



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Александар М. Мијатовић

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗАМ СУПСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА
КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) И РУТЕНИЈУМА(II)

Докторска дисертација

Крагујевац, 2015.

Аутор

Име и презиме: **Александар М. Мијатовић**

Датум и место рођења: **06.08.1984. Крагујевац**

Садашње запослење: **Рударско-геолошки факултет, Београд**

Докторска дисертација

Наслов: Кинетика и механизам супституционих реакција комплекса паладијума(II) и рутенијума (II)

Број страница: 100

Број слика: 31

Број библиографских јединица: 221

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

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

Ментор: **др Живадин Д. Бугарчић**

Оцена и одбрана

Датум пријаве теме:

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

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

Број одлуке: **IV-01-689/15.**

Датум прихватања докторске дисертације: **11.12.2013.**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. Др Живадин Д. Бугарчић, ментор, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област:* Неорганска хемија
2. Др Милош Ђуран, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област:* Неорганска хемија
3. Др Маријана Петковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча”, *Научна област:* Хемија
4. Др Биљана Петровић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, *Научна област:* Неорганска хемија

Датум одбране докторске дисертације:

РОДИТЕЉИМА

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

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

Захваљујем се професорима др Милошу Ђурану и др Маријани Петковић на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе.

Посебно се захваљујем др Биљани Петровић на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе, као и на саветима током израде и писања докторске дисертације и пријатељској подршци од самог почетка израде тезе.

Захвалност дугујем др Ратомиру Јелићу, др Биљани Шмит и др Јовани Богојески на помоћи током израде експеримената и обраде добијених резултата. Сарадницима из групе проф. Бугарчића захваљујем на помоћи у завршном кориговању тезе.

Породици дугујем највећу захвалност на пруженој љубави и разумевању. Родитељима захваљујем што су у најтежим тренуцима веровали у мене. Надам се да вам на овај начин делић уложеног враћам.

Списак радова

Радови публиковани у међународним часописима:

1. Aleksandar Mijatović, Biljana Petrović, Ratimir Jelić, Živadin D. Bugarčić

Equilibrium and kinetic studies of the reactions between [Ru(terpy)(bipy)Cl]Cl complex and biologically important N-donor ligands

Inorganica Chimica Acta, 2012, **383**, 300-304.

IF-1,687 (M22)

2. Aleksandar Mijatović, Biljana Šmit, Ana Rilak, Biljana Petrović, Dragan Čanović, Živadin D. Bugarčić

NMR kinetic studies of the interactions between [Ru(terpy)(bipy)(H₂O)]²⁺ and some sulfur-donor ligands

Inorganica Chimica Acta, 2013, **394**, 552-557.

IF-2,041 (M22)

3. Aleksandar Mijatović, Ratimir Jelić, Jovana Bogojeski, Živadin D. Bugarčić, Biljana Petrović

Kinetics, mechanism and equilibrium studies of the reactions between ruthenium(II) complex and some nitrogen- and sulfur- donor nucleophiles

Monatshefte für Chemie, 2013, **144**, 1489-1498.

IF-1,347 (M22)

Радови саопштени на међународним научним конференцијама:

- 1. Jovana Bogojeski, Mirjana Đurović, Aleksandar Mijatović, Biljana Petrović, Živadin D. Bugarčić;**

Kinetics and the mechanism of the substitution reactions of some Pt(II) and Pd(II) complexes

EICC-1, First EuCheMS Inorganic Chemistry Conference, 2011, Manchester, UK, April 11-14, Abstract RM_P012.

- 2. Aleksandar Mijatović, Biljana Petrović, Ratomir Jelić, Živadin. D. Bugarčić;**

Kinetics and equilibrium studies of the reaction between [Ru(terpy)(bipy)Cl]Cl complex and biologically important ligands

16th European Conference on Analytical Chemistry “Challenges in Modern Analytical Chemistry” September 12-15, Abstract PM07.

ИЗВОД

Открићем антитуморског дејства цисплатине од стране Б. Розенберга 60-их година двадесетог века отпочела је права револуција у терапији тешких болести лековима на бази комплекса јона прелазних метала. Многобројна истраживања у овој области довела су до тога да се данас поред цисплатине и неки други комплекси Pt(II), као што су карбоплатина и оксалиплатина, интезивно користе у хемотерапији. Последњих 40 година велики број других комплекса платине синтетисан је са циљем да се постигне боља активност у односу на цисплатину. Поред комплекса Pt(II) са уобичајеном квадратно-планарном структуром испитивани су и тзв. неklasични комплекси платине, где спадају комплекси Pt(IV), полинуклеарни Pt(II) комплекси, али и комплекси других јона метала.

Комплекси Ru имају велики потенцијал за употребу у терапији канцера због својих значајних карактеристика, као што су кинетика лигандне измене, широк опсег оксидационих стања и сличних особина рутенијума и гвожђе у биохемијским процесима. Кинетика лигандне измене одређује биолошку активност комплекса метала и његову интеракцију са макромолекулама, као што су протеини. Такође су подједнако важне и интеракције са аминокиселинама, пептидима и нуклеотидима. Параметри кинетике лигандне измене за комплексе Ru(II) и Ru(III) јона су слични параметрима за комплексе Pt(II) јона. Рутенијум у физиолошким условима постоји у три оксидациона стања: Ru(II), Ru(III) и Ru(IV), која карактеришу различите биолошке активности. Комплекси Ru(III) су биолошки инертнији од аналогних Ru(II) и Ru(IV) комплекса, а посебно је важно то што под утицајем средине могу променити своје оксидационо стање. Рутенијум се на молекуларном нивоу понаша као гвожђе и може се везати за албумин и трансферин. Пошто ћелије канцера имају повећану потребу за гвожђем, на њиховој површини је повећан број трансферинских рецептора од 2 до 12 пута у односу на здраве ћелије. Комплекси Ru се тада везују за трансферин и тиме селективније делују на туморска ткива, па су и споредни нежељени ефекти смањени. Још једна важна карактеристика комплекса рутенијума је спречавање одвајања и миграције туморних ткива, као и њихове адхезије на удаљеним местима.

За испитивање кинетике и механизма супституционих реакција комплекса Pt(II) једињења Pd(II) представљају погодне моделе, узимајући у обзир чињеницу да комплекси

Pd(II) реагују 10^3 - 10^5 пута брже од аналогних комплекса Pt(II). Због јако великог афинитета према сумпор- и азот-донорским лигандима, као и јако велике реактивности, селективност комплекса Pd(II) према биомолекулима је мала, што ограничава употребу ових једињења као антитуморских агенаса. Међутим, последњих година утврђено је да неки комплекси Pd(II) ипак поседују антитуморску активност.

У оквиру овог рада представљени су резултати добијени изучавањем супституционих реакција Ru(II) и Pd(II) комплекса са различитим сумпор- и азот-донорским нуклеофилима. Интеракције комплекса јона прелазних метала са азот- и сумпор-донорским биомолекулима су значајне, јер се помоћу њих објашњава антиканцерогена активност комплекса, али и њихова токсичност.

Добијени резултати су представљени следећим редоследом:

- Кинетика супституционих реакција $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ и $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ комплексних јона са нуклеофилима Tu, I⁻, Br⁻, NO₂⁻, py и DMSO испитивана је у 0,1 M NaClO₄. Реакције су изучаване као реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације лиганда и температуре „stopped-flow” спектрофотометријски. Температурска зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , је проучавана за реакције супституције $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ са I⁻ и Py, као и за реакције супституције $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ са I⁻, Br⁻, Py и DMSO. Код изучаваних процеса супституције солволитички пут је елиминисан додатком 10 mM NaCl, па се реакције директне супституције одигравају као реверзибилан процес. Добијени резултати указују да $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ реагује приближно три пута брже него $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$. Такође, тиоуреа је најреактивнија у односу на остале улазне лиганде, док је због веће поларизабилности I⁻ јон реактивнији од Br⁻ и NO₂⁻ јона. Мала реактивност DMSO и пиридина је последица стерних ефеката. Негативне вредности ентропије активирања за све изучаване реакције указују на асоцијативни механизам супституције.
- Кинетика супституционих реакција $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ са Tu, L-Met, L-Cys и GSH испитивана је ¹H и ¹³C NMR методом. Реакције су праћене у еквимоларном односу реактанта у D₂O, на температури од 295 K и pH = 4 - 5,3, као и у присуству фосфатног пуфера на pH = 7,4. Након растварања полазног $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ у води долази до брзе хидролизе и формирања аква

аналога. Реактивност улазних лиганда према $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ опада у низу: $\text{Tu} \gg \text{L-Met} > \text{L-Cys} > \text{GSH}$. Процес супституције на $\text{pH} = 7,4$ је нешто бржи него на $\text{pH} = 4 - 5,3$.

- Кинетика и механизма супституционих реакција $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ комплексног јона са Tu , L-His , DMSO и $5'\text{-GMP}$ је испитивана спектрофотометријски на 310 K у $0,1 \text{ M NaClO}_4$ уз додатак 20 mM NaCl , да би се спречила спонтана хидролиза Ru(II) комплекса. Реакције су изучаване под условима реакције *pseudo*-првог реда. На основу добијених вредности за константу брзине реакције другог реда, k_2 , одређен је редослед реактивности нуклеофила: $\text{Tu} > 5'\text{-GMP} > \text{L-His} > \text{DMSO}$. Реакција између $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ и Tu проучавана је на три различите температуре ($288, 298$ и 308 K), а на основу израчунате вредности ентропије активирања потврђен је асоцијативни механизам супституције.
- Испитивање хидролизе $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ вршено је потенциометријском и спектрофотометријском методом. Израчуната константа киселости за $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ је $\text{pK}_{a1} = 4,27$. Први корак хидролизе подразумева формирање хидроксо-комплекса $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{OH}]^+$, док у другом ступњу хидролизе настаје врло специфичан комплекс $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{O})]$, на $\text{pK}_{a2} = 10,11$. Одређена је равнотежна константа за реакцију димеризације, $K_{\text{dim}} = 3,45$. На физиолошкој pH вредности $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ првенствено егзистира у хидроксо облику $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{OH}]^+$.
- Испитивањем реакција комплексирања између $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ и $5'\text{-GMP}$ или L-His потенциометријском методом у $0,1 \text{ M NaClO}_4$ на 298 K израчунате су константе стабилности наглађених комплекса, као и њихов састав. Добијене вредности за константе стабилности, $\log\beta_{1,1,0}$, показују да је комплекс са $5'\text{-GMP}$ много стабилнији у односу на комплекс са L-His због присуства интрамолекулских водоничних веза.

Резултати ове докторске дисертације публиковани су у оквиру 3 научна рада у познатим интернационалним часописима.

SUMMARY

Discovery of the antitumor activity of cisplatin by B. Rosenberg during the 60's of the twentieth century started a real revolution in the treatment of severe disease drugs based on the transition metal ion complexes. Most of the results in this field have led to the conclusion that today, beside cisplatin, other complexes of Pt(II), such as carboplatin and oxaliplatin, are used extensively in chemotherapy. In the past 40 years a large number of other platinum complexes were synthesized in order to obtain a compound with better activity than cisplatin. In addition, the complexes of Pt(II) with conventional square-planar structure and so-called nonclassical platinum complexes, which include complexes of Pt(IV) and polynuclear Pt(II) complexes have been studied as well. However, the complexes of other metal ions were also included in these investigations.

Ruthenium complexes have a great potential for application in cancer therapy because of their significant features, such as kinetics of ligand exchange, different oxidation states and property that ruthenium can mimic iron in biochemical processes. Kinetics of the ligand exchange determines their biological activity and interactions with macromolecules, such as proteins. The interactions with other biomolecules (amino acids, peptides and nucleotides) are also very important. The parameters of the ligand exchange kinetics for the Ru(II) and Ru(III) complexes are very similar to the values obtained for Pt(II) complexes. Under the physiological conditions ruthenium can exist in three oxidation states: Ru(II), Ru(III) and Ru(IV). Each of them has different biological activity. Complexes of Ru(III) are biologically more inert than analogue Ru(II) or Ru(IV) complexes. Nevertheless, the ruthenium ion can easily change its oxidation state depending of the environment. Ruthenium can mimic iron and it may be bound to albumin and transferrin. Since cancer cells have an increased need for iron, on their surface accumulates increased number of transferrin receptors, 2 to 12 times more than in the case of healthy cells. Then, the ruthenium complexes bind to transferrin and thereby selectively act on tumor tissue, whereas side effects are reduced. Another important feature of the ruthenium complexes is preventing the separation and migration of tumor tissues and their adhesion on remote locations.

For study of the kinetics and mechanism of the substitution reactions of Pt(II) complexes Pd(II) complexes are very suitable models, taking into account the fact that Pd(II) complexes

react 10^3 - 10^5 times faster than the Pt(II) analogous. Due to the very high affinity for sulfur and nitrogen donor ligands, as well as a very high reactivity, the selectivity of Pd(II) complexes toward bio-molecules is small. All these facts limit the application of these compounds as antitumor agents. However, in recent years it was established that some complexes of Pd(II) possess antitumor activity.

In this thesis are presented results obtained from the study of substitution reaction of some Ru(II) and Pd(II) complexes with different sulfur- and nitrogen-donor nucleophiles. The interactions of the complexes with sulfur- and nitrogen-containing bio-molecules are very important since that their antitumor activity as well as toxic side effects could be explained by these interactions.

The results are presented in the following order:

- Kinetic of the substitution reactions of $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ and $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ with nucleophiles such as Tu, I^- , Br^- , NO_2^- , py and DMSO were studied in 0.1 M NaClO_4 . The reactions were studied as a *pseudo*-first order reactions as a function of ligand concentration and temperature by stopped-flow spectrophotometry. Temperature dependence of the *pseudo*-first order rate constants was studied for the substitution reaction of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ with I^- and Py as well as for the substitution reactions of $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ with I^- , Br^- , Py and DMSO. In all studied systems solvolytic pathway was eliminated by addition of 10 mM NaCl. So, all reactions occur in a reversible manner. The obtained results indicate that $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ reacts approximately three times faster than $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$. Furthermore, thiourea is the most reactive ligand compared with the other incoming ligands. The great polarizability of I^- can explain its higher reactivity comparing with reactivity of Br^- and NO_2^- ions. Small reactivity DMSO and pyridine is the result of steric effects. Negative values of entropy of activation for all studied reactions indicate the associative substitution mechanism.
- Kinetics of the substitution reaction of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ with Tu, L-Met, L-Cys and GSH was studied by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The concentration of the reactants was equimolar for all studied systems. The reactions were monitored in D_2O at 295 K and at pH 4.0, 5.3 and 7.4. After dissolution of the starting $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ ion in water a rapid hydrolysis and the formation of aqua

analogs occurs. Reactivity towards incoming ligands of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ decreases in the order: Tu \gg L-Met $>$ L-Cys $>$ GSH. Process of the substitution at pH 7.4 is faster than at pH 4 and 5.3.

- Kinetics and mechanism of the substitution reactions of $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ with Tu, L-His, DMSO and 5'-GMP was monitored spectrophotometrically at 310 K in 0.1 M NaClO_4 with the addition of 20 mM NaCl, to prevent spontaneous hydrolysis of Ru(II) complexes. The reactions were studied under the *pseudo*-first order conditions. Based on the obtained values for the calculated second-order rate constants, k_2 , the order of reactivity of the nucleophile was determined: Tu $>$ 5'-GMP $>$ His L $>$ DMSO. The reaction between $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ and Tu has been studied at three different temperatures (288, 298 and 308 K). On the base of the calculated value for entropy of activation an associative mechanism of substitution was confirmed.
- The hydrolysis of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ was studied by potentiometric and spectrophotometric method. The calculated acidity constant for $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ complex is $\text{pK}_{a1} = 4.27$. The first hydrolysis step involves the formation of hydroxo $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{OH}]^+$ complex while in a second step of the hydrolysis a very specific ion $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{O})]$ at $\text{pK}_{a2} = 10.11$ was formed. The equilibrium constant for the dimerization reaction was calculated, $K_{\text{dim}} = 3.45$. At physiological pH $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ exists primarily in the form of hydroxo $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{OH}]^+$ complex.
- Study of the complexation reactions between $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ and 5'-GMP and L-His by potentiometric method in 0.1 M NaClO_4 at 298 K enables a calculation of the stability constants of formed complexes as well as their composition. The obtained values of stability constants, $\log\beta_{1,1,0}$ show that the complex with 5'-GMP is more stable than the complex with L-His due to the presence of intramolecular hydrogen bonds.

The results of this doctoral thesis were published within three scientific papers in international journals.

СКРАЋЕНИЦЕ И ОЗНАКЕ

Uv-Vis	спектрофотометрија у ултраљубичастој и видљивој области
NMR	нуклеарно магнетна резонантна спектроскопија
IR	инфрацрвена спектроскопија
stopped-flow	метода заустављеног тока
S _E	електрофилна супституција
S _N	нуклеофилна супституција
D	дисоцијативни механизам
A	асоцијативни механизам
I	механизам измене
E _a	енергија активирања
R	гасна константа (8,314 JK ⁻¹ M ⁻¹)
T	температура у Келвиновим степенима (K)
ΔH [‡]	промена енталпије активирања
ΔS [‡]	промена ентропије активирања
ΔG [‡]	промена слободне (Гибсове) енергије
ΔV [‡]	промена запремине активирања
N	Авогадров број (6,022 · 10 ²³ mol ⁻¹)
h	Планкова константа (6,626 · 10 ⁻³⁴ Js)
P	Притисак
k ₁	константа брзине реакције супституције која се одиграва по
k ₂	константа брзине реакције директне нуклеофилне супституције
k	константа брзине хемијске реакције
k _o	фактор учестаности
bpy	2,2'-бипиридин
dach	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-диаминциклохексан
phen	1,10-фенантролин
trpy	2,2':6',2''-терпиридин
en	етилендиамин
bn	бутилендиамин
ox	оксалато лиганд
цисплатина	<i>cis</i> -диамминдихлоридоплатина(II)
трансплатина	<i>trans</i> -диамминдихлоридоплатина(II)

карбоплатина	<i>cis</i> -диамин(1,1-циклобутандикарбоксилато)платина(II)
оксалиплатина	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-диаминциклохексан(оксалато)платина(II)
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
L-Met	L-метионин
L-Cys	L-цистеин
L-His	L-хистидин
GSH	глутатион (γ-глутамил-цистеинил-глицин)
5'-GMP	гуанозин-5'-монофосфат
DMSO	диметилсулфоксид
edta	етилендиаминтетрасирћетна киселина
pdta	1,2-пропилендиаминтетраацетато
dppz	дипиридо[3,2-а:2',3'-с]феназин
dpq	дипиридо[3,2-ф:2',3'-h]хиноксалин
dpx	7,8-диметилдипиридофеназин
GSSG	глутатион дисулфид (оксидовани)
Tu	тиоуреа
A	апсорбција раствора
t	време у секундама (s)
k _{obs}	константа брзине реакције <i>pseudo</i> -првог реда
K _{dim}	равнотежна константа за реакцију димеризације
K _{H2O}	константа хидролизе
K _a	константа киселости
TL ^{tBu}	2,6- <i>bis</i> [(1,3-ди- <i>terc</i> -бутилимидазолин-2-имино)метил]пиридина
tpdm	терпиридиндиметан
NAMI-A	имидазолијум[<i>trans</i> -тетрахлоридо(диметилсулфоксид)]
azpy	2-фенил-азопиридин
py	пиридин
KP1019	имидазолијум[<i>trans</i> -тетрахлоридобис(1H-индазол)(имидазол)]

САДРЖАЈ:

Увод.....	1
1. Општи део	
1.1. Кинетика хемијских реакција рутенијума и паладијума.....	4
1.2. Супституционе реакције комплексних једињења.....	5
1.3. Активациони параметри.....	7
1.4. Одређивање механизма нуклеофилних супституционих реакција.....	9
1.5. Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса.....	10
1.6. Утицај различитих фактора на реактивност квадратно-планарних комплекса.....	13
1.6.1. Утицај централног јона метала.....	13
1.6.2. Ефекат улазног лиганда.....	14
1.6.3. <i>Trans</i> -ефекат.....	18
1.7. Хидролиза и хидратација јона метала.....	19
1.8. Реакције супституције октаедарских комплекса.....	20
1.8.1. Утицај одлазећег лиганда.....	22
1.8.2. Утицај природе инертног лиганда.....	22
1.8.2.1. Утицај положаја инертног лиганда.....	24
1.8.2.2. Утицај наелектрисања инертног лиганда.....	25
1.8.3. Стерне сметње.....	26
1.8.4. Редокс-реакције октаедарских комплекса.....	26
1.9. Антитуморска активност комплекса Ru и Pd.....	27
1.10. Комплекси Ru(III).....	30
1.11. Комплекси Ru(II).....	32
1.12. Рутенијум(II) аренски комплекси.....	33
1.13. Комплекси рутенијума са лигандима edda типа.....	37
1.14. Комплекси Pd(II).....	38
1.15. Класични и неklasични хемотерапеутици.....	42
Задатак рада.....	46
2. Експериментални део	
2.1. Реагенси и раствори.....	47
2.2. Синтеза комплекса.....	47
2.2.1. Синтеза комплекса хлоридо-2,2'-бипиридин-2,2':6',2''-терпиридинрутенијум (II)-перхлората [RuCl(trpy)(bpy)]ClO ₄	47
2.2.2. Синтеза комплекса хоридо-2,6-бис[(1,3-ди- <i>терц</i> -бутил имидазолин-2-имино) метил]пиридинпаладијум(II)-перхлората, [(TL ^{tBu})PdCl] ClO ₄	48
2.2.3. Синтеза комплекса хоридо(терпиридиндиметил)паладијум(II)-перхлората, [Pd(tpdm)Cl]ClO ₄	48
2.3. Инструменти.....	49
2.4. Кинетичка мерења.....	50
2.4.1. Супституционе реакције комплекса Ru(II).....	50

2.4.2.	Супституционе реакције комплекса Pd(II).....	50
2.5.	¹ H NMR мерења.....	51
2.6.	Спектрофотометријска титрација јона [Ru(trpy)(bpy)H ₂ O] ²⁺	52
2.7.	Потенциометријска мерења.....	52

3. Резултати и дискусија резултата

3.1.	Испитивање кинетике супституционих реакција [(TL ^t Bu)PdCl] ⁺ и [PdCl(tpdm)] ⁺ комплекса.....	54
3.2.	Испитивање кинетике супституционих реакција [Ru(trpy)(bpy)H ₂ O] ²⁺ комплекса са Tu, L-Met, L-Cys и GSH.....	64
3.3.	Испитивање кинетике супституционих реакција [RuCl(trpy)(bpy)] ⁺ комплекса.....	75
3.4.	Испитивање хидролизе и реакција комплексирања [Ru(trpy)(bpy)H ₂ O] ²⁺ комплекса.....	78
3.4.1.	Испитивање хидролизе [Ru(trpy)(bpy)H ₂ O] ²⁺ комплекса потенциометријском методом.....	78
3.4.2.	Испитивање хидролизе [Ru(trpy)(bpy)H ₂ O] ²⁺ комплекса спектрофотометријском методом.....	80
3.4.3.	Испитивања реакција комплексирања [Ru(trpy)(bpy)H ₂ O] ²⁺ комплекса и лиганата HL (где је HL = 5'- GMP или L- His).....	82
Закључак		85
Литература		87
Биографија		100

УВОД

Комплексна једињења, поред свог фундаменталног значаја у оквиру координационе хемије, заузимају посебно место у бионеорганској и медицинској хемији због примене у дијагностици и лечењу различитих врста обољења, као што су канцер, артритис, дијабетес, Алцхајмерова болест, итд.^{1,2} С тим у вези, многобројна истраживања су данас усмерена ка дизајнирању и добијању нових комплексних једињења која ће за циљ имати успешније лечење, али и превенцију различитих болести.

Један од главних циљева бионеорганске хемије тренутно је испитивање механизма деловања комплекса јона прелазних метала у биолошким системима, јер се сам почетак болести одиграва на ћелијском нивоу и ту треба тражити одговоре на питања да ли је могуће ток болести зауставити или не.¹⁻³

Открићем антитуморних карактеристика комплекса цисплатине крајем шездесетих година прошлог века покренута су опсежна истраживања у области платинских једињења.⁴ Успех цисплатине изазвао је велики интерес за развој нових Pt(II) комплекса, тако да се данас карбоплатина и оксалиплатина интензивно користе као антитуморски лекови. Поред тога, уследила је синтеза многих других неплатинских комплекса, са циљем добијања једињења које ће имати већу биолошку активност, а мању токсичност у односу на цисплатину.

У досадашњим истраживањима комплекси Ru(II) и Ru(III) показали су завидну антитуморску активност у *in vitro* условима, док се само неколико комплекса налази у клиничким испитивањима. Механизам антитуморског дејства комплекса рутенијума још увек у потпуности није разјашњен и представља предмет многобројних истраживања. Зато је испитивање реакција супституције комплекса рутенијума са различитим сумпор- и азот-донорским биомолекулима од великог значаја.

Комплекси Pd(II) не показују антитуморску активност, али изазивају велику пажњу у истраживањима услед тога што показују слично хемијско понашање као и комплекси

Pt(II), с тим што реагују 10^3 - 10^5 пута брже. Они се пре свега користе као погодни модели за истраживања.

У оквиру ове докторске дисертације приказани су резултати добијени проучавањем супституционих реакција комплекса Ru(II) и Pd(II) са различитим сумпор- и азот-донорским биомолекулима.

- У Општем делу детаљно су описане супституционе реакције комплексних једињења, као и методе за одређивање механизма супституционих реакција. Детаљно су приказане супституционе реакције квадратно-планарних и октаедарских комплекса са посебним освртом на факторе који утичу на процес супституције. Такође, дат је преглед биолошке активности и начина антитуморског дејства комплекса Ru(II), Ru(III) и аренских Ru(II) комплекса. Приказани су и досадашњи публиковани резултати истраживања Pd(II) комплекса.
- У Експерименталном делу, су поред припреме реагенса и раствора, описане синтезе проучаваних комплекса и методе коришћене приликом испитивања кинетике супституционих реакција. Детаљно су описане методе (потенциометријска и спектрофотометријска) за изучавање хидролизе и комплексирања Ru(II) јона.
- У поглављу Резултати и дискусија резултата прво су приказани добијени резултати испитивања кинетике и механизма супституционих реакција $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ и $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ са I^- , Br^- , NO_2^- , Tu и DMSO у зависности од температуре и концентрације нуклеофила. Испитивања су вршена спектрофотометријски, методом заустављеног тока. Потом су приказани резултати испитивања супституционих реакција монофункционалног комплекса $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ са лигандима L-His, 5'-GMP, Tu и DMSO UV- Vis спектрофотометријски на 298 K, док је само реакција са Tu испитивана на 288, 298 и 308 K. Након тога приказани су резултати испитивања кинетике супституционих реакција монофункционалног комплекса $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^+$ са лигандима L-Met, L-Cys, GSH и Tu помоћу ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије на 295 K у присуству фосфатног пуфера. Такође, детаљно

су описани резултати добијени потенциометријским испитивањем хидролизе $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^+$ и комплексирања $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^+$ јона са L-His и 5'-GMP. pKa вредност $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^+$ одређена је и UV-Vis спектрофотометријски.

Резултати ове докторске дисертације објављени су у оквиру 3 научна рада у познатим међународним часописима.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Кинетика хемијских реакција рутенијума и паладијума

Изучавање кинетике хемијске реакције има за циљ утврђивање брзине којом од реактаната настаје производ реакције, као и утврђивање утицаја различитих параметара (промена концентрације реактаната, рН, промена температуре и притиска, увођење катализатора, итд.) на брзину реакције. Утврђивање елементарних реакционих корака који воде ка настанку производа реакције, тј. одређивање механизма реакције је, такође, један од циљева изучавања хемијске кинетике реакција. Одређивање механизма реакције подразумева анализу начина на који се нека хемијска веза раскида, а затим и начина на који се нова хемијска веза формира. Пошто се у том случају мора узети у обзир да сваки елементарни корак реакције има свој механизам, комплетно објашњење реакционог механизма је тешко достижан циљ.

Са Шеме 1.1. могу се видети одређене фазе које се морају узети у обзир приликом одређивања механизма хемијске реакције.⁵



Шема 1.1. Кораци у одређивању механизма хемијске реакције.⁵

Проучавање механизма неорганских реакција доживљава експанзију развојем органометалне и бионеорганске хемије, односно са развојем нових експерименталних техника (Uv-Vis спектрофотометрија, NMR спектроскопија, „stopped-flow” спектрофотометрија, HPLC, итд.).

1.2. Супституционе реакције комплексних једињења

Супституционе реакције комплексних једињења могу бити електрофилне (S_E) и нуклеофилне (S_N) у зависности од тога да ли у процесу супституције долази до замене централног јона метала или лиганда. Уколико се у току реакције супституише јон метала, тј. електрофил, у питању је реакција електрофилне супституције, једначина (1.2.1), а уколико се врши замена лиганда, комплекс подлеже реакцији нуклеофилне супституције, једначина (1.2.2).



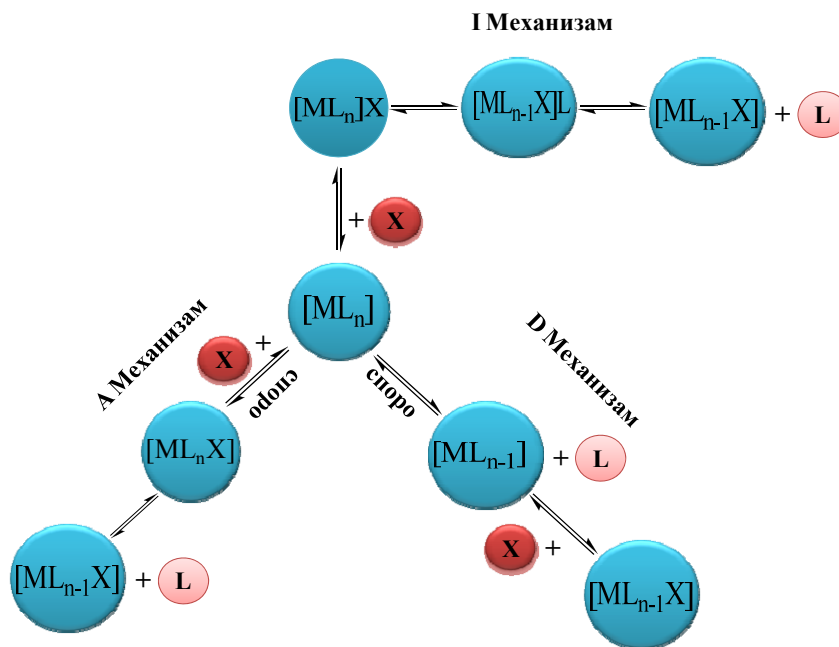
Нуклеофилне супституционе реакције, према Лангфорду и Греју (Langford, Gray),⁶ одвијају се по три различита механизма:

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

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

Код асоцијативног механизма (A) у првој фази улазни лиганд X се везује за централни јон метала, градећи интермедијер са повећаним координационим бројем, а затим, у другој фази одлазећи лиганд L напушта координациону сферу комплекса.

Реакција грађења интермедијера са повећаним координационим бројем је спорија и она одређује брзину овог процеса супституције.



Шема 1.2. Механизми нуклеофилне супституције комплексних једињења.

Механизам измене (I) је процес код кога се, у првој фази, улазни лиганд X везује електростатичким силама за спољашњу координациону сферу комплекса. Потом долази до миграције улазног лиганда из спољашње у унутрашњу координациону сферу уз истовремену миграцију одлазећег лиганда L из унутрашње у спољашњу координациону сферу. Крајни процес је раскидање везе између комплекса и одлазећег лиганда. Овај механизам, за разлику од претходна два нема интермедијера али постоји прелазно стање, тј. процес поседује своју енергију активирања. Механизам измене се може поделити на I_a и I_d механизме. Уколико процес раскидања везе између централног јона метала и одлазећег лиганда L има већи утицај на брзину реакције, механизам се обележава са I_d, а уколико процес формирања нове везе између централног јона метала и улазног лиганда X има већи утицај на брзину хемијске реакције, механизам се обележава са I_a.^{6,7}

1.3. Активациони параметри

Одређивање механизма хемијске реакције заснива се на анализи добијених вредности термодинамичких параметара (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔV^\ddagger), који карактеришу одређени процес. Неопходно је прво дефинисати вредност константе брзине хемијске реакције k , за чије одређивање постоји велики број експерименталних метода. Избор одговарајуће методе зависи како од брзине процеса који се проучава, тако и од особина учесника хемијске реакције.⁸

Познавање вредности константе брзине хемијске реакције на различитим температурама омогућава одређивање осталих термодинамичких параметара. Вредност енергије активирања E_a одређује се помоћу Аренијусове (Arrhenius) једначине (1.3.1).⁸⁻¹⁰

$$k = k_0 \exp(-E_a/RT) \quad (1.3.1)$$

у којој је k константа брзине хемијске реакције, k_0 фактор учестаности, R гасна константа и T температура на којој је одређена вредност константе брзине. Логаритмовањем једначине (1.3.1) добија се израз:

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT \quad (1.3.2)$$

у коме постоји линеарна зависност $\ln k$ од $1/T$. Ова зависност је линеарна у ужем температурном интервалу од 30 - 40°C. То значи да познавањем вредности константе брзине хемијске реакције за најмање три температуре, графичким путем може се одредити вредност члана $-E_a/R$, односно, вредност енергије активирања за изучавану реакцију.^{8,9}

Промена енталпије активирања ΔH^\ddagger одређује се из једначине (1.3.3).

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (1.3.3)$$

Промена ентропије активирања ΔS^\ddagger је величина која представља мерило неуређености система, односно, промену слободне (Gibbs-ове) енергије ΔG^\ddagger са променом температуре T и може се изразити помоћу једначине (1.3.4)

$$\left(\frac{d(\Delta G^\ddagger)}{dT}\right) = -\Delta S^\ddagger \quad (1.3.4)$$

Вредност ΔS^\ddagger одређије се на основу Ајрингове (Eyring) једначине (1.3.5):

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (1.3.5)$$

С обзиром да се промена слободне енергије ΔG^\ddagger може изразити преко промене енталпије активирања и промене ентропије активирања, једначина (1.3.6):

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger + T\Delta S^\ddagger \quad (1.3.6)$$

заменом у изразу (1.3.5) даје једначину (1.3.7):

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \quad (1.3.7)$$

Логаритмовањем једначине (1.3.7) добија се израз:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{R}{Nh}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (1.3.8)$$

На основу израза (1.3.8) видимо да постоји линеарна зависност $\ln(k/T)$ од $1/T$, тј. графички на основу ове једначине из нагиба добијене праве одређује се вредност промене енталпије активирања, а из одсечка праве израчунава се вредност промене ентропије активирања. Први члан, $\ln(R/Nh)$, је константа и на 25°C износи 23,8.^{10,11}

Повезаност константе брзине хемијске реакције и промене запремине активирања ΔV^\ddagger дата је Вант-Хофовом (Van't Hoff) једначином (1.3.9):

$$\left(\frac{d(\ln k)}{dP}\right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.3.9)$$

Вредност за ΔV^\ddagger добија се праћењем промене константе брзине хемијске реакције у зависности од притиска, а на основу једначине (1.3.10):

$$\Delta V^\ddagger = -bRT \quad (1.3.10)$$

у којој b представља нагиб праве $\ln k = f(P)$. Запремина активирања ΔV^\ddagger састоји се из два члана, једначина (1.3.11).

$$\Delta V^\ddagger = \Delta V^\ddagger_{\text{int}} + \Delta V^\ddagger_{\text{sol}} \quad (1.3.11)$$

Први члан $\Delta V^\ddagger_{\text{int}}$ односи се на промене у интернуклеарним растојањима и угловима веза приликом настајања активираниог комплекса, док други члан $\Delta V^\ddagger_{\text{sol}}$ описује промене у наелектрисању, као и диполне интеракције у активираниом комплексу. Зато, уколико реагују наелектрисани јони у процесу супституције допринос другог члана може бити већи од првог, па вредност запремине активирања није поуздан критеријум за одређивање механизма. Међутим, када у току процеса супституције нема промена у наелектрисању, други члан у изразу (1.3.11) може се занемарити, тј. тада запремина активирања зависи само од $\Delta V^\ddagger_{\text{int}}$. У том случају је вредност ΔV^\ddagger најпоузданији критеријум за одређивање механизма супституције.^{12,13}

1.4. Одређивање механизма нуклеофилних супституционих реакција

Одређивање механизма нуклеофилне супституционе реакције врши се на основу вредности термодинамичких параметара,⁹⁻¹³ који карактеришу проучавани процес. Један од параметара помоћу кога се на врло једноставан начин може прелиминарно одредити механизам супституције је константа брзине хемијске реакције. На основу једначина које карактеришу процесе дисоцијативног, асоцијативног и механизма измене (Шема 1.2) може

се видети да је процес супституције по дисоцијативном механизму реакција првог реда, а по асоцијативном механизму реакција другог реда. С тим у вези, уколико се приликом изучавања неке реакције установи да природа улазног лиганда не утиче на брзину реакције, тада се ради о дисоцијативном или I_d механизму супституције. И обрнуто, уколико брзина хемијске реакције зависи од природе улазног лиганда, реакција се дешава по асоцијативном или I_a механизму супституције.^{6,7}

Поузданији критеријум за одређивање механизма је познавање вредности промене ентропије активирања ΔS^\ddagger . Пошто је ентропија активирања мерило неуређености система, а на основу сазнања да се код различитих механизма формира интермедијер са већом или мањом неуређеношћу, овај параметар омогућава одређивање механизма супституције. У случају D механизма настаје интермедијер са смањеним координационим бројем, односно, повећава се неуређеност система и ΔS^\ddagger има позитивну вредност. Код асоцијативног механизма настаје интермедијер са повећаним координационим бројем и смањује се неуређеност система, односно, ΔS^\ddagger има негативну вредност. У случају I механизма ΔS^\ddagger је приближно једнако нули.

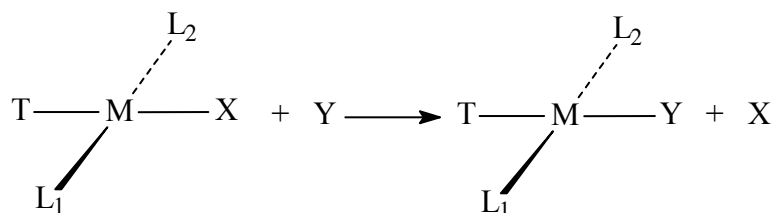
Најпоузданији критеријум за одређивање механизма је вредност промене запремине активирања.^{12,13} Узимајући у обзир врсту интермедијера код различитих механизма, повећање притиска ће убрзавати реакције које се дешавају по A механизму, а успоравати реакције по D механизму. Зато, негативна вредност за ΔV^\ddagger указује на A или I_a механизам, а позитивна вредност за ΔV^\ddagger указује на D или I_d механизам супституције. У случају механизма измене, притисак не утиче значајније на брзину супституције.

1.5. Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса

Квадратно-планарне комплексе граде јони метала са d^8 електронском конфигурацијом. У ову групу спадају $Pt(II)$, $Pd(II)$, $Au(III)$, $Ir(I)$, $Rh(I)$ и $Ni(II)$. Општа формула ових комплексних једињења је $[ML_1L_2TX]$, односно, они се састоје од централног јона метала и четири лиганда. Ова група комплексних једињења поседује D_{4h} групу симетрије, тако да су везе метал-лиганд усмерене дуж x - и y -осе.¹⁴

Супституционе реакције комплекса Ir(I) и Rh(I), као и Pd(II) и Au(III), одигравају се веома брзо. Међутим, супституционе реакције комплекса Pt(II) одигравају се знатно спорије.¹⁵

Реакција супституције лиганда код квадратно-планарних комплекса^{6,7} приказана је на Шеми 1.3.



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

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

Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса одвијају се по два кинетичка пута. Један је тзв. директна нуклеофилна супституција окарактерисана константом k_2 , једначина (1.4.1).



