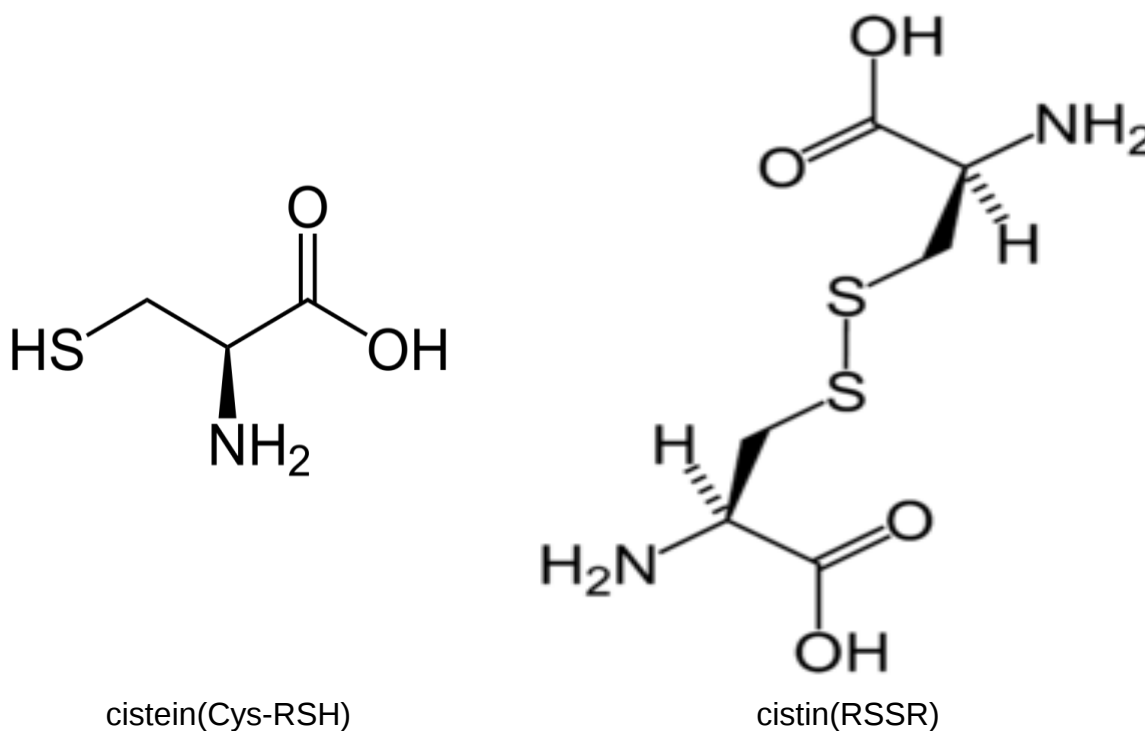
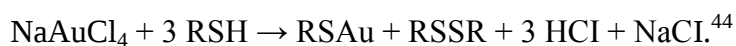
Slika 30. Interakcija auranofina s albuminom uzrokuje tranzicijski prijelaz cisteina-34 (Cys) iz unutarnje domene proteina na vanjsku stranu domene⁴⁴

3.6.5 Toksičnost lijekova zlata

Nakon tretmana liječenja s kompleksima zlata(I), zlato u organizmu može oksidirati u oksidacijsko stanje +3.⁴⁴ Za tu pretvorbu su potrebni snažni oksidansi. Na primjer enzim mijeloperoksidaza koji katalizira proizvodnju reaktivnih oksidacijskih vrsta koje utječu na oštećenje tkiva tijekom upale, u prisutnosti vodikova peroksida i kloridnog iona može oksidirati zlato(I) iz aurotiomalata, aurotioglukoze i auranofina u zlato(III), tvoreći hipokloritni anion.⁴⁴ Nadalje u trovalentnom stanju zlato potiče širenje limfocita u stanici. Taj proces uzrokuje toksične efekte.⁴⁴

3.6.6 Interakcija zlata (III) s peptidima

Zlato(III) najčešće reagira s aminokiselinama i peptidima proteina koji sadrže sumporove atome ili disulfidne mostove. Primjerice aminokiseline sa sumporovim atomom su: cistein (Cys) i metionin (Met).⁴⁴ Reakcija se odvija tako da zlato(III) može oksidirati disulfidne mostove u proteinu albuminu u reakciji natrijevog tetrakloroaurata(III) s cisteinom (RSH), a prema jednadžbi reakcije,