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



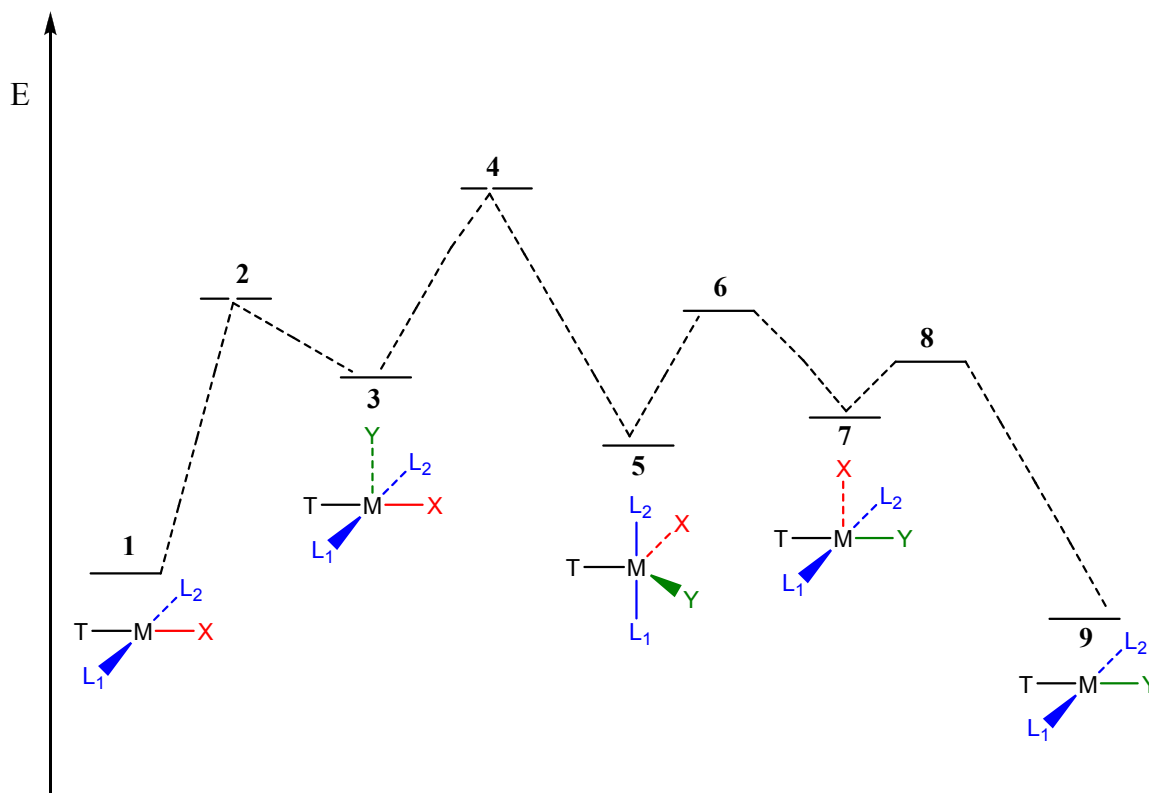
Израз за брзину супституционе реакције обухвата оба кинетичка пута и приказан је једначином (1.4.4).

$$\text{BRZINA} = k_1[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}] + k_2[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}][\text{Y}] \quad (1.4.4)$$

Односно

$$\text{BRZINA} = (k_1 + k_2[\text{Y}])[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}] \quad (1.4.5)$$

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



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

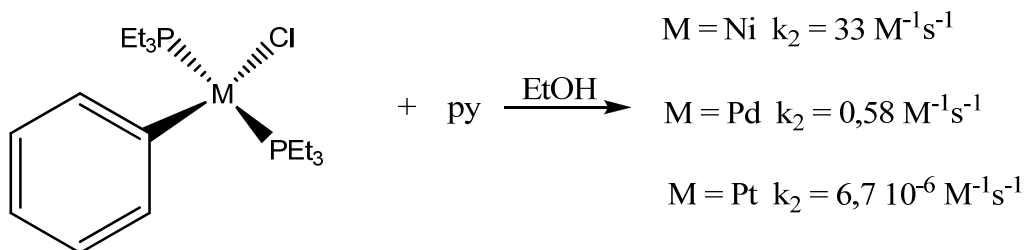
1.6. Утицај различитих фактора на реактивност квадратно-планарних комплекса

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

1.6.1. Утицај централног јона метала

Ефекат централног јона метала на брзину супституције квадратно-планарних комплекса је веома велики. Уочено је да реактивност комплекса у зависности од врсте јона метала опада у низу $\text{Ni(II)} > \text{Pd(II)} > \text{Pt(II)}$.⁹ Велика разлика у реактивности ових

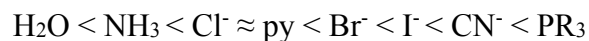
комплекса може се приписати порасту величине јона метала од Ni(II) (83 pm) до Pt(II) (94 pm), што доприноси да Ni(II) јон може много лакше да повећа координациони број, тј. да награди интермедијер тригонално-бипирамидалне структуре, преко кога се одигравају супституционе реакције квадратно-планарних комплекса (Шема 1.4.).^{9,14}



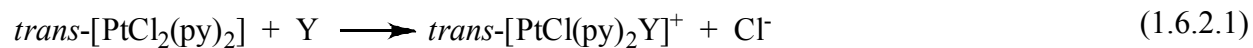
Слика 1.1. Константа брзине за реакције супституције комплекса јона метала d^8 електронске конфигурације.¹¹

1.6.2. Ефекат улазног и одлазећег лиганда

Брзина супституционе реакције квадратно-планарног комплекса зависи од врсте, односно, нуклеофилности улазног лиганда. Код великог броја супституционих реакција Pt(II) комплекса константа брзине реакције директне супституције, k_2 , расте у следећем низу улазних лиганата:



Овај редослед лиганата је дат на основу вредности за нуклеофилну реактивности n_{Pt} ,⁹ тј. која се дефинише на основу реакције (1.6.2.1).



при чему се константа брзине ове реакције обележава са k_2' када је $\text{Y} = \text{MeOH}$, и тада је $n_{\text{Pt}} = 0$. Вредност за n_{Pt} у случају других лиганата добија се на основу једначине 1.6.2.2.

$$n_{Pt} = \log k_2/k_2' \quad (1.6.2.2)$$

Вредности за нуклеофилну реактивност, n_{Pt} , неких лиганада дате су у Табели 1.1.

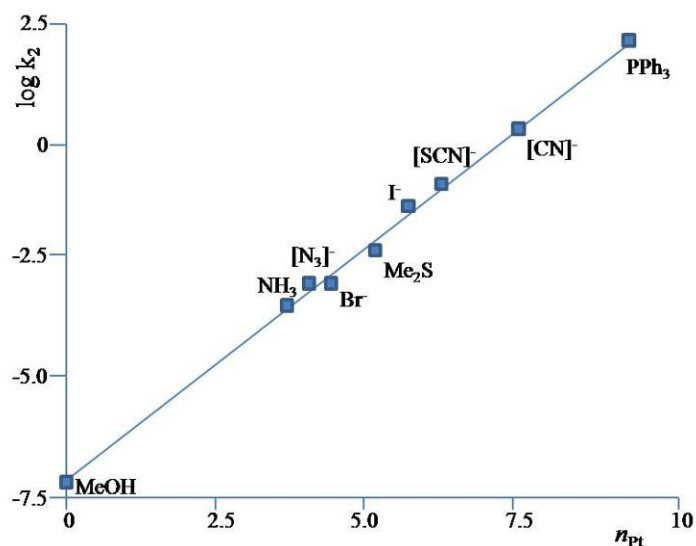
Табела 1.1. Вредности нуклеофилне реактивности, n_{Pt} , за улазне лиганде Y у реакцији (1.6.2.1).

Лиганд	Cl ⁻	NH ₃	py	Br ⁻	I ⁻	CN ⁻	PR ₃
n_{Pt}^a	3,04	3,07	3,19	4,18	5,46	7,14	8,93

^aРеф: 9,14

На основу вредности из Табеле 1.1. може се видети да уколико је улазни лиганд „мекша” база то је његова нуклеофилна реактивност већа. На пример, нуклеофилна реактивност расте у низу Cl⁻ < Br⁻ < I⁻, а то је уједно и смер пораста „мекоће” ових лиганада. Јасно је да ће већу реактивност према Pt(II), као „мекој” киселини, имати „мекша” база.⁹

Код супституционих реакција Pt(II) комплекса уочена је линеарна зависност између пораста логаритма константе брзине, log k_2 , и n_{Pt} вредности, што је приказано на Слици 1.2.



Слика 1.2. Зависност $\log k_2$ од n_{Pt} за реакцију $trans-[PtCl_2(py)_2]$ са различитим нуклеофилима у метаноу на 298K (за PPh_3 , CN^- , Me_2S) или 303 K (за SCN^- , I^- , Br^- , N_3^- , NH_3 , $MeOH$).¹⁶

На основу једначине (1.6.2.3), одређује се вредност за *фактор нуклеофилне дискриминације*, s , који има карактеристичну вредност за одређени Pt(II) комплекс. Његова вредност се одређује из нагиба праве зависности $\log k_2$ од n_{Pt} . Вредности фактора s за неколико Pt(II) комплекса дате су у Табели 1.2.

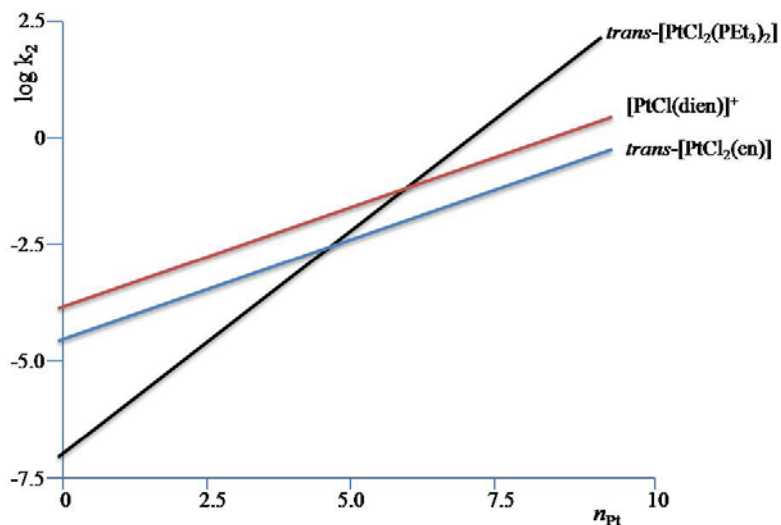
$$\log k_2 = s(n_{Pt}) + \log k_2' \quad (1.6.2.3)$$

Табела 1.2. Вредности фактора нуклеофилне дискриминације, s , за неколико изабраних комплекса Pt(II).

Комплекс	s^a
$trans-[PtCl_2(PEt_3)_2]$	1,43
$trans-[PtCl_2(AsEt_3)_2]$	1,25
$trans-[PtCl_2(py)_2]$	1,00
$[PtCl_2(en)]$	0,64
$[PtBr(dien)]^+$	0,75
$[PtCl(dien)]^+$	0,65
$[Pt(dien)(H_2O)]^{2+}$	0,44

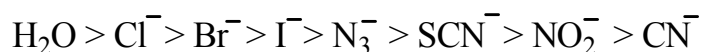
^aРеф: 14

Релативно мала вредност фактора s за $[\text{Pt}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ у односу на друге комплексе $\text{Pt}(\text{II})$ указује на то да је утицај улазног лиганда мали, односно, да је поменути комплекс доста реактиван када су у питању супституционе реакције. То је свакако повезано са чињеницом да је H_2O лако одлазећи лиганд. На Слици 1.3. приказана је зависност $\log k_2$ од n_{Pt} за три различита комплекса $\text{Pt}(\text{II})$.



Слика 1.3. Зависност $\log k_2$ од n_{Pt} за три комплекса $\text{Pt}(\text{II})$.¹⁷

Реакције супституције квадратно-планарних комплекса зависе и од природе одлазећег лиганда.^{9,14} У случају комплекса $\text{Pt}(\text{II})$ показало се да брзина супституције опада у следећем низу одлазећих лиганата:



Овај ефекат представља мерило лабилности везе метал-одлазећи лиганд, а самим тим указује на брзину којом одлазећи лиганд може да се супституише. Као што се може видети молекула воде, као и халогени, се лако супституишу, а сумпор-донорски лиганди као и CN^- јон теже, што је повезано са тврдо-меким карактеристикама градитеља везе метал-лиганд.

1.6.3. *Trans*-ефекат

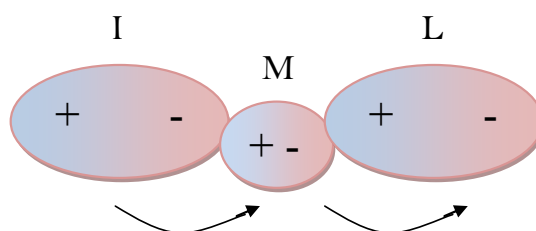
Код квадратно-планарних комплекса на брзину супституционе реакције велики утицај има врста инертног лиганда који се налази у *trans*-положају у односу на одлазећи лиганд. Тај ефекат је познат као кинетички *trans*-ефекат.^{6-9,11}

Лиганди се могу поделити на следећи начин:

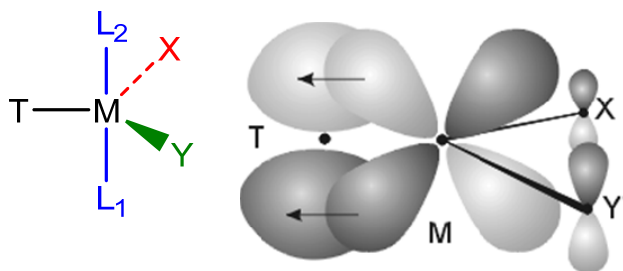
σ-донори: $\text{OH}^- < \text{NH}_3 < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{CN}^-$, CO , CH_3^- , $< \text{I}^- < \text{SCN}^- < \text{PR}_3 < \text{H}^-$

π-акцептори: $\text{Br}^- < \text{I}^- < \text{NCS}^- < \text{NO}_2^- < \text{CN}^- < \text{CO}$, C_2H_4

Поларизабилност лиганда у *trans*-положају доводи до појаве *trans*-ефеката.⁹ Што је поларизабилност тог лиганда већа, *trans*-ефекат је јачи. Ефекат је индуктиван и преноси се са инертног лиганда (I) на јон метала (M), а са јона метала на лабилни лиганд (L). На овај начин *trans*-ефекат испољавају лиганди σ-донори.



У случају лиганда π-донора долази до грађења додатне π-везе између лиганда у *trans*-положају и јона метала, при чему се стабилизује прелазно стање, тј. активирани комплекс структуре тригоналне бипирамиде. У активираном комплексу се лиганд у *trans*-положају, одлазећи и улазни лиганд налазе у равни, што им омогућава π-комуникацију.^{9,14,18} Грађење додатне π-везе привремено учвршћује везу јона метала са лигандом, услед чега се осиромашује електронска густина око јона метала, тако да се улазни лиганд лакше координује формирајући тригоналну бипирамиду.



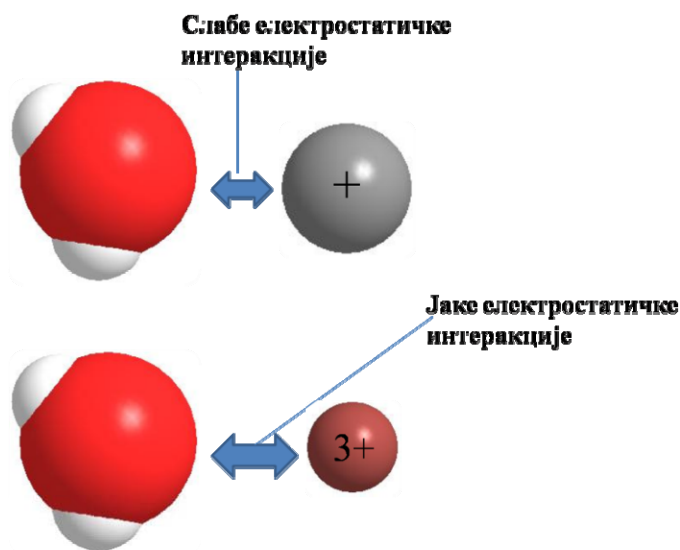
1.7. Хидролиза и хидратација јона метала

Сви јони, без обзира на то да ли су позитивно или негативно наелектрисани, растварањем у води се хидратишу. Енергија хидратације, у случају јона метала, може да се дефинише као количина енергије која се ослободи када слободан јон метала прелази из гасне фазе у водени раствор и при томе се хидратише,¹⁴ једначина (1.7.1).



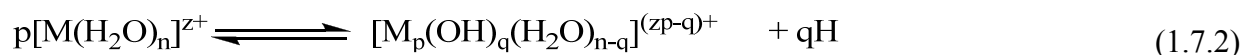
Енергија хидратације је последица интеракције између јона метала и молекула воде. Када се јон метала нађе у воденом раствору, он се окружује молекулима воде, при чему се формирају три хидратационе сфере.

Јони метала великог радијуса, а малог наелектрисања, подлежу хидратацији. У групу метала који хидратишу спадају јони алкалних и земноалкалних метала (изузев берилијума). Међутим, јони метала малог радијуса, а великог наелектрисања, подлежу хидролизи (Al^{3+} , Fe^{3+} , ...).

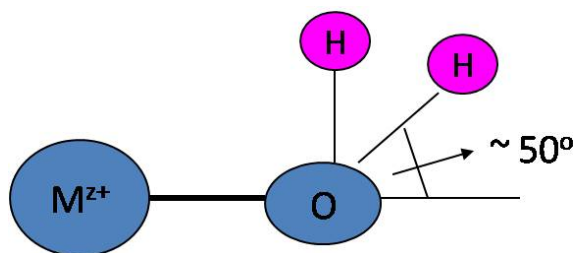


Слика 1.4. Приказ електростатичких интеракција између молекула воде и јона метала.

Електростатичке интеракције између јона метала великог наелектисања и воде довољно су јаке да доведу до ослобађања H^+ јона из молекула воде (Слика 1.4.), што се може приказати једначином¹¹ (1.7.2).



На основу једначине (1.7.2) може се видети да се ови јони метала понашају као киселине.^{14,19} Новија истраживања су показала да уколико је угао између осе која пролази кроз везу метал-кисеоник и везе кисеоник-водоник већи од 50° , тај јон метала хидролизује, а уколико је угао мањи од 50° , јон метала хидратише.²⁰



У процесу хидролизе јона метала, у почетку прво настају мононуклеарни хидролитички комплекси типа $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_{(n-1)}(\text{OH})]^{z-1}$, који се затим у даљем току реакције полимеризују дајући полинуклеарне комплексе типа $[\text{M}_p(\text{OH})_q]^{(zp-q)+}$. Хидроксидни јони су најчешће мостни лиганди, јер имају велику способност да везују више од једног јона метала, па су самим тим одговорни за формирање полинуклеарних хидролитичких комплекса.

Хидролиза јона метала зависи од природе и концентрације јона метала. Поред тога, она зависи од температуре, јонске силе раствора, природе растварача, као и присуства одређених супстанци које могу са јоном метала да граде комплексна једињења.

1.8. Реакције супституције октаедарских комплекса

Комплексна једињења са координационим бројем 6 најчешће поседују октаедарску геометрију. Ова група комплексних једињења има O_h групу симетрије. Велики број

елемената различитих електронских конфигурација има могућност да гради октаедарске комплексе.

Јони Na^+ и Mg^{2+} , који спадају у групу s-елемената, могу да граде октаедарске комплексе, као и неки p-елементи попут сумпора и силицијума (SF_6 и $[\text{SiF}_6]^{2-}$).^{6,7,9} Међутим, најбројнији су октаедарски комплекси јона метала прелазних d-елемената.

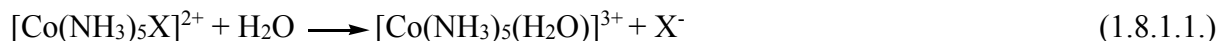
Процес супституције лиганата код октаедарских комплекса разликује се од процеса супституције лиганда код квадратно-планарних комплекса. Са једне стране, p_z орбитала јона метала, која је код квадратно-планарних комплекса доступна да прими електронски пар улазног лиганда у процесу супституције по А механизму, код октаедарских комплекса је попуњена. Са друге стране, волуминозност октаедарских комплекса је већа у односу на квадратно-планарне, па је и прилаз улазног лиганда отежан.⁷

Реакције супституције октаедарских комплекса могу се, такође, одвијати по D, А или I механизму, као што је описано у делу 1.1. Унутрашње-орбитални октаедарски комплекси (d^2sp^3 хибридизација), чији јон метала има електронску конфигурацију d^0 , d^1 , d^2 као и d^4 електронску конфигурацију високог спина, су координационо незасићени, тј. имају празне унутрашње d-орбитале. Дакле, ови јони метала поседују могућност да приме електронски пар улазног лиганда, који би, по А механизму, наградио интермедијер са координационим бројем 7. Извесна могућност за А механизам супституције постоји и код конфигурација ниског спина d^3 и d^4 , уколико се накнадним спрезањем може испразнити једна d-орбитала. Међутим, за спољашње-орбиталне октаедарске комплексе (sp^3d^2 хибридизација) очекује се D механизам супституције. У том случају уколико је веће позитивно наелектрисање централног акцептора електрона, комплекси су инертнији. Ова чињеница је потврђена порастом инертности према супституцији код хексафлуоро-комплекса: $\text{AlF}_6^{3-} < \text{SiF}_6^{2-} < \text{PF}_6^- < \text{SF}_6$. Најстабилнији сумпор-хексафлуорид је добро познати инертни гас са јаким ковалентним S-F везама.^{8,9}

Највећи број супституционих реакција октаедарских комплекса дешава се по D или I_a механизму, док на брзину супституције велики утицај имају природа одлазећег лиганда и природа инертног лиганда. У случају ових комплекса, стерне сметње су мање значајне.

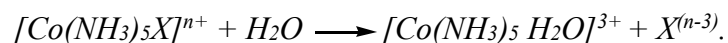
1.8.1. Утицај одлазећег лиганда

Утицај одлазећег лиганда на брзину супституције октаедарских комплекса може се објаснити на примеру киселе хидролизе комплекса типа $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{X}]^{2+}$, једначина (1.8.1.1):



Брзина којом одлазећи лиганд X напушта координациону сферу полазног комплекса зависи од јачине хемијске везе између јона метала и посматраног лиганда. Уколико су у питању лиганди истог наелектрисања, брзина реакције супституције расте са порастом величине лиганда. Међутим, ако посматрамо лиганде различитог наелектрисања, брзина реакције супституције опада са порастом наелектрисања одлазећег лиганда.⁹

Табела 1.3. Константе брзине за реакције киселе хидролизе



X	k/s ⁻¹	X	k/s ⁻¹
HCO ₃ ⁻	1,6 · 10 ⁻³	SO ₄ ²⁻	1,2 · 10 ⁻⁶
NO ₃ ⁻	2,6 · 10 ⁻⁵	F ⁻	8,6 · 10 ⁻⁸
I ⁻	8,3 · 10 ⁻⁶	NO ₂ ⁻	веома мале
Br ⁻	6,3 · 10 ⁻⁶	NH ₃	веома мале
Cl ⁻	1,6 · 10 ⁻⁶	OH ⁻ и CN ⁻	веома мале

1.8.2. Утицај природе инертног лиганда

Ако упоредимо вредности константи брзина у Табели 1.4 за комплексе Со(III) са *en* и *trien* хелатним лигандима, код којих не постоји разлика у разгранатости, а ни у величини самих лиганда, брзине се знатно разликују.

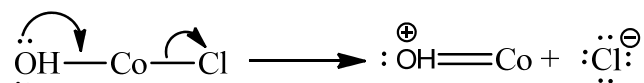
Табела 1.4. Константе брзине за киселу хидролизу неких тетраамминдихлоро- и пентаамминхлорокобалт(III) комплекса (само један Cl лиганд се супституише са H₂O)

Комплекс	10 ⁷ k/s ⁻¹
<i>cis</i> -[Co(NH ₃) ₄ Cl ₂] ⁺	Врло висока
<i>cis</i> -[Co(en) ₂ Cl ₂] ⁺	2400
<i>cis</i> -[Co(trien) Cl ₂] ⁺	1500
[Co(NH ₃) ₅ Cl] ²⁺	67
<i>cis</i> -[Co(en) ₂ NH ₃ Cl] ²⁺	14
<i>cis</i> -[Co(trien)NH ₃ Cl] ²⁺	6,7

Trien као тетраедарски лиганд гради три хелатна прстена, док два *en* лиганда граде четири (сваки лиганд по два) хелатна прстена. Басоло и Пирсон овај ефекат објашњавају смањењем хидратације јона. Наиме, раздвајање јонског пара је лакше ако је хидратација једног и другог јона већа, односно, ако је „локална“ диелектрична константа средине између јона већа. На основу тога може се закључити да ако комплекс има више хелатних прстенова, локална диелектрична константа је мала, хидратација јона је смањена, а тиме и дисоцијација јонског пара.⁹

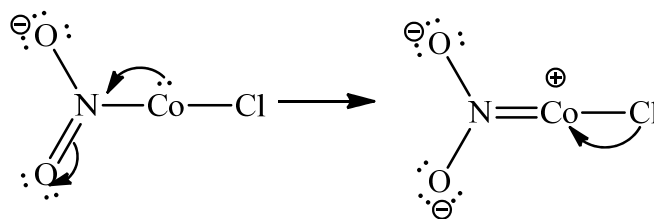
С друге стране инертни лиганди се могу посматрати према њиховим π-донорским или π-акцепторским особинама. Они могу да испољавају утицај на одлазећи лиганд X тако што утичу на лабилност везе метал-одлазећи лиганд, и то на следеће начине:

Лиганди π-донори, делокализацијом свог слободног електронског пара могу успостављати у извесној мери додатну π-везу са јоном метала, чиме слабе везу између јона метала и лиганда који се супституише.



Лиганди π-акцептори, делокализују у извесној мери електронски пар са јона метала формирајући додатну π-везу чиме је знатно појачана веза јона метала и лиганда који се

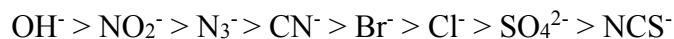
супституише. На основу тога треба очекивати, ако је инертни лиганд π -акцептор, да ће супституциони процес бити знатно спорији.



1.8.2.1. Утицај положаја инертног лиганда

На брзину реакције супституције октаедарских комплекса значајно утиче природа лиганда који се налазе у *cis*- или *trans*-положају у односу на одлазећи лиганд. На примеру комплекса $[\text{Co}(\text{en})_2\text{XCl}]^+$, где је са X означен инертан анјонски лиганд, ефекат се може објаснити на следећи начин:

Уколико се X налази у *trans*-положају у односу на Cl^- , лабилност опада у низу:



Уколико се X налази у *cis*-положају у односу на Cl^- , лабилност опада у низу:



Комплекси са *cis* геометријском структуром већином реагују брже него одговарајући *trans* комплекси, осим у случају када је $\text{X} = \text{NO}_2^-$ или N_3^- .^{11,21}

Као што се види из Табеле 1.5, већа лабилизација у *cis* него у *trans* положају базира се на стерним ефектима π -донора. Дисоцијативни процес биће утолико енергетски повољнији уколико је лиганд π -донор спремнији да својом попуњеном p -орбиталом прекрива празну d^2sp^3 хибридную орбиталу $\text{Co}(\text{III})$. На основу тога може се рећи да је прекривање лакше у *cis* него у *trans*-положају, који захтева премештање лиганда и прелаз из геометрије квадратно-планарне пирамиде у тригоналну бипирамиду. Зато је хидролиза

утолико бржа уколико је лиганд X јачи π -донор и ако је у *cis* положају у односу на лиганд супституент. ^{7,9}

Табела 1.5. Константе брзине за реакцију супституције (25°C):



Изомер	Лиганд X	10^5 k/s^{-1}	% <i>cis</i> продукта
<i>Cis</i>	OH ⁻	1200	100
<i>Cis</i>	Cl ⁻	24	100
<i>Cis</i>	Br ⁻	14	100
<i>Cis</i>	N ₃ ⁻	24	100
<i>Cis</i>	NO ₂ ⁻	11	100
<i>Cis</i>	SCN ⁻	1,1	100
<i>Cis</i>	NH ₃	0,05	100
<i>Trans</i>	OH ⁻	160	75
<i>Trans</i>	Cl ⁻	3,5	35
<i>Trans</i>	Br ⁻	4,5	-
<i>Trans</i>	N ₃ ⁻	25	20
<i>Trans</i>	NO ₂ ⁻	98	0
<i>Trans</i>	SCN ⁻	0,005	60
<i>Trans</i>	NH ₃	0,03	-

1.8.2.2. Утицај наелектрисања инертног лиганда

Утицај наелектрисања стално везаних инертних лиганата на брзину супституције може се видети на основу вредности датих у Табели 1.5. У складу са D механизмом, комплекси са два Cl⁻ лиганда имају већу константу брзине од сличних комплекса са само једним Cl⁻ лигандом. Примећује се да ће дисоцијација једног Cl⁻ лиганда бити олакшана уколико је укупно позитивно наелектрисање комплекса мање.

1.8.3. Стерне сметње

Уколико постоје стерне сметње око јона метала реакције супституције код октаедарских комплекса се одвијају по D механизму, док се A механизам подразумева за стерно незаштићене комплексе. На пример, реакција хидролизе за *mezo* облик комплекса $[\text{Co}(\text{bn})_2\text{Cl}_2]^+$, је око 3 пута бржа у односу на смешу *d* и *l* облика, зато што је *mezo* облик више стерно заштићен.²¹ У Табели 1.6 је приказан утицај стерних сметњи различитих лиганата на константу киселе хидролизе комплекса $\text{trans}-[\text{Co}(\text{L})_2\text{Cl}_2]^+$.

Табела 1.6. Константе брзине киселе хидролизе комплекса $\text{trans}-[\text{Co}(\text{L})_2\text{Cl}_2]^+$ при $\text{pH}=1$ (25°C) према реакцији: $\text{trans}-[\text{Co}(\text{L})_2\text{Cl}_2]^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow [\text{Co}(\text{L})_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{Cl}^-$.

L	ознака	10^5 k/s^{-1}
$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$	(en)	3,2
$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}_2$	(pn)	6,2
<i>dl</i> - $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}_2$	(<i>dl</i> -bn)	15
<i>mezo</i> - $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{NH}_2$	(<i>m</i> -bn)	45
$\text{NH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}_2$	(me_4en)	врло висока
$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	(tn)	1000

1.8.4. Редокс-реакције октаедарских комплекса

Октаедарски комплекси подлежу и редокс реакцијама. Постоје два начина по којима се дешавају редокс реакције. Реакције спољне сфере су реакције првог реда у односу на оксидант и редуктант. У прелазном стању оксидант и редуктант задржавају своје координационе сфере нетакнуте, а пренос електрона је знатно бржи од процеса супституције лиганата, који може, али и не мора, да прати редокс процес. Код реакција унутрашње сфере долази до формирања моста између оксиданта и редуктанта преко кога

се врши пренос електрона. За механизам унутрашње сфере неопходно је да бар један од реактаната буде супституционо лабилан и да оксидант поседује лиганд погодан за улогу мостног лиганда. Константа брзине ове реакције зависи од природе мостног лиганда.¹⁴

Постоје многе редокс реакције у којима су реактанти и продукти у погледу супституције лабилни, а промене у координационој сфери могу да се догоде пре или после процеса преноса електрона. У том случају није могуће јасно разликовати реакције спољашње сфере од реакција унутрашње сфере.

1.9. Антитуморска активност комплекса Ru и Pd

Прелазни метали имају важну улогу у техничким процесима (катализа, екстракција и пречишћавање металних комплекса) у биологији и медицини (биолошки трансфер електрона, токсикологија и коришћење комплекса јона метала као лекова). Последњих година јони метала налазе све већу примену у медицини за терапеутску примену или као дијагностичка средства. Тако се данас неки комплекси јона метала користе за лечење различитих болести (канцер, артритис, дијабетес, Алцхајмерова болест, итд). Механизам деловања неких комплексних једињења у биолошким системима још увек није добро познат, тако да се данас велики број истраживача бави истраживањима управо у тој области. Пошто се почетак болести одиграва на ћелијском нивоу, најпре ту треба тражити одговоре на питања да ли је могуће ток болести зауставити или не.²²⁻²⁴

По статистикама светске здравствене организације за 2012. годину,²³ малигна обољења су значајан узрок морталитета како у светској популацији, тако и код нас. Код мушкараца су најдоминантнији карциноми простате и плућа, као и колоректални карцином, док су код жена најзаступљенији карциноми дојки и плућа.²⁴

Тумори су обољења које карактерише неконтролисана деоба малигнућ ћелија и продирање у околна здрава ткива (метастаза).²² Терапијски приступ лечењу малигнућ болести подразумева више фаза: хирушка, радиотерапијска и хемотерапијска фаза. Хемотерапије се заснива на примени одговарајућих цитостатика, једињења која испољавају антитуморску активност, а њихова главна мета је најчешће ДНК или неки други биомолекул који учествује у ћелијској деоби.

На Слици 1.4. означени су јони метала чија једињења имају значајну примену у медицинске сврхе, пре свега у лечењу канцера.

1																	18					
H																	He					
2																	13	14	15	16	17	18
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne					
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	Ar															
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr					
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe					
55	56	57	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87				
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn					
87	88	89	104																			
Fr	Ra	Ac																				
58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71									
Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu									
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr									

Слика 1.4. *Периодни систем елемената на коме су бојом означени елементи чија једињења показују антитуморску активност.*

Од открића антитуморских карактеристика *цисплатине* до данас синтетисан је велики број комплексних једињења у циљу проналазка потенцијалних хемотерапеутика са већом активношћу, већом селективношћу према туморским ћелијама и мањим нежељеним дејствима.^{4,25,26} Пажња је нарочито усмерена на синтезу платинских комплекса. Иако је синтетисано неколико хиљада једињења једино су *цисплатина*, *карбоплатина* и *оксалиплатина* ушли у клиничку употребу.^{27,28} *Цисплатина* се користи за лечење карцинома плућа, тестиса, мокраћне бешике и грлића материце. *Карбоплатина* се употребљава за лечење истих малигнитета, али због мање цитотоксичности у односу на *цисплатину* користе се веће дозе овог лека. *Оксалиплатин* се користи у комбинацији са 5-флуороурацилом у лечењу колоректалног карцинома. Главни недостаци ових једињења су развијање туморске резистенције на хемотерапеутик и велика токсичност према здравим ћелијама (неуротоксичност, мијелосупресија, ототоксичност, нефротоксичност итд.). Управо из тих разлога постоји стална потреба за синтезом бољег, према туморским ћелијама ефикаснијег, а мање токсичног хемотерапеутика²⁹⁻³³.

Последњих година комплексна једињења других јона метала, нарочито галијума, злата, титана и рутенијума, проучавана су у погледу могућности примене у терапији тумора.^{34,35} Главни циљ при синтетисању активних једињења је постизање контроле

токсичних (споредних) ефеката и усмеравање дејства на одређено ткиво, орган или ћелију где јон метала треба да испољи своје дејство. Биомедицинска неорганска хемија управо има за циљ синтетисање нових терапеутских и дијагностичких агенаса који ће омогућити лечење и превенцију или дијагностику болести које су данас неизлечиве.³³ Поред тога, неопходно је познавање начина за одстрањивање вишка јона метала из биолошких система. То се најчешће изводи увођењем молекула (лиганда) који имају велики афинитет према јонима метала.³²

Цитотоксични потенцијал комплекса рутенијума установљен је скоро пре четири деценије.³⁶ Резултати истраживања су показали да су ова једињења најперспективнија група антитуморских агенаса, са првенствено антиметастатичким потенцијалом. Примена ових једињења у терапији различитих врста тумора заснива се на значајним карактеристикама комплекса рутенијума, као што су: кинетика лигандне измене, широк опсег оксидационих стања и особине да рутенијум имитира гвожђе у биохемијским процесима.

Кинетика лигандне измене одређује биолошку активност комплекса кроз његове интеракције са макромолекулима, као што су протеини. Такође су подједнако важне и интеракције са аминокиселинама, пептидима и нуклеотидима.

Параметри кинетике лигандне измене за комплексе Ru(II) и Ru(III) јона су слични параметрима за комплексе Pt(II) јона. То подразумева да иако су комплекси рутенијума првенствено октаедарске геометрије, насупрот квадратно-планарним комплексима Pt(II), брзина супституције лиганда комплекса рутенијума слична је брзини супституције лиганда комплекса Pt(II).³⁶

Рутенијум у физиолошким условима може постојати у три оксидациона стања: Ru(II), Ru(III) и Ru(IV), која карактеришу различите биолошке активности. Комплекси Ru(III) су биолошки инертнији од аналогних Ru(II) и Ru(IV) комплекса. Такође, постоје једињења рутенијума са мешовитим оксидационим стањима јона метала који се употребљавају као ћелијске боје,³⁷ а могу деловати као митохондријални инхибитори.³⁸ У ту групу спадају $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$ (рутенијум-црвено) и $[\text{Cl}(\text{NH}_3)_4\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4\text{OH}]^{3+}$ (Ru360).

Рутенијум се на молекуларном нивоу понаша као гвожђе и може се везати за албумин и трансферин. Ћелије канцера имају повећану потребу за гвожђем, па је на

њиховој површини повећан број трансферинских рецептора од 2 до 12 пута у односу на здраве ћелије. Тада постоји могућност да се комплекси рутенијума везују за трансферин и тиме селективније делују на туморска ткива.

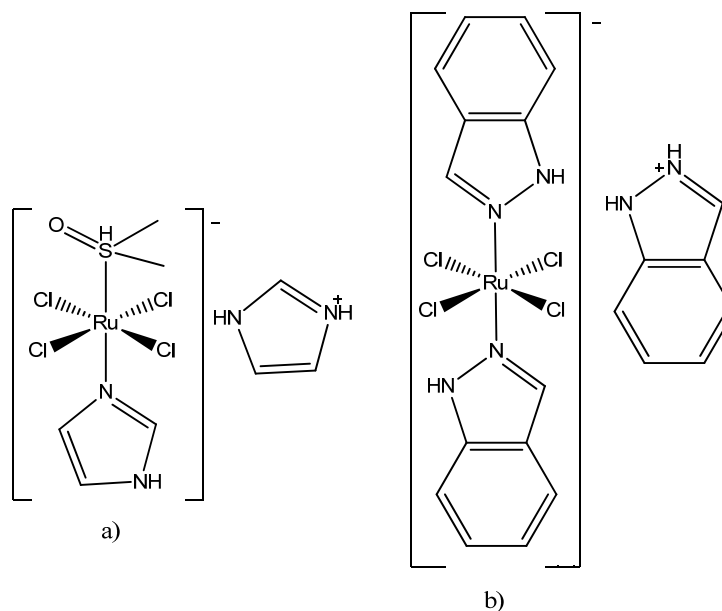
Још једна важна карактеристика комплекса рутенијума је спречавање одвајања и миграције туморних ткива и њихове адхезије на удаљеним местима. Зато неки комплекси рутенијума показују већу селективност према канцерогеним ћелијама,^{39,40} а у неким случајевима чак и бољу активност од *цисплатине*.⁴¹⁻⁴⁵

1.10. Комплекси рутенијума(III)

Пошто *цисплатина* садржи два хлоридо и два аминска лиганда, Кларк (Clarke) и сарадници су синтетисали комплексе Ru(III) који, такође, садрже поменуте лиганде, *fac*-[Ru^{III}Cl₃(NH₃)₃]⁴⁶ и *cis*-[Ru^{III}Cl₂(NH₃)₄]⁺.^{47,48} Насупрот *цисплатини*, која се доминантно везује за остатке гуанина унутар једног ланца ДНК, поменути комплекси Ru(III) ступају у интеракцију са ДНК везивањем између два ланца,⁴⁹ што је највероватније последица октаедарске геометрије комплекса. Иако су ови комплекси Ru(III) показали веома добру антитуморску активност, ниска растворљивост ограничила је њихова даља испитивања.⁵⁰⁻⁵²

Последњих година детаљно су испитивана цитотоксична својства великог броја Ru(II) и Ru(III) једињења, као што су полипиридински комплекси *cis*-[RuCl₂(N,N-bpy)₂] и *mer*-[RuCl₃(N,N,N-trpy)],^{53,54} аминокарбоксилатни комплекси [RuCl₂(N,N,O,O-pdta)] и [RuCl(N,N,O,O,O-edta)],^{55,56} диметилсулфоксидни комплекси *cis* и *trans*-[RuCl(S-DMSO)₄]⁵⁷⁻⁵⁹ и арилазопиридински комплекси [RuCl₂(N,N,N,N-azpy)₂].^{42,43}

У скорије време, синтетисане су и испитане на антитуморску активност две групе структурно сличних комплекса Ru(III),^{60,61} а клиничка испитивања на канцерогеним ћелијама задовољила су само два комплекса: имидазолијум[*trans*-тетрахлоридо (диметилсулфоксид)(имидазол)рутенат(III)] (NAMI-A) и имидазолијум[*trans*-тетрахлоридо-*bis*(1*H*-индазол)(имидазол)рутенат(III)] (KP1019)⁶²⁻⁶⁴ (Слика 1.5). Оба комплекса су тренутно у другој фази клиничког испитивања. Комплекс NAMI-A је испољио значајну ефикасност према метастазама на претклиничким и клиничким моделима, док је KP1019 испољио одлично цитотоксично дејство на ћелије примарних тумора.^{49,60-68}



Слика 1.5. Комплекси Ru(III): а) (NAMI-A) и б) (KP1019).

Када говоримо о начину координовања комплекса Ru(III), претпоставља се да након интравенозне апликације комплекс KP1019 брзо интерагује са серумским протеинима, што може бити разлог његове ниске токсичности.⁶⁹ Брзо везивање за ове протеине спречава хидролизу комплекса.^{69,70} Поред тога, резултати су показали да се комплекс KP1019 координује за трансферин, протеин који преноси гвожђе. Малигне ћелије поседују велики број рецептора за трансферин. Рутенијум и гвожђе могу лако да се измењују у трансферину. Тако се преноси рутенијумски комплекс у хемијски непромењеном облику.⁷¹ Након уласка у ћелију, Ru(III) комплекс се у присуству глутатиона⁷² и других редукујућих биомолекула редукује до Ru(II), који је знатно реактивнији облик. Међутим, и у свом +3 оксидационом стању у KP1019, рутенијум је генерално јако реактиван, посебно у физиолошким условима.

Добро је познато да се антитуморска активност платинских комплекса објашњава интеракцијом комплекса и ДНК молекула.^{36,73-76} Међутим, механизам интеракције комплекса рутенијума још увек није разјашњен у потпуности. Претпоставља се да се ова једињења активирају процесом хидролизе. У принципу, активирање хидролизом је доминантно за механизам деловања ове класе једињења, док даље хемијско понашање у великој мери зависи од киселости средине и концентрације хлорида. Након хидролизе

долази до редукције Ru(III) у Ru(II) комплекс, јер ћелија садржи различите редукционе агенсе.^{49,65,68} Настали Ru(II) комплекс реагује са ДНК молекулом, при чему је фаворизована координација за N7 атом гуанина.⁷⁷ Управо овај активациони механизам, предложен од стране Кларка (Clarke), постао је познат као хипотеза „активација редукцијом“.⁴⁹ У сагласности са поменутом хипотезом, праћена је редукција NAMI-A до NAMI-AR аскорбинском киселином и тако је утврђено да је NAMI-A много ефикаснији у спречавању раста метастаза.⁷⁸

У случају комплекса KP1019, молекул ДНК није главна мета. Утврђено је, да се под утицајем овог комплекса, апоптоза ћелије одвија унутрашњим, тј. митохондријалним путем, али је за разјашњење потпуног механизма деловања KP1019 неопходно сагледати и истражити све потенцијалне мете овог комплекса.⁷⁹

1.11. Комплекси рутенијума(II)

Комплекси Ru(II) лако подлежу оксидацији. Важну улогу у стабилизацији рутенијумовог оксидационог стања +2 имају лиганди који се координују за јон метала. Лиганди који садрже атоме сумпора, фосфора и азота се врло лако координују за Ru(II) јон, при чему настају стабилни комплекси.^{39,80-84} Октаедарски комплекси типа *cis*- и *trans*-[Ru(DMSO)₄X₂] (X = Cl, Br) испољили су добру антитуморску активност према метастазама карцинома плућа: C75B1 и BD2F1, при чему је *trans* изомер показао 20 пута већу активност од *cis* изомера. Резултати су, такође, показали да се ови комплекси координују ковалентно за N7 атом гуанина.⁵⁷

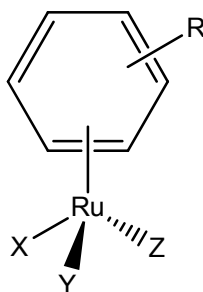
Разноврсност у структури активних једињења заправо наводи да различити механизми активације могу бити укључени код различитих типова једињења рутенијума.⁸⁵ Комплекси са хелатним лигандима су активнији у односу на комплексе са монодентатним лигандима.⁸⁶ Последњих година посебна пажња је посвећена комплексима рутенијума са полипиридинским лигандима.^{44,53,87} Анализом интеракција ових комплекса, који садрже поред полипиридинских лиганата и аква или хлоридо лиганде, нађено је да се они ковалентно везују за ДНК у ћелији. Аква или хлоридо лиганди у овим комплексима представљају лако одлазеће групе, насупрот веома стабилним полипиридинским групама, што у многим ситуацијама олакшава везивање биомолекула за јон метала. Хидролиза

Ru-Cl везе је веома важна у активацији, дајући аква производ који се лакше везује за ДНК ланац.

Комплекси Ru(II) са бипиридинским и полипиридинским јединицама су инертни према супституцији, координативно засићени и испољавају јединствена редокс својства. Почетком педесетих година прошлог века публиковани су први резултати везани за биолошку активност Ru(II) комплекса са бипиридил и полипиридил лигандима, као што су *bpy*, *phen* и *trpy*.^{81,88-105} Доказано је да се полипиридил Ru(II) комплекси везују за молекуле ДНК нековалентним интеракцијама.¹⁰⁶ Такође, резултати су показали да поменуте интеракције зависе од типа хелатног лиганда. Наиме, комплекс $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ показује веома слабу склоност ка везивању за ДНК, док је везивање $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ комплекса за ДНК много израженије. Способност ових комплекса да интерагују са молекулом ДНК зависи од величине и броја прстена полипиридилног лиганда. Тако, на пример, комплекси $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ и $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ веома добро интерагују са ДНК, док комплекси $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dpq})]^{2+}$ и $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dpx})]^{2+}$ испољавају изразито мању способност за интеракцију.¹⁰⁷

1.12. Рутенијум(II) аренски комплекси

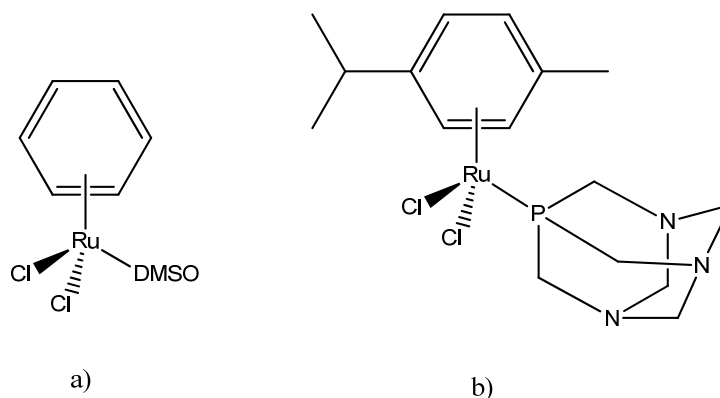
Ru(II) јон може се лако стабилизovati координацијом са η^6 ароматичним системима формирајући тзв. „**half sandwich**“ комплексе.^{89-94,108} Тако, Ru(II) јон гради комплекс *pseudo*-октаедарске тј. „**piano-stool**“ геометрије, где ароматични прстен формира „**sedlo**“, а преостала три лиганда „**nogare**“ клавирске столице (Слика 1.6).



Слика 1.6. Општа структура Ru(II) комплекса са „**piano-stool**“ геометријом.

Органорутенијум(II) комплекси могу да садрже различите аренске моно- и бидентатне лиганде.^{81,109-111} Досадашња истраживања су показала да најмање један халогенидни лиганд мора бити координован за Ru(II) јон, јер је хидролиза врло битан корак у механизму њиховог антитуморског деловања.¹¹² Добра способност ка хидролизи праћена је у великом броју случајева добром растворљивошћу комплекса, што олакшава даља биолошка истраживања, као и клиничку примену. Активност ових комплекса зависи и од типа координованог аренског лиганда.¹¹³⁻¹¹⁵ Наиме, ароматични лиганд стабилизује јон метала у нижем оксидационом стању и тиме спречава могућност потенцијалне оксидације, а уједно представља и хидрофобни део молекула који олакшава пасивни транспорт кроз ћелијску мембрану. Такође, ови лиганди су инертни према супституцији помоћу других аренских лиганда, а повећање ароматичности лиганда повезано је са могућношћу интеракције комплекса и ДНК. Преостала три места могу заузети различити монодентатни или бидентатни лиганди са азор-, кисеоник-, сумпор- и фосфор-донорским групама.¹¹⁶

Један од првих комплекса овог типа који је испитиван био је $[RuCl_2(C_6H_6)(DMSO)]$ комплекс (Слика 1.7. а). Овај комплекс је показао значајну инхибицију топоизомеразе II, који је један од ензима одговорних за спречавање губитка генетске информације на теломерама у току митозе.¹¹⁷ Заменом DMSO лиганда са 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3,3,1,1]декан (РТА) лигандом у Ru(II) аренским комплексима добијени су комплекси познатији под именом RАРТА⁹¹ комплекси (Слика 1.7. б). Присуство хидрофилног РТА лиганда обезбеђује бољу растворљивост ових једињења у води, што знатно олакшава биолошка испитивања. Такође, доказано је да ова једињења испољавају већу селективност, као и нижу токсичност. Заменом ароматичног прстена у RАРТА комплексима макроциклом са сумпором 1,4,7-тритацклононаном, добијени су комплекси који су испољили сличну *in vitro* активност.^{72,118}



Слика 1.7. а) $[RuCl_2(C_6H_6)(DMSO)]$ и б) $RAPTA-C$.

Увођењем оксалатног или циклобутан-1,1-дикарбоксилног лиганда уместо хлоридо лиганда у структуру комплекса, као што је био случај код *оксалиплатине* и *карбоплатине*, добијена су једињења која нису имала значајну биолошку активност.^{119,120} Комплекси опште формуле, $[Ru(\eta^6-p\text{-cimen})(X)(Y)(Z)]$ (X, Y или Z представљају халогениде, ацетонитрил или изоникотинамид) са три монодентатна лиганда, такође, нису показали значајну антитуморску активност према A2780 ћелијској линији хуманог карцинома јајника. Изостанак цитотоксичности може се објаснити њиховом великом и брзом реактивношћу са малим биомолекулима, чиме се спречава да поменута једињења реагују са главним унутарћелијским метама.^{79,90}

Комплекси са N,N-хелатним лигандима на бројним ћелијским линијама су испољили цитотоксичну активност упоредиву са *цисплатином*.^{77,121} Због тога су органометална једињења опште формуле $[Ru(aren)(en)(X)]^+$ (aren = бензен или његови деривати)^{113,114,122} интензивно проучавана, а резултати су показали да је координација хелатног етилендиамина утицала на смањење реактивности комплекса, у поређењу са комплексима који садрже монодентатне лиганде, што за последицу има интересантну биолошку активност.⁷⁹ Цитотоксична активност ових комплекса према A2780 хуманој ћелијској линији зависи од величине координованог аренског дела^{90,117} (Табела 1.7). Јасно се уочава да комплекс са најхидрофобнијим аренским лигандом испољава највећу антитуморску активност.

Табела 1.7. IC_{50} вредности⁹⁰ добијене ММТ тестом на А2780 ћелијској линији која је третмана одговарајућим Ru(II) аренским комплексима, цисплатином и карбоплатином 24 сата.

Ru-aren/Pt kompleks	IC ₅₀ /μM
$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}(\text{CH}_3\text{CN})_2]\text{PF}_6$	> 150
$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2(\text{izonikotinamid})]$	> 150
$[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$	17
$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$	9
$[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$	55
$[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5)\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$	6
<i>Karboplatina</i>	6
<i>Cisplatina</i>	0,5

Као што је већ напоменуто хидролиза халогенида код органорутенијум(II) комплекса има значајну улогу у механизму испољавања цитотоксичне активности.^{81,123,124} Одласком халогенида дисоцијативним путем и даљом реакцијом са молекулом растварача настају комплекси који под физиолошким условима реагују изузетно брзо са биомолекулима, што значајно утиче на фармакокинетичке и фармакодинамичке параметре.^{71,79} Неки комплекси аренског типа испољавају високу селективност за везивање преко N7 атома гуанина.^{77,90}

Замена етилендиамина анјонским *O,O*-хелатним лигандима има за последицу настајање неутралних комплекса, који имају повећану електронску густину око Ru(II) јона. Тада је олакшана измена лиганада и процес хидролизе, што у многим случајевима води ка бољој растворљивости.⁷⁹ Испитивањем биолошке активности појединих Ru(II) аренских комплекса са *O,O*- и *S,O*- хелатима показало је да ова једињења делују као инхибитори протеин-киназа.¹¹⁶ Такође је доказано да је селективност неких органорутенијум(II) комплекса са *O,O*-бидентатним лигандима према нуклеинским базама другачија у односу на селективност Ru(II)-етилендиаминских комплекса.¹²⁵⁻¹²⁷ Наиме, комплекс $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{асас})]$ показује много већи степен везивања за аденин него за гуанин.¹²⁸

1.13. Комплекси рутенијума са лигандима edda типа

Комплексна једињења рутенијума са полиаминополикарбоксилатним хелатним лигандима спадају у посебну групу потенцијалних антитуморских агенаса.^{50,129,130} Најрепрезентативнији пример представља комплекс $\text{H}[\text{Ru}(\text{H}_3\text{pdta})\text{Cl}_2]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, за који су резултати показали да испољава нарочиту антитуморску активност према ћелијској линији мишије леукемије L1210. Проучавана је интеракција овог комплекса са протеинима плазме (албумин и трансферин) помоћу електронске апсорпције, CD и NMR спектроскопије.⁵⁵ На основу ових анализа добијени резултати су указали да се комплекс највероватније везује за поменуте протеине преко имидазолског прстена хистидина након одласка хлоридног лиганда из комплекса, док полидентатни лиганд остаје координован за јон метала.^{131,132}

Први комплекси рутенијума са edda лигандима синтетисани су још седамдесетих година прошлог века. Најзначајни из ове групе су $\text{K}[\text{RuCl}_2(\text{edda})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{RuCl}(\text{edda})\text{H}_2\text{O}]$ комплекси.¹³³ Такође су синтетисани комплекси Ru(III) са eddp лигандом и монодентатним лигандима, најчешће хлоридно лигандом.¹³⁴ На основу резултата добијених испитивањем антипролиферативне активности и цитотоксичности комплекса $\text{K}[\text{RuCl}_2(\text{eddp})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ може се видети да он испољава значајну селективну антипролиферативну активност према HeLa и HT-29 ћелијским линијама.¹³⁵ Такође, методом CD спектроскопије и електрофорезом праћена је интеракција овог комплекса са pBR322 плазмидом ДНК. Резултати ових испитивања указали су на ковалентну интеракцију између комплекса и молекула ДНК. Ова интеракција се најпре одвија формирањем једне хемијске везе, а након развијања ДНК хеликса координација се одвија преко две везе, највероватније са истог ланца ДНК. Добијени резултати су потврдили претпоставку да комплекси Ru(III) у *in vivo* системима могу да се трансформишу у веома реактивне Ru(II) врсте.¹³⁵

Генерално, врста хелатног лиганда има значајни утицај на хемијска, физичка и биолошка својства комплекса рутенијума. Такође, нековалентне интеракције, присуство водоничних веза, различита хидрофобност лиганда и електростатичке интеракције имају одлучујућу улогу при везивању комплекса за биолошке мете, нарочито за нуклеинске киселине.¹³⁶

1.14. Комплекси Pd(II)

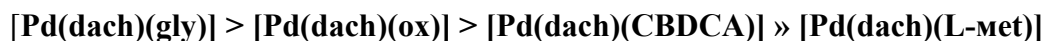
Метали Ni, Pd и Pt налазе се у истој групи перидоног система, међутим, само комплексна једињења Pt показује антитуморску активност.¹³⁷ Хемијско понашање у растворима структурно сличних комплексних једињења Pt(II) и Pd(II) је идентично.¹³⁸ Из тог разлога се комплексна једињења Pd(II) често користе као модел молекули за испитивање кинетике и механизма супституционих реакција комплекса Pt(II), мада реагују 10^3 - 10^5 пута брже од аналогних комплекса Pt(II). Због јако великог афинитета према сумпор- и азот-донорским лигандима, као и јако велике реактивности, селективност комплекса Pd(II) према биомолекулима је мала, што ограничава њихову употребу као антитуморских реагенаса.

Велики број структурно аналогних комплекса Pd(II) са комплексима Pt(II) синтетисано је и испитивана је кинетика и механизам њихових супституционих реакција са различитим биомолекулима. Испитиване су супституционе реакције комплекса $[PdCl_2(en)]$ са различитим сумпор- и азот-донорским биомолекулима, при различитим експерименталним условима. Тако, у реакцијама са L-Met настаје *S,N*-хелат. Међутим, у реакцији са S-Met-L-Cys не долази до формирања *S,N*-хелата, већ се два молекула тиоетра координују за Pd(II). Такође је испитивана реактивност етилендиаминских комплекса Pd(II) код којих су у структури етилендиамина неки од аминских водоникових атома замењени метил- или етил-групама. Због присутних стерних сметњи реактивност ових једињења је умањена.¹³⁹ У реакцијама са азот-донорским нуклеозидима и нуклеотидима, $[PdCl_2(en)]$ комплекс реагује идентично одговарајућем комплексу Pt(II), везујући се првенствено преко N7 атома азота, док је веза преко N1 заступљена у мањој мери. Реактивност нуклеотида израженија је у односу на реактивност нуклеозида, због настајања производа који су додатно стабилизовани интрамолекулским водоничним везама.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Неки од производа ових хемијских реакција су изоловани и окарактерисани, као што је случај са $[Pd(en)(N7-IMP)_2]$ комплексом.¹⁴⁴

Такође су испитиване интеракције и других бифункционалних комплекса Pd(II) аналогних комплексима платине. Један од таквих комплекса је $[PdCl_2(SMC)]$. У реакцијама $[PdCl_2(SMC)]$ комплекса са фрагментима ДНК (INO, 5'-IMP и 5'-GMP) утврђено је да је молекул 5'-GMP најбољи нуклеофил.¹⁴⁵ Присуство пиридинског прстена у комплексу

Pd(II) повећава електрофилност јона метала на исти начин као и код комплекса Pt(II). Такође су испитивања показала да је комплекс [PdCl₂(bpy)] знатно реактивнији у односу на [PdCl₂(en)] и то у реакцији са тиоуреом, тетраметилтиоуреом и 5'-IMP, што је свакако последица присутних пиридинских јединица.¹⁴⁶ Међутим, комплекс Pd(II) са пиперизином, [Pd(Pip)(H₂O)₂]²⁺, који такође има способност електронске комуникације са јоном метала, у реакцији са 5'-GMP показује мању реактивност него комплекс са етиледиамином, што је последица стерних сметњи.¹⁴⁷

Комплекс [PdCl₂(dach)], који садржи 1,2-диаминциклохексан, испитиван је у реакцијама са GSH и оксидованим GSSG. Резултати су показали да долази до формирања *S,N*-хелата,¹⁴⁸ док се у реакцијама са нуклеотидима и фрагментима ДНК комплекс понаша на уобичајен начин. Испитиване су и реакције аналогних комплекса у којима су хлоридо лиганди супституисани различитим бидентатним лигандима, тј. комплекси типа: [Pd(dach)(CBDCA)], [Pd(dach)(Gly)], [Pd(dach)(L-Met)] и [Pd(dach)(ox)] у реакцијама са INO, 5'-IMP и 5'-GMP.¹⁴⁹ Карактеристично је да природа одлазећег лиганда тј. CBDCA, Gly, L-Met или ox у великој мери утиче на брзину којом ће се одвијати процес супституције, при чему је редослед реактивности комплекса следећи:¹⁴⁹



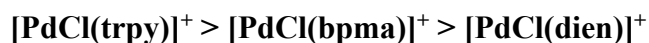
Од изабраних нуклеофила 5'-GMP је реаговао најбрже.

Такође су синтетисани и испитивани различити монофункционални комплекси Pd(II). Један од изучаваних комплекса је [PdCl(*N,N,S*-Gly-Met)] у коме улогу тридентатно-координованог лиганда има дипептид Gly-Met координован за Pd(II) преко атома сумпора из молекула L-Met, азота из пептидне везе и азота из терминалне аминок групе. Понашање овог комплекса у реакцијама са тиолима (L-Cys, GSH, DL-пенициламином) је идентично понашању осталих монофункционалних комплекса Pd(II) и Pt(II).¹⁵⁰ Тако је [PdCl(dien)]⁺ комплекс испитиван у реакцијама са различитим сумпор- и азот-донорским биомолекулима. У реакцијама са тиолима (L-Cys, GSH, DL-пенициламином) долази до супституције хлоридо лиганда молекулом тиола. Молекул GSH је најреактивнији, док је реакција са DL-пенициламином најспорија. Са порастом рН вредности, поред настајања комплекса типа 1:1, примећено је присуство динуклеарних комплекса са сумпором као мостним лигандом.¹⁵¹ Пошто експериментални услови јако утичу на одређене процесе

супституције, управо је у случају реакције супституције $[\text{PdCl}(\text{dien})]^+$ комплекса са L-Cys и GSH испитиван утицај промене растварача, јонске силе раствора, рН вредности и присуства анјонских тензида.¹⁵² У реакцијама са фрагментима ДНК молекула, $[\text{PdCl}(\text{dien})]^+$ јон реагује формирајући производе преко N7 атома азота.¹⁵³

Присуство пиридинског прстена у комплексу Pd(II) повећава електрофилност јона метала на исти начин као и код комплекса Pt(II). Тако су испитивања показала да је комплекс $[\text{PdCl}_2(\text{bipy})]$ знатно реактивнији у односу на $[\text{PdCl}_2(\text{en})]$ и то у реакцији са тиоуреом, тетраметилтиоуреом и 5'-IMP, што је свакако последица присутних пиридинских молекула.^{154, 155}

Код монофункционалних комплекса Pd(II) уочено је да број и распоред пиридинских јединица у тридентатно координованом NNN-донорском лиганду у великој мери утичу на реактивност комплекса. Упоређивањем реактивности поменутих комплекса добијено је да реактивност комплекса опада у низу:



што је свакако у сагласности са резултатима добијеним за одговарајуће Pt(II) комплексе.^{156,157} Комплексни јон $[\text{Pd}(\text{trpy})\text{Cl}]^+$ не реагује са тиоетрима,¹⁵⁸ а у реакцијама са тиолима (GSH, L-Cys, DL-пенициламин)¹⁵⁹ он се понаша идентично *trpy* комплексу Pt(II). Упоређивањем односа константи брзина реакција супституције одговарајућих монофункционалних комплекса Pd(II) и Pt(II) са тиолма, најмања разлика у реактивности је у случају *trpy* комплекса.¹⁶⁰ У реакцијама са фрагментима ДНК молекула $[\text{PdCl}(\text{trpy})]^+$ реагује знатно брже.¹⁶¹ Такође, већа реактивност овог комплексног јона у односу на остале монофункционалне комплексе Pd(II) примећена је и у реакцијама супституције са пиридином и *para*-дериватима пиридина.¹⁶²

Комплексни јон $[\text{Pd}(\text{bpma})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ испитиван је у реакцијама са серијом лиганата: Cl^- , I^- , Br^- , SCN^- , Tu, DMTU и TMTU.¹⁶³ Добијени редослед реактивности посматраних лиганата је: $\text{I}^- > \text{DMTU} > \text{Tu} > \text{SCN}^- > \text{TMTU} > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$, што је у сагласности са електронским и стерним ефектима. Наведени комплекс реагује око 10^3 пута брже од одговарајућег Pt(II) аналога.¹⁶³ Ови резултати још једном показују колико присуство пиридинских јединица увећава брзину супституционих реакција. Такође, испитивана је и реактивност пиридина и деривата пиридина према $[\text{PdCl}(\text{bpma})]^+$ комплексном јону,¹⁶³ а

утврђено је да реактивност деривата пиридина зависи од карактеристика присутних супституената.¹⁶³ $[\text{PdCl}(\text{bpma})]^+$ комплексни јон испитиван је у реакцијама са азолима и диазинима, специфичном групом шесточланих и петочланих азот-донорских хетероцикла.¹⁶⁴ Азоли су јако значајни са бионеорганског становишта, с обзиром да имидазол улази у састав хемопротеина.¹⁶⁵ Такође, азоли могу да инхибирају везивање СО за неке цитохроме, док неки деривати триазола показују антибактеријско дејство на патогене бактерије биљака.¹⁶⁶ Једињења која у свом саставу садрже пиридазин, пиридин, као и друга хетероциклична једињења, користе се у терапијске сврхе за лечење реуматског артритиса, остеоартритиса, остеопорозе, псоријазе и др.¹⁶⁷ Поред триазола, деривати на бази пиридазина и пиразола такође показују антибактеријско и антигљивично дејство.¹⁶⁸ Азоли, као и диазини, често се користе као мостни лиганди при грађењу динуклеарних комплекса $\text{Pt}(\text{II})$.^{169,170} Од испитиваних азола и диазина највећу реактивност према $[\text{PdCl}(\text{bpma})]^+$ комплексном јону има триазол.¹⁶⁵

Комплекс $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$, код кога су за разлику од $[\text{PdCl}(\text{trpy})]^+$ комплекса пиридински прстени раздвојени метиленским групама, реагује са сумпор- и азот-донорским молекулима знатно спорије. Реактивност комплексног јона $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ је готово истог реда величине као $[\text{PdCl}(\text{dien})]^+$ комплекса. Карактеристично за $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ комплекс је да реагује са L-Met, за разлику од $[\text{PdCl}(\text{trpy})]^+$.¹⁷¹

Последњих година чине се напори да се увођењем различитих лиганата у координациону сферу комплекса $\text{Pd}(\text{II})$ добије комплекс који ће испољавати цитотоксичну активност. Синтетисано је неколико комплекса $\text{Pd}(\text{II})$ који садрже 4-толуенсулфонил-L-амино киселиноу и диимин (*bpy* или *phen*). Сви комплекси су показали активност на ћелијама карцинома. Највећу активност показао је $[\text{Pd}(\text{phen})(\text{TsleuNO})] \text{H}_2\text{O}$.¹⁷² Синтетисан је и комплекс $\text{Pd}(\text{II})$ са лигандом који у својој структури садржи пиридин и амид, N-(4-хлорофенил)-3-пиридинкарбоксиамид. Добијени комплекс има *trans* геометрију. Утврђено је да се он координује за молекул ДНК и да испољава цитотоксичност на неке ћелије канцера. Међутим, активност наведеног комплекса мања је у односу на комплекс $\text{Pt}(\text{II})$ са истоименим лигандом.¹⁷³

Поред антитуморске активности, неки комплекси $\text{Pd}(\text{II})$ показују активност против туберкулозе, као што је комплекс *trans*- $[\text{PdX}_2(\text{isn})_2]$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{N}_3, \text{SCN}$, или NCO ; *isn* = изоникотинамид), при чему је најактивнији комплекс са азидом. Ови комплекси су

показали и антитуморску активност, али знатно мању у односу на цисплатину.¹⁷⁴ Аминоалкохоли, као што су (-)-ефедрин, (-)-норепедрин, L-пролинол, L-валинол и L-изолеуцинол, коришћени су у синтези комплекса Pd(II), при чему су добијени комплекси показали извесну антитуморску активност.¹⁷⁵

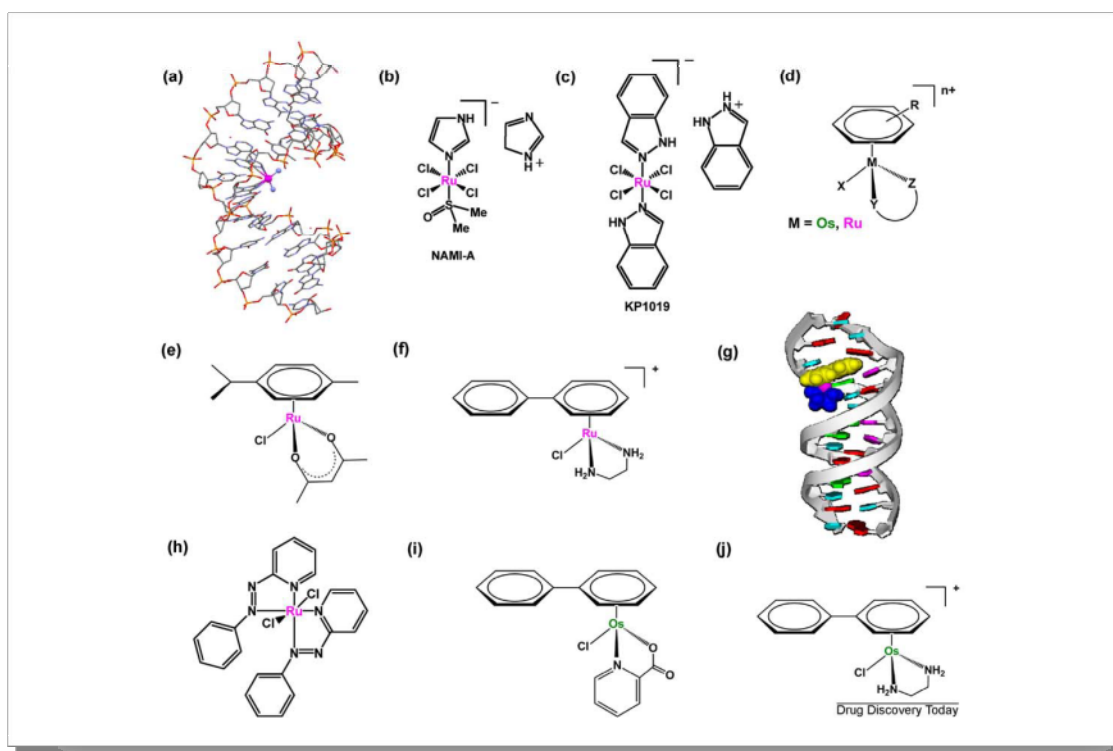
Хелатни лиганди заузимају важно место у модерној органометалној хемији, хомогеној катализи,¹⁷⁶ као у бионеорганској хемији.¹⁷⁷ Велики број различитих *Schiff*-база користи се као помоћни лиганди у реакцијама катализованим прелазним металима.^{178,179} Захваљујући великом успеху дииминских лиганада, аналогни лиганди са етиленом или пиридином као мостним лигандом који повезује *bis*(имидазолин-2-имино) лиганде су синтетисани. Наведени лиганди са *bis*(имидазолин-2-имином) садрже имин као дозор, који је јако базан и самим тим изузетно јак нуклеофил, што је последица способности имидазоловог прстена да стабилизује позитивно наелектрисање.¹⁸⁰ Велика електрон-донорска способност ових лиганада, као и велика реактивност према прелазним металима, потвђена је синтезом веома реактивног Cu(I) комплекса и синтезом молибденских и рутенијумских сендвич комплекса, који садрже још и циклохептатриенил, циклопентадиенил и арена лиганде.^{181,182} Такође, ови лиганди имају способност да граде комплексе са металима из прве групе прелазних метала, тј. од мангана до цинка.¹⁸³ У оквиру овог рада синтетисана су два комплекса Pd(II) са лигандима овог типа.

1.15. Класични и неklasични хемотерапеутици

И након 30 година активног коришћења цисплатине у лечењу канцера она остаје најпримењенији антитуморски лек, упркос великим недостацима као што су ограничен број канцера на који делује, резистентност и токсичност. Поред цисплатине, око десетак других платинских једињења одобрено је за медицинску употребу, али још увек нису решени проблеми са којима се суочавало током употребе цисплатине.⁷⁵

Данас се антитуморска једињења могу поделити у две групе: класични и неklasични хемотерапеутици.^{2,184,185} Цисплатина делује на тај начин што доводи до дисторзије ДНК, па се термин „класични хемотерапеутици” користи за она једињења која имају за мету ДНК. Уводећењем других јона метала у синтезу класичних антитуморских агенаса тежи се повећању антитуморске активности, ширем спектру деловања, али и

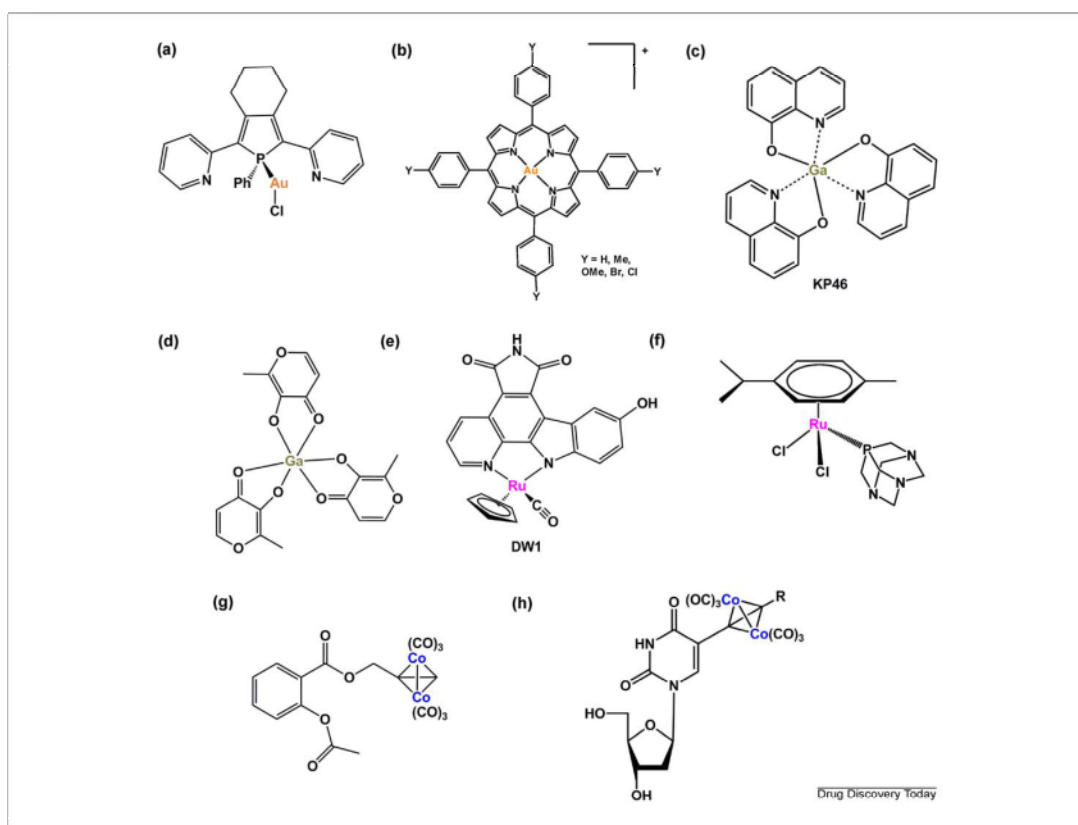
превазилажењу поменутих негативних ефеката. На Слици 1.8 приказана су једињења различитих јона метала која спадају у групу класичних хемотерапеутика тренутно заступљена у различитим фазама медицинских испитивања.



Слика 1.8. Класични хемотерапеутици: (a) кристална структура, на којој се види веза цисплатине и ДНК; (b) NAMI-A; (c) KP1019; (d) општа формула рутенијум(II) и осмијум(II) арена комплекса; (e,f) примери цитотоксичних рутенијум(II) арена комплекса; (g) модел који показује интеракцију рутенијум(II) арена комплекса и ДНК; (h)[g-Ru(azpy)₂Cl₂] (i,j) примери цитотоксичних осмијум(II) арена комплекса;²

Дизајнирање „некласичних хемотерапеутика” уследило је након открића рецептора и фактора раста у ћелијама канцера. Ово откриће омогућило је развој нове стратегије у дизајнирању антитуморских једињења, тј. указало на то да управо рецептори и фактори раста у канцерогеним ћелијама могу бити нова места за координовање. Сходно томе, уследила је синтеза једињења „некласичних хемотерапеутика”, која би била погодна за

координовање са протеинима и ензимима, као циљним групама. На Слици 1.9 приказане су структурне формуле неких од њих.²



Слика 1.9. Примери антиканцерогених једињења са протеинима и ензимима као циљним групама: (a) злато(I) комплекс; (b) злато(III) мезо-тетраарилпорфирински комплекс; (c) KP46; (d) галијум tris-малтолат; (e) DW1; (f) Ru(II) арене комплекси са рта лигандом; (g) комплекс кобалта аналог аспирину; (h) хексакарбонил дикобалт комплекс са нуклеозидом као лигандом.²

У циљу проналаска једињења са што бољим антитуморским карактеристикама, али и са што мањим споредним ефектима, велика пажња поклања се развоју једињења који ће у организму имати улогу прекурсора, тзв. про-лека. У току метаболизма ових једињења ослобађају се активна једињења која показују антитуморску активност. Ова једињења се могу активирати фотохемијским процесима,¹⁸⁶ оксидацијом или редукцијом, као и супституционим реакцијама. Дизајнирање ових комплекса захтева познавање константи брзина супституционих реакција, редокс потенцијала, фотохемије, особина јона метала,

као и познавање ефекта координованих лиганата у комплексу.¹⁻³ У ову групу једињења спадају фотоактивна једињења Pt(IV),^{169,187-189} као и комплекси Pt(IV) који редукцијом прелазе у одговарајуће комплексе Pt(II).¹⁹⁰⁻¹⁹² Такође, у ову групу једињења спадају и једињења гвожђа, кобалта, родијума и рутенијума.^{2,193}

Фарел (Farrell) са сарадницима је први пут дошао на идеју да синтетички комплексно једињење које садржи два јона платине повезана флексибилним мостним лигандом, а која имају антитуморску активност.¹⁹⁴ Након синтезе испитивањима је установљено да се ова једињења координују за ДНК.^{195,196} Затим је уследила синтеза и испитивање антитуморске активности већег броја динуклеарних комплекса Pt(II), при чему су се као мостни лиганди користили хетероциклична или алифатична једињења азота.^{3,197}

Поред динуклеарних, синтетисани су и тринуклеарни комплекси Pt(II), који се могу бифункционално координовати за ДНК.^{198,199} Такође, синтетисани су и динуклеарни комплекси са различитим јонима метала. Најчешће су то комплекси који садрже платину, бакар или рутенијум.²⁰⁰⁻²⁰² Синтеза овог типа молекула има за циљ, као и у свим претходним случајевима, добијање комплекса са бољим антитуморским карактеристикама у односу на цисплатину.

ЗАДАТАК РАДА

Предмет ове докторске дисертације био је испитивање супституционих реакција комплекса Ru(II) и Pd(II) са биолошки значајним лигандима. Наведена испитивања могу се поделити на следећи начин:

- Испитивање кинетике и механизма супституционих реакција $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ комплекса са нуклеофилима: Tu, I⁻, Br⁻, NO₂⁻, py и DMSO у 0,1 М NaClO₄ у присуству 10 mM NaCl на три температуре (288, 298 и 308 К) „stopped-flow“ спектрофотометријски.
- Испитивање кинетике реакција супституције $[RuCl(trpy)(bpy)]^+$ са 5'-GMP, L-His, DMSO и Tu на 298 К у 0.1 М NaClO₄ у присуству 20 mM NaCl Uv-Vis спектрофотометријски. Реакција са Tu је изучавана на 288 К, 298 К и 308 К.
- Испитивање реакција супституције $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ са сумпор-везивним нуклеофилима као што су: L-Met, L-Cys, GSH и Tu на pH = 5,3 и 7,4 у D₂O на 295 К, ¹H и ¹³C NMR спектроскопијом.
- Спектрофотометријско одређивање pK_a вредности $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ јона.
- Изучавање процеса хидролизе и комплексирања $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ јона са азот-везивним нуклеофилима 5'-GMP и L-His потенциометријском методом на константној температури од 298 К, у 0,1 М NaClO₄.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1. Реагенси и раствори

Комплекси $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]\text{ClO}_4$, $[(\text{TL}^{t\text{Bu}})\text{PdCl}]\text{ClO}_4$ и $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]\text{ClO}_4$ су синтетисани по раније публикованим поступцима.^{171,203-206} Чистоћа добијених једињења потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и ¹H NMR спектроскопијом.