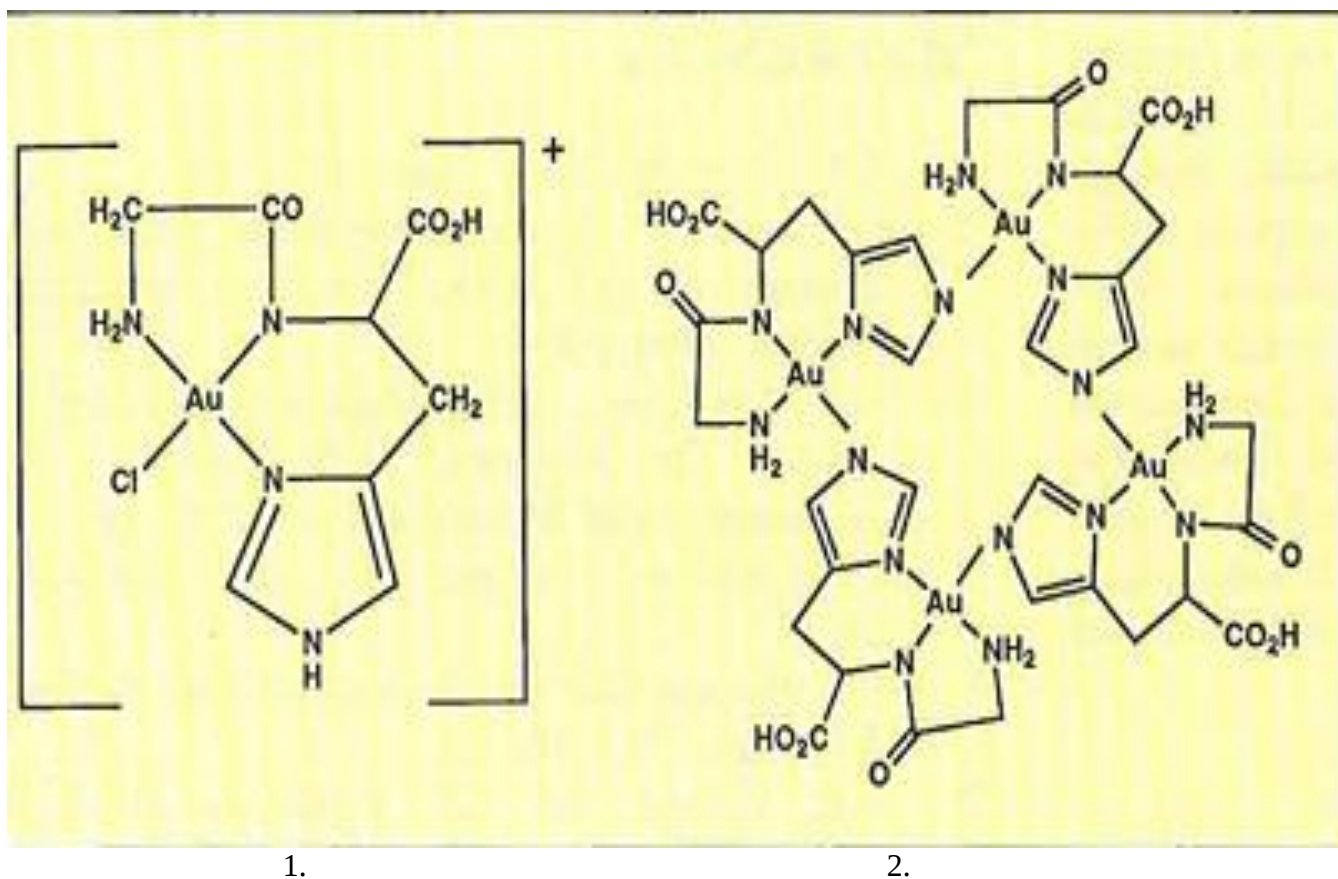


Slika 31. Aminokiseline koje sadrže sumpor^{47 48}

Nastali cistein (RSH) može se oksidirati u cistin (RSSR) koji dalje reagira s kalijevim tetrabromoauratom(III) pri čemu nastaje elementarno zlato, prema jednadžbi,



Aminokiselina metionin (Met) u proteinu može također biti oksidirana pomoću zlata(III), reakcijama koje su brze i stereospecifične.⁴⁴ Osim aminokiselina cisteina (Cys) i metionina (Met) zlato može interagirati i s aminokiselinama kao što su, glicin (Gly) i histidin (His), pri čemu nastaju kompleksi prikazani na slici 32.