$\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Acros Organics), PdCl_2 (Strem Chemicals), D_2O (Deutero GmbH 99 %), NaOH (Merck), NaCl (Zorka Šabac), NaClO_4 (Merck p.a.), HClO_4 (Merck p.a.), AgClO_4 (Merck), HCl (Merck), етанол (Merck), H_2SO_4 (Merck) су коришћени без предходног пречишћавања.

L-хистидин, L-His, (Merck), гуанозин-5'-монофосфат, 5'-GMP, (Acros Organics), глутатион, GSH, (Acros Organics), тиоуреа, Tu, (Acros Organics), 2,2'-бипиридин, bpy, (Aldrich), 2,2':6',2''-терпиридин, trpy (Sigma Aldrich), L-цистеин, L-Cys, (Aldrich), L-метионин, L-Met, (Aldrich), диметилсулфоксид, DMSO, (Acros Organics) коришћени су, такође, без предходног пречишћавања.

2.2. Синтеза комплекса

2.2.1. Синтеза хлоридо-2,2'-бипиридин-2,2':6',2''-терпиридинрутенијум(II)-перхлората, $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]\text{ClO}_4$:

Комплекс $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ је припремљен по већ публикованој методи.²⁰³⁻²⁰⁵ Со рутенијума $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ је растворена мешањем и загревањем у 30 cm^3 апсолутног етанола. Након растварања, 0.21 g (0.89 mmol) лиганда trpy је додато и мешано уз рефлуктовање око 3 сата.²⁰⁴ Затим је у раствор додата еквимоларна количина bpy (0.14g, 0.89 mmol) и целокупна смеша рефлуктована још 4 сата са LiCl у вишку (1.5 mmol) и триетиламином (0.4 mmol) као редукционим средством.²⁰⁵ Овим процесом долази до редукције Ru(III) и

као крајњи производ настаје Ru(II) комплекс. Након хлађења, настали црвено-наранџаст талог се процеди, испере етанолом и етром и суши на ваздуху. Резултати анализе добијеног комплекса помоћу елементалне анализе, Uv-Vis спектрофотометрије и ^1H NMR спектроскопије се добро слажу са претходно публикованим резултатима.²⁰³⁻²⁰⁵ Принос: 350 mg (89,31%). Нађено: C, 53.74%; H, 4.44%; N, 12.56. Израчунато за $\text{RuCl}_2\text{N}_5\text{C}_{25}\text{H}_{19}$: C, 53.48%; H, 3.41%; N, 12.56%. $\lambda_{\text{max}} = 239 \text{ nm}, 281 \text{ nm}, 290 \text{ nm}, 313 \text{ nm}, 488 \text{ nm}$. IR (ν_{max} , KBr): 3043 cm^{-1} C-H, 1600 cm^{-1} C-N, 1463 cm^{-1} C=N, 568 cm^{-1} Ru-Cl. ^1H NMR (δ , D_2O): 9.95 ppm (d, $\text{H}_6\text{-bpy}$) 7.79 ppm (d, $\text{H}_d\text{-tpy}$).

2.2.2. Синтеза хлоридо-2,6-bis[(1,3-ди-*terc*-бутилимидазолин-2-имино)метил] пиридинпаладијум(II)-перхлората, $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]\text{ClO}_4$:

Комплекс $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]\text{ClO}_4$ је припремљен по већ публикованој методи²⁰⁶. Раствор лиганда 2,6-bis[(1,3-ди-*terc*-бутилимидазолин-2-имино)метил]пиридина (TL^{tBu}),²⁰⁷ 200 mg, (0,405 mmol) у води (10 cm^3) додат је у капима у еквимоларну суспензију PdCl_2 у води (10 cm^3) на собној температури. pH вредност је подешена на 5 додатком 0,1 M HClO_4 . Добијени раствор је рефлуктован 24 h на $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Након тога, запремина раствора је смањена на 5 cm^3 упаравањем, а производ је таложен додатком засићеног раствора NaClO_4 (20 cm^3). Након филтрирања производ је испран алкохолом и ацетоном (20 cm^3), а тамно-црвени прах је сушен под вакумом. Кристализација комплекса урађена је у смеши ацетон/етанол, процеђен је и сушен под вакумом. Комплекс је окарактерисан елементалном анализом и ^1H NMR спектроскопијом. Принос: 250 mg (94%). Нађено: C, 47,8%; H, 6,2 %; N, 13,5 %. Израчунато за $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{Cl}_2\text{H}_7\text{O}_4\text{Pd}$: C, 47,9 %; H, 6,97 %; N, 13,0 %; ^1H NMR (δ , D_2O): 7,56 ppm (d, *m*-Py), 7,45 ppm (t, *p*-Py), 4,57 ppm (s, Py- CH_2) и 1,68 ppm (s, CCH_3).

2.2.3. Синтеза комплекса хлоридо(терпиридиндиметан)паладијум(II)-перхлората, $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]\text{ClO}_4$:

Комплекс $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]\text{ClO}_4$ је синтетисан по већ публикованој методи.¹⁷¹ У водени раствор који садржи 1mmol (0,326g) K_2PdCl_4 додата је еквимоларна количина

циклооктадиена (COD) (1mmol, 0,108g) и раствор је мешан 1h. Настали слабо растворан комплекс [PdCl₂(COD)] се профилира и остави да се осуши. Након сушења, комплекс се раствори у смеси метанол/вода (50/50, v/v) и у добијени раствор дода еквимоларна количина терпиридиндиметан лиганда (*tpdm*), који је синтетисан по раније публикованој методи.²⁰⁸ Суспензија је мешана неколико сати, а температура одржавана константном на 50 °C. Након хлађења, раствор је остављен у леду преко ноћи. Жути талог је одвојен од раствора, прекристалисан из воде и окарактерисан елементалном анализом, Uv-Vis и IR спектроскопијом. Принос: 380 mg (94,32%). Израчунато за C₁₇H₁₅Cl₂N₃Pd: C, 46,53 %; H, 3,42 %; N, 9,58 %. Нађено: C, 44,07 %; H, 3,92 %; N, 8,37 %. $\lambda_{\max} = 265,1 \text{ nm}$, IR (ν_{\max} , KBr): 786 cm⁻¹ Pd-N, 1454 cm⁻¹ C-N, 1591 cm⁻¹ C=N, 3400 cm⁻¹ O-H.

2.3. Инструменти

За мерење рН раствора коришћен је Jenway 4330 рН-метар са комбинованом Jenway стакленом електродом стандардизованом помоћу Fischer стандардних пуфера чији је рН = 4.00; 7.00; 10.00.

Елементалне анализе (C, H, N) рађене су помоћу Carlo Erba Elemental Analyser 1106.

Uv-Vis спектри снимани су помоћу Perkin Elmer Lambda 35 Uv-Vis спектофотометра са термостатираном 1,00 cm кварцном Suprasil киветом.

„Stopped-flow“ мерења вршена су помоћу Applied Photophysics SX.18MV stopped-flow инструмента.

¹H NMR спектри снимани су на Varian Gemini-200, Bruker Avance DPX 200 и 400 WB спектрометру, док су рD мерења вршена помоћу inoLab Sen Tix[®] Mic рН микроелектроде.

2.4. Кинетичка мерења

2.4.1. Супституционе реакције комплекса рутенијума(II)

Кинетика реакција супституције $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]\text{Cl}$ комплекса са 5'-GMP, L-His, DMSO и Tu изучавана је Uv-Vis спектрофотометријски. Све реакције су проучаване као реакције *pseudo*-првог реда на температури од 25 °C у 0.1 M NaClO_4 уз додатак 20 mM NaCl, а са Tu је реакција изучавана на 15 °C, 25 °C и 37 °C.

Радна таласна дужина одређена је снимањем спектра реакционе смеше у одређеним временским интервалима у опсегу таласних дужина између 220 и 450 nm. Као радна таласна дужина узима се она таласна дужина на којој је највећа промена у апсорбцији раствора са временом. Супституционе реакције су започете мешањем истих запремина раствора комплекса и раствора лиганда (по 1,5 cm³). Концентрација лиганда била је у великом вишку (најмање 10 пута) у односу на концентрацију комплекса, како би се обезбедили услови реакције *pseudo*-првог реда. Спектрофотометријско одређивање константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , врши се праћењем промене апсорбције раствора A_t са временом t на одређеној таласној дужини, на основу једначине 2.4.1.1.

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obs}} t \quad (2.4.1.1)$$

Зависност $\ln(A_t - A_\infty)$ од времена t је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за k_{obs} . Величина A_∞ представља апсорбцију раствора након „бесконечно“ дугог времена (обично после 8-10 полувремена реакције). Добијена вредност за константу брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , представља средњу вредност 4 до 5 независних кинетичких мерења.

2.4.2. Супституционе реакције комплекса паладијума(II)

Кинетика реакција супституције $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ и $[\text{PdCl}(\text{tpdm})]^+$ помоћу лиганда Tu, I⁻, Br⁻, NO₂⁻, ру и DMSO праћена је помоћу Uv-Vis „stopped-flow“ спектрофотометрије. Сва

кинетичка мерења су вршена праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена. Радна таласна дужина за сваки проучавани систем је одређена на начин као што је описано у делу 2.4.1. Реакције су започете мешањем истих запремина раствора комплекса и лиганата директно у апарату. Кинетика испитиваних реакција је праћена под условима реакција *pseudo*-првог реда (концентрација лиганата је била 10-30 пута већа у односу на концентрацију комплекса). Све супституционе реакције су проучаване у 0,1 М NaClO₄, зато што се перхлоратни јон не координује за Pd(II) и Pt(II) јоне у воденој средини.²⁰⁹ У циљу сузбијања хидролизе комплекса реакције су извођене уз додатак 10 mM NaCl. Температурска зависност константе брзине реакције другог реда проучавана је за реакције [(TL^{tBu})PdCl]⁺ са I⁻ и ру, а за [PdCl(tpdm)]⁺ са I⁻, Br⁻, ру и DMSO. Вредности за константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs}, добијене су анализом спектралних података уз помоћ компјутерског програма ORIGINPRO 8.

2.5. ¹H NMR мерења

Реакције супституције [Ru(trpy)(bpy)H₂O]²⁺ са L-Met, L-Cys, GSH и Tu изучаване су ¹H NMR спектроскопијом у моларном односу 1 : 1. Почетне концентрације реактанта биле су 8 mM, сем у случају GSH, чија је почетна концентрација била 20mM.

Раствор комплекса припреман је растварањем одмерене количине у 300 μL D₂O око 8 сати пре почетка извођења експеримента. Да би се постигла боља растворљивост комплекса коришћена је ултразвучна када. ¹H NMR спектри су снимани на 295 К у периоду од неколико дана до три недеље. Супституционе реакције праћене су на рН = 5,3 и на рН = 7,4, у присуству фосфатног пуфера, да би се окарактерисали процеси у физиолошким условима.²¹⁰ Киселост раствора, рD (рD = рН + 0,4),²¹⁰ подешавана је додатком 0,01-0,05 М раствора NaOD или DCl. Сва хемијска померања дата су у односу на TSP (натријум-триметилсиллилпропан-3-сулфат). Добијени резултати су анализирани помоћу компјутерских програма Origin 6.1 и Microsoft Excel 2003.

2.6. Спектрофотометријска титрација јона $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$

У циљу одређивања pK_a вредности, раствор аква комплекса $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, чија је концентрација 0,02 mM, титрован је помоћу стандардног раствора NaOH на 25 °C у опсегу pH од 1,15 до 11,53. Састав система у зависности од промене киселости праћен је Uv-Vis спектрофотометријски. Јонска средина раствора подешена је помоћу 0,01 M NaClO₄.

Да би се избегла корекција услед разблаживања, за титрацију је коришћена велика почетна запремина раствора комплекса (100 cm³). Промена pH из 2 у 3 постигнута је додатком тачно одмерене количине чврстог NaOH, а затим је раствор титрован стандардним раствором NaOH концентрације 0,1000 M помоћу микропипете. Ради спречавања контаминације раствора комплекса услед урањања електроде, за свако мерење узимане су запремине од по 2 cm³ раствора. Комбинована електрода калибрисана је пуферима стандардних pH вредности 4,00 и 7,00. Оперативни параметри били су следећи: брзина скенирања 2nm/s, ширина прореза 0,3 nm, фото осетљивост 0,2 abs јединица. Снимани су спектри у интервалу таласних дужина од 220-1020 nm. Коришћене су кварцне кивете дебљине 1cm.

Спектрофотометријски подаци су обрађивани помоћу компјутерског програма pHAb2006,²¹¹ а расподела хидролитичких врста у раствору израчуната је помоћу програма Hyss 2006.²¹²

2.7. Потенциометријска мерења

Све потенциометријске титрације извођене су у балону са двоструким зидом. Током свих титрација одржавана је константна температура (298,0 ± 0,1 K), кружењем термостатиране воде кроз зидове балона. Кроз раствор током титрације је увођен азот како би се обезбедила инертна атмосфера и мешање раствора. Раствор је додатно мешан уз помоћ магнетне мешалице. Стандардни раствор базе је постепено додаван у малим аликвотима (0,005-0,01 cm³) помоћу аутоматске бирете. Промена потенцијала бележена је после сваког додатка титранта. Протокол титрације изабран је на такав начин да реакције

хидролизе и комплексирања протичу у условима готово идентичним са стварном равнотежом. Просечно време успостављања константног потенцијала за сваку тачку на почетку титрације било је 5 min, а касније знатно више. Очитаване вредности потенцијала устаљивале су се на $\pm 0,1$ mV/min.

Константе стабилности комплекса одређене су титрацијом 1,0 и 2,0 mM раствора комплекса стандардним раствором NaOH. Константе формирања комплекса одређене су титрацијом раствора у коме је однос концентрација комплекса и лиганда био 1:1 и 1:2 (комплекс : лиганд). Раствор који се титрује имао је запремину од 20,0 cm³. Као јонска средина коришћен је 0,1 M NaClO₄. Све титрације су извођене два пута и слагања између титрација су била веома добра, са одступањима мањим од 1%.

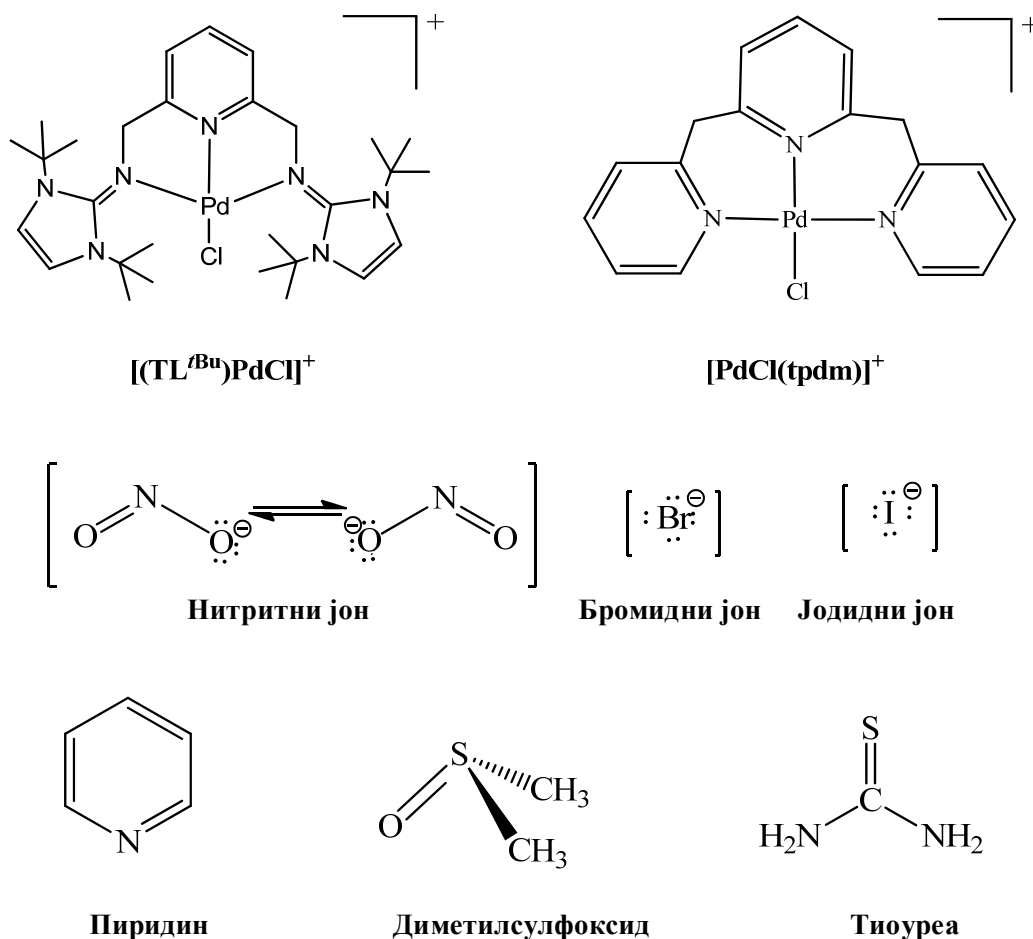
Опште константе протоновања 5'-GMP и L-His узете су из литературе.²¹³

Потенциометријски подаци су обрађивани помоћу компјутерског програма Нурегquad 2006,²¹⁴ а расподела хидролитичких врста у раствору израчуната је помоћу програма Hyss 2006.²¹²

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

3.1. Испитивање кинетике супституционих реакција $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ комплекса

Реакције супституције монофункционалних Pd(II) комплекса са нуклеофилима Tu , I , Br^- , NO_2^- , py и $DMSO$ су изучаване „stopped-flow” спектрофотометријском методом. На Слици 3.1 приказане су структурне формуле испитиваних комплекса и нуклеофила. Реакције су изучаване тако што је праћена промена у апсорбаци система на погодним радним таласним дужинама у функцији времена. У експерименталном делу је детаљно описан начин за одређивање радне таласне дужине.

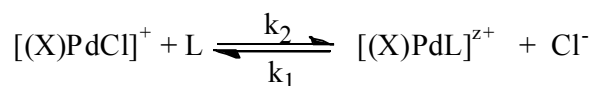


Слика 3.1. Структурне формуле проучаваних комплекса и нуклеофила

Испитивање супституционе реакције $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ су започета мешањем једнаких запремина раствора комплекса и нуклеофила директно у „stopped-flow“ инструменту. Концентрације реактанта изабране су тако да обезбеђују услове реакције *pseudo*-првог реда. Најчешће је концентрација лиганда била у великом вишку, најмање 10 пута у односу на концентрацију комплекса. Свака реакција је праћена до завршетка, односно у трајању од 8-10 полувремена реакције.

Све супституционе реакције су изучаване у 0,1 М NaClO₄, јер познато је да се перхлоратни јон не координује за Pt(II) и Pd(II) јоне у воденим растворима.²⁰⁹ У раствор хлоридо комплекса додат је 10 mM NaCl, како би се спречила спонтана хидролиза комплекса и грађење аква честице.

Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса се одигравају по два паралелна пута.⁷ Први пут укључује директан нуклеофилни напад од стране улазног лиганда, док други, солволитички пут, започиње прво координацијом растварача за централни јон метала, а потом долази до супституције молекула растварача улазним лигандом. У нашем случају, код изучаваних $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ комплекса, солволитички пут је елиминисан додатком 10 mM NaCl, тако да се реакција директне супституције одиграва као реверзибилан процес, што је приказано на Шеми 3.1.

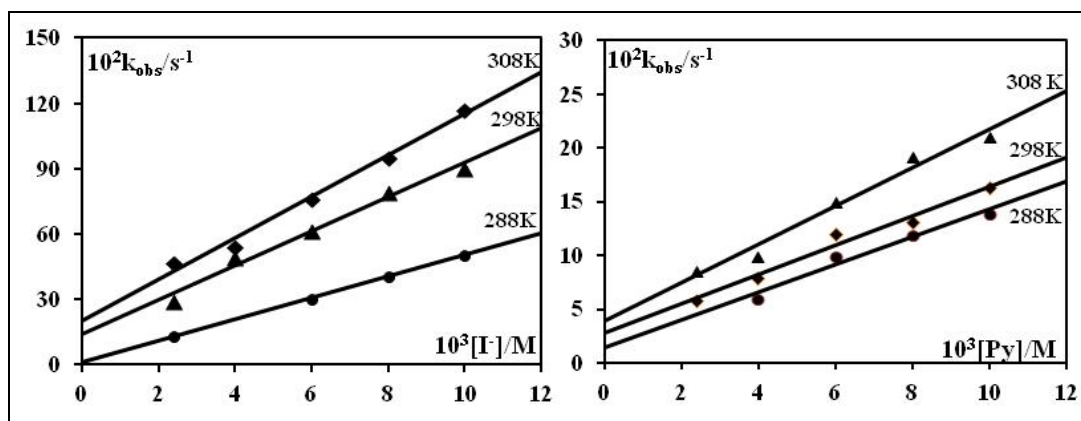


Шема 3.1.

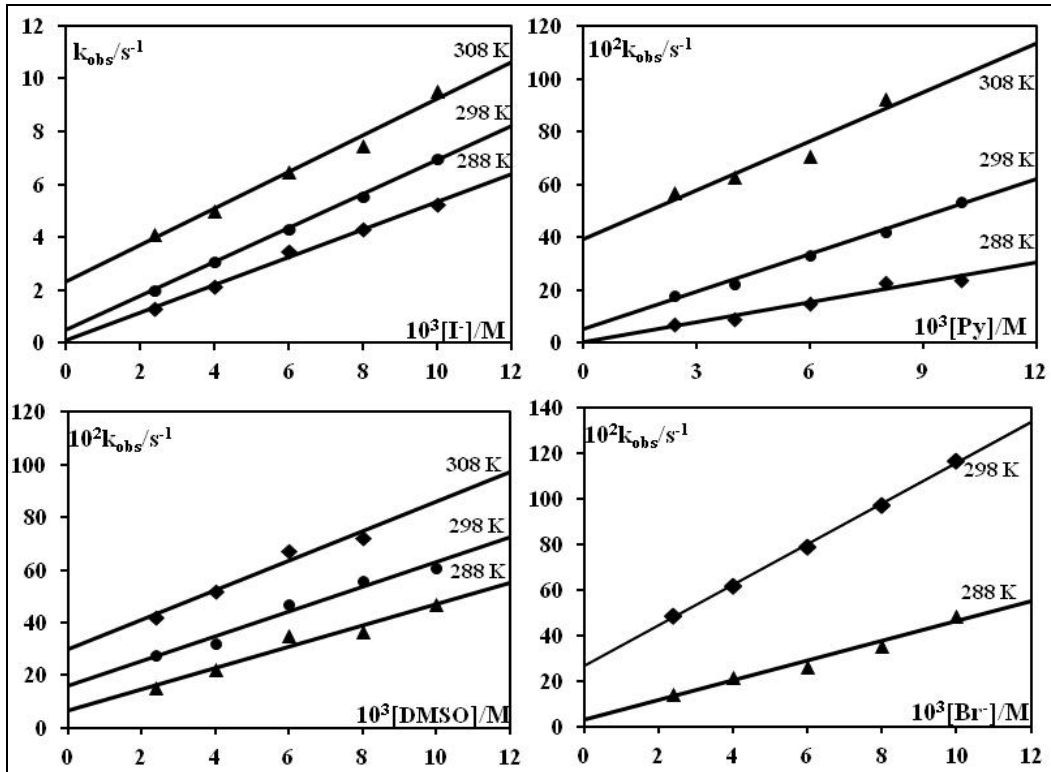
Константа k_2 представља константу брзине реакције директне нуклеофилне супституције, док константа k_1 представља константу брзине повратне реакције. Константа брзине другог реда, k_2 , се израчунава из нагиба праве добијене функционалном зависношћу између константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији концентрације нуклеофила, на основу једначине 3.1.1:

$$k_{obs} = k_2[L] + k_1[Cl^-] \quad (3.1.1)$$

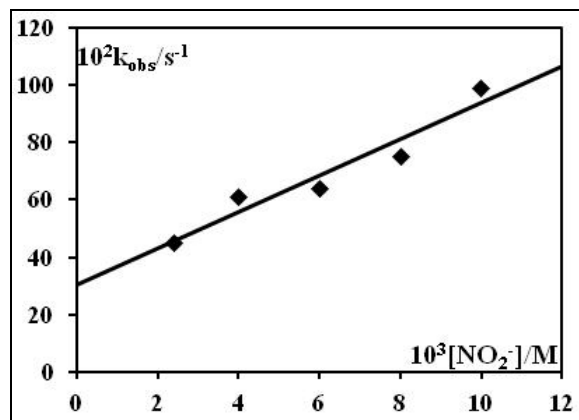
Посматрана константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , је израчуната као средња вредност неколико (најчешће 4 до 8) независних кинетичких мерења, користећи програм OriginPro8. Температурска зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , је проучавана за реакције супституције $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ са I⁻ и Py, као и за реакције супституције $[PdCl(tpdm)]^+$ са I⁻, Br⁻, Py и DMSO. Експериментални резултати мерења приказани су на Сликама 3.2; 3.3; 3.4 и 3.5, а израчунате вредности су сумиране у Табели 3.1.



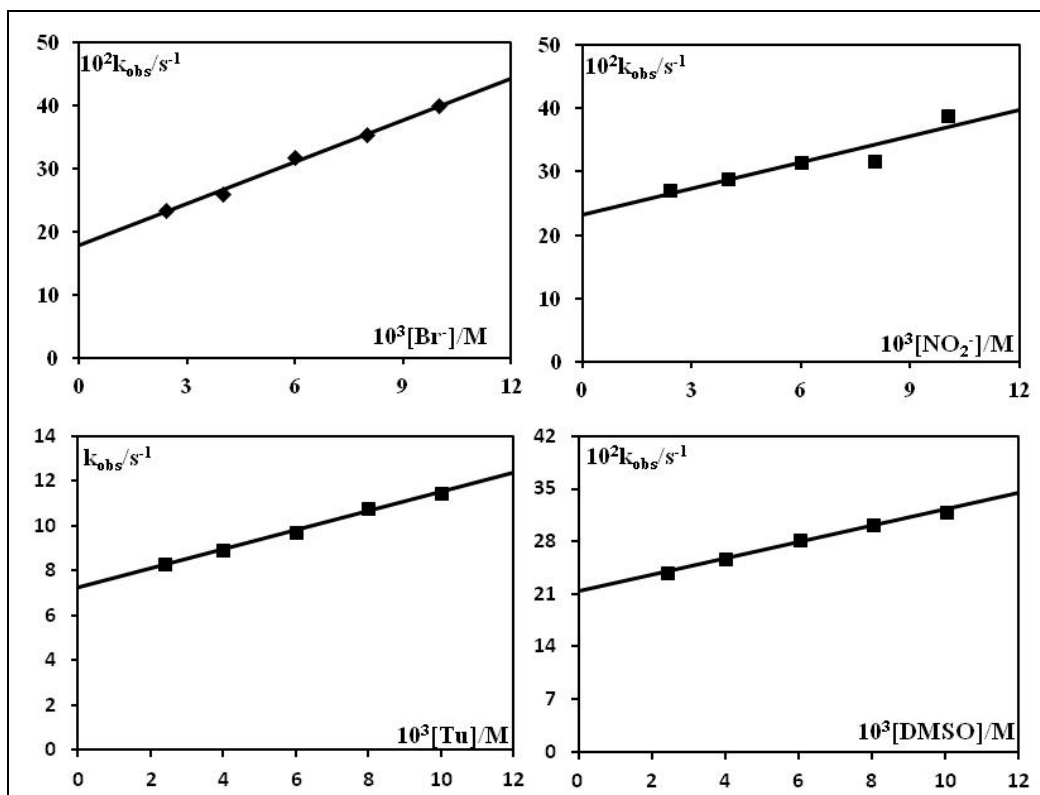
Слика 3.2. Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , од концентрације нуклеофила и температуре за реакције супституције $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ са I⁻ и Py у 0,1 M NaClO₄, [Cl⁻] = 10 mM.



Слика 3.3. Зависност константе брзине реакције pseudo-првог реда, k_{obs} , од концентрације нуклеофила и температуре за реакције супституције $[PdCl(tpdm)]^+$ са I^- , Py , $DMSO$ и Br^- у $0,1 M NaClO_4$, $[Cl^-] = 10 mM$.



Слика 3.4. Зависност константе брзине реакције pseudo-првог реда, k_{obs} , од концентрације нуклеофила за реакцију супституције $[PdCl(tpdm)]^+$ са NO_2^- у $0,1 M NaClO_4$, $[Cl^-] = 10 mM$.



Слика 3.5. Зависност константе брзине реакције pseudo-првог реда, k_{obs} , од концентрације нуклеофила за реакцију супституције $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ са Tu , Br^- , NO_2^- и $DMSO$ у $0,1 M NaClO_4$, $[Cl^-] = 10 mM$.

Табела 3.1. Константе брзине и активациони параметри за супституционе реакције $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ са различитим нуклеофилима у 0.1 M NaClO₄ и 10 mM NaCl.

$[PdCl(tpdm)]^+$		$k_2/M^{-1}s^{-1}$	$k_1[Cl^-]/M^{-1}s^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/kJmol^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/J K^{-1}mol^{-1}$
Tu ^a	298	$(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$0,37 \pm 0,08$	29 ± 3	-75 ± 8
I ⁻	288	526 ± 3	12 ± 1		
	298	646 ± 5	47 ± 2	8 ± 3	-180 ± 9
	308	693 ± 6	230 ± 5		
Br ⁻	288	43 ± 1	$3,2 \pm 0,1$	/	/
	298	90 ± 2	26 ± 1		
NO ₂ ⁻	298	$63,5 \pm 0,5$	30 ± 1	/	/
py	288	$25,1 \pm 0,1$	$0,36 \pm 0,01$		
	298	$47,5 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,1$	31 ± 7	-120 ± 20
	308	$61,9 \pm 0,2$	39 ± 2		
DMSO	288	$40,4 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,1$		
	298	47 ± 1	16 ± 1	10 ± 1	-195 ± 3
	308	56 ± 2	30 ± 2		

$[Pd(TL^{tBu})Cl]^+$		$k_2/M^{-1}s^{-1}$	$k_1[Cl^-]/M^{-1}s^{-1}$	$\Delta H_2^\ddagger/kJmol^{-1}$	$\Delta S_2^\ddagger/J K^{-1}mol^{-1}$
Tu	298	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^3$	39 ± 2	/	/
I ⁻	288	49 ± 1	$1,3 \pm 0,1$		
	298	79 ± 1	$13,8 \pm 0,1$	22 ± 6	-150 ± 20
	308	95 ± 2	$20,2 \pm 0,2$		
Br ⁻	298	$22,1 \pm 0,4$	21 ± 1	/	/
NO ₂ ⁻	298	14 ± 2	23 ± 1	/	/
py	288	$12,8 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,1$		
	298	$13,6 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,1$	10 ± 5	-205 ± 15
	308	$17,8 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,2$		
DMSO	298	$10,9 \pm 0,5$	24 ± 2	/	/

^a Реф. 171

Генерално, познато је да комплекси Pd(II) и Pt(II) имају велики афинитет према нуклеофилима који садрже сумпор-донорске атоме.^{147,214} На основу резултата испитивања приказаних у овом делу највећу реактивност од свих изучаваних нуклеофила показује тиоуреа. Најјача нуклеофилност тиоурее произилази из њених двојних особина, а то су особине тиолне групе као σ -донора и тиоетарске групе као σ -донора и π -акцептора.^{171,215}

Боља реактивност I⁻ јона у поређењу са Br⁻ и NO₂⁻ јонима може се објаснити различитом поларизабилношћу ових нуклеофила (Слика 3.3). Наиме, I⁻ јон је најполаризабилнији халогенидни јон ($4,7 \cdot 10^{-24} \text{cm}^3$)²¹⁶ и може се класификовати као

„мека“ база. Пошто је Pd(II) „мека“ киселина, велика реактивност са I⁻ јоном је очекивана.²¹⁷

Поларизабилност Br⁻ јона је $3,05 \cdot 10^{-24} \text{cm}^3$. Овај јон је нешто мање „мека“ база у односу на I⁻ јон,²¹⁶ па је то главни разлог за мању реактивност Br⁻ јона. Како је NO₂⁻ јон прелазна „тврдо-мека“ база, очекивана је и добијена његова мања реактивност у поређењу са халогенидним јонима (Слика 3.4 и Слика 3.5).

Мала реактивност DMSO нуклеофила је такође очекивана, управо зато што DMSO има специфичне карактеристике (Слика 3.3 и Слика 3.5). Наиме, DMSO има два донорска атома, атом O и атом S. Пошто спада у групу амбидентатних лиганда, увек се координује монодентатно. На основу раније публикованих резултата добро је познато да се DMSO у реакцијама са Pd(II) јоном прво координује преко атома O, где је локализована негативна парцијална шаржа, а након тога долази до интрамолекуларске изомеризације, када настаје термодинамички стабилан производ код кога је јон метала координован преко атома S.¹⁶² На другој страни, волуминозност две метил групе у молекулу DMSO, као и волуминозност тридентатног инертног лиганда у координационој сфери полазних комплекса, могу додатно ометати формирање везе метал-лиганд и тиме успорити процес супституције.

Мала реактивност пиридина се може објаснити на два начина. Наиме, због присисува волуминозних инертних лиганда у структури полазних комплекса отежан је прилаз шесточланог цикличног прстена и формирање нове везе. Са друге стране, пиридин је знатно слабији нуклеофил у односу на остале, јер спада у групу „тврдо-меких“ база.

Реактивност изучаваних комплекса према одабраним нуклеофилима је дефинисана на основу података о константи брзине (Табела 3.1). [PdCl(tpdm)]⁺ комплекс реагује приближно три пута брже него [(TL^{tBu})PdCl]⁺ комплекс. Оба комплекса су стерно веома заштићена инертним тридентатним лигандима, али присуство волуминозних *tert*-бутил групе у структури [(TL^{tBu})PdCl]⁺ комплекса значајно утиче на опадање брзине супституционог процеса овог комплекса.

Имајући у виду да су одабрани комплекси новосинтетисани, за боље разумевање њихових карактеристика упоређене су израчунате вредности за константе брзина реакција супституције са I⁻ јоном са вредностима добијеним за друге стерно заштићених Pd(II) комплексе, Табела 3.2.

Табела 3.2. Константе брзина супституционих реакција за серију $[Pd(L)Cl]^+$ комплекса са I^- јоном као нуклеофилом на 298 K.

Лиганд	$k_2 / M^{-1}s^{-1}$
$[PdCl(tpdm)]^+$	646 ± 5
$[(TL^{tBu})PdCl]^+$	79 ± 1
$[PdCl(dien)]^+$	4446 ± 40^a
$[PdCl(1,4,7-Me_3dien)]^+$	3542 ± 300^a
$[PdCl(1,4,7-Et_3dien)]^+$	932 ± 4^a
$[PdCl(1,1,4-Et_3dien)]^+$	$21,2 \pm 0,3^a$
$[PdCl(1,1,7,7-Me_4dien)]^+$	$0,28 \pm 0,50^a$
$[PdCl(1,1,7,7-Et_4dien)]^+$	$8,0 \pm 1 \cdot 10^{-4}^a$

^a Реф. 215

На основу података из Табеле 3.2 може се закључити да испитивани комплекси $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ имају сличну реактивност као јако стерно заштићени $[PdCl(1,4,7-Et_3dien)]^+$ и $[PdCl(1,1,4-Et_3dien)]^+$ комплекси.²¹⁵

Реактивност комплекса који садрже инертне тридентатне азот-донорске лиганде са пиридинским прстеновима јако зависи од броја и распореда пиридинских јединица.²¹⁸ На пример, у случају *trpy* лиганда интеракција између јона метала и пиридинских прстенова је јака, посебно са централним пиридинским прстеном. Настале интеракције доводе до појаве снажног кинетичког *trans*-ефекта, који, са друге стране, проузокује веома брзе процесе супституције. Проучавани $[PdCl(tpdm)]^+$ комплекс, такође, садржи пиридинске прстенове, али су у тридентатном лиганду они раздвојени метиленским групама, па је самим тим систем много флексибилнији. У овом случају интеракције инертног лиганда са јоном метала са знатно мање изражене, па је и реактивност $[PdCl(tpdm)]^+$ комплекса у рангу $[PdCl(dien)]^+$ комплекса, који не садржи пиридинске прстенове.¹⁷¹

Из свега наведеног јасно се може закључити да и релативно мале структурне модификације тридентатног лиганда могу имати јак утицај на реактивност комплекса.

Устаљени ред афинитета $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ према испитиваним нуклеофилима добијен је коришћењем и LFER (Linear Free Energy Relationship) методе. Веза између логаритма константе брзине реакције другог реда ($\log k_2$) и константе нуклеофилности (n_{Pr^\ominus}) приказана је једначином (3.1.2):

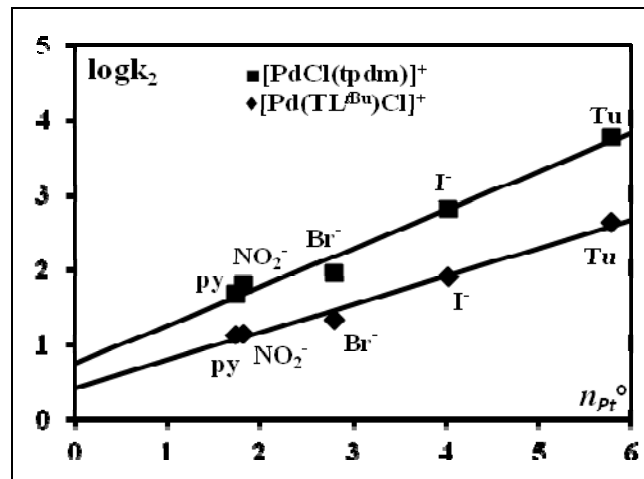
$$\log k_2 = s \cdot n_{Pt}^0 + \log k_s \quad (3.1.2.)$$

Добијени подаци приказани су у Табели 3.3.

Табела 3.3. Константа нуклеофилности (n_{Pt}^0) и $\log k_2$ за реакције супституције $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ комплекса са различитим нуклеофилима.

L	n_{Pt}^0	$\log k_2$ $[(TL^{tBu})PdCl]^+$	$\log k_2$ $[PdCl(tpdm)]^+$
Tu	5,78	3,11	3,76
I ⁻	4,03	1,90	2,81
Br ⁻	2,79	1,34	1,95
NO ₂ ⁻	1,83	1,14	1,80
Py	1,74	1,13	1,68

На основу података из Табеле 3.3. графички је приказана линеарна зависност за оба комплекса, Слика 3.6.



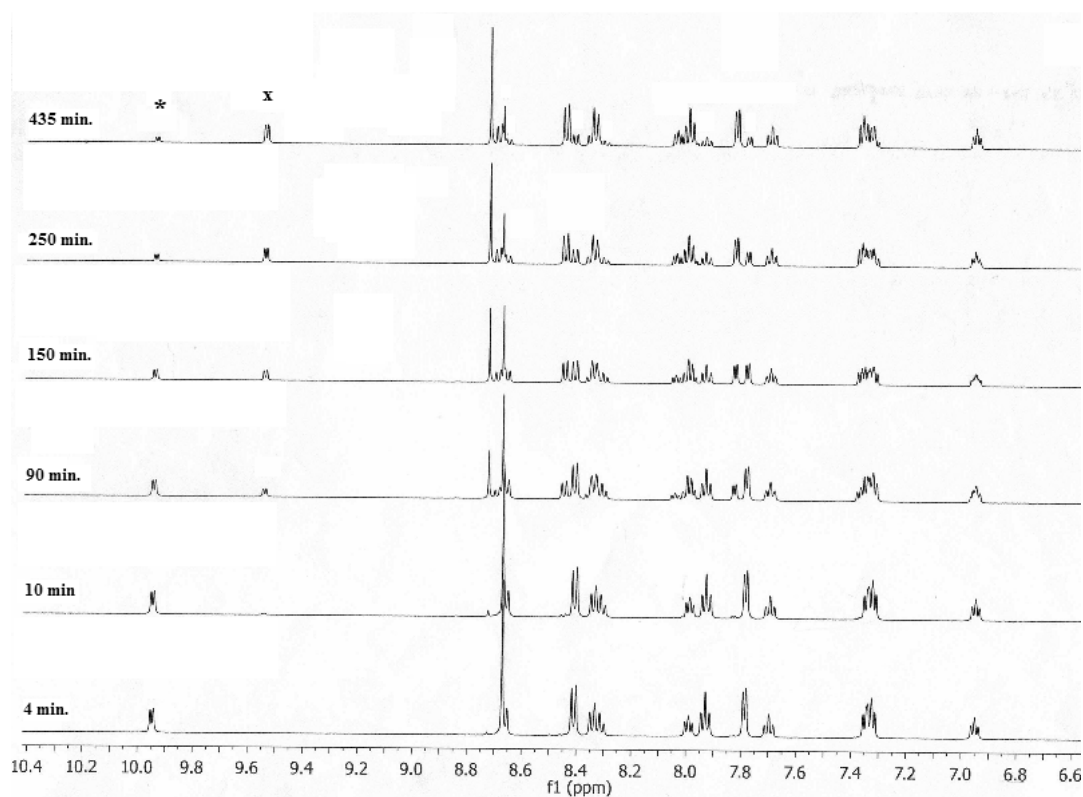
Слика 3.6. Логаритам константе брзине реакције другог реда у функцији од нуклеофилности лигананда за процес супституције $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ и $[PdCl(tpdm)]^+$ на 298 K у 0.1M NaClO₄ и 10 mM NaCl.

Као што се са приложене слике може видети добијена је линеарна зависност што је јасан доказ да се супституција хлоридног јона из испитиваних комплекса одвија по истом механизму. Нагиб праве се означава са s и представља степен афинитета комплекса према нуклеофилима.²¹⁹ Добијена вредност фактора s за $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ комплекс износи 0,47, а за $[PdCl(tpdm)]^+$ комплекс је 0,51. Наиме, s вредност дефинише реактивност комплекса, односно што је она већа комплекс је реактивнији према изучаваним лигандима.

Осетљивост константе брзине реакције на природу улазног лиганда, као и израчунате негативне вредности за ентропију активирања, дате у Табели 3.1, потврђују чињеницу да се ове супституционе реакције одвијају по асоцијативном (A) механизму.

3.2. Испитивање кинетике супституционих реакција $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ комплекса

Комплекси рутенијума се последњих година интензивно изучавају, јер су показали јако добре особине као потенцијални антитуморски лекови. Заједничка особина свих комплекса је хидролиза у воденим растворима. Комплекс $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$, који је испитиван у овом раду, такође подлеже хидролизи, што је потврђено ^1H NMR методом. На Слици 3.7 приказан је ^1H NMR спектар $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ комплекса у D_2O , у тачно дефинисаним временским интервалима.

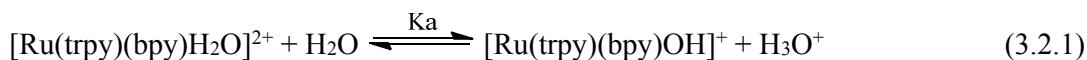


Слика 3.7. Хидролиза $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ комплекса праћена ^1H NMR спектроскопијом (* - $\text{H}_6\text{-bipy}$ у $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$; x - $\text{H}_6\text{-bpy}$ у $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$)

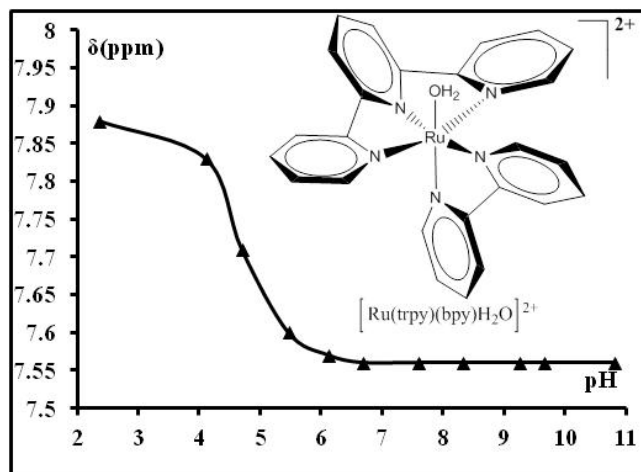
Наиме, интензитет сигнала на 9,95 ppm, који одговара H_6 протону *bpy* лиганда у хлоридо комплексу, опада, док истовремено интензитет сигнала на 9,56 ppm, који одговара H_6 протону *bpy* лиганда у аква комплексу, расте са временом. Процес хидролизе је завршен за око 8 сати, а израчуната константа хидролизе на 295 K износи

$k_{H_2O} = (1,07 \pm 0,4) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 1,8 \text{ h}$). На основу ових података може се закључити да растварањем полазног комплекса у води долази до брзе хидролизе и формирања аква аналога.

Координовани молекул воде у $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ може да подлегне депротонацији, формирајући хидроксо комплекс, што је приказано једначином (3.2.1).



Способност да отпусти протон, тј. киселост аква комплекса, окарактерисана pK_a вредношћу, зависи од структуре комплекса и електронских ефеката у комплексу. Уколико у комплексу постоји више π -акцептора, комплекс ће имати нижу pK_a вредност, и обрнуто. На Слици 3.8 приказани су резултати одређивања pK_a вредности $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ комплекса ^1H NMR спектроскопијом, праћењем промене интензитета погодног сигнала у функцији од pD вредности. У овом случају одабран је H_a протон *trpy* лиганда. Анализом добијене NMR титрационе криве израчуната је вредност за $pK_a = 5,19 \pm 0,06$.

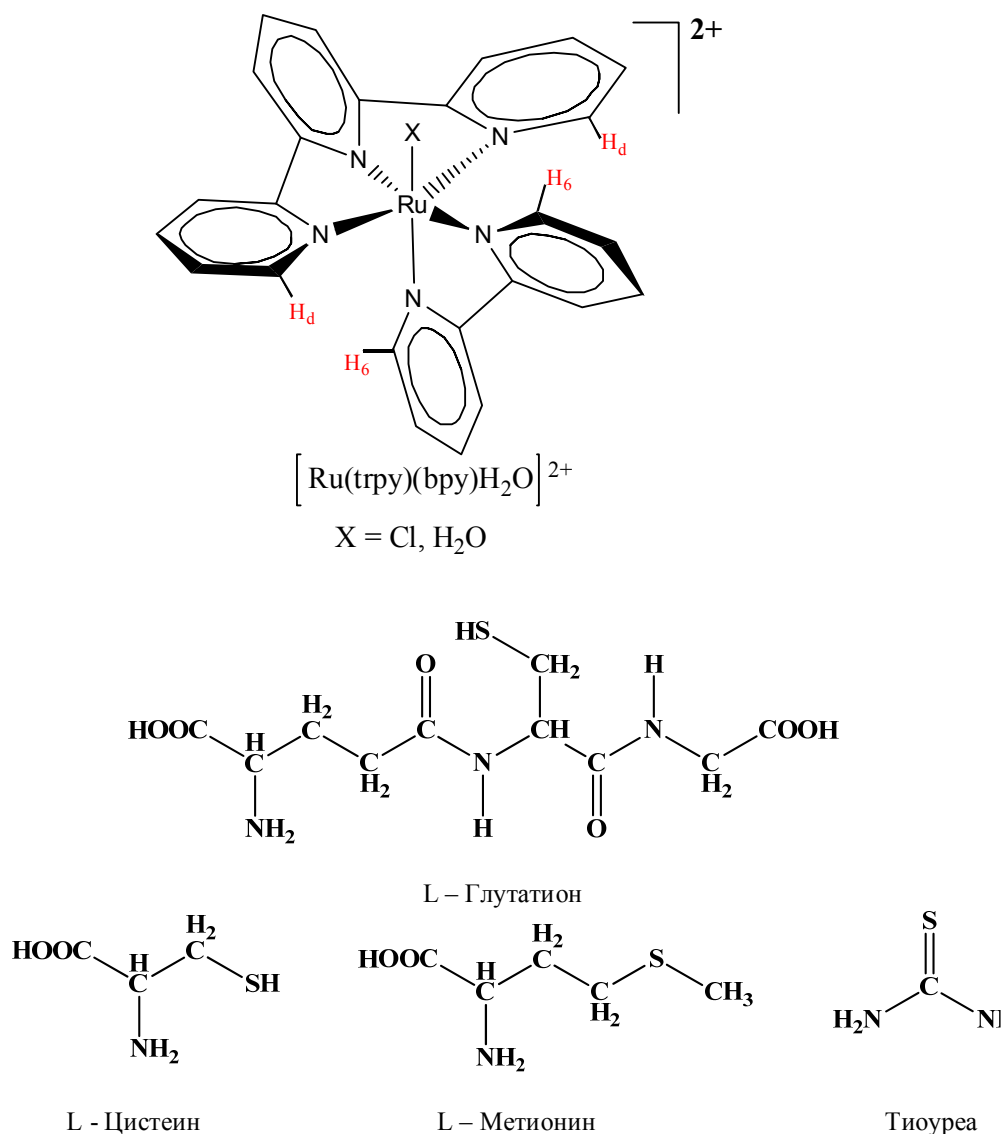


Слика 3.8. Промене положаја H_a протона *trpy* лиганда са променом pD вредности раствора током титрације $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ комплекса на 295 K, $C_{[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Већа киселост $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ се може приписати π -акцепторсим дејству инертних хелатних лиганда (*trpy* и *bpy*), који додатним интеракцијама са јоном метала

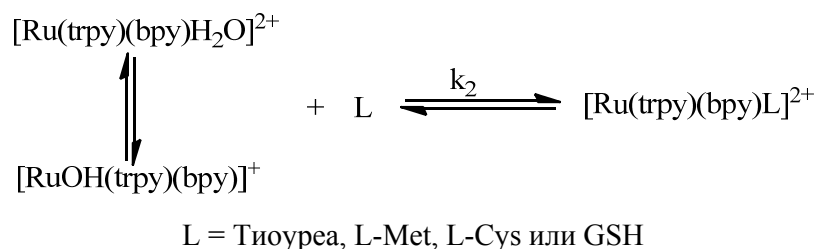
повећавају његову електрофилност, што за последицу има смањење рКа вредности аква комплекса.

Кинетика супституционих реакција $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ са Tu, L-Met, L-Cys и L-GSH лигандима испитивана је ^1H NMR и ^{13}C NMR спектроскопијом. Ове реакције су изучаване у еквимоларном односу реактанта у D_2O на 295 К и $\text{pH} = 4 - 5,3$ у периоду од три недеље. Исте супституционе реакције проучаване су и у присуству фосфатног пуфера на $\text{pH} = 7,4$. Ови услови су коришћени да би се обезбедили услови блиски физиолошким. Структурне формуле изучаваног комплекса и лиганада приказане су на Слици 3.9.



Слика 3.9. Структура комплекса и одабраних сумпор-донорских лиганада.

Реакција супституције $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ са Tu, L-Met, L-Cys и GSH је реверзибилан процес, као што је приказано на Шеми 3.2.



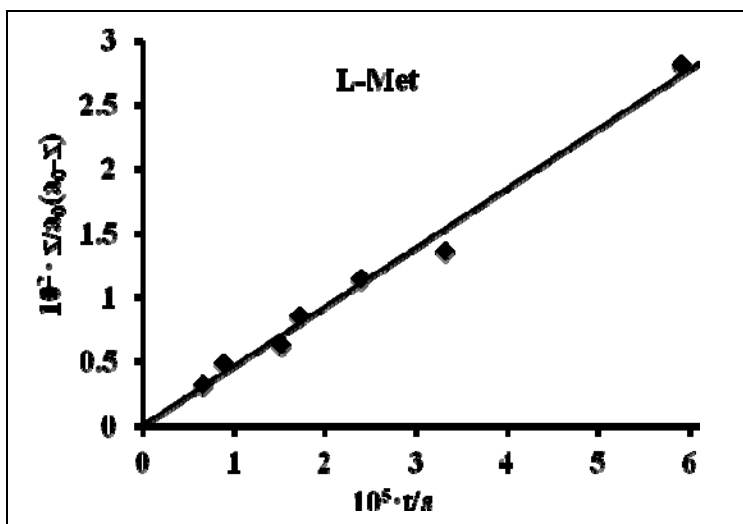
Шема 3.2.

Константа брзине реакције другог реда, k_2 , одређује се на основу једначине (3.2.2):

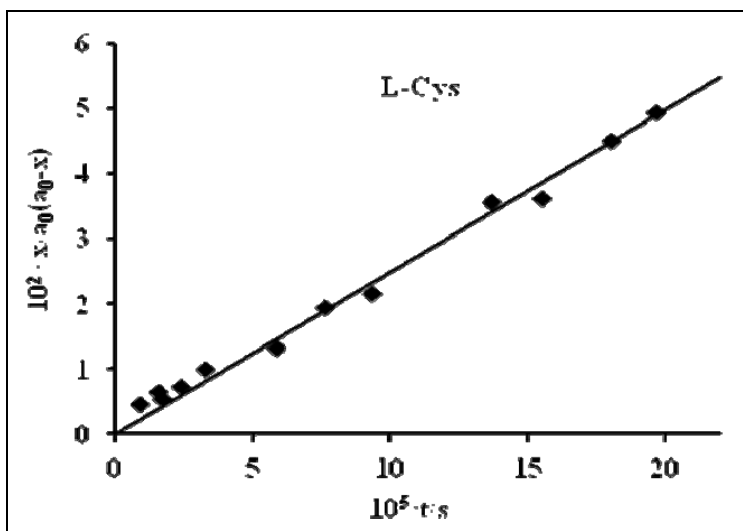
$$k_2 t = \frac{x}{a_0(a_0 - x)} \quad (3.2.2)$$

у којој a_0 представља почетну концентрацију реактаната, а x представља концентрацију производа реакције у одређеним временским интервалима.

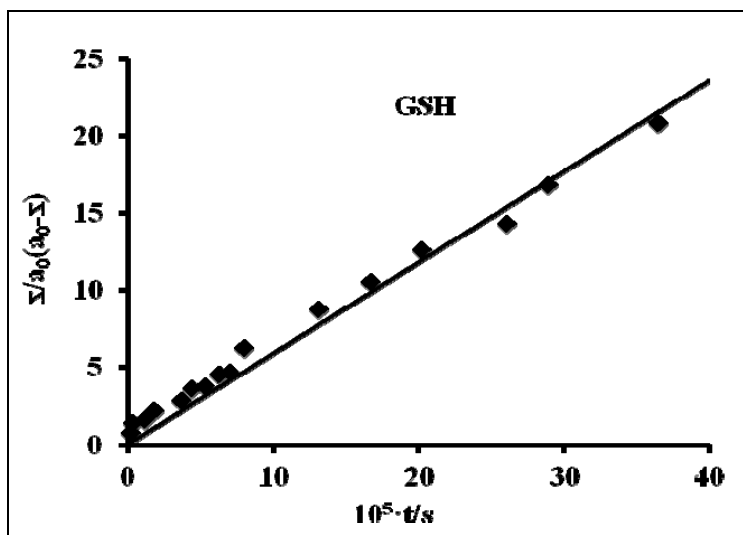
Гугенхајмова (Guggenheim) зависност члана $x/a_0(a_0-x)$ у функцији од времена за супституционе реакције $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ са Tu, L-Met, L-Cys и GSH су линеарне, што се може видети на Сликама 3.10, 3.11 и 3.12. Вредности за константу брзине реакције другог реда, k_2 , израчунате су из нагиба добијених линеарних зависности и приказане су у Табели 3.4.



Слика 3.10. Гугенхајмова зависност члана $x/a_0(a_0-x)$ у функцији од времена, за супституциону реакцију $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ (4 mM) са L-Met (4 mM) у D_2O на 295 K, $pD = 5,3$.



Слика 3.11. Гугенхајмова зависност члана $x/a_0(a_0-x)$ у функцији од времена, за супституциону реакцију $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ (4 mM) са L-Cys (4 mM) у D_2O на 295 K, $pD = 5,0$.



Слика 3.12. Гугенхајмова зависност члана $x/a_0(a_0-x)$ у функцији од времена, за супституциону реакцију $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ (10 mM) са GSH (4 mM) у D_2O на 295 K, $pD=4,0$.

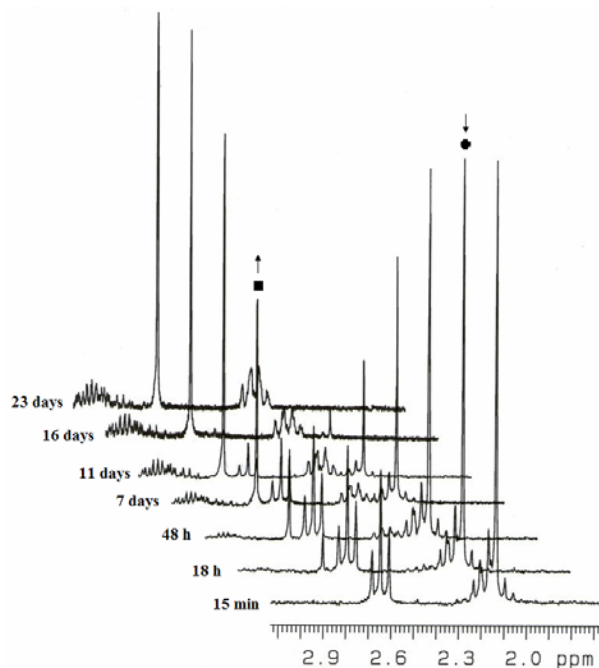
Табела 3.4. Константе брзине другог реда, k_2 , за супституционе реакције $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ са сумпор-донорским лигандима у D_2O на 295K.

Лиганд	pH	$10^4 k_2/ M^{-1}s^{-1}$
Tu	5,3	Веома брза реакција
	7,4	Веома брза реакција
L-Met	5,3	$4,6 \pm 0,2$
	7,4	$5,8 \pm 0,8$
L-Cys	5,0	$2,49 \pm 0,06$
	7,4	$3,26 \pm 0,05$
GSH	4,0	$0,050 \pm 0,001$
	7,4	$0,99 \pm 0,02$

На основу података датих у Табели 3.4 може се закључити да су реакције супституције веома споре, са изузетком реакције са Tu. Велика реактивност Tu је

објашњена у делу 3.1. Такође, на основу вредности датих у Табели 3.4 се види да брзина супституције незнатно зависи од рН вредности. Реакције на рН = 7,4 су нешто брже него на нижим рН вредностима (4 – 5,3) за све изучаване системе. Иако је очекивана знатно бржа супституциона реакција на физиолошкој рН, протолиза аква комплекса и формирање мање реактивног хидроксо комплекса има доминантан утицај на брзину супституције.

Анализом ^1H NMR спектра добијених за реакцији супституције између $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ и L-Met на рD = 5,3 (Слика 3.13) могу се уочити два сигнала, један на 2,14 ppm, који потиче од CH_3 -групе слободног L-Met, а други на 2,76 ppm, сигнал од CH_3 -групе координованог L-Met. Сигнал CH_3 -групе координованог L-Met појављује се тек након 12 h од почетка реакције и његов интензитет расте са временом, док сигнал CH_3 -групе некоординованог L-Met опада са временом. На рD = 7,4 ова два сигнала су померена за 0,02 ppm ка слабијем пољу. Сигнали који потичу од полазног Ru(II) комплекса такође се мењају у току супституционог процеса. Тако, сигнал у ^1H NMR спектру који потиче од H_6 протона *bpy* лиганда несупституисаног комплекса се појављује на 9,56 ppm, а супституисаног на 9,86 ppm. У Табели 3.5 су дата хемијска померања погодних сигнала лиганата на основу којих су праћени процеси супституције, а у Табели 3.6 су дата хемијска померања H_6 протона *bpy* лиганда код несупституисаног и супституисаног комплекса.



Слика 3.13. ^1H NMR спектар реакције између $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (4 mM) и L-Met (4 mM) и D_2O на 295K, $\text{pH}=5,3$, (■ – координовани L-Met, $\delta(\text{CH}_3(\text{s})) = 2,76$ ppm; ● – слободни L-Met, $\delta(\text{CH}_3(\text{s})) = 2,14$ ppm)

Табела 3.5. Хемијска померања погодних сигнала лиганата праћених током супституционе реакције $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ комплекса ^1H NMR методом на 295 K, $\text{pD}=7,4$.

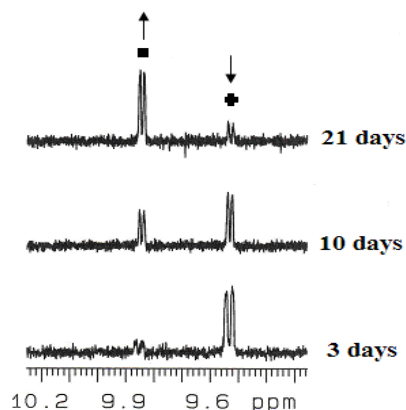
Лиганд	Група	δ (ppm)	
		слободан	координован
L-Met	CH ₃ (s)	2,16	2,78
	CH (dd)	3,89	4,42
L-Cys	CH (dd)	4,00	4,14
	CH ₂ (m)	3,08	3,31
GSH	Cys-H _β (m)	2,98	-
	Cys-H _α (dd)	4,59	-
GSSG	Cys-H _α (dd)	4,77	4,45
Tu ^a	C=S	183,6	177,9

^a хемијска померања тио групе у ^{13}C NMR спектру.

Табела 3.6. Промена хемијских померања H_6 -врсту протона код $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ током супституционе реакције са одабраним сумпор-донорским лигандима 1H NMR методом на 295 K, $pD = 7,4$.

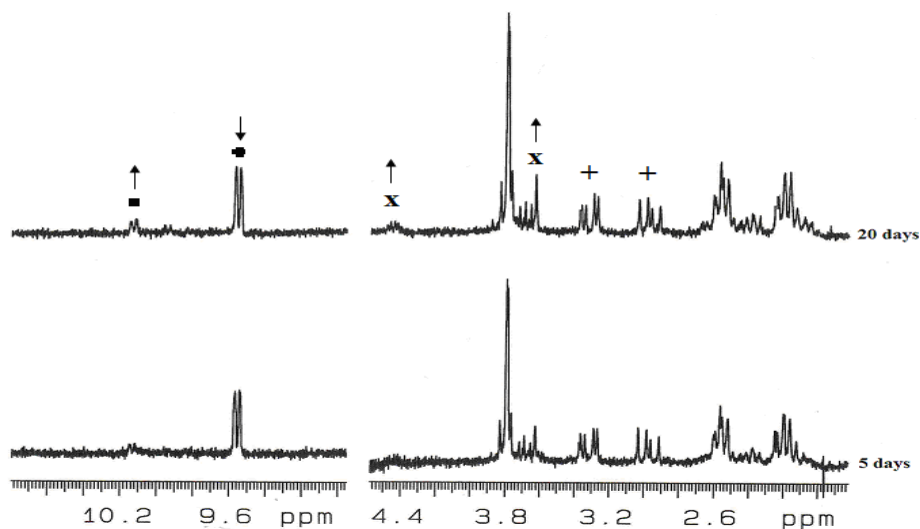
Лиганд	δ (ppm)	
	H_6 -врсту аква	H_6 -врсту супституисан
L-Met	9,56	9,86
L-Cys	9,56	9,86
GSH	9,56	10,13
Tu	9,56	10,13

У реакцији између $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ и L-Cys на $pD = 5$ сигнал протона SH -групе слободног L-Cys се налази на 4,00 ppm, док се сигнал координованог L-Cys, који се појављује у спектру тек тек након 48 h, налази на 4,15 ppm (Табела 3.5). На $pD = 7,4$ посматрани сигнали су на готово истим хемијским померањима. Положај сигнала који одговарају H_6 протонима bpy лиганда су дати у Табели 3.6. и на Слици 3.14. На основу вредности за константу брзине реакције, Табела 3.4, може се видети да је реакција са L-Cys спорија од реакције са L-Met, чиме је поново потврђена чињеница да су тиоетри бољи нуклеофили од тиола.



Слика 3.14. 1H NMR спектар реакције између $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ (4 mM) и L-Cys (4 mM) и D_2O на 295K, $pH = 7,4$. (■ – супституисани комплекс, $\delta (H_6\text{-врсту}) = 9,86$ ppm; ● – несупституисани комплекс, $\delta (H_6\text{-врсту}) = 9,56$ ppm)

За реакције између $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ и GSH на $\text{pD} = 4$ и $\text{pD} = 7,4$ хемијска померања слободног и координованог лиганда дата су у Табели 3.5. У Табели 3.6 дата су хемијска померања полазног и супституисаног комплекса. Анализом поменутих сигнала израчуната је вредност за константу брзине (Табела 3.4). На основу ове вредности може се закључити да је процес супституције са GSH јако спор. Наиме, на почетку ове реакције примећено је да сигнал (мултиплет), који потиче од Cys- H_β протона на 2,98 ppm, и сигнал (дублет дублета), који потиче од од Cys- H_α протона, на 4,59 ppm GSH опадају са временом, док се сигнали који одговарају полазном комплексу са временом не мењају. Поред тога, у спектру је примећен сигнал од Cys- H_α протона на 3,35 ppm, који одговара оксидованој форми глутатиона, GSSG. Након 5 дана, када је процес оксидације GSH завршен, започиње процес супституције што потврђује појављивање сигнала на 4,45 ppm. У исто време долази до појаве сигнала $\text{H}_6\text{-bpy}$ лиганда супституисаног комплекса на 10,13 ppm (Слика 3.15). Добро је познато да се GSH у неутралним воденим растворима може оксидовати кисеоником из ваздуха.²²⁰ Тек након оксидације настали GSSG молекули започиње процес супституције што објашњава малу реактивност GSH на рН вредностима испод 7. У киселој средини отежано је депротоновање GSH лиганда, а самим тим и процес оксидације је спорији. Из тог разлога је овај процес супституције најспорији.



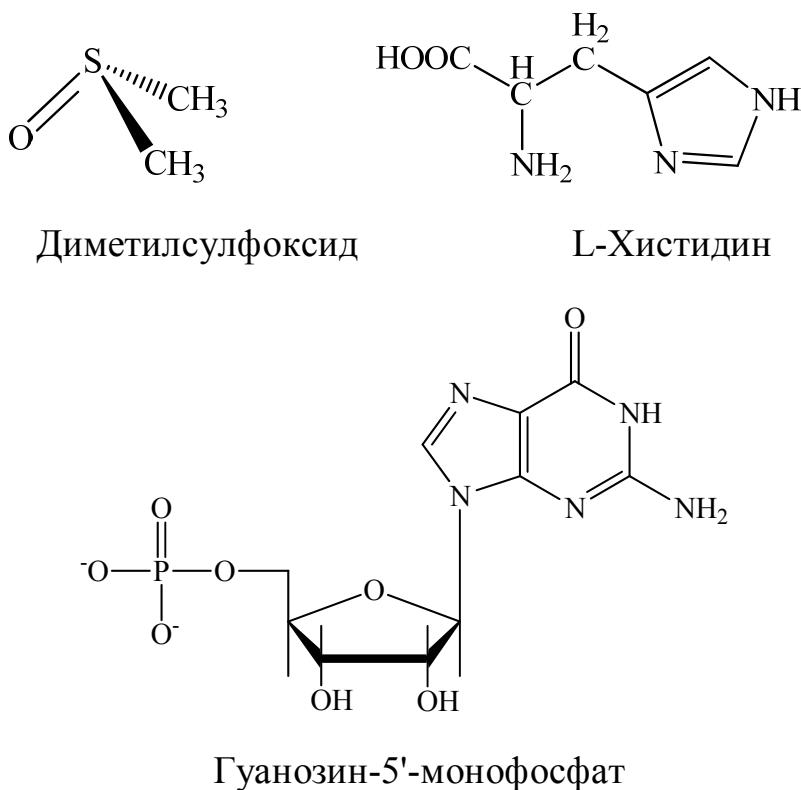
Слика 3.15. ^1H NMR спектар реакције између $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (4 mM) и GSH (4 mM) у D_2O на 295K, $\text{pH}=7,4$, (■ – супституисани комплекс, $\delta(\text{H}_6\text{-bpy}) = 10,13$ ppm; ● – несупституисани комплекс, $\delta(\text{H}_6\text{-bpy}) = 9,56$ ppm; + - оксидациони продукт GSSG, $\delta(\text{CH}_2) = 2,9 - 3,4$ ppm; x – координовани GSSG $\delta(\text{Cys-H}_\alpha) = 4,45$ ppm).

Као што је већ напоменуто, реакција са Ту је јако брза да би се могла пратити ^1H NMR спектроскопијом, али је координација Ту за јон метала потврђена на основу сигнала у ^1H NMR и ^{13}C NMR спектрима. У ^1H NMR спектру сигнал за $\text{H}_6\text{-bpy}$ протоне несупституисаног комплекса се налази на 9,56 ppm, а након координовања Ту он се помера на 10,13 ppm. У ^{13}C NMR спектру хемијско померање атома угљеника из $\text{C}=\text{S}$ групе у молекулу некоординоване Ту налази се на 183,6 ppm, а у молекулу координоване Ту на 177,9 ppm (Табела 3.5).

На основу добијених резултата може се закључити да је у свим изучаваним системима хидролиза $\text{Ru}(\text{II})$ комплекса примаран процес, а након хидролизе започиње процес супституције. Редослед реактивности улазних лиганата зависи од типа, структуре и хемијских карактеристика. Такође, све реакције су незнатно брже на физиолошкој рН вредности.

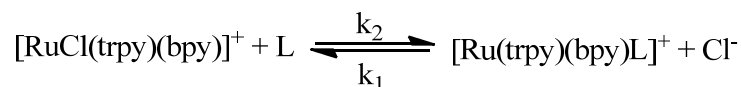
3.3. Испитивање кинетике супституционих реакција $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ комплекса

Кинетика супституционих реакција $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ и нуклеофила Tu, L-His, DMSO и 5'-GMP је испитивана спектрофотометријски праћењем промене апсорбанце на радној таласној дужини у функцији од времена на 310 K. Раствори комплекса и лигананда су припремани у 0,1 M NaClO_4 уз додатак 20 mM NaCl , да би се спречила спонтана хидролиза Ru(II) комплекса. Концентрација од 20 mM NaCl је изабрана након праћења промене апсорбанце раствора комплекса при различитим концентрацијама NaCl . Целокупна кинетичка испитивања изучавана су под условима реакције *pseudo*-првог реда, где је концентрација нуклеофила увек била најмање 10 пута већа од концентрација комплекса. На Слици 3.9 су приказане структурне формуле комплекса и Tu, а на Слици 3.16 су приказуане структурне формуле L-His, DMSO и 5'-GMP.



Слика 3.16. Структурне формуле испитиваних лигананда.

Процес супституције октаедарског Ru(II) комплекса приказан је на Шеми 3.3:



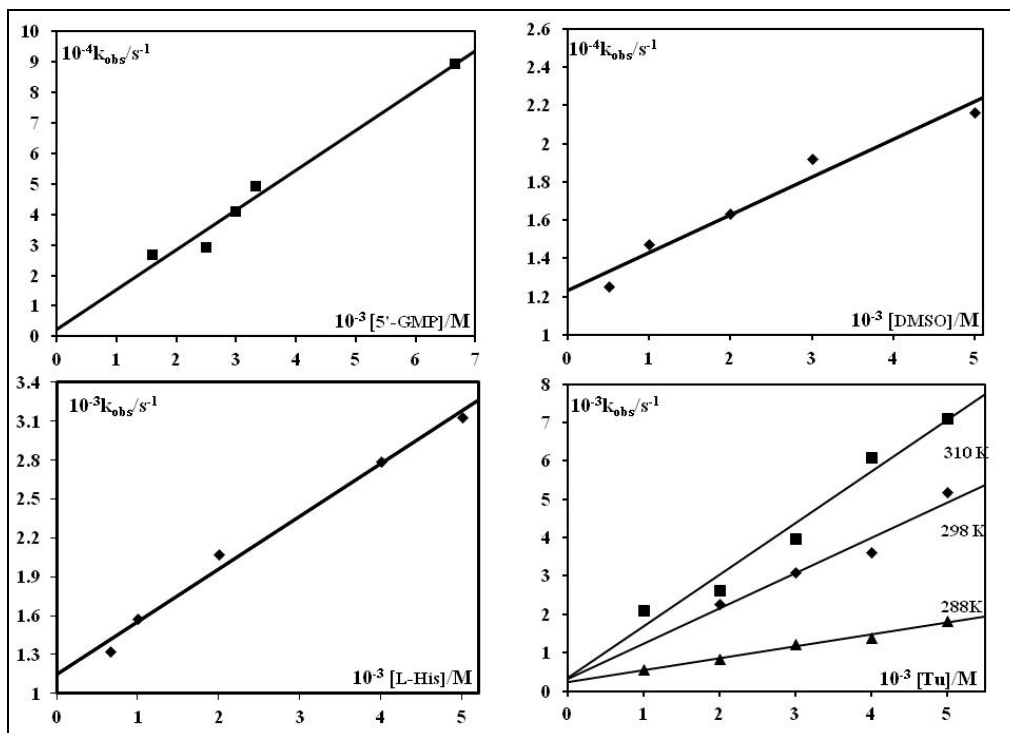
L=5'-GMP, L-His, Tu, DMSO

Шема 3.3.

Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда од концентрације нуклеофила [L] представљена је помоћу једначине (3.3.1):

$$k_{\text{obs}} = k_2[\text{L}] + k_1 \quad (3.3.1)$$

Константа брзине реакције другог реда, k_2 , која карактерише формирање реакционих продуката, израчуната је из нагиба праве $k_{\text{obs}} = f[\text{L}]$. Добијени резултати приказани су у Табели 3.7 и представљени су на Слици 3.17.



Слика 3.17. Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , од концентрације лиганда и температуре за реакције супституције $[\text{RuCl}(\text{trpy})(\text{bpy})]^+$ комплекса и нуклеофила Tu, 5'- GMP, L-His и DMSO у 0,1 M NaClO₄, [Cl⁻] = 20 mM, 298 K.

Табела 3.7. Константе брзине реакције другог реда, k_2 , за супституциону реакцију $[RuCl(trpy)(bpy)]^+$ са одабраним лигандима у 0,1 М $NaClO_4$ и 20 mM $NaCl$ на 310 К.

Лиганд	$k_2/ M^{-1}s^{-1}$	$10^4 k_1/s^{-1}$
Tu	$1,35 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,3$
5'- GMP	$1,33 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,2$
L- His	$0,41 \pm 0,02$	11 ± 1
DMSO	$0,020 \pm 0,002$	$1,2 \pm 0,6$

Сагласно резултатима приказаним у Табели 3.7 и на Слици 3.17 добијен је следћи ред реактивности лиганата: Tu > 5'-GMP > L-His > DMSO. Као што је у предходним поглављима напоменуто било је очекивано да Tu има највећу реактивност према Ru(II) комплексу.^{102,103} Међутим, 5'- GMP показује незнатно мању реактивност од тиоурее. Узимајући у обзир величину молекула, 5'- GMP би требао да реагује знатно спорије. Одабрани нуклеотид, поред координације преко атома азота може се, такође, координовати и преко атома кисеоника из фосфатног остатка. Овај вид координације за неке Ru(II) комплексе је раније уочен и публикован.^{1,77} Након формирања производа код кога је застипљена Ru(II)–O хемијска веза, долази до споре интрамолекулске изомеризације формирајући Ru(II)-N7 хемијску везу. Реакција са аминокиселином L- His одиграва се, примарно, координацијом преко атома кисеоника из карбоксилне групе, а потом долази до изомеризације формирајући хемијску везу између јона метала и N3 атома имидазоловог прстена. Реакција са DMSO је најспорија. С обзиром да се DMSO може координовати преко атома S или преко атома O, веома крута геометрија нуклеофила чини приступ и формирање везе отежаним.

Вредности за константу брзине повратне реакције, k_1 , одређене су из одсечка посматране линеарне зависности (Слика 3.17). Оне су неколико реда величине мање у односу на вредности за k_2 и незнатно доприносе укупној брзини реакције.

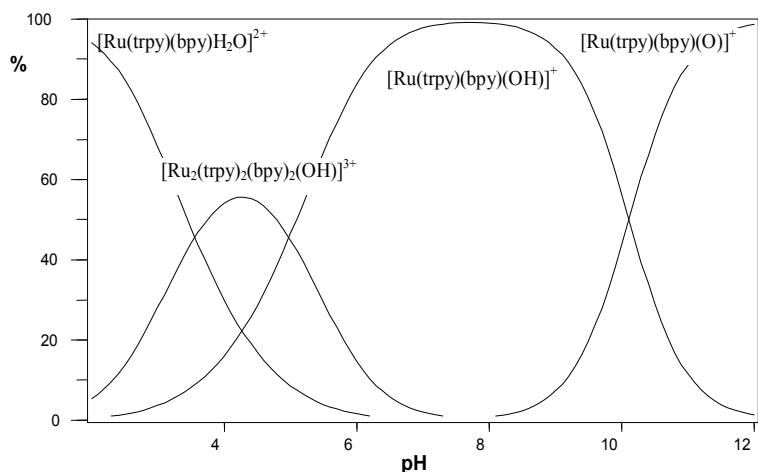
Да би се одредиле вредности термодинамичких параметара и дефинисао механизам супституције, реакција између $[RuCl(trpy)(bpy)]^+$ и Tu проучавана је на три различите температуре. Израчунате вредности за константе на одговарајућим температурама су $k_2^{288} = (0,31 \pm 0,02) M^{-1}s^{-1}$ и $k_2^{298} = (0,92 \pm 0,04) M^{-1}s^{-1}$, а добијена негативна вредност ентропије активирања, $\Delta S = - (105 \pm 5) K^{-1}M^{-1}$, потврђује чињеницу

Табела 3.8. Константе стабилности $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ – HL комплекса (HL = 5'-GMP или L-His) формираних у 0,1 М NaClO₄ на 298 К.

Комплекси	$\log \beta_{p,q,r} \pm \sigma$			
	Потенциометријски	Спектрофотометријски	Потенциометријски	
	ОН ⁻	ОН ⁻	5'-GMP	L-His
$[Ru(trpy)(bpy)(OH)]^+$	- 4,27(2)	- 4,19(6)		
$[Ru(trpy)(bpy)(O)]$	- 14,38(4)	- 14,29(6)		
$[Ru_2(trpy)_2(bpy)_2(OH)]^{3+}$	- 0,82(6)	-		
$[Ru(trpy)(bpy)(L)]^+$	-	-	8,69(9)	7,53(7)
$[Ru(trpy)(bpy)(HL)]^{2+}$	-	-	15,62(6)	14,20(6)
$\{[Ru(trpy)(bpy)]_2(HL)\}^{4+}$	-	-	-	18,69(13)
Статистика	$\chi^2 = 13,32$ $s = 1,96$	$\chi^2 = 10,32$ $s = 1,73$	$\chi^2 = 13,06$ $s = 1,51$	$\chi^2 = 12,79$ $s = 2,73$

На основу добијених резултата израчунате су константе киселости добијених хидролитичких комплекса. Први корак хидролизе подразумева формирање хидроксо-комплекса, где је $pK_{a1} = 4,27$, а у другом ступњу настаје врло специфичан комплекс $[Ru(trpy)(bpy)(O)]$, где је $pK_{a2} = 10,11$. Формирање комплекса са окси-радикалом (O^{2-}) је раније публиковано.^{105,221} Равнотежна константа за реакцију димеризације K_{dim} , је одређена и износи 3,45 ($\log K_{dim} = \log \beta_{20-1} - \log \beta_{10-1}$, једначина 3.4.1.4).

На Слици 3.18. је приказана расподела хидролитичких комплекса.

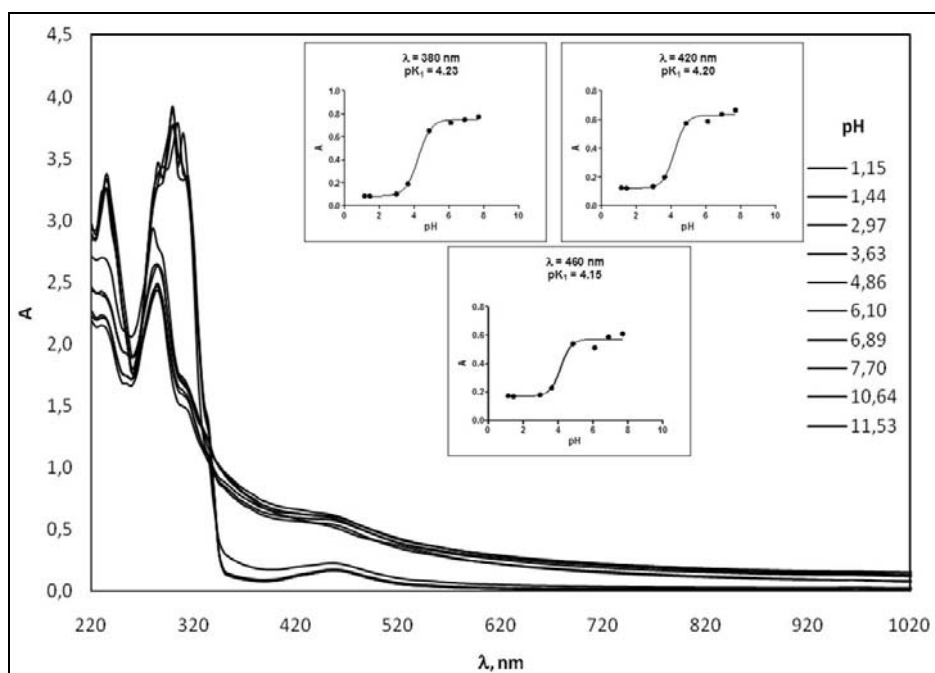


Слика 3.18. Дистрибуциони дијаграм хидролитичких врста код $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ комплекса у $0,1\text{ M NaClO}_4$ на 298 K , $C_{[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}} = 2.00\text{ mM}$.