Slika 32. Zlato(III)-peptid-kompleksi: 1. $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-H}_1)\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i

2. $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-H}_3)]_4\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ⁴⁴

Kompleksi imaju kvadratnu i cikličku strukturu u kojoj je ion zlata(III) premošten dušikovim atomima dviju različitih glicin-L-histidin(Gly-L-Hys) molekula.⁴⁴ Vodene otopine kompleksa zlata(III) imaju pH između 6-7.

§ 4. STRATEGIJE U DIZAJNIRANJU LIJEKOVA

Tradicionalno, otkriće mnogih lijekova bilo je vezano uz sreću ili slučajno opažanje. U novije se vrijeme lijekovi nastoje otkriti postupkom sustavnog probiranja prirodnih spojeva ili raznih drugih spojeva u traganju za željenim medicinskim svojstvima. Kao alternativom znanstvenici se danas koriste znanjima o svojstvima ciljnog mjesta na koje bi budući lijek trebao djelovati i prema tim svojstvima nastoje stvoriti spojeve sa željenim svojstvima.¹⁴

4.1 Farmakokinetika: Termodinamička stabilnost i kinetička labilnost

Molekula lijeka na svojem putu do cilja nailazi na mnoge prepreke, a to se uglavnom odnosi na apsorpciju, raspodjelu, metabolizam i izlučivanje. Ti su procesi međusobno povezani. Za svojstva lijeka koja se odnose na apsorpciju, raspodjelu, metabolizam i izlučivanje rabi se akronim ADME (engl. absorption, distribution, metabolism, excretion) pa se govori o „ADME“ svojstvima.¹⁴ Pomoću ADME su definirane farmakokinetičke karakteristike lijeka. Farmakokinetičke karakteristike lijeka su jako povezane s fizikalnim i kemijskim svojstvima kao što su: topljivost, lipofilnost i stabilnost koje mogu biti modelirane pomoću particijskog koeficijenta raspodjele ($\log P$) i pK_a koji utvrđuju raspodjelu koju lijek postigne između vode i organske faze, n-oktanola.⁶ Mjerenja pK_a i $\log P$ su korisna u predviđanju vezanja lijeka na protein, raspodjeli lijeka u tkivima i apsorpciji lijeka u gastrointestinalnom traktu. Kemičar Christopher Andrew Lipinski je definirao četiri pravila lipofilnosti koja govore da se slaba apsorpcija može očekivati kod spojeva

1. molekulske mase veće od 500,
2. kada je broj donora vodikovih veza veći od 5,
3. kada je broj akceptora vodikovih veza veći od 10, i
4. kada je koeficijent raspodjele (particijski koeficijent) [mjeren kao $\log P$] veći od 5.

Iako su pravila korisna za procjenu i identifikaciju oralne bioraspoloživosti lijekova, ono što treba imati na umu je da ta pravila nađena u malim organskim molekulama lijekova ne moraju se nužno primijeniti i na lijekove koji sadrže metalne ione. Oralna bioraspoloživost opisuje se kao omjer između najviše koncentracije spoja uzetog na usta i najviše koncentracije iste doze dotičnog spoja injicirane izravno u krvotok.¹⁴ Struktura lijekova koji sadrže metal može se mijenjati izmjenom liganda ili transmetilacijom a što je određeno jakom vezom metal-ligand.⁶ Jakost veze se može izraziti pomoću konstante stabilnosti ($\log \beta_n$ n je broj liganada) koja u stanju ravnoteže iznosi 1. To je mjera jakosti kelatacije i izražava se jednačom:

$$\log \beta_n = \log \left(\frac{[ML_n]}{[M][L]^n} \right)$$

Jednačba može biti izražena i pomoću protonacijskih konstanti (K_a i pK_a), disocijacijskih konstanti (K_d i pK_d), efektivne konstante vezanja (K_{eff}) i koncentracije metalnih iona pM .⁶ Mnogi lijekovi su davani intravenozno zbog njihove ograničene topljivosti u usnoj šupljini, pa je potrebno korištenje malih količina metalnih iona da se izbjegnu toksični učinci i nedostatak stabilnosti metal-ligand kompleksa kroz različite pH vrijednosti u trbuhu i crijevima.⁶ Istraživanjem novih lijekova se otvaraju novi vidici u poboljšanju unosa tih lijekova i njihovom usmjeravanju k ciljanoj molekuli.

4.2 Razvoj lijekova

Razvoj lijeka se odvija u dvije glavne faze: preklinički i klinički razvoj lijeka.

4.2.1 Preklinički razvoj lijeka

Tijekom ranog(prekliničkog) razvoja potencijalno korisni spojevi izučavaju se na životinjama radi procjene željenih učinaka i toksičnosti.⁴⁹ Tvari koje se pokazuju djelotvornima i dobro podnošljivima, postaju kandidati za ispitivanje na ljudima čime počinje klinički razvoj.

4.2.2 Klinički razvoj lijeka

Kliničkim se eksperimentima provjeravaju učinkovitosti i mogući neželjeni popratni učinci potencijalnog lijeka prije no što se odobri njegova uporaba. Ti eksperimenti prolaze kroz barem tri faze.**Error! Bookmark not defined.**¹⁴

Prva faza ispitivanja počinje prvom primjenom lijeka kod ljudi.⁵⁰ Provodi se na malom broju ispitanika (20-100) koji su najčešće zdravi dobrovoljci. U toj fazi se ispituje ponašanje lijeka u organizmu, njegova raspoloživost te mogući neželjeni učinci primjene lijeka. Budući da je najčešće riječ o zdravim ispitanicima, cilj nije liječenje bolesti, već utvrditi raspon doze koju je potrebno primijeniti da bi lijek u djelotvornoj dozi stigao do ciljnog mjesta u organizmu. Taj raspon doze koristit će se u budućim ispitivanjima. Važni su i podaci o podnošljivosti lijeka, odnosno priroda štetnih nuspojava. Ispitivanja I. faze provode se u samo jednom ispitnom centru ili nekoliko njih te je obično potreban boravak u bolnici radi pomnog praćenja reakcija. Nakon što se ispitivanjem I. faze utvrdi dinamika lijeka u organizmu i razumna sigurnost primjene lijeka, kreće se s ispitivanjima II. faze.

U drugoj fazi počinje se ispitivati djelotvornost lijeka kod većeg broja ispitanika (obično do nekoliko stotina) koji boluju od određene bolesti.**Error! Bookmark not defined.** Poblje se određuju optimalno djelotvorne doze lijeka, a djelotvornost lijeka uspoređuje se sa standardno dostupnim liječenjem ili placebo, tj. preparat poput šećernih tableta, najbolji standardni lijek koji ne sadrži ljekovite tvari. Cilj te faze ispitivanja je utvrditi ima li lijek željeni terapijski učinak uz prihvatljive štetne događaje.

U trećoj fazi ispitivanja provode se istraživanja na većoj populaciji (100-1000).**Error! Bookmark not defined.** Svrha te faze je potvrda rezultata koji se odnose na učinkovitost potencijalnog lijeka, kao i otkrivanje rjeđih neželjenih popratnih pojava lijeka na većoj populaciji.

Klinička istraživanja su obično skupa, a u istraživanje su uključeni mnogi liječnici, medicinske sestre, klinički farmakolozi, statističari i razni drugi istraživači. Cijene istraživanja se mogu kretati od desetaka do stotina milijuna dolara. Na kraju kada su se rezultati lijeka u sve tri faze pokazali pozitivnima, slijedi zahtjev za registraciju lijeka od FDA (Uprava za hranu i lijekove) što omogućava dostupnost novog lijeka u velikom broju zemalja.**Error! Bookmark not defined.**