У најкиселијој области до рН око 4 у систему доминира полазни аква комплекс. У рН опсегу између 3 и 6 у систему доминира $[Ru_2(trpy)_2(bpy)_2(OH)]^{3+}$ комплекс, са максималном концентрацијом на рН око 4. Овај јон представља димеризациони облик $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ и $[Ru(trpy)(bpy)OH]^+$ комплекса, као што је приказано на Шеми 3.4.1.3. $[Ru(trpy)(bpy)OH]^+$ комплексни јон настаје на рН око 2 и достиже свој максимум у концентрације на рН око 8. Комплексни јон $[Ru(trpy)(bpy)(O)]$ се формира на рН = 8 и његова концентрација расте са даљим порастом рН вредности. Веома је битна чињеница да на физиолошкој рН вредности овај комплекс првенствено егзистира у хидроксо облику.

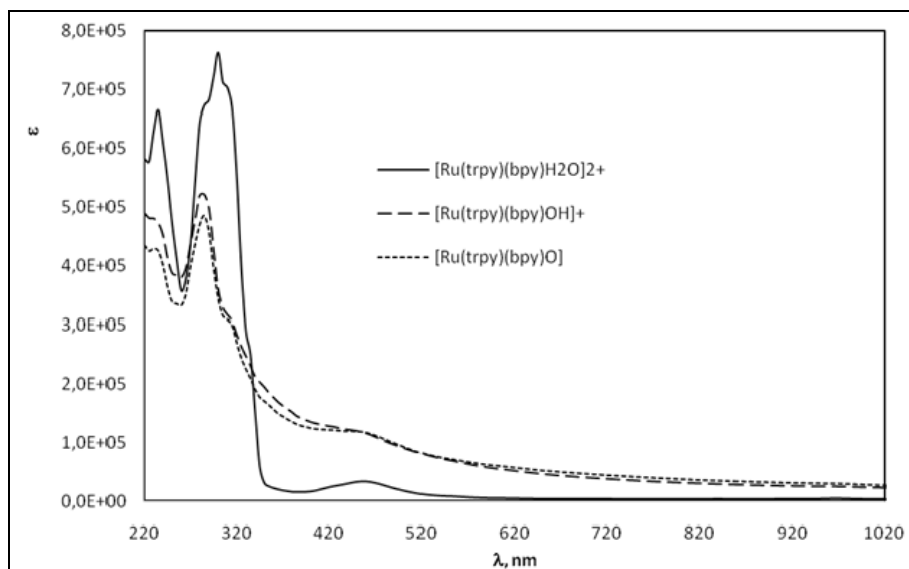
3.4.2. Испитивање хидролизе $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ комплекса спектрофотометријском методом

Процес хидролизе $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ изучаван је и спектрофотометријски. Испитивање је засновано на снимању UV-VIS спектра раствора код кога је концентрација комплекса била константна, док се киселост раствора мењала додатком стандардних раствора HCl или NaOH. Сви UV-Vis спектри су показивали интензивне траке у области од 280 и 300 nm, као и сигнале слабијег интензитета у области од 450 и 470 nm (Слика 3.19).



Слика 3.19. UV-Vis спектар $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ комплекса на различитим pH вредностима. Уметнути график: Зависност апсорбанце од pH на $\lambda = 380, 420$ и 460 nm.

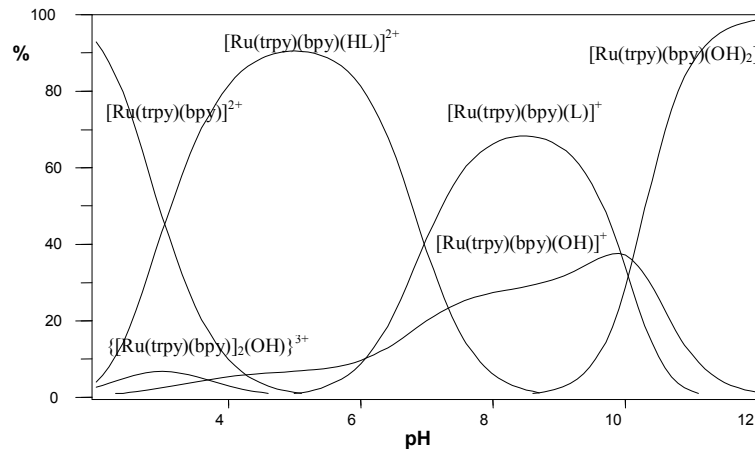
Сви спектрални подаци су обрађени помоћу компјутерског програма рНАв 2006.²¹¹ Прихватљиви резултати ових израчунавања дати су у Табели 3.8. Поред константе стабилности, у спектралним израчунавањима добијена је и моларна апсорптивност комплекса, као и теориски добијени спектри различитих хидролитичких врста приказани на Слици 3.20. Добијени резултати потврђују врло добро слагање између потенциометријских и спектрофотометријских мерења.



Слика 3.20. Спектри различитих хидролитичких врста $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ комплекса добијени помоћу компјутерског програма *pHAb 2006*

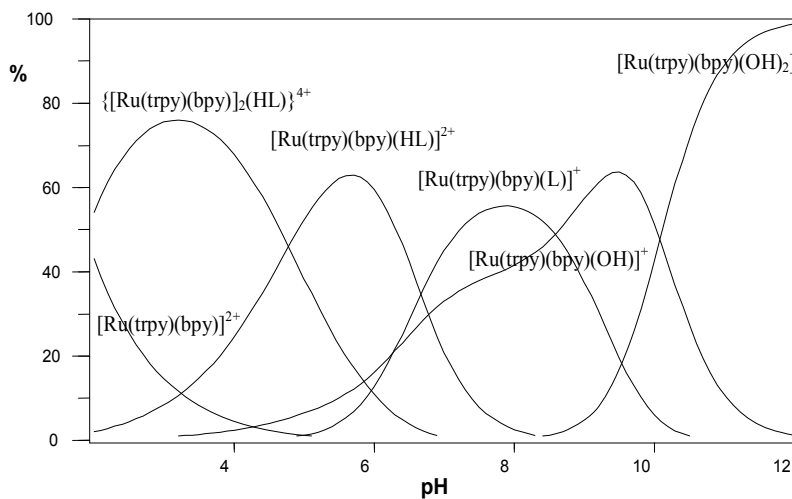
3.4.3. Испитивања реакција комплексирања $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ комплекса и лиганда HL (где је HL = 5'-GMP или L-His)

Реакције комплексирања између $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ и лиганда 5'-GMP или L-His, означених као HL, проучаване су потенциометријским титрацијама у 0,1 М NaClO₄ на 298 К. Титрације су извођене у системима код којих је однос концентрације комплекса према концентрацији лиганда HL био 1:1, 1:2 и 2:1. Добијени производи реакције комплексирања означавају се општом формулом M_pH_qL_r (где је M = $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$, HL = 5'-GMP или L-His). Израчунавања су вршена помоћу компјутерског програма *Hyperquad 2006*.²¹⁴ Константе стабилности насталих производа дате су у Табели 3.8, а дистрибуциони дијаграми насталих комплекса приказани су на Слици 3.21 и Слици 3.22.



Слика 3.21. Дистрибуциони дијаграм формираних комплекса у систему $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ - 5'-GMP, ($[\text{комплекс}] : [5'\text{-GMP}] = 1 : 2$)

На самом почетку титрације долази до формирања комплекса $[Ru(trpy)(bpy)HL]^{2+}$ (HL = 5'- GMP) који максимум у концентрацији достиже на рН око 5. Комплекс са депротонаним нуклеотидом $[Ru(trpy)(bpy)(L)]^{+}$ почиње да се формира на рН = 5 и свој максимум у концентрацији достиже на рН око 8,5. Чисти хидролитички комплекси су такође присутни у раствору у знатним количинама.



Слика 3.22. Дистрибуциони дијаграм формираних комплекса у систему $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ - L- His, ($[\text{комплекс}] : [L\text{- His}] = 1 : 2$)

Дистрибуциони дијаграм за систем који садржи полазни комплекс $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ и L- His, приказан на Слици 3.22, указује да је у области најнижих

pH вредности доминантан комплекс $[[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})]_2(\text{HL})]^{4+}$ (HL = L- His). Формирање комплекса $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{HL})]^{2+}$ започиње на pH око 2 и максимум у концентрацији достиже на pH око 6. Комплекс $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{L})]^+$ почиње да се формира на pH око 5 и достиже свој максимум на pH = 8. Чисти хидролитички комплекси $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{OH}]^+$ и $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{OH})_2]$ су, такође, присутни у знатним количинама на pH изнад 9.

Израчунате вредности за константе стабилности, које су приказане у Табели 3.8, показује да је комплекс са 5'- GMP много стабилнији у односу на комплекс са L- His. С обзиром на величину молекула нуклеотида и аминокиселине, као и на волуминозност инертних лиганата у структури $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, може се закључити да интрамолекулске водоничне везе играју значајну улогу у повећавању стабилности добијених производа. У оба изучавана система, смеша $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{HL})]^{2+}$ и $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{L})]^+$ комплекса заступљена је на физиолошкој pH вредности, што значајно може помоћи даљем разумевању интеракција у биолошким системима.

ЗАКЉУЧАК

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

Резултати испитивања кинетике и механизма супституционих реакција $[PdCl(tpdm)]^+$ и $[(TL^{tBu})PdCl]^+$ са Tu, I, Br, NO_2^- , py и DMSO:

- Тиоуреа је најреактивнија у односу на остале улазне лиганде у процесима супституције $[PdCl(tpdm)]^+$ и $[(TL^{tBu})PdCl]^+$.
- Због веће поларизабилности I јон је реактивнији од Br и NO_2^- јона.
- Мала реактивност DMSO и пиридина је последица стерних ефеката.
- $[PdCl(tpdm)]^+$ реагује приближно три пута брже него $[(TL^{tBu})PdCl]^+$.
- Из свега наведеног јасно се може закључити да релативно мале структурне модификације тридентатног инертног лиганда могу имати јак утицај на реактивност комплекса.
- Негативне вредности ентропије активирања за све изучаване реакције указују на асоцијативни механизам супституције.

Резултати добијени испитивањем кинетике супституционих реакција $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ са Tu, L-Met, L-Cys и GSH:

- Након растварања полазног $[RuCl(trpy)(bpy)]^+$ комплекса у води долази до брзе хидролизе и формирања аква комплекса, $[Ru(trpy)(bpy)(H_2O)]^{2+}$.
- Ниска вредност за рКа $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ је последица π -акцепторског дејства инертних хелатних лиганда (*trpy* и *bpy*), који додатним интеракцијама повећавају електрофилност јона метала.
- Испитивани сумпор-донорски лиганди су добри нуклеофили, а њихов ред реактивности опада у низу: Tu \gg L-Met > L-Cys > GSH.
- На основу добијених вредности за константе брзине реакције супституције може се закључити да је процес супституције на рН = 7,4 нешто бржи него на рН = 4 – 5,3.

Резултати добијени испитивањем кинетике и механизма супституционих реакција $[RuCl(trpy)(bpy)]^+$ са Tu, L-His, DMSO и 5'-GMP:

- Реактивност изучаваних лиганата опада у низу: Tu > 5'-GMP > L-His > DMSO.
- 5'-GMP показује незнатно мању реактивност од тиоуреае, што је последица примарног формирања хемијске везе јона метала и атома кисеоника из фосфатног остатка. Након тога долази до споре интрамолекуларске изомеризације када настаје Ru(II)-N7 производ.
- Реакција са L-His одиграва се, такође, примарном координацијом јона метала преко атома кисеоника из карбоксилне групе, а потом долази до споре изомеризације и грађења термодинамички стабилније Ru(II)-N3 везе.
- Реакција са DMSO је најспорија услед присутног стерног ефекта волуминозних метил група.
- Супституциона реакција између $[RuCl(trpy)(bpy)]^+$ и Tu одиграва се по асоцијативном механизму супституције.

Резултати испитивања хидролизе $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ комплекса и реакција комплексирања са 5'-GMP и L-His

- Израчуната константа киселости за $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ је $pK_{a1} = 4,27$.
- Хидролизом комплекса долази до формирања врло специфичног комплекса $[Ru(trpy)(bpy)(O)]$, на $pK_{a2} = 10,11$.
- На физиолошкој рН вредности $[Ru(trpy)(bpy)H_2O]^{2+}$ комплекс првенствено егзистира у хидроксо облику $[Ru(trpy)(bpy)OH]^+$.
- Комплекс са 5'-GMP је много стабилнији у односу на комплекс са L-His, јер је додатно стабилизован интрамолекуларским водоничним везама.

Литература:

1. L. Ronconi and P. J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, 251, 1633.
2. P. C. A. Bruijninx and P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, 2009, 61, 1.
3. M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger and B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2008, 183.
4. a) B. Rosenberg and L. V. Camp, *Nature*, 1965, 205, 698; b) B. Rosenberg, L. V. Camp, J. E. Trosko and V. H. Mansour, *Nature*, 1969, 222, 385; c) B. Rosenberg and L. V. Camp, *Canc. Res.*, 1970, 30, 1799; d) B. Rosenberg, L. V. Camp, E. B. Grimley and A. J. Thomson, *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 1347.
5. R. van Eldik, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, 251, 1649.
6. C. H. Langford and H. B. Gray, in *Ligand Substitution Processes*, Benjamin, New York, 1974, ch. 2.
7. M. L. Tobe and J. Burgess, in *Inorganic Reaction Mechanism*, Longman, England, 1999, p. 70, 74, 364 ch. 2,4.
8. Ž. D. Bugarčić, *Kinetika i Mehanizam Supstitucionih Reakcija*, PMF Kragujevac, 1996, p. 12.
9. I. Gal, *Mehanizmi Neorganskih Reakcija*, Naučna knjiga, 1979, ch. 2, 3.
10. K. J. Laidler, in *Chemical Kinetics*, Harper and Row, New York, 1987, ch. 4, 6.
11. J. H. Espenson, in *Chemical Kinetics and Reaction Mechanism*, 2nd Ed, McGraw Hill, New York, 1995, ch. 2, 6.
12. M. Kotowski and R. van Eldik, in *Inorganic High Pressure Chemistry, Kinetics and Mechanism*, Ed., R. van Eldik, Elsevier, Amsterdam, 1986, ch. 1, 3, 4.
13. R. van Eldik, T. Asano and W. J. Le Noble, *Chem. Rev.*, 1989, 59, 93.
14. Z. E. Housecroft and A. G. Sharp, *Inorg. Chem.*, Essex, England, 2001, ch. 6, 19, 20, 25.
15. S. Ašperger, in *Chemical Kinetics and Inorganic Reaction Mechanisms*, 2nd Ed., Plenum Publishers, New York, 2003, ch. 2.
16. R. G. Pearson, H. Sobel and G. Songsted, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, 319.

17. U. Belluco, L. Catalini, F. Basolo, R. G. Pearson and A. Luico, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 241.
18. J. Burgess and C. D. Hubbard, in *Advances in Inorganic Chemistry*, Eds., R. van Eldik and C. D. Hubbard, Elsevier, Amsterdam, 2003, ch. 2.
19. D. T. Richens, in *The Chemistry of Aqua Ions*, John Wiley & Sons, NY, 1997, ch 1.
20. C. F. Baes and R. E. Mesmer, in *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, NY, 1976, ch. 3.
21. F. Basolo and R. C. Johnson, in *Coordination Chemistry*, 2nd Ed., Science Reviews, London, 1987, ch. 6.
22. S. Filipović, *Osnovi kliničke onkologije*, Naša knjiga, Beograd, 2009.
23. a) G. Sava and A. Bergamo, *Int. J. Can.*, 2000, 17, 353; b) B. K. Keppler, M. R. Bergamo and M. H. Heim, *Can. Treat. Rev.*, 1990, 17, 261.
24. L. Fass, *Mol. Oncol.*, 2008, 2, 115.
25. P. J. Sadler, in *Metals in Medicine*, University Science Books, 2007, p. 95.
26. T. W. Hambley, *Science*, 2007, 318, 1392.
27. R. J. Mayer, *J. Clin. Oncol.*, 2012, 30, 3325.
28. I. Kostova, *Recent. Pat. Anti-Canc.*, 2006, 1, 1.
29. K. H. Thompson and C. Orvig, in *Concepts and Model Systems in Bioinorganic Chemistry*, Eds., H. B. Kraatz and N. Metzler-Nolte, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, ch. 25.
30. B. D. Glišić, U. Rychlewska and M. I. Đuran, *Dalton Trans.*, 2012, 41, 6887.
31. M. Milovanović, A. Đeković, V. Volarević, B. Petrović, N. Arsenijević and Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, 104, 944.
32. V. Volarević, M. Milovanović, A. Đeković, B. Petrović, N. Arsenijević and Ž. D. Bugarčić, *J. BUON*, 2010, 15, 768.
33. M. Arsenijević, M. Milovanović, V. Volarević, A. Đeković, T. Kanjevac, N. Arsenijević, S. Đukić and Ž. D. Bugarčić, *Med. Chem.*, 2012, 8, 2.
34. M. Groessl and C. G. Hartinger, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405, 1791.
35. F. Giannini, J. Furrer, G. Süß-Fink, C. M. Clavel and P. J. Dyson, *J. Organomet. Chem.*, 2013, 734, 45.
36. M. A. Jakubec, M. Galanski and B. K. Keppler, *Rev. Physiol. Biochem. Pharma.*, 2003,

- 146, 1.
37. W. L. Ying, J. Emerson, M. J. Clarke and D. R. Sanadi, *Biochemistry*, 1991, 30, 4949.
 38. R. Dierichs, *Histochem.*, 1979, 64, 171.
 39. C. S. Allardayce and P. J. Dyson, *Platinum Met. Rev.*, 2001, 45, 62.
 40. J. Kostova, *Curr. Med. Chem.*, 2006, 13, 1085.
 41. J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2003, 100, 3611.
 42. A. C. G. Hotze, S. E. Caspers, D. de Vos, H. Kooijman, A. L. Spek, A. Flamigni, M. Bacac, G. Sava, J. G. Haasnoot and J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, 9, 354.
 43. A. H. Velders, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, D. de Vos and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2000, 39, 2966.
 44. A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernandez, S. Parsons, I. D. H. Oswald, A. Parkin, F. P. A. Fabbiani, J. E. Davidson, A. Dawson, R. E. Aird, D. I. Jodrell and P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 6858.
 45. R. A. Vilaplana, F. Delmani, C. Manteca, J. Torreblanca, J. Moreno, G. García-Herdugo and F. González-Vilchez, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, 100, 1834.
 46. F. Bottony, *Can. J. Chem.*, 1977, 55, 2788.
 47. D. Frasca, J. Ciampa, J. Emerson, R. S. Umans and M. J. Clarke, *Met.-Based Drugs*, 1996, 3, 197.
 48. J. R. Durig, J. Danneman, W. D. Behnke and E. E. Mercer, *Chem. Biol. Interact*, 1976, 13, 287.
 49. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, 236, 209.
 50. M. J. Clarke, F. Zhu and D. R. Frasca, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2511.
 51. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 232, 69.
 52. M. J. Clarke, *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, 1980, 627, 332.
 53. O. Novakova, J. Kasparkova, O. Vrana, P. M. Vanvliet, J. Reedijk and V. Brabec, *Biochemistry*, 1995, 34, 12369.
 54. P. M. Vanvliet, S. M. S. Toekimin, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, O. Novakova, O. Vrana, and V. Brabec, *Inorg Chim Acta*, 1995, 231, 57.
 55. R. Vilaplana, M. Romero, M. Quiros, J. Salas and F. Gonzalez-Vilches, *Met. Based Drugs*, 1995, 2, 211.

56. D. Chatterjee, A. Mitra and G. S. De, *Platinum Met. Rev.*, 2006, 50, 2.
57. E. Alessio, G. Mestroni, G. Nardin, W. M. Attia, M. Calligaris, G. Sava and S. Zorzet, *Inorg Chem*, 1988, 27, 4099.
58. G. Sava, S. Pacor, S. Zorzet, E. Alessio and G. Mestroni, *Pharmacol. Res.*, 1989, 21, 617.
59. M. Coluccia, G. Sava, F. Loseto, A. Nassi, A. Bocarelli, D. Giordano, E. Alessio and G. Mestroni, *Eur. J. Cancer.*, 1993, 29, 1873.
60. B. K. Keppler, K. G. Lipponer, B. Stenzel and F. Kratz, in *Metal complexes in cancer chemotherapy*, Ed., B. K. Keppler, VCH, Weinheim, Germany, 1993.
61. G. Mestroni, E. Alessio, G. Sava, S. Pacor and M. Coluccia, *Metal complexes in cancer chemotherapy*, Ed., B. K. Keppler, VCH, Weinheim, Germany, 1993.
62. G. Sava, S. Pacor, A. Bergamo, M. Cocchietto, G. Mestroni and E. Alessio, *Chem. Biol. Interact.*, 1995, 95, 109.
63. C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas and B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, 100, 891.
64. T. Gianferrara, I. Bratsos and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2009, 7588.
65. E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo and G. Sava, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, 4, 1525.
66. J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen and J. H. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, 2004, 10, 3717.
67. I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrara and E. Alessio, *Chimia*, 2007, 61, 692.
68. B. Gava, S. Zorzet, P. Spessotto, M. Cocchietto and G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, 317, 284.
69. M. Brindell, D. Piotrowska, A. A. Shoukry, G. Stochel and R. Van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, 12, 809.
70. B. Cebrian-Losantos, E. Reisner, C. R. Kowol, A. Roller, S. Shova, V. B. Arion and B. K. Keppler, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 6513.
71. A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko and B. K. Keppler, *Chem. Rev.*, 2006, 106, 2224.
72. P. Schluga, C. G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. A. Jakupec and B.

- K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2006, 1796.
73. J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2499.
74. D. Wang and S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug. Disc.*, 2005, 4, 307.
75. B. Lippert, in *Cisplatin, Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, Wiley, VCH, Zurich, 1999.
76. R. T. Door, in H. M. Pinedo, J. H. Schornagel (eds), *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy*, Plenum, NY, 1996.
77. H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris and P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 173.
78. G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Iengo, E. Alessio and G. Mestroni, *Eur. J. Canc.*, 2002, 38, 427.
79. W. Kandioller, *Dissertation, Maltol-derived ruthenium(II)-cymene complexes with tumor inhibiting properties*, University of Vienna. Fakultät für Chemie, 2009.
80. W. H. Ang and P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 4003.
81. G. Süs-Fink, *Dalton Trans.*, 2010, 39, 1673.
82. T. Bugarčić, A. Habtemariam, R. J. Deeth, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 2009, 48, 9444.
83. T. Bugarčić, A. Habtemariam, J. Stepankova, P. Heringova, J. Kasparikova, R. J. Deeth, R. D. L. Johnstone, A. Prescimone, A. Parkin, S. Parsons, V. Brabec and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 2008, 47, 11470.
84. G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni and E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis*, 1992, 10, 273.
85. V. Brabec and O. Novakova, *Drug Resist. Update*, 2006, 9, 111.
86. R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Chen, P. J. Sadler and D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, 2002, 86, 1652.
87. E. Corral, A. C. G. Hotze, H. den Dulk, A. Leczkowska, A. Rodger, M. J. Hannon and J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, 14, 439.
88. L. Salassa, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011, 4931.
89. G. Gasser, I. Ott and N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem.*, 2011, 54, 3.
90. R. E. Morris, R. E. Aird, P. S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. Jodrell and P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2001, 44,

- 3616.
91. C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 4161.
 92. W. H. Ang, A. Casini, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Organomet. Chem.*, 2011, 696, 989.
 93. A. Rilak, I. Brastos, E. Zangrando, J. Kljun, I. Turel, Ž. D. Bugarčić and E. Alessio, *Dalton Trans.*, 2012, 41, 11608.
 94. A. Rilak, B. Petrović, S. Grgurić-Šipka, Z. Trešić and Ž. D. Bugarčić, *Polyhedron*, 2011, 30, 2339.
 95. B. Tang, F. B. Yu, P. Li, L. Tong, X. Duan, T. Xie and X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 3016.
 96. Y. H. Gao, J. Y. Wu, Y. M. Li, P. P. Sun, H. P. Zhou, J. X. Yang, S. Y. Zhang, B. K. Jin and Y. P. Tian, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 5208.
 97. J. R. Peterson, T. A. Smith and P. Thordarson, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, 8, 151.
 98. J. Kelland, *Nat. Rev. Cancer.*, 2007, 7, 573.
 99. S. J. Dougan, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 2006, 45, 10882.
 100. F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson and P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 5810.
 101. I. Brastos, B. Serli, E. Zangrando, N. Katsaros and E. Alessio, *Inorg. Chem.*, 2007, 46, 975.
 102. M. T. Ashby, *Comments. Inorg. Chem.*, 1990, 10, 297.
 103. S. G. Murray and F. R. Hartley, *Chem. Rev.*, 1981, 81, 365.
 104. R. G. Pearson, in *Hard and Soft Acids and Bases*, Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, PA, 1973.
 105. V. G. Vaidyanathan and U. Nair, *Dalton Trans.*, 2005, 2842.
 106. G. B. Jiang, Y. Y. Xie, G. J. Lin, H. L. Huang, Z. H. Liang and Y. J. Liu, *J. Photoch. Photobio. B.*, 2013, 129, 48.
 107. A. Mihailović, I. Vladescu, M. McCauley, M. C. Williams, E. M. Spain, M. E. Nunez, *Langmuir*, 2006, 22, 4699.
 108. P. Kumar, R. K. Gupta and D. S. Pandey, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, 707.

109. G. S. Smith and B. Therrien, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 10793.
110. S. Mirtschin, A. Slabon-Turski, R. Scopelliti, A. H. Velderer and K. Severin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 14004.
111. W. Zheng, Q. Luo, Y. Lin, Y. Zhao, X. Wang, Z. Du, X. Hao, Y. Yu, S. Lü, L. Ji, X. Li, L. Yang and F. Wang, *Chem. Comm.*, 2013, 49, 10224.
112. M. V. Babak, S. M. Meier, A. A. Legin, M. S. Adib Razavi, A. Roller, M. A. Jakupec, B. K. Keppler and C. G. Hartinger, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 4308.
113. W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler and C. G. Hartinger, *J. Organomet. Chem.*, 2011, 696, 999.
114. J. H. Kasser, W. Kandioller, C. G. Hartinger, A. A. Nazarov, V. B. Arion, P. J. Dyson and B. K. Keppler, *J. Organomet. Chem.*, 2010, 695, 875.
115. F. A. Khan, B. Therrien, G. Süß-Fink, O. Zava and P. J. Dyson, *J. Organomet. Chem.*, 2013, 730, 49.
116. J. Kljun, A. K. Bytzek, W. Kandioller, C. Bartel, M. A. Jakupec, C. G. Hartinger, B. K. Keppler and I. Turel, *Organometallics*, 2011, 30, 2506.
117. Y. N. V. Gopal, D. Jayaraju and A. K. Kondapi, *Biochemistry*, 1999, 38, 4382.
118. K. J. Kilpin, S. M. Cammack, C. M. Clavel and P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, 2013, 42, 2008.
119. A. Casini, P. J. Dyson and L. Messori, *Chem. Med. Chem.*, 2007, 2, 631.
120. W. H. Ang, E. Daldini, C. Scolaro, R. Scopelliti, L. Juillerat-Jeannerat and P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, 2006, 45, 9006.
121. H. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould and P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 3064.
122. A. F. Peacock, M. Melchart, R. J. Deeth, A. Habtemariam, S. Parsons and P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 2601.
123. S. Grgurić Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V. B. Arion, B. K. Keppler and Ž. Lj. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45, 1051.
124. F. Wang, A. Habtemariam, E. P. L. Van der Geer, R. Fernandez, M. Melchart, R. J. Deeth, R. Aird, S. Guichard, F. P. A. Fabbiani, P. Lozano-Casal, I. D. H. Oswald, D. I. Jodrell, S. Parsons and P. J. Sadler, *P. Natl. Acad. Sci., USA*, 2005, 112, 18269.

125. I. Turel, J. Kljun, F. Perdih, E. Morozova, V. Bakulev, N. Kasyanenko, Jo. A. W. Byl and N. Osheroff, *Inorg. Chem.*, 2010, 49, 10750.
126. R. Lang, K. Polborn, T. Severin and K. Severin, *Inorg. Chem. Acta*, 1999, 294, 62.
127. O. Novakova, A. A. Nazarov, C. G. Hartinger, B. K. Keppler and V. Brabec, *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 77, 364.
128. R. Fernandez, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons and P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 2004, 10, 5173.
129. K Akdi, R. A. Vilaplana, S. Kamah, J. A. R. Navaro, J. M. Salas and F. Gonzalez-Vilchez, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, 90, 51.
130. R. Vilaplana-Serrano, M. G. Basallote, C. Ruiz, E. Gutierrez-Puebla and F. Gonzalez-Vilchez, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1991, 100.
131. F. Gonzalez-Vilchez, R. Vilaplana, G. Blasco and L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, 71, 45.
132. F. Gonzalez-Vilchez and R. Vilaplana, in *Trends in Cancer Research*, Ed., E. Barbara, Viczaya, UPV, 1986, 194.
133. N. A. Ezerskaya, T. P. Solovykh, O. N. Evstafeva, L. K. Shubochkin and N. K. Bel'Skii, *Zh. Neorg. Khim.*, 1975, 20, 1036.
134. S. R. Grgurić-Šipka, R. A. Vilaplana, J. M. Perez, M. A. Fuertes, C. Alonso, Y. Alvarez, T. J. Sabo and F. Gonzalez-Vilchez, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, 97, 215.
135. S. R. Grgurić-Šipka, Doktorska disertacija, *Kompleksi kobalta(III) i rutenijuma(III) sa etilendiamin-N,N'-di-3-propionatom i nekim monodentatnim i bidentatnim ligandima*, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 16. juli 2003.
136. H. Lui, J. A. Parkinson, J. Bella, F. Wang and P. J. Sadler, *Chem. Sci.*, 2010, 1, 258.
137. B. Lippert in *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of Leading Antitumor Drugs*, Wiley, VCH, Zurich, 1999, p. 183.
138. M. T. Rau and R. van Eldik, in *Metal Ions in Biological Systems*, Eds. A. Sigel and H. Sigel, Marcel Dekker, NY, 1996, 32, p. 339.
139. S. Suvachittanont and R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1995, 2027.
140. M. Shoukry and R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 2673.
141. M. Shoukry, H. Hohnmann and R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta*, 1992, 187, 198.

142. S. Suvachittanont, H. Hohnmann, R. van Eldik and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1993, 32, 4544.
143. S. Suvachittanont and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 1994, 33, 895.
144. T. Rau and R. van Eldik, *Chem. Ber. Recueil*, 1997, 130, 1551.
145. Ž. D. Bugarčić, M. M. Shourky and R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 3945.
146. A. Shoukry, T. Rau, M. Shoukry and R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1998, 3105.
147. A. Shoukry, M. Brindell and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2007, 4169.
148. V. P. Munk and P. J. Sadler, *Chem. Comm.*, 2004, 1788.
149. B. Petrović, Ž. D. Bugarčić and R. Van Eldik R, *Dalton Trans.*, 2008, 807.
150. Ž. D. Bugarčić, D. Ilić and M. I. Đuran, *Aust. J. Chem.*, 2001, 54, 237.
151. Ž. D. Bugarčić, D. M. Jančić, A. A. Shoukry and M. M. Shoukry, *Monatsh. Chem.*, 2004, 135, 151.
152. V. Vasić, M. Čakar, J. Savić, B. Petrović, J. Nadeljković and Ž. Bugarčić, *Polyhedron*, 2003, 22, 279.
153. E. L. J. Breet and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 1987, 26, 2517.
154. J. Zhang, L. Li, L. Wang, F. Zhang and X. Li, *E. J. Medic. Chem.*, 2010, 45, 5337.
155. C. Y. Shi, E. J. Gao, S. Ma, M. L. Wang, Q. T. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20, 7250.
156. B. Petrović and Ž. D. Bugarčić, *J. Coord. Chem.*, 2001, 53, 35.
157. G. Annibale, P. Bergamini, V. Bertolasi, M. Cattabriga, A. Lazzaro, A. Marchi and G. Vertuani, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 3877.
158. R. Karkalić and Ž. D. Bugarčić, *Monatsh. Chem.*, 2000, 131, 819.
159. E. L. J. Breet and R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1987, 408.
160. Ž. D. Bugarčić, G. Liehr and R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 951.
161. A. Kiss, E. Farkas, I. Savago, B. Thormann and B. Lippert, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, 85.
162. Ž. D. Bugarčić, B. Petrović and E. Zangrando, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, 357, 2650.
163. D. Jaganyi, F. Tiba, O. Q. Munro, B. Petrović and Ž. D. Bugarčić, *Dalton Trans.*,

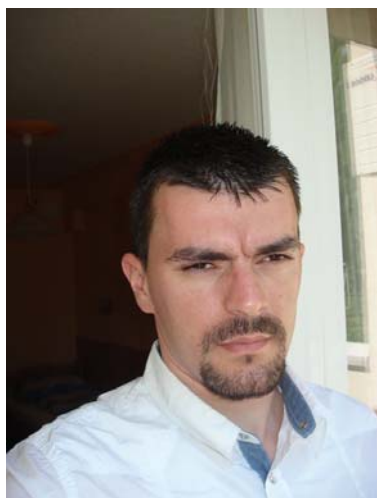
- 2006, 2943.
164. Ž. D. Bugarčić, S. T. Nandibewoor, M. S. A. Hamza, F. Heinemann and R. Van Eldik, *Dalton Trans.*, 2006, 2984.
 165. R. J. Sundberg and R. B. Martin, *Chem. Rev.*, 1974, 74, 471.
 166. B. E. Choi, G. J. Choi, and C. S. Park, *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongo*, 2004.
 167. T. Kimura, N. Okawa, A. Nakao, T. Nagasaki and R. Shimozato, *Jpn. Kokai Tokyo Koho*, 2006, 279.
 168. E. Akbas and I. Berber, *Europ. J. Medic. Chem.*, 2006, 41, 904.
 169. F. S. Mackay, J. A. Woods, H. Moseley, J. Ferguson, A. Dawson, S. Parsons and P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.* 2006, 12, 3155.
 170. M. A. Fuertes, C. Alonso and J. M. Perez, *Chem. Rev.*, 2003, 103, 3.
 171. B. Petrović, Ž. D. Bugarčić, A. Dees, I. Ivanović-Burmazović, F. Heinemann, R. Puchta and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2012, 51, 1516.
 172. J. Zhang, L. Li, L. Wang, F. Zhang and X. Li, *E. J. Medic. Chem.*, 2010, 45, 5337.
 173. C.Y. Shi, E. J. Gao, S. Ma, M. L. Wang and Q. T. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, 20, 7250.
 174. R. A. de Souza, A. Stevanato, O. Treu-Filho, A. V.G. Netto, A. E. Mauro, E. E. Castellano, I. Z. Carlos, F. R. Pavan and C. Q.F. Leite, *E. J. Medic. Chem.*, 2010, 45, 4863.
 175. F. Accadbled, B. Tinant, E. H' enon, D. Carrez, A. Croisy and S. Bouquillon, *Dalton Trans.*, 2010, 39, 8982.
 176. B. Rieger, L. S. Baugh, S. Kacker and S. Striegler, in *Late Transition Metal Polymerization Catalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2003.
 177. S. J. Lippard and J. M. Berg in *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1994.
 178. G. J. P. Britovsek, V. C. Gibson and D. F. Wass, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 428.
 179. S. D. Ittel, L. K. Johnson and M. Brookhart, *Chem. Rev.* 2000, 100, 1169.
 180. M. Tamm, D. Petrović, S. Randoll, S. Beer, T. Bannenberg, P. G. Jones and J. Grunenberg, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, 5, 523.
 181. a) D. Petrović, T. Bannenberg, S. Randoll, P. G. Jones and M. Tamm, *Dalton Trans.*,

- 2007, 2812; b) B. Petrović, L. M. R. Hill, P. G. Jones, W. B. Tolman and M. Tamm, *Dalton Trans.*, 2008, 887.
182. a) D. Petrović, T. Glöge, T. Bannenberg, C. G. Hrib, S. Randoll, P. G. Jones and M. Tamm, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, 3472; b) D. Petrović, C. G. Hrib, S. Randoll, P. G. Jones and M. Tamm, *Organometallics*, 2008, 27, 778; c) T. Glöge, D. Petrović, C. Hrib, P. G. Jones and M. Tamm, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 4538.
183. T. Glöge, D. Petrović, C. G. Hrib, C. Daniliuc, E. Herdtweck, P. G. Jones and M. Tamm, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2010, 636, 2303.
184. A. Bergamo and G. Sava, *Dalton Trans.*, 2007, 13, 1267.
185. S. P. Fricker, *Dalton Trans.*, 2007, 43, 4903.
186. N. J. Farrer and P. J. Sadler, *Aust. J. Chem.*, 2008, 61, 669.
187. P. J. Bednarski, R. Grunert, M. Zielzki, A. Wellner, F. S. Mackay and P. J. Sadler, *Chem. Biol.*, 2006, 13, 61.
188. M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan and T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, 2007, 50, 3403.
189. L. Ronconi and P. J. Sadler, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 262.
190. M. Campone, J. M. Rademaker-Lakhai, J. Bennouna, S. B. Howell, D. P. Nowotnik, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, *Cancer Chemoth Pharm*, 2007, 60, 523.
191. R. P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 27, 8438.
192. I. H. L. Hamelers, R. W. H. M. Staffhorst, J. Voortman, B. de Kruijff, J. Reedijk, P. M. P. V. Henegouwen and A. I. P. M. de Kroon, *Clin. Cancer Res.*, 2009, 4, 1259.
193. A. M. Pizarro, A. Habtemariam and P. J. Sadler, *Topics in Organometallic Chemistry* 2010, 32, 21.
194. N. Farrell and Y. Qu, *Inorg. Chem.* 1989, 28, 3416.
195. M. J. Bloemink, J. Reedijk, N. Farrell, Y. Qu and A. I. Stetsenko, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 1002.
196. D. Z. Yang, S. van Boom, J. Reedijk, J. H. van Boom, N. Farrell and A. H. J. Wang, *Nat. Struct. Biol.* 1995, 2, 577.
197. A. Mambanda, D. Jaganyi, S. Hochreuther and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2010, 39,

- 3595.
198. P. Kabolizadeh, J. Ryan and N. Farrell, *Biochem. Pharmacol.* 2007, 73, 1270.
199. V. Brabec, J. Kasparikova, O. Vrana, O. Novakova, J. W. Cox, Y. Qu and N. Farrell, *Biochemistry*, 1999, 38, 6781.
200. P. de Hoog, M. J. Louwerse, P. Gamez, M. Pitié, E.J. Baerends, B. Meunier and J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 612.
201. P. de Hoog, M. Pitié, G. Amadei, P. Gamez, B. Meunier, R. Kiss and J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, 13, 575.
202. K. van der Schilden, F. Garcia, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot and J. Reedijk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 5668.
203. N. Chanda, S. M. Mobin, V. G. Puranik, A. Datta, M. Niemeyer and G. K. Lahiri, *Inorg. Chem.*, 2004, 43, 1056.
204. B. P. Sullivan, J. M. Calvert and T. J. Mayer, *Inorg Chem*, 1980, 19, 1404.
205. E. Jakubikova, W. Chen, D. M. Dattelbaum, F. N. Rein, R. C. Rocha, R. L. Martin and E. R. Batista, *Inorg. Chem.*, 2009, 48, 10720.
206. J. Bogojeski, R. Jelić, D. Petrović, E. Herdtweck, P. G. Jones, M. Tamm and Ž. D. Bugarčić, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 6515.
207. A. N. Vedernikov, J. C. Huffman and K. G. Caulton, *Inorg. Chem.*, 2002, 41, 6244.
208. D. Petrović, L. M. R. Hill, P. G. Jones, W. B. Tolman and M. Tamm, *Dalton Trans.*, 2008, 887.
209. T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph and C. S. M. Thompson, *Inorg. Chem.*, 1984, 23, 3521.
210. K. Mikkelsen and S. O. Nielsen, *J. Phys. Chem.*, 1960, 64, 632.
211. P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, *Ann. Chim.*, 1999, 89, 45.
212. L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini and A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 184, 311.
213. Ž. D. Bugarčić, T. Soldatović, R. Jelić, B. Alguero and A. Grandas, *Dalton Trans.*, 2012, 22, 3869.
214. a) P. Illner, S. Kern, S. Begel and R. van Eldik, *Chem. Commun.*, 2007, 4803; b) P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, 43, 1739.

215. E. L. J. Breet and R. Van Eldik, *Inorg. Chem.*, 1984, 23, 1865.
216. B. Pitteri, G. Marangoni, L. Cattalini and T. Bobbo, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1995, 3853.
217. R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1936, 85, 3533.
218. A. Hofmann, D. Jaganyi, O. Q. Munro, G. Liehr and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2003, 42, 1688.
219. R. G. Pearson, H. Sobel and J. Songstad, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, 319.
220. S. J. Barners-Price and P. J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.*, 1996, 151, 1.
221. K. Kobayashi, H. Ohtsu, T. Wada, T. Kato and K. Tanaka, *J. Amer. Chem. Soc.*, 2003, 125, 6729.

Биографија



Александар Мијатовић је рођен 06.08.1984. године у Крагујевцу. Основну школу је завршио у Драгобраћи, а средњу, Другу крагујевачку гимназију, у Крагујевцу. На Природно-математички факултет, одсек хемија, уписао се школске 2003/2004. године, где је дипломирао 2008. године са просечном оценом 8.38. Докторске студије, смер Неорганска хемија, уписао је школске 2008/2009 године.

Од 01.10.2009. до 01.10.2010. године боравио је на Институту за Неорганску и Аналитичку хемију, Универзитета у Дебрецену, Мађарска, у групи професора Иштвана Фабијана.

Од октобра 2010. године радио је на Државном универзитету у Новом Пазару као сарадник у настави на предметима: Неорганска хемија, Органска хемија и Физичка хемија. Био је учесник билатералног пројекта између Републике Србије и Републике Хрватске за пројектни период од 2009-2010. године.

Од 01.10.2013. године ради на Рударско-геолошком факултету, Универзитета у Београду, као асистент на предметима: Општа хемија, Хемија и прерада нафте и гаса, Одабрана поглавља у неорганској хемији и Заштита животне средине.

ПРИЛОГ



Substitution reactions of some novel sterically hindered monofunctional Pd(II) complexes

Aleksandar Mijatović, Jovana Bogojeski, Biljana Petrović, Živadin D. Bugarčić*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2011

Received in revised form 28 October 2011

Accepted 9 November 2011

Available online 19 November 2011

Keywords:

Pd(II)
Substitution
Kinetics
Mechanism
Reactivity

ABSTRACT

Substitution reactions of the monofunctional complexes $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$, where $\text{TL}^{\text{tBu}} = 2,6\text{-bis}[(1,3\text{-di-}t\text{-tert-butylimidazolin-2-imino)methyl]pyridine$ and $\text{tpdm} = \text{terpyridinedimethane}$, with nucleophiles such as: thiourea, I^- , Br^- , NO_2^- , pyridine and dimethyl-sulfoxide (DMSO) were studied in 0.1 M NaClO_4 aqueous solution in the presence of 10 mM NaCl. The reactions were carried out at three different temperatures (288, 298 and 308 K) using a variable-temperature stopped-flow technique. The substitutions were followed under the *pseudo*-first-order conditions with a large excess of nucleophiles. Obtained results show that the complex with tpdm ligand reacts faster than the complexes with TL^{tBu} ligand due to the bulkiness of the inert tridentate ligands. Also, the presence of *t*-Bu groups on the terminal imidazole rings of TL^{tBu} ligand significantly slow down the rate of the substitution. The order of reactivity of used ligands is: thiourea > I^- > Br^- > NO_2^- > pyridine > DMSO. This order is in agreement with their electronic and structural characteristics. The negative values reported for the entropy of activation confirmed the associative substitution mode. These results are discussed in order to find the connection between the structure and reactivity of the complexes with tridentate sterically hindered ligands.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coordination compounds of palladium(II) with tridentate ligands such as diethylenetriamine (dien), bis(2-pyridylmethyl)amine (bpma) or 2,2':6',2'-terpyridine (terpy) provide very useful substrates for studies on ligand substitution reactions of square-planar complexes [1–6,21,22]. It is well known that relatively small structural modifications in a multidentate ligand can produce significant changes in the reactivity of the complexes [7–9].

There is a high interest among scientists nowadays in the field of the steric and electronic tuning of the lability of square-planar Pd(II) complexes as well as their influence on the interaction between such complexes and bio-relevant nucleophiles and DNA fragments [10]. Furthermore, some mixed ligand palladium(II) complexes have shown to act as potential anticancer agents [11–16].

Recently Zhang et al. synthesized a number of Pd(II) complexes with unusual ligand 4-toluenesulphonyl α -amino acid and bipy or phen which show antitumor activity in cancer cell lines [17]. In addition Pd(II) complex with *N*-(chlorophenyl)-3-pyridinecarboxamide ligand has a *trans* geometry and could be coordinated to DNA

Abbreviations: TL^{tBu} , 2,6-bis[(1,3-di-*tert*-butylimidazolin-2-imino)methyl]pyridine; tpdm , terpyridinedimethane.

* Corresponding author. Tel.: +381 (0) 34300262; fax: +381 (0) 34335040.

E-mail address: bugarcic@kg.ac.rs (Ž.D. Bugarčić).

[18]. Furthermore, Pd(II) complexes generally formulated as *trans*- $[\text{PdX}_2(\text{isn})_2]$, where $\text{X} = \text{Cl}^-$, N_3^- , SCN^- or NCO^- and $\text{isn} = \text{isonicotinamide}$ have very small anticancer but significant antituberculous activity [19] while complexes with amino alcohols, such as α -prolinol, α -valinol, α -isoleucinol show certain antitumor activity [20].

As a part of our interest in the synthesis, structure and reactivity of coordination complexes of Pd(II) with chelating ligands [1–6,21,22] and with the aim to contribute towards our previously published work, we synthesized novel tridentate nitrogen-donor ligands $\text{TL}^{\text{tBu}} = 2,6\text{-bis}[(1,3\text{-di-}t\text{-tert-butylimidazolin-2-imino)methyl]pyridine$ and $\text{tpdm} = \text{terpyridinedimethane}$ and the corresponding Pd(II) complexes, $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ [23,24]. We studied and report here complex formation of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ with different nucleophiles (Fig. 1) in 0.1 M NaClO_4 aqueous solution and in the presence of 10 mM NaCl to prevent spontaneously hydrolysis.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

The ligands thiourea (Kemika, Zagreb), NaI, KBr, NaNO_2 , pyridine (Zorka, Šabac) dimethylsulfoxide (DMSO) (Fluka) were used without further purification. The complexes $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ were prepared according to published procedures [23,24]. Prepara-

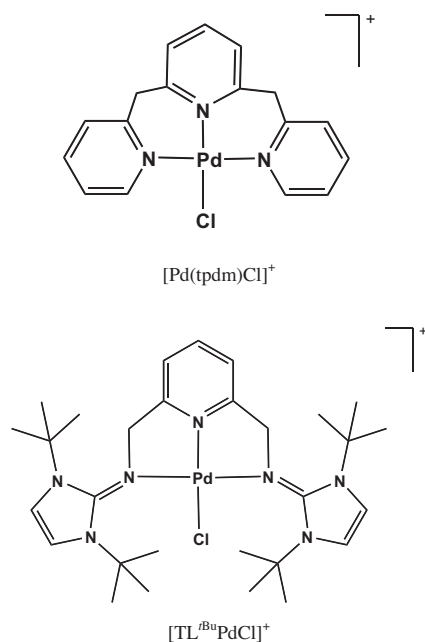


Fig. 1. The structures of investigated complexes.

tion of the ligands TL^{tBu} and tpdm has been also previously published [25,26]. All the other chemicals were of the highest purity commercially available.

2.2. Instrumentation

UV–Vis spectra were recorded on Perkin Elmer Lambda 25 spectrophotometers with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. Kinetic measurements were performed on an Applied Photophysics SX.18 stopped-flow instrument coupled to an online data acquisition system. The temperature was controlled throughout all kinetic experiments to ± 0.1 K.

2.3. Kinetic measurements

The substitution reactions of the $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes with the nucleophiles: thiourea, I^- , Br^- , NO_2^- , pyridine and DMSO were studied spectrophotometrically by following the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time. Spectral changes were recorded over the range from 200 to 400 nm to establish a suitable wavelength at which kinetic measurements could be performed. Substitution reactions of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes were initiated by mixing equal volumes of complex and ligand solutions directly in the stopped-flow instrument and the reaction was followed for at least eight half-lives. The substitution process was monitored as change in absorbance with time under *pseudo*-first-order conditions.

All substitution reactions were studied in 0.1 M NaClO_4 aqueous solution. The NaClO_4 was taken because it is well known that perchlorate ions do not coordinate to Pt(II) or Pd(II) in aqueous solution [27]. To the solution was added 10 mM NaCl to prevent the spontaneous hydrolysis of the complexes.

The temperature dependence of the second-order rate constants was studied for the reactions of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ complex with I^- and pyridine and for the $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complex with I^- , Br^- , pyridine and DMSO.

The observed *pseudo*-first-order rate constants, k_{obs} , were calculated as the average value from four to eight independent kinetic runs using the program ORIGINPRO 8. Experimental data are reported in Tables S1–S11 (Supplementary material).

3. Results and discussion

Substitution reactions of the $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes proceeds according to Scheme 1.

Substitution reactions of square-planar metal complexes proceed according to two parallel pathways [28]. One involves the formation of a solvent-coordinated complex, followed by rapid substitution of the coordinated solvent molecule by the entering nucleophile (solvolytic pathway), and the other involves direct nucleophilic attack by the entering nucleophile. In the present study direct nucleophilic attack proceeds in a reversible manner as suggested in Scheme 1. Under *pseudo*-first-order conditions, these rate constants can be determined from the plot of the linear dependence of k_{obs} versus total nucleophile concentration, according to the Eq. (1). The slope of the line represents k_2 , whereas the intercept represents $k_1[\text{Cl}^-]$. All kinetic data are summarized in Tables S1–S11 (Supporting information, ESI).

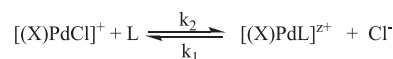
The observed *pseudo*-first order rate constant, k_{obs} , as a function of total ligand concentration is given by Eq. (1).

$$k_{\text{obs}} = k_2[\text{L}] + k_1[\text{Cl}^-] \quad (1)$$

Direct nucleophilic attack is characterized by the rate constants k_2 , and the reverse reactions are presented by the rate constants k_1 . The second-order rate constant k_2 , characterizing the formation of the product, can be evaluated from the slope of a plot k_{obs} versus ligand concentration. The experimental results for the displacement of chloride ion from $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes are summarized in Table 1. Representative plots are shown in Figs. 2–5 (others are given in Supplementary material, Figs. 1S–7S). As can be seen in all cases k_{obs} , depends linearly of the entering ligand concentration.

According to the values of k_2 , from the Table 1, the used nucleophiles are good entering ligands for the substitution reactions of the Pd(II) complexes. Comparing the reactivity of the nucleophiles we observed that the reactivity decreases in the following order: thiourea > I^- > Br^- > NO_2^- > pyridine > DMSO.

It is generally known that the Pt(II) and Pd(II) complexes have a very high affinity towards nucleophiles containing S-donor atoms. Recently published rate constants for the substitution reactions of some Pd(II) complexes with sulfur-donor nucleophiles are very high [29,30] whereas the highest reactivity shows thiourea compared to the other used ligands. Thiourea is a very useful nucleophile since it combines the ligand properties of thiolates (σ -donor) and thioethers (σ -donor, π -acceptor) [22,24] so it shows the strongest nucleophilicity. Our results confirm this explanation. Better reactivity of I^- ion compared to that of Br^- and NO_2^- ions can be explained by different polarizability of these nucleophiles. Namely, iodide ion is the most polarized halide ion ($4.7 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$) [31], so it can be classified as “the softest” halide ion. “Soft” (polarizable) nucleophile favors “soft” substrate. Since Pd(II) is a “soft” acid its high reactivity with iodide is not surprising [32]. The polarizability of the Br^- is $3.05 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ [31], so this ion is also “soft” base, but less “soft” than iodide. This is the main reason for the lower reactivity of bromide. Since NO_2^- ion is a “transition hard-soft” base, we expected and observed lower reactivity compared to that of halide



X = TL^{tBu} , tpdm

L = thiourea, I^- , Br^- , DMSO, pyridine, NO_2^-

Scheme 1. Schematic presentation of the substitution reactions of the $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes with nucleophiles: thiourea, I^- , Br^- , NO_2^- , pyridine and DMSO.

Table 1
Rate constants and activation parameters for the substitution reactions of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes with different nucleophiles in 0.1 M NaClO_4 and 10 mM NaCl .

$[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$		k_2 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$k_1[\text{Cl}^-]$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	ΔH_2^\ddagger (kJ mol^{-1})	ΔS_2^\ddagger ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$)
Thiourea ^a	298	$(5.8 \pm 0.2) \times 10^3$	0.37 ± 0.08	29 ± 3	-75 ± 8
	288	526 ± 3	12 ± 1		
	298	646 ± 5	47 ± 2	8 ± 3	-180 ± 9
	308	693 ± 6	230 ± 5		
	288	43 ± 1	3.2 ± 0.1	/	/
	298	90 ± 2	26 ± 1		
NO_2^-	298	63.5 ± 0.5	30 ± 1	/	/
	288	25.1 ± 0.1	$(3.6 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	31 ± 7	-120 ± 20
	298	47.5 ± 0.2	5.0 ± 0.1		
DMSO	308	61.9 ± 0.2	39 ± 2		
	288	40.4 ± 0.5	7.0 ± 0.1		
	298	47 ± 1	16 ± 1	10 ± 1	-195 ± 3
	308	56 ± 2	30 ± 2		
$[\text{Pd}(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{Cl}]^+$					
Thiourea	298	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^3$	39 ± 2	/	/
	288	49 ± 1	1.3 ± 0.1		
	298	79 ± 1	13.8 ± 0.1	22 ± 6	-150 ± 20
	308	95 ± 2	20.2 ± 0.2		
Br^-	298	22.1 ± 0.4	21 ± 1	/	/
	298	14 ± 2	23 ± 1	/	/
Pyridine	288	12.8 ± 0.5	1.4 ± 0.1		
	298	13.6 ± 0.5	2.8 ± 0.1	10 ± 5	-205 ± 15
DMSO	308	17.8 ± 0.8	4.0 ± 0.2		
	298	10.9 ± 0.5	24 ± 2	/	/

^a Ref. [24].

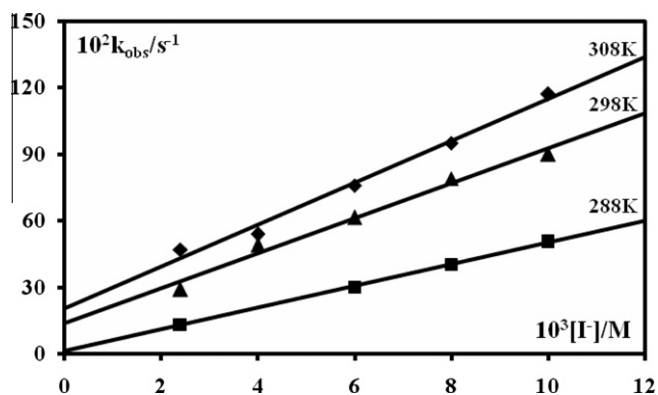


Fig. 2. Pseudo-first order rate constants, k_{obs} , as a function of ligand concentration and temperature for the substitution reactions of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ complex with I^- in 0.1 M NaClO_4 and 10 mM NaCl .

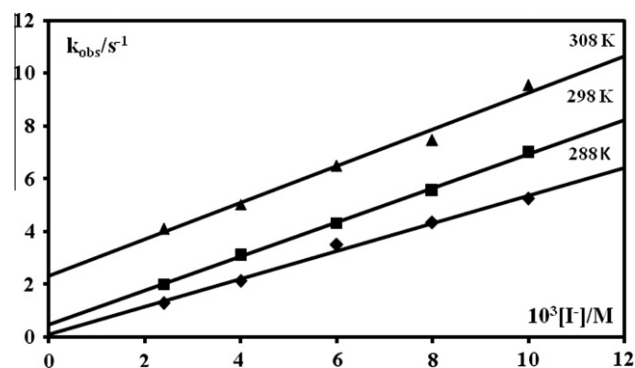


Fig. 4. Pseudo-first order rate constants, k_{obs} , as a function of ligand concentration and temperature for the substitution reactions of $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complex with I^- in 0.1 M NaClO_4 and 10 mM NaCl .

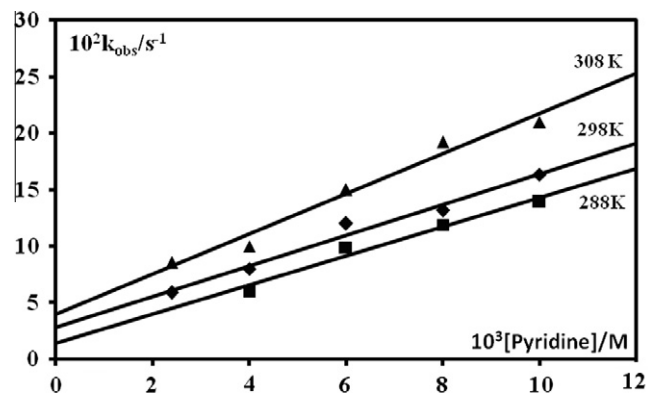


Fig. 3. Pseudo-first order rate constants, k_{obs} , as a function of ligand concentration and temperature for the substitution reactions of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ complex with pyridine in 0.1 M NaClO_4 and 10 mM NaCl .

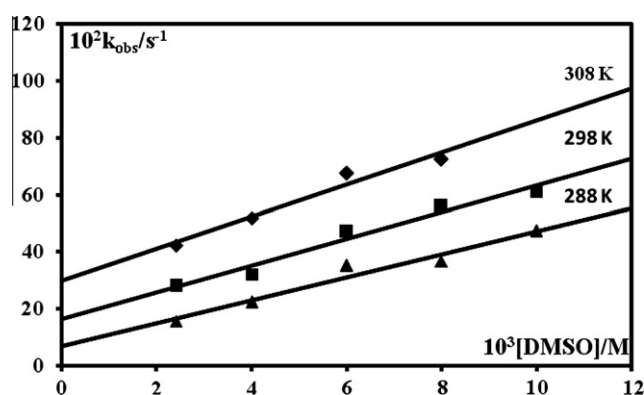


Fig. 5. Pseudo-first order rate constants, k_{obs} , as a function of ligand concentration and temperature for the substitution reactions of $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complex with DMSO in 0.1 M NaClO_4 and 10 mM NaCl .

ions. Small reactivity of DMSO was also expected since DMSO has a specific feature. It has two donor atoms. In studied reactions DMSO is first coordinated through the oxygen atom, where the negative partial charge is localized. Then, the Pd(II)–O bond breaks forming the thermodynamically more stable sulfur-coordinated product. On the other side, the bulkiness of two methyl groups in the molecule of DMSO as well as the bulkiness of the inert tridentate ligands in the structure of the studied complexes could prevent the formation of the metal–ligand bond and slow down the rate of the substitution. The reactivity of pyridine is almost the same as that for DMSO. Here we have a competition between the type of donor atom and size of the entering ligand.

The reactivity of the studied complexes toward selected nucleophiles is determined from the data of the rate constants (Table 1). The $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complex reacts faster than $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ complex (approximately three times). Both complexes have a sterically hindered inert tridentate ligand. But, the presence of *tert*-butyl groups in the structure of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ complex has a significant influence on the decreasing of the substitution rate.

Having in mind that these complexes are novel, for better understanding of their characteristics we compared the rate constants for the substitution reactions with I^- with earlier published values for some other sterically crowded monofunctional Pd(II) complexes, Table 2. According to the values for the second-order rate constant can be concluded that both complexes $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ have the reactivity between those of $[\text{Pd}(1,4,7\text{-Et}_3\text{dien})\text{Cl}]^+$ and $[\text{Pd}(1,1,4\text{-Et}_3\text{dien})\text{Cl}]^+$ complexes [22].

The reactivity of the complexes that contain inert tridentate NNN-donor ligands with pyridine rings largely depends on the number and arrangement of the pyridine rings [33]. For example, in the case of the terpy chelate, there is strong interaction between the metal ion and the pyridine rings, especially with the central pyridine ring in the terpy chelate, resulting in a strong *trans*-effect and very fast substitution reactions. In contrast, $[\text{PdCl}(\text{dien})]^+$ does not contain pyridine rings and react much more slowly. The

studied $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complex also includes pyridine rings, but in the tridentate *tpdm* ligand they are separated by methylene groups, so the system is more flexible in comparison with terpyridine. This is confirmed by the crystal structure of the $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complex [24]. Observed results clearly illustrate that a relatively small structural modification of the tridentate ligand has a strong influence on the reactivity of the complex.

In order to determine the affinity of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes towards studied nucleophiles, a Linear Free Energy Relationship (LFER) was used. The relationship between second-order rate constant, k_2 , and nucleophilicity constants of the nucleophiles (n_{Pt}^0) is given by Eq. (2) while the values of $\log k_2$ and n_{Pt}^0 are given in Table 12S.

$$\log k_2 = sn_{\text{Pt}}^0 + \log k_s \quad (2)$$

A plot of $\log k_2$ against the nucleophiles nucleophilicity constants (n_{Pt}^0) is shown in Fig. 6.

Since the points appear approximately on a straight line, it is an indication that the substitution of a chloride ion from studied complexes by selected nucleophiles occurs *via* the same mechanism (Fig. 6). The slope of the line presents the *s* value, which represents degree of affinity of the complex towards the nucleophiles. The *s* values for $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ complex is 0.47 and for $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complex is 0.51. These values are lower than the value of the standard substrate *trans*- $[\text{Pt}(\text{py})_2\text{Cl}_2]$ (*s* = 1.00) [34]. This means that studied $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes are less discriminated in comparison with *trans*- $[\text{Pt}(\text{py})_2\text{Cl}_2]$ complex for the substitution reactions with different nucleophiles. The $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ has a slightly lower discriminating factor, so it reacts slower than $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$, what is in agreement with experimentally observed results.

The sensitivity of the rate constants on the nature of the entering ligands and the negative entropies of activation given in Table 1 indicates that the substitution reactions proceed *via* an associative mode of activation.

Table 2

Second order rate constants, k_2 , for the substitution reactions of series of different $[\text{Pd}(\text{L})\text{Cl}]^+$ complexes with I^- at 298 K.

L	k_2 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Ref.
tpdm	646 ± 5	This work
TL^{tBu}	79 ± 1	This work
Dien	4446 ± 41	[22]
1,4,7-Me ₃ dien	3542 ± 319	[22]
1,4,7-Et ₃ dien	932 ± 4	[22]
1,1,4-Et ₃ dien	21.2 ± 0.3	[22]
1,1,7,7-Me ₄ dien	0.28 ± 0.53	[22]
1,1,7,7-Et ₄ dien	8.0×10^{-4}	[22]

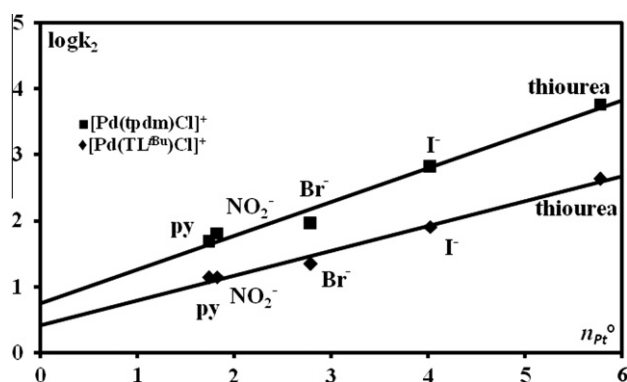


Fig. 6. Linear Free Energy Relationship of $[(\text{TL}^{\text{tBu}})\text{PdCl}]^+$ and $[\text{Pd}(\text{tpdm})\text{Cl}]^+$ complexes with different nucleophiles.

4. Conclusion

The substitution reactions of two novel Pd(II) complexes containing different chelating inert ligands with selected nucleophiles were investigated. The obtained results show that the nature of entering ligand as well as the nature of the inert tridentate ligand play an important role in the kinetic behavior of the Pd(II) complexes. These results also show that the complex with *tpdm* ligand reacts faster than the complex with TL^{tBu} ligand, which could be explained by the bulkiness of the inert tridentate ligands. Namely, the presence of *t*-Bu groups on the terminal imadazole rings of TL^{tBu} ligand significantly prevent the substitution. The order of reactivity of entering ligands is: thiourea > I^- > Br^- > NO_2^- > pyridine > DMSO. The mechanism of the substitution reactions is associative supported by the negative values of ΔS^\ddagger .

Acknowledgements

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

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ica.2011.11.031](https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.11.031).

References

- [1] Ž.D. Bugarčić, G. Liehr, R. van Eldik, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2002) 951.
- [2] R. Karkalić, Ž.D. Bugarčić, *Monatsh. Chem.* 131 (2000) 819.
- [3] D. Jaganui, F. Tiba, O.Q. Munro, B. Petrović, Ž.D. Bugarčić, *Dalton Trans.* (2006) 2943.
- [4] Ž.D. Bugarčić, S. Nandibewoor, M.S.A. Hamza, F. Hainemann, R. van Eldik, *Dalton Trans.* (2006) 2984.
- [5] B. Petrović, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *Dalton Trans.* (2008) 807.
- [6] T. Soldatović, M. Shoukry, R. Puchta, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2009) 2261.
- [7] (a) M.R. Plutino, L.M. Scolaro, R. Romeo, A. Grassi, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 2712; (b) R. Romeo, M.R. Plutino, L.M. Scolaro, S. Stoccoro, G. Minghetti, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 4749. and references cited therein.
- [8] D. Jaganyi, A. Hofmann, R. van Eldik, *Angew. Chem., Int. Ed.* 40 (2001) 1680.
- [9] M.T. Rau, R. van Eldik, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, New York, 1996, p. 339.
- [10] T.A. Al-Allaf, L.J. Rashan, *Boll. Chim. Farmac.* 140 (2001) 205.
- [11] E.J. Gao, F.C. Liu, M.C. Zhu, L. Wang, Y. Huang, H.Y. Liu, S. Ma, Q.Z. Shi, N. Wang, *Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25 (2010) 1.
- [12] E.J. Gao, L. Wang, M.C. Zhu, L. Liu, W.Z. Zhang, *J. Med. Chem.* 45 (2010) 311.
- [13] R. Jose, D.V. Maria, C. Natalia, L. Gregorio, H. Concepcion, B. Delia, M. Virtudes, V.J. Laura, *J. Inorg. Chem.* 47 (2008) 4490.
- [14] R. Jose, L. Julia, V. Consuelo, G. Lopez, M.L. Jose, M. Miguel, X.A. Francesc, B. Delia, M. Virtudes, A. Laguna, *J. Inorg. Chem.* 47 (2008) 6990.
- [15] R. Guddneppanavar, J.R. Choudhury, A.R. Kheradi, B.D. Steen, G. Saluta, G.L. Kucera, C.S. Day, U. Bierbach, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 2259.
- [16] E.J. Gao, M.C. Zhu, H.X. Yin, L. Liu, Q. Wu, Y.G. Sun, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1958.
- [17] J. Zhang, L. Li, L. Wang, F. Zhang, X. Li, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5337.
- [18] C.Y. Shi, E.J. Gao, S. Ma, M.L. Wang, Q.T. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 7250.
- [19] R.A. de Souza, A. Stevanato, O. Treu-Filho, A.V.G. Netto, A.E. Mauro, E.E. Castellano, I.Z. Carlos, F.R. Pavan, C.Q.F. Leite, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4863.
- [20] F. Accadbled, B. Tinant, E. Hénon, D. Carrez, A. Croisy, S. Bouquillon, *Dalton Trans.* 39 (2010) 8982.
- [21] Ž.D. Bugarčić, B.V. Petrovic, E. Zangrando, *Inorg. Chim. Acta* 357 (2004) 2650.
- [22] E.L.J. Breet, R. Van Eldik, *Inorg. Chem.* 23 (1984) 1865.
- [23] J. Bogojeski, R. Jelić, D. Petrović, E. Herdtweck, P.G. Jones, M. Tamm, Ž.D. Bugarčić, *Dalton Trans.* 40 (2011) 6515.
- [24] B. Petrović, Ž.D. Bugarčić, A. Dees, I. Ivanović-Burmazović, F. Heinemann, R. Puchta, R. van Eldik, 2011, submitted to *Inorg. Chem.*
- [25] A.N. Vedernikov, J.C. Huffman, K.G. Caulton, *Inorg. Chem.* 41 (2002) 6244.
- [26] D. Petrović, L.M.R. Hill, P.G. Jones, W.B. Tolman, M. Tamm, *Dalton Trans.* (2008) 887.
- [27] T.G. Appleton, J.R. Hall, S.F. Ralph, C.S.M. Thompson, *Inorg. Chem.* 23 (1984) 3521.
- [28] *Inorganic Reaction Mechanisms*, in: M.L. Tobe and J. Burgess (Ed.), Addison Wesley Longman Inc., Essex, 1999, p. 74.
- [29] P. Illner, S. Kern, S. Begel, R. van Eldik, *Chem. Commun.* (2007) 4803.
- [30] A. Shoukry, M. Brindell, R. van Eldik, *Dalton Trans.* (2007) 4169.
- [31] B. Pitteri, G. Marangoni, L. Cattalini, T. Bobbo, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1995) 3853.
- [32] R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1936) 3533.
- [33] A. Hofmann, D. Jaganyi, O.Q. Munro, G. Liehr, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 1688.
- [34] R.G. Pearson, H. Sobel, J. Songstad, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 319.



NMR kinetic studies of the interactions between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ and some sulfur-donor ligands

Aleksandar Mijatović^a, Biljana Šmit^a, Ana Rilak^a, Biljana Petrović^a, Dragan Čanović^b, Živadin D. Bugarčić^{a,*}

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, R. Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^bUniversity of Kragujevac, Faculty of Medicine, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2012

Received in revised form 15 September 2012

Accepted 19 September 2012

Available online 27 September 2012

Keywords:

Ruthenium(II)

Complexes

Substitution

Kinetics

NMR study

ABSTRACT

Substitution reactions of monofunctional $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex, where terpy = 2,2':6',2''-terpyridine and bipy = 2,2'-bipyridine, with biologically relevant sulfur-donor nucleophiles, such as thiourea, L-methionine, L-cysteine and glutathione, are studied in aqueous solutions by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy techniques. All reactions are studied at pH 7.4, in the presence of phosphate buffer, to mimic the physiological environment during the substitution process. The reactions are carried out at 295 K under the second-order conditions. Observed results show that the rate of substitution strongly depends on the type and the structure of the entering nucleophile. The obtained order of reactivity for the entering sulfur-donor ligands is: thiourea > L-methionine > L-cysteine > glutathione. The pK_a value of coordinated water ligand was determined in D₂O by the ¹H NMR technique. These results confirm the strong influence of inert polypyridyl ligands on the chemical behavior of Ru(II) complex as well as their influence on the lability of coordinated water molecule.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Metal complexes offer potential in medicinal chemistry and drug design [1–3]. In the search for anticancer agents containing metal ions other than platinum, ruthenium compounds offer a good potential [4–9].

In attempts to find novel, metal-based drug with the activity complementary to that of cisplatin, complexes containing ruthenium mainly in its lower oxidation state, have also been prepared and tested for antitumor activity [10–12]. Several ruthenium compounds with nitrogen ligands have shown not only good activity in screening studies, but many are also preferentially localized in tumor tissue. The significant structural differences between ruthenium and most platinum-based antitumor drugs offer a potential that ruthenium-based drugs could be suitable alternatives to cisplatin and carboplatin. Antitumor ruthenium compounds possess octahedral, six-coordinated geometry as opposed to the square-planar one of cisplatin or carboplatin. In addition, the two additional coordination sites for ruthenium as opposed to platinum(II) center may allow for new modes of binding to intracellular targets.

Ruthenium has therefore been considered to be an attractive alternative to platinum, in particular since many ruthenium

compounds are not very toxic and some ruthenium compounds have been shown to be quite selective for cancer cells [13,14].

Ruthenium anticancer chemistry has already shown many promising results. Several compounds have been described to shown the activity comparable to that of cisplatin and in some cases even better [15–19]. Indeed, two ruthenium compounds are currently in clinical trials [20,21]. For one of these, NAMI-A, the compound does not show dramatic cytotoxicity against tumor cells in vitro, but it shows a very high activity against metastases [20,21].

Ruthenium complexes, such as KP1019 and NAMI-A, are among the most interesting next-generation anticancer drugs in clinical trials and most importantly, in addition to their tumor-inhibiting properties, the treatment is not accompanied by major drug-related side effects [20–23].

Nevertheless a large variety of potential ruthenium drugs have been synthesized, with ligands such as amines, imines, DMSO, polypyridyl compounds and arenes [6,13,24–26]. The diversity in structures of the active compounds in fact suggests that different mechanisms of action may be involved for different types of ruthenium complexes [27]. Complexes containing chelating ligands tend to be more active than those containing only monodentate ligands [28].

In the last decades, particular attention has been paid to ruthenium complexes of polypyridyl ligands [29,30]. The analogues of these ruthenium complexes containing, besides polypyridyl ligands, aqua or chlorido groups have been also synthesized and

* Corresponding author. Tel.: +381 34 300262; fax: +381 34 335040.

E-mail address: bugarcic@kg.ac.rs (Ž.D. Bugarčić).

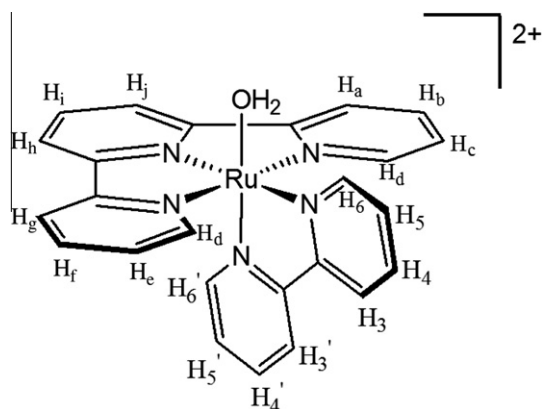


Fig. 1. Structure of the $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex.

were found to bind DNA covalently in cell-free media. The aqua or chlorido ligands in these complexes represent the leaving ligands, in contrast to the kinetically more stable pyridyl groups, and this facilitates the binding of the biomolecule to the metal centre. Hydrolysis of the Ru–Cl bond appears to be important for the activation, giving the aqua adducts which can bind to DNA and form a monofunctional adduct. The chelating ligand can play a crucial role in the anticancer activity [18].

With the aim to extend our earlier work [31], we reported here kinetic studies for the ligand substitution reactions of the monofunctional $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex (Fig. 1) with biologically relevant sulfur-donor nucleophiles, namely thiourea, L-methionine (L-Met), L-cysteine (L-Cys) and glutathione (GSH) (Fig. 2). The pK_a value of the coordinated water has been determined. The reactions are studied in aqueous solution and in the presence of phosphate buffer (pH 7.4) and monitored by the ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy techniques.

It was envisaged that this study could throw more light on the mechanism of the interactions for some Ru(II) complexes with sulfur-donor ligands, and to provide a better understanding of the mechanism of chemo-protection and ruthenium metabolism.

2. Experimental

2.1. Chemicals and solutions

$\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Precious metal Online, Ru content about 40%), 2,2':6',2''-terpyridine (terpy) (Aldrich) and 2,2'-bipyridine (bipy)

(Acros Organics) were used as received. Ligand stock solutions were prepared shortly before use by dissolving the chemicals, L-cysteine (Fluka, Assay >99.5%), glutathione (Fluka, Assay >99%), L-methionine (Fluka, Assay >99%) and thiourea (Merck, p.a.). Methanol (Centrohem, p.a.) was dried over Mg/I_2 . Deuterium-oxide (99.9% Deutero GmbH) is commercially available and used as received. All other chemicals were of the highest purity commercially available and were used without further purification. Ultra pure water was used in all experiments involving aqueous solutions.

2.2. Preparation of complexes

$[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})\text{Cl}]\text{Cl}$ was prepared according to the already published method [32–34]. First, $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$ was synthesized by stirring of the mixture of $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.4 mmol) dissolved in water and 2,2':6',2''-terpyridine (0.4 mmol) dissolved in MeOH for about 3 h [32]. The obtained brown powder was filtered and dried. Then, the equimolar amounts of $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$ (0.2 mmol) and 2,2'-bipyridine (0.2 mmol) were heated at reflux about 4 h in the mixture of MeOH/ H_2O (75/25, v/v) with the addition of an excess of LiCl (1.5 mmol) and triethylamine (0.4 mmol) as a reductant [33,34]. Under this procedure the reduction of Ru(III) occurs and the final product is Ru(II) complex. Elemental analysis, UV–Vis, and ^1H NMR spectral data were in a good agreement with those found in the literature [32–34] (Figs. 1S and 2S, Supplementary material). Anal. Calc. for $\text{RuC}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{Cl}_2$: C, 53.48; H, 3.41; N, 12.47. Found: C, 53.74; H, 3.44; N, 12.56%.

The aqua adduct $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ was prepared by treatment of $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})\text{Cl}]\text{Cl}$ (10 mM, 0.0113 g) with AgClO_4 (20 mM, 0.0083 g) in 2 ml D_2O at room temperature overnight and removal of AgCl by filtration. The aqua complex was confirmed on the basis of ^1H NMR spectra [33,34].

2.3. Instrumentation

Elemental analyses were performed on a Carlo Erba elemental analyser 1106.

UV–Vis spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 35 double beam spectrophotometer in 1.00 cm quartz Suprasil cells.

In D_2O solutions, the pH values were measured with an InoLab SenTix[®] Mic pH Microelectrode. The pH meter was calibrated with Fisher-certified buffer solutions of pH 4.00, 7.00 and 11.00. Meter readings were corrected for the deuterium isotope effect by adding

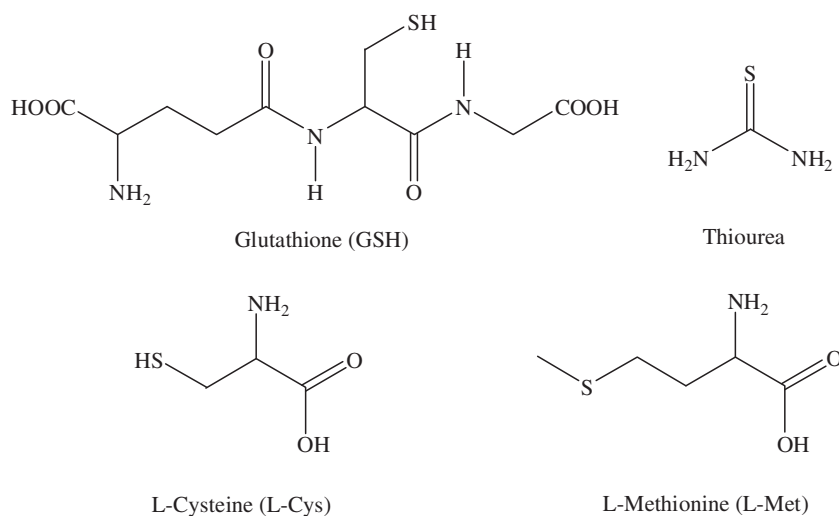


Fig. 2. Structures of studied sulfur-donor ligands.

0.4 U to the display readout. The pD was adjusted with 0.01–0.05 M solutions of KOD and DCl.

The NMR spectra were acquired on a Varian Gemini-2000 spectrometer equipped with 5 mm probe. All chemical shifts are referenced to TSP (3-trimethylsilylpropionic acid- D_4 sodium salt).