§ 5. LITERATURNI IZVORI

1. https://hr.wikipedia.org/wiki/Kompleksni_spojevi (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
2. C.Orvig, J. Abrams, *Chem. Rev.* **9** (1999) 2202-2203.
3. https://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organsku_kemiju/osnove_bioorganometalne_kemije (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
4. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salvarsan_trimer_and_pentamer.svg (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
5. <https://en.wikipedia.org/wiki/Cisplatin> (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
6. K. Dralle Mjos, C. Orvig, *Chem. Rev.* **21** (2013)
7. L. A. Finney, T. V. O'Halloran, *Science* **300** (2003) 931-936.
8. https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-p8-enzimi-1.pdf (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
10. https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae#/media/File:Saccharomyces_cerevisiae_SEM.jpg (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
11. [https://hr.wikipedia.org/wiki/Bakar_\(element\)](https://hr.wikipedia.org/wiki/Bakar_(element)) (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
12. <https://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/Cu/spojevi.html> (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
13. https://www.krenizdravo.rtl.hr/zdravlje/bolesti_zdravlje/Wilsonova-bolest-uzroci-simptomi-i-lijecenje (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
14. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Zagreb, 2013, str. 41-1009.
15. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Mitochondrij> (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
16. https://www.wikiwand.com/bs/Citohrom_c (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
17. <https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-Cox17-and-Sco1-fig5-5776993> (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
18. <https://sr.wikipedia.org/wiki/Metalotionein> (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
19. https://hr.wikipedia.org/wiki/Menkesova_bolest (datum pristupa 27. prosinca 2018.)
20. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Cink> (datum pristupa 28. prosinca 2018.)
21. <https://bs.wikipedia.org/wiki/Cink> (datum pristupa 28. prosinca 2018.)
22. <https://www.x-mol.com/paper/147681> (datum pristupa 28. prosinca 2018.)
23. R. W. – Yin Sun, D. – Lung Ma, E. L. – Ming Wong, C. – Ming Che, *Dalton Trans* (2007) 4884-4892.
24. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Platina> (datum pristupa 28. prosinca 2018.)
25. https://hr.wikipedia.org/wiki/Platina#/media/Datoteka:Platinum_crystal.jpg (datum pristupa 28. prosinca 2018.)
26. <https://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/Pt/spojevi.html> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)

-
27. S. Rendić, M. Medić-Šarić, *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 1.
 28. https://www.researchgate.net/figure/The-platinum-atom-of-cisplatin-binds-covalently-to-the-N7-position-of-purines-to-form_fig2_221920821 (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 29. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10870-013-0419-9> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 30. <https://sandwalk.blogspot.com/2007/07/intercalating-agent-binds-to-dna.html> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 31. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Rutenij> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 32. <https://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/ru/spojevi.html> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 33. <https://edu.glogster.com/glog/rutenij/2b74wd706dq?=glogpedia-source> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 34. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Željezo> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 35. <https://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/fe/spojevi.html> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 36. https://bs.wikipedia.org/wiki/Željezo#/media/Datoteka:Iron_electrolytic_and_1cm3_cube.jpg (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 37. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/bleomycin> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 38. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Vanadij> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 39. <https://www.vanadiumcorp.com/news/industry/http-digitaljournal-com-pr-3994946/attachment/vanadium-1170x610> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 40. <https://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/V/spojevi.html> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 41. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Zlato> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 42. <https://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/Au/spojevi.html> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 43. <https://www.express.hr/ekonomix/kanalizacije-u-svicarskoj-pune-su-zlata-12506> (datum pristupa 29. prosinca 2018.)
 44. Sabine L. Best, Peter J. Sadler, *Gold Bulletin*, **29**(3) (1996) 87-92.
 45. <https://bs.wikipedia.org/wiki/Metaloprotein> (datum pristupa 30. prosinca 2018.)
 46. <https://pharmanetwork.rs/albumin> (datum pristupa 2. siječnja 2019.)
 47. <https://bs.wikipedia.org/wiki/Cistein> (datum pristupa 2. siječnja 2019.)
 48. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Cistin> (datum pristupa 2. siječnja 2019.)
 49. <https://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/klinicka-farmakologija/temelji-farmakoterapije/razvoj-lijekova> (datum pristupa 2. siječnja 2019.)
 50. <https://www.onkologija.hr/lijecenje-raka/klinicka-ispitivanja> (datum pristupa 2. siječnja 2019.)