Potentiometric measurements were carried out using a Mettler Delta 350 digital pH meter with a resolution of ± 0.01 mV, with a combination glass electrode. This electrode was calibrated using standard buffer solutions of pH 4 and 7 obtained from Sigma. Titrant was delivered from a Metrohm (Donau, Swiss) Dosimat model 665 autoburette. The constant temperature was maintained with a VEB Prufgerate model E3E circulating ultrathermostat.

2.4. 1H NMR kinetic measurements

1H NMR measurements of the reactions between $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ complex with L-Met, L-Cys, GSH and thiourea were carried out in NMR tubes. The 8 mM solution of the complex (20 mM in the case of GSH) was prepared in 300 μ L D_2O approximately 8 h prior to the start of the kinetic experiment. The 300 μ L D_2O solution with the same concentration of ligand was added to the solution of the complex to initiate the reaction. 1H NMR spectra were recorded at 295 K over a period of several days up to three weeks. The same substitution reactions were followed at pH 7.4 (pD = pH + 0.4) [35] in the presence of phosphate buffer, to characterize the processes at physiological conditions. Experimental data are reported in Tables S1–S3 (Supplementary material).

2.5. Potentiometric studies

The hydrolysis of the complex was determined by titrating 1.0, 1.5 and 2.0 mM solution of $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ complex with NaOH. The starting volume was 20 cm^3 . All titrations were performed in a double mantled, thermostated glass vessel closed with a Teflon stopper. A constant temperature of (298 ± 0.1) K was maintained by circulating thermostated water through the jacket. Purified and oxygen-free nitrogen gas was bubbled through the solution to provide an inert atmosphere and stirring. Additional stirring was achieved with a magnetic stirrer. To reduce the concentration of the hydrogen ion, the alkali was added stepwise from an auto burette in small aliquots (0.005–0.01 ml). The potential was monitored after each addition of titrant.

The hydrolysis of $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ complex were characterized by fitting the potentiometric titration data to various acid–base models [36]. The experimental data were obtained by glass electrode Emf measurements in 0.1 M $NaClO_4$ medium at 298.0 K. To find the model that gives the best fit to the experimental data, the following complex and various combinations of hydrolytic species were included in Hyperquad2006 calculations [37]. The distribution diagrams for the hydrolyzed $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ complex are shown in Fig. 3S (Supplementary material).

3. Results and discussion

The aqua adducts of the anticancer Ru(II) complexes may play key roles in the biological mechanism of action of this classes of complexes. However, it is important to gain a detailed understanding of the interactions between the aqua Ru(II) complexes with biomolecules such as nucleobases, DNA, oligonucleotides, amino acids and proteins. Particularly the reactions with sulfur-bonding ligands could be very important [38]. Also several sulfur-donor ligands (glutathione, thiourea) are usually co-administered with platinum-based drugs to reduce the toxicity [39,40].

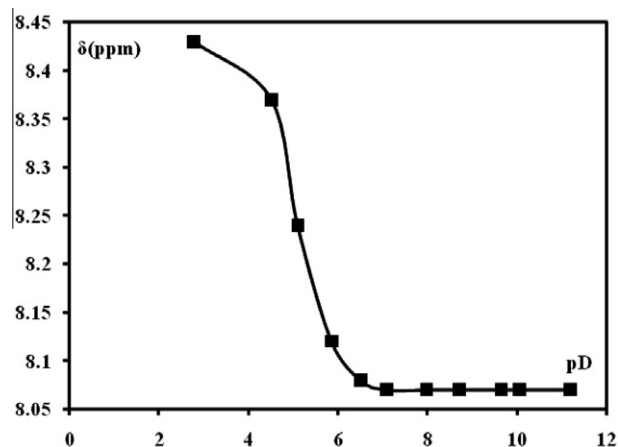
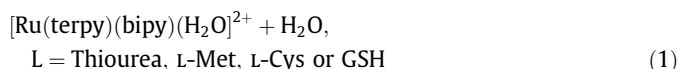


Fig. 3. The changes of chemical shifts of H_d proton of terpyridine as a function of pD for the $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ complex at 295 K.

The rate of hydrolysis of chlorido complex is also of interest with regard to storage and clinical application of ruthenium complexes as well as to further reactions of drugs in blood and in the cell. Synthesized $[Ru(terpy)(bipy)Cl]^+$ complex in aqueous media forms aqua complex, $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$, what we confirmed by NMR (Fig. 2S, Supplementary material). According to the decrease of the signal intensity with time for H6 proton of bipyridine at 9.95 ppm, which correspond to the chlorido complex, and increase of the signal intensity at 9.56 ppm for the same proton in the aqua analogue, can be seen that the hydrolysis starts after 10 min and it is over after about 8 h. The calculated rate of hydrolysis for $[Ru(terpy)(bipy)Cl]^+$ complex at 298 K is $k_{H_2O} = (1.07 \pm 0.4) 10^{-4} s^{-1}$ ($t_{1/2} = 1.8$ h). This result confirms the fact that in our studied systems hydrolysis occurs before the substitution process started.

However, the coordinated aqua ligand undergoes acid dissociation to form hydroxo complex $[Ru(terpy)(bipy)(OH)]^+$, which is usually less reactive than the aqua analogue. We have determined the acid dissociation constant of the aqua adduct (pK_a) by 1H NMR spectroscopy following the changes in chemical shifts of suitable signal as a function of pD. Here, we selected H_d proton of terpyridine which shifts to a lower frequency if pD increases. The results used for the calculations are given in Table 4S (Supplementary material). Analysis of the NMR titration curve (Fig. 3) gave $pK_a = 5.19 \pm 0.06$. This value is much lower than the pK_a values for some other Ru(II) complexes. This could be contributed to the strong π -back bonding properties of coordinated polypyridyl ligands, such as terpyridine and bipyridine, which increase the electrophilicity of metal center and reduce the pK_a value. Also, by potentiometric measurements we defined the distribution diagram for $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ hydrolytic species in 0.1 mol dm^{-3} $NaClO_4$ ionic medium at 298 K (Fig. 3S, Supplementary material). However, the dominant specie in the system at physiological pH is monohydroxo (1,–1,0) complex, $[Ru(terpy)(bipy)(OH)]^+$. This notification is very important for explanation of the observed rate constant for studied substitution reactions.

Substitution reactions of the $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ complex with selected sulfur-donor ligands (L) proceed according the Eq. (1).



These interactions of $[Ru(terpy)(bipy)(H_2O)]^{2+}$ complex with L-Met, L-Cys, GSH and thiourea were studied by 1H NMR spectroscopy. First, these reactions are followed in a 1:1 M ratio in D_2O at

295 K for a period of several weeks. Then, the same substitution reactions were studied in phosphate buffer at pH 7.4 by the same technique. These conditions were selected to mimic the physiological environment during the substitution process. Although, there is now a possibility for ligand exchange reactions with the buffer components, these results can help for a better understanding of all occurrences in the cell.

Second order rate constants, k_2 , were calculated from Eq. (2).

$$k_2 t = x/a_0(a_0 - x) \quad (2)$$

where x represent the concentration of formed product of the substitution reaction, while a_0 is an initial concentration of complex (and ligand). Calculations were performed by relative integration (estimated error is 5%) of the suitable proton signals in ^1H NMR spectra of free and coordinated ligand during the reaction time. In the Tables 1 and 2 are given the chemical shifts for suitable protons of the complex and ligands before and after substitution occurs. The values of the rate constants were determined from the Guggenheim plot of $x/a_0(a_0 - x)$ versus reaction time t . The slope of the straight line, which passes through the zero, represents the value of the second order rate constant k_2 . The results are summarized in the Table 3. The rate constant at pH 7.4 are slightly higher than the values at lower pH (4–5) for all studied systems. However, we expected a much faster substitution at physiological pH, but the protolysis of aqua complex and formation of less reactive hydroxo complex have a dominant influence on the observed rates.

Analyzing spectra obtained for the reaction between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ and L-Met (Fig. 4) at pH 5.3 two signals of methyl group could be seen at 2.14 ppm for free and at 2.76 ppm for coordinated L-Met. The signal of coordinated ligand appears after 12 h of the reaction and its intensity increases with the time, while the signal for free ligand decreases. At pH 7.4 these two signals are moved downfield just for 0.02 ppm (Fig. 11S, Supplementary material). The signals which correspond to the protons of started Ru(II) complex also undergo changes of their positions during the substitution. We followed the intensities of very specific signal for H_6 proton of bipyridine at 9.56 ppm of $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ and at 9.86 ppm for substituted product with L-Met. The significant chemical shifts are given in the Tables 1 and 2.

The reactions at pH 5.3 and 7.4 were followed about 3 weeks and the Guggenheim plots are shown on Fig. 5. Calculated second order rate constant k_2 are summarized in Table 3. On the base of the values for the rate constants can be concluded that this substitution is very slow and its rate slightly depends on the pH. However, from the distribution diagram of the complex species (Fig. 3S, Supplementary material) can be mentioned that at both selected pH values dominant species is hydroxo complex, which is less reactive than the aqua analogue. On the other side, distribution diagram of L-Met system (Fig. 4S, Supplementary material) confirm presence of the same chemical species in solution at pH 5.3 and 7.4. So, protolytic forms of the complex and ligand does not much define the observed rate.

Table 1

The chemical shift for H_6 proton of inert bipyridine in $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex during the substitution reactions with selected sulfur donor ligands at 295 K, pH 7.4.

Ligand	δ (ppm)	
	H_6 -bipy free	H_6 -bipy substituted
L-Met	9.56	9.86
L-Cys	9.56	9.86
GSH	9.56	10.13
Thiourea	9.56	10.13

Table 2

The chemical shifts for some suitable protons of sulfur donor ligands during the substitution reactions with $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ at 295 K, pH 7.4.

Ligand	Group	δ (ppm)	
		Free	Coordinated
L-Met	$\text{CH}_3(\text{s})$	2.16	2.78
	$\text{CH}(\text{dd})$	3.89	4.42
L-Cys	$\text{CH}(\text{dd})$	4.00	4.14
	$\text{CH}_2(\text{m})$	3.08	3.31
GSH	Cys- $\text{H}_\beta(\text{m})$	2.98	–
	Cys- $\text{H}_\gamma(\text{dd})$	4.59	–
GSSG	Cys- $\text{H}_\alpha(\text{dd})$	4.77	4.45
Thiourea ^a	C=S	183.6	177.9

^a Data from ^{13}C NMR.

Table 3

The second-order rate constants k_2 for the substitution reactions of $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex with sulfur donor nucleophiles in D_2O at 295 K.

Ligand	pH	$10^4 k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
L-Met	5.3	4.6 ± 0.2
	7.4	5.8 ± 0.8
L-Cys	5.0	2.49 ± 0.06
	7.4	3.26 ± 0.05
GSH (GSSG)	4.0	0.050 ± 0.001
	7.4	0.99 ± 0.02
Thiourea	Very fast	

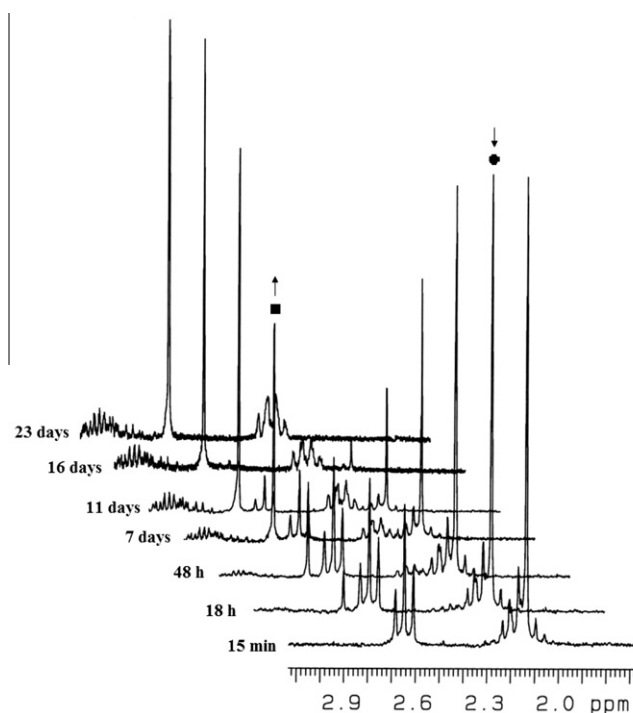


Fig. 4. ^1H NMR spectra of the reaction between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex (4 mM) and L-Met (4 mM) in D_2O at 295 K, pH 5.3. (■ – coordinated L-Met, δ ($\text{CH}_3(\text{s})$) = 2.76 ppm; ● – free L-Met, δ ($\text{CH}_3(\text{s})$) = 2.14 ppm).

In ^1H NMR spectra of the reaction between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ and L-Cys at pH 5.0 we monitored the signals of CH proton at 4.00 ppm for free and 4.15 ppm for coordinated L-Cys (Fig. 5S, Supplementary material). The reaction started after 48 h. At pH 7.4 the signals of the same CH proton is at 4.00 ppm for free and at 4.14 ppm for coordinated L-Cys, while the signal of CH_2 group is

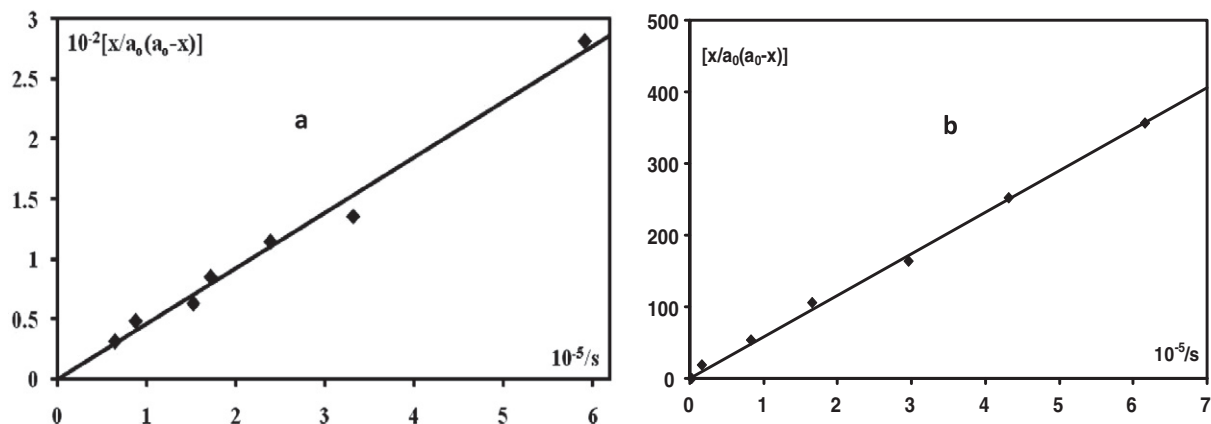


Fig. 5. Guggenheim plot for the substitution reaction between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex (4 mM) and L-Met (4 mM) in D_2O at 295 K, (a) pH 5.3; (b) pH 7.4.

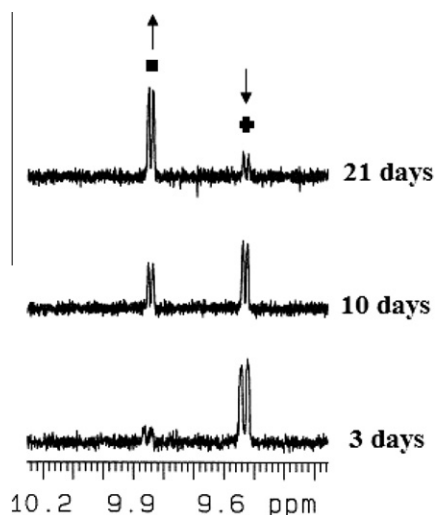


Fig. 6. ^1H NMR spectra of the reaction between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex (4 mM) and L-Cys (4 mM) in D_2O at 295 K, pH 7.4. (■ – substituted complex, δ (H_6 -bipy) = 9.86 ppm; ● – unsubstituted complex, δ (H_6 -bipy) = 9.56 ppm).

at 3.08 ppm for free and at 3.31 ppm for coordinated thiol (Table 2 and Fig. 12S, Supplementary material). The changes of chemical shifts are also mentioned in the region for H_6 bipyridine proton, at 9.56 for aqua and 9.86 for substituted complex (Fig. 6), Table 3. The calculated second order rate constants k_2 are given in Table 3 and the Guggenheim plots are shown on Fig. 6S, Supplementary material. As it was explained for the substitution process with L-Met, dominant chemical species in this system at pH 5.0 and 7.4 are almost the same (Figs. 3S and 7S). The substitution is slower than the reaction with L-Met what confirm again the higher nucleophilicity of thioethers than thiols.

Figs. 7, 8S and 13S (Supplementary material) shows the time course of the reaction between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ and GSH at pD 4.0 and 7.4. Chemical shifts are given in the Tables 1 and 2. According to the intensities of the corresponding signals in spectra we calculated rate constants at both pH values, given in Table 3 (Figs. 8S, 9S and 10S, Supporting material). These rate constants are very small, about order of magnitude less than the rates for other reactions. Following this reactions by ^1H NMR we noticed that the signal of reduced form of GSH at 2.98 ppm decrease with the time, but the new signal of substituted complex does not

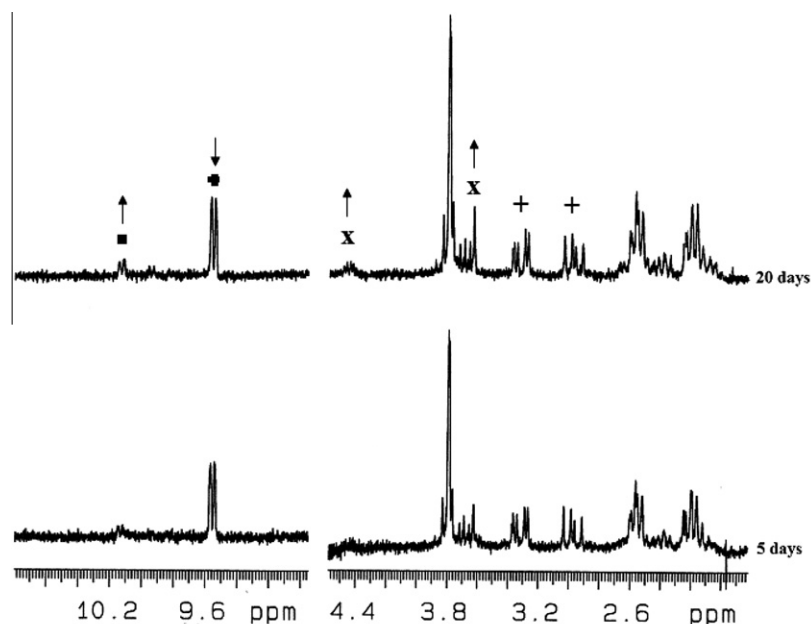


Fig. 7. ^1H NMR spectra of the reaction of $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex (4 mM) and GSH (4 mM) in D_2O at 295 K, pH 7.4. (■ – substituted complex, δ (H_6 -bipy) = 10.13 ppm; ● – unsubstituted complex, δ (H_6 -bipy) = 9.56 ppm; + – oxidation product GSSG, δ (CH_2) = 2.9–3.4 ppm; x – coordinated GSSG δ (Cys-H_α) = 4.45 ppm).

appear in the spectra. Moreover, we noticed the appearance of the signals for oxidized form of glutathione, GSSG, at 3.35 ppm. After 5 days, when the oxidation was over, the process of substitution started and the signal of substituted complex at 10.13 ppm appeared in the spectra, Fig. 7. Namely, it is well known that in neutral water solutions GSH could be oxidized by air [2]. Finally, after oxidation, formed GSSG molecule undergoes substitution reaction with $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex. This could be a reason for the unexpected very slow substitution with GSH.

The substitution reaction between $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex and thiourea was too fast for ^1H NMR time scale (Fig. 14S, Supplementary material). However, coordination to the complex was resulted in the ^{13}C NMR spectra in an upfield shift of 6 ppm for the resonance of C=S carbon, Table 2, as well as by the signals in ^1H NMR for free, at 9.56 ppm, and for substituted complex, at 10.13 ppm, Table 1. This huge reactivity of thiourea was usually explained by the fact that it combines the ligand properties of thiolates (σ -donor) and thioethers (σ -donor, π -acceptor) [41,42].

The reactivity of the studied complex toward selected nucleophiles is determined from the data of the rate constants. Rate of substitution depends on the type, structure and chemical characteristics of entering nucleophile. The obtained order of reactivity for entering ligands is: thiourea > L-Met > L-Cys > GSH. However, obtained spectra show primary hydrolysis of Ru(II) complex before the substitution with selected nucleophiles. Also, in all systems only one product of the substitution reaction was confirmed.

4. Conclusions

Here we determined the rate constants for the substitution reactions of $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ complex with four sulfur-donor nucleophiles. The reactions were studied in water without and with phosphate buffer. The obtained order of reactivity for the entering sulfur-donor ligands is: thiourea > L-methionine > L-cysteine > glutathione. The reactivity of the used ligands is in a good agreement with their electronic structure and chemical characteristics. All reactions are slightly faster at physiological pH value. For the reaction with GSH, primary oxidation of the ligand is followed by the very slow substitution. The acid dissociation constant of the aqua complex, $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, is $\text{p}K_a = 5.19 \pm 0.06$. The lower value is the result of strong electronic interactions between inert polypyridyl ligands (terpy and bipy) in the complex.

Acknowledgments

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

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2012.09.016>.

References

- [1] J.F. Norman, T.W. Hambley, in: E. Alessio (Ed.), *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, p. 49.
- [2] S.J. Barners-Price, P.J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.* 151 (1996) 1.
- [3] Z. Guo, P.J. Sadler, *Angew. Chem., Int. Ed.* 38 (1999) 1512.
- [4] M.J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* 236 (2003) 209.
- [5] S.J. Dougan, P.J. Sadler, *Chimia* 61 (2007) 704.
- [6] W.H. Ang, P.J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2006) 4003.
- [7] I. Bratsos, G. Birarda, S. Jedner, E. Zangrando, E. Alessio, *Dalton Trans.* (2007) 4048.
- [8] I. Bratsos, S. Jedner, A. Bergamo, G. Sava, T. Gianferrara, E. Zangrando, E. Alessio, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1120.
- [9] S.B. Fricker, *Dalton Trans.* (2007) 4903.
- [10] B.K. Keppler, *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, 1989, p. 25.
- [11] G. Mestroni, E. Alessio, G. Sava, S. Pacor, M. Coluccia, A. Boccarelli, *Met. Based Drugs* 1 (1994) 41.
- [12] M.J. Clarke, in: B.K. Keppler (Ed.), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993.
- [13] C.S. Allardayce, P.J. Dyson, *Platinum Met. Rev.* 45 (2001) 62.
- [14] J. Kostova, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1085.
- [15] J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 3611.
- [16] A.C.G. Hotze, S.E. Caspers, D. de Vos, H. Kooijman, A.L. Spek, A. Flamigni, M. Bacac, G. Sava, J.G. Haasnoot, J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 354.
- [17] A.H. Velders, H. Kooijman, A.L. Spek, J.G. Haasnoot, D. de Vos, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 2966.
- [18] A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernandez, S. Parsons, I.D.H. Oswald, A. Parkin, F.P.A. Fabbiani, J.E. Davidson, A. Dawson, R.E. Aird, D.H. Jodrell, P.J. Sadler, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6858.
- [19] R.A. Vilaplana, F. Delmani, C. Manteca, J. Torreblanca, J. Moreno, G. García-Herdugo, F. González-Vilchez, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1834.
- [20] G. Sava, S. Pacor, A. Bergamo, M. Cocchietto, G. Mestroni, E. Alessio, *Chem. Biol. Interact.* 95 (1995) 109.
- [21] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891.
- [22] J.M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3717.
- [23] I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrara, E. Alessio, *Chimia* 61 (2007) 692.
- [24] G. Süss-Fink, *Dalton Trans.* 39 (2010) 1673.
- [25] T. Bugarčić, A. Habtemariam, R.J. Deeth, F.P.A. Fabbiani, S. Parsons, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 9444.
- [26] T. Bugarčić, A. Habtemariam, J. Stepankova, P. Heringova, J. Kasparkova, R.J. Deeth, R.D.L. Johnstone, A. Prescimone, A. Parkin, S. Parsons, V. Brabec, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 11470.
- [27] V. Brabec, O. Novakova, *Drug Resist. Update* 9 (2006) 111.
- [28] R.E. Aird, J. Cummings, A.A. Ritchie, M. Muir, R.E. Chen, P.J. Sadler, D.I. Jodrell, *Br. J. Cancer* 86 (2002) 1652.
- [29] O. Novakova, J. Kasparkova, O. Vrana, P.M. van Vliet, J. Reedijk, V. Brabec, *Biochemistry* 34 (1995) 12369.
- [30] E. Corral, A.C.G. Hotze, H. den Dulk, A. Leczkowska, A. Rodger, M.J. Hannon, J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 439.
- [31] A. Rilak, B. Petrović, S. Grgurić-Šipka, Ž. Tešić, Ž.D. Bugarčić, *Polyhedron* 30 (2011) 2339.
- [32] B.P. Sullivan, J.M. Calvert, T.J. Mayer, *Inorg. Chem.* 19 (1980) 1404.
- [33] N. Chanda, S.M. Mobin, V.G. Puranik, A. Datta, M. Niemeyer, G.K. Lahiri, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 1056.
- [34] E. Jakubikova, W. Chen, D.M. Dattelbaum, F.N. Rein, R.C. Rocha, R.L. Martin, E.R. Batista, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 10720.
- [35] K. Mikkelsen, S.O. Nielsen, *J. Phys. Chem.* 64 (1960) 632.
- [36] A.M. Mijatovic, B. Petrovic, R. Jelic, Z.D. Bugarcic, unpublished results.
- [37] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* 43 (1996) 1739.
- [38] F. Tiba, D. Jaganyi, A. Mambanda, *J. Coord. Chem.* 63 (2010) 2542.
- [39] S.J. Barners-Price, K.J. Barnham, U. Frey, P.J. Sadler, *Chem. Eur. J.* (1996) 1283.
- [40] E.L.M. Lempers, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 217.
- [41] M.T. Ashby, *Comments Inorg. Chem.* 10 (1990) 297.
- [42] S.G. Murray, F.R. Hartley, *Chem. Rev.* 81 (1981) 365.

Kinetics, mechanism, and equilibrium studies of the reactions between a ruthenium(II) complex and some nitrogen- and sulfur-donor nucleophiles

Aleksandar M. Mijatović, Ratomir M. Jelić, Jovana Bogojeski, Živadin D. Bugarčić & Biljana Petrović

Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly

An International Journal of Chemistry

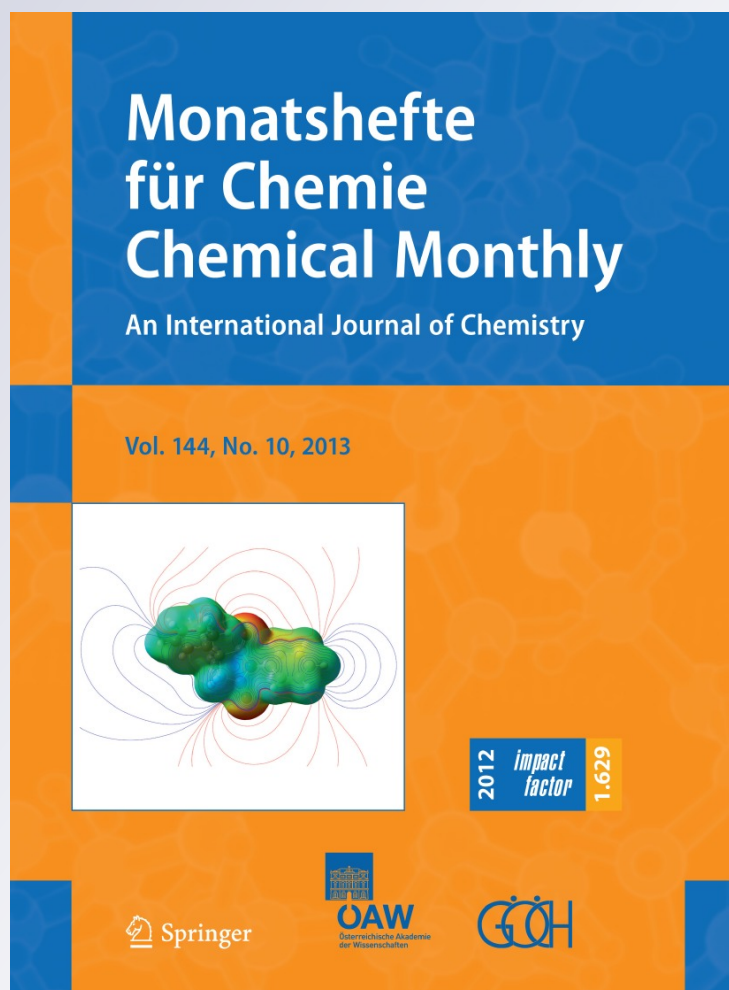
ISSN 0026-9247

Volume 144

Number 10

Monatsh Chem (2013) 144:1489-1498

DOI 10.1007/s00706-013-1044-1



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Wien. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Kinetics, mechanism, and equilibrium studies of the reactions between a ruthenium(II) complex and some nitrogen- and sulfur-donor nucleophiles

Aleksandar M. Mijatović · Ratomir M. Jelić ·
Jovana Bogojeski · Živadin D. Bugarčić ·
Biljana Petrović

Received: 27 March 2013 / Accepted: 25 June 2013 / Published online: 22 August 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract Kinetics and mechanism of the substitution reactions between $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ with nucleophiles guanosine-5'-monophosphate, L-histidine, thiourea, and dimethylsulfoxide were studied spectrophotometrically in 0.1 M NaClO_4 at 310 K. The observed order of reactivity for selected ligands is: thiourea > guanosine-5'-monophosphate > L-histidine > DMSO. This order is associated with the electronic, structural, and chemical characteristics of complex and nucleophiles. The substitution reaction with thiourea was studied at three different temperatures (288, 298, and 310 K). Negative entropy of activation ΔS^\ddagger confirms the associative mode of activation. The complex formation of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ with ligands guanosine-5'-monophosphate and L-histidine was investigated by potentiometry and spectrophotometry as well. The stoichiometry and stability constants of the species formed in these systems were determined. The concentration distribution diagram of the various complexes has been evaluated as a function of pH. Comparing the calculated values for $\log\beta$, we determined that the product with nucleotide is more stable than the product with L-histidine.

Keywords Kinetics · Equilibrium · Ru(II) · L-Histidine · Guanosine-5'-monophosphate · Dimethylsulfoxide · Thiourea

Introduction

Since the antitumor activity of cisplatin was discovered, a number of platinum complexes have been synthesized and evaluated as potential chemotherapeutic agents [1–3]. The limited range of activity of cisplatin and its analogs and their several side effects have stimulated the search for other metal-based anticancer drugs with metal ions different from platinum [4, 5]. Ruthenium complexes are today the most promising compounds for the investigation of antitumor activity of metal-containing pharmaceuticals [6–10].

The first ruthenium compounds studied for antitumor activity were the chlorido-ammine complexes *fac*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}_3]$ and *cis*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]$ [11]. However, although active, these compounds were not soluble enough for pharmaceutical use [6, 7]. In the following years, a large number of different Ru(II) and Ru(III) compounds were studied for their cytotoxic properties, such as polypyridyl complexes *cis*- $[\text{Ru}(\text{N,N-bpy})_2\text{Cl}_2]$ and *mer*- $[\text{Ru}(\text{N,N,N-trpy})\text{Cl}_3]$ [12, 13], aminocarboxylato complexes $[\text{Ru}(\text{N,N,O,O-pdta})\text{Cl}_2]$ (pdta = 1,2-propylenediaminetetraacetato) and $[\text{Ru}(\text{N,N,O,O,O-edta})\text{Cl}]$ (edta = ethylenediaminetetraacetato) [14, 15], dimethylsulfoxide complexes *cis*- and *trans*- $[\text{Ru}(\text{S-DMSO})_4\text{Cl}_2]$ [16–18], and arylazopyridine complexes $[\text{Ru}(\text{N,N,N,N-azpy})_2\text{Cl}_2]$ (azpy = 2-phenylazopyridine) [19, 20]. More recently, two classes of structurally similar Ru(III) complexes were synthesized and investigated for antitumor activity: $[\text{HL}]\text{trans-}[\text{RuCl}_4\text{L}_2]$ (L = imidazole or indazole) [21] and $[\text{HL}]\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO-S})\text{L}]$

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00706-013-1044-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. M. Mijatović · J. Bogojeski · Ž. D. Bugarčić · B. Petrović (✉)
Department of Chemistry, Faculty of Science,
University of Kragujevac, R. Domanovića 12,
PO box 60, 34000 Kragujevac, Serbia
e-mail: biljanap@kg.ac.rs

R. M. Jelić
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,
S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

(L = heterocyclic nitrogen ligand) [22]. In particular just two compounds are undergoing clinical evaluation today, the indazole (ind) derivative cytotoxic to cancer cells [Hind]-*trans*-[RuCl₄(ind)₂], known as KP1019, and the imidazole (im) derivative [Him]*trans*-[RuCl₄(DMSO-S)(im)], known as NAMI-A, which is relatively non-toxic but has antimetastatic activity [21–25].

It is generally accepted that the antitumor activity of platinum drugs can be ascribed to interactions between complex and DNA molecules [1–5]. However, the mechanism of action of ruthenium compounds has not yet been clarified. It was proposed that they are activated by hydrolysis, mainly of the chlorido ligands. After hydrolysis, the reduction of Ru(III) to Ru(II) complex occurs because cells contain different amounts of reducing agents [23–25]. Finally, the Ru(II) complex formed reacts with the DNA molecule, binding preferentially to guanine residues via N7 coordination [26]. This activation mechanism, proposed by Clarke, has become known as the “activation by reduction” hypothesis [25]. In accordance with the “activation by reduction” hypothesis, NAMI-AR, obtained by the reduction of NAMI-A with ascorbic acid prior to administration was found to be more efficient than NAMI-A against metastasis growth [27].

Today, many different ruthenium complexes have been synthesized and investigated to elucidate the relationship between the structure of inert ligands and properties of the complexes. Complexes with polypyridyl ligands [9, 28–30] and organometallic half sandwich ligands [31–37] are studied frequently in order to gain insight into the factors that influence hydrolysis and binding to bio-molecules. In particular, activation through hydrolysis is important for the mechanism of action of this class of compounds, and their chemical behavior depends to a great extent on the acidity and chloride concentration.

Taking into account that biomedical and pharmaceutical utilizations of terpyridine-type ligands (e.g., as DNA-binding or active antitumor agents) are currently fast growing fields of research [38–41], we studied the kinetics of the substitution reactions between [Ru(trpy)(bpy)Cl]⁺ and nucleophiles such as thiourea (Tu), dimethylsulfoxide (DMSO), L-histidine (L-His), and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) by conventional UV–Vis spectrophotometry. The ligands L-His and 5'-GMP are biologically relevant molecules. Tu is commonly used as a “protective agent” for the better excretion of “soft” metal ions [3–5], while DMSO is already present in the structures of some Ru complexes, such as NAMI-A. Also, we studied the hydrolysis of [Ru(trpy)(bpy)H₂O]⁺ as well as complex formation equilibria between [Ru(trpy)(bpy)H₂O]⁺ and L-His or 5'-GMP by potentiometric and spectrophotometric methods. The structures of [Ru(trpy)(bpy)Cl]⁺ and nucleophiles are shown in Fig. 1.

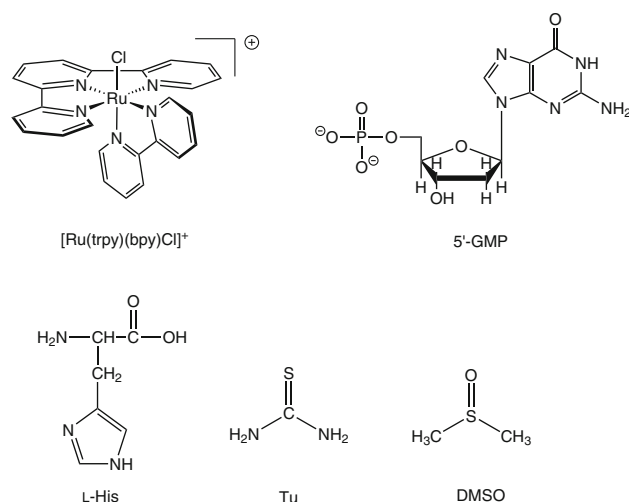


Fig. 1 The structures of complex and nucleophiles

Results and discussion

Kinetic studies

Kinetics of the substitution reactions of [Ru(trpy)(bpy)Cl]⁺ with nucleophiles Tu, L-His, DMSO, and 5'-GMP were investigated spectrophotometrically by following the changes in absorbance at suitable wavelengths as a function of time at 310 K. The complex and ligands were dissolved in aqueous 0.1 M NaClO₄ with the addition of 20 mM NaCl to prevent the spontaneous hydrolysis of Ru(II) complex [42–44]. The concentration of 20 mM NaCl was chosen after recording the changes in absorbance of the complex at different chloride concentrations. The obtained results are given in the Supplementary material (Table 1S; Fig. S1). All kinetic experiments were performed under pseudo first-order conditions, where the concentration of nucleophiles was always in at least tenfold excess (Supplementary Material, Tables 2S–5S).

Substitution reaction of selected octahedral ruthenium(II) complex can be presented as shown in Scheme 1. The pseudo first-order rate constants were found to be linearly dependent upon the concentration of nucleophile (L), as presented in Eq. (1).

$$k_{\text{obsd}} = k_2[L] + k_1 \quad (1)$$

The second-order rate constant k_2 characterizing the formation of the reaction product can be evaluated from the slope of a plot k_{obsd} vs. [L]. The experimentally obtained results are summarized in Table 1 and presented in Fig. 2. The value for the rate constant of the reverse reaction k_1 , which is independent on the concentration of nucleophile L, is determined from the intercept of the observed lines (Fig. 2). It is very small and contributes little to k_{obsd} .

According to the results shown in Table 1 and Fig. 2, the following order of reactivity of the selected nucleophiles was observed: Tu > 5'-GMP > L-His > DMSO. It was expected that thiourea has the highest reactivity toward the Ru(II) complex studied, because it combines the ligand properties of thiolates (σ -donor) and thioethers (σ -donor, π -acceptor) [45, 46]. However, 5'-GMP reacts slightly slower than thiourea. Taking into account the size of the

Scheme 1

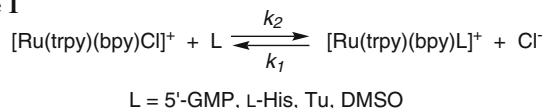


Table 1 Rate constants for the substitution reaction of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^{2+}$ complex with selected nucleophiles in 0.1 M NaClO_4 , 20 mM NaCl at 310 K

Nucleophile	$k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 k_1/\text{s}^{-1}$
Thiourea	1.35 ± 0.03	1.4 ± 0.3
5'-GMP	1.33 ± 0.03	0.16 ± 0.2
L-His	0.41 ± 0.02	11 ± 1
DMSO	0.020 ± 0.002	1.2 ± 0.6

molecule, we expected that 5'-GMP reacts very slowly. But, besides nitrogen donor atoms in the structure of the purine base and the well-known coordination to metal ions via N7 atoms, this nucleotide could be bound to Ru(II) via phosphate oxygen atoms as well. This kind of coordination has been already published for some Ru(II) complexes [9, 26]. After formation of an adduct where the metal ion is coordinated to oxygen from the phosphate group, very slow isomerization to the N7 atom of purine takes place. The reaction with amino acid L-His could also proceed in a similar way by coordination via oxygen atoms followed by slow isomerization to N3 from the imidazole ring. The reaction with DMSO is the slowest. This was unexpected because DMSO could coordinate via sulfur or oxygen. However, here a very rigid geometry of the nucleophile makes access and bond formation difficult.

As mentioned above, Ru(II) complexes have a huge potential for antitumor activity. The investigation of their interactions with biomolecules could help a lot toward better understanding of some cell processes. On the basis of the chemical characteristics of such complexes and biologically relevant molecules, some interactions could be predicted. One of the most important facts is knowledge of their "hard" and "soft" behavior. The ruthenium compounds belong to the "border line" group, which means that they are somehow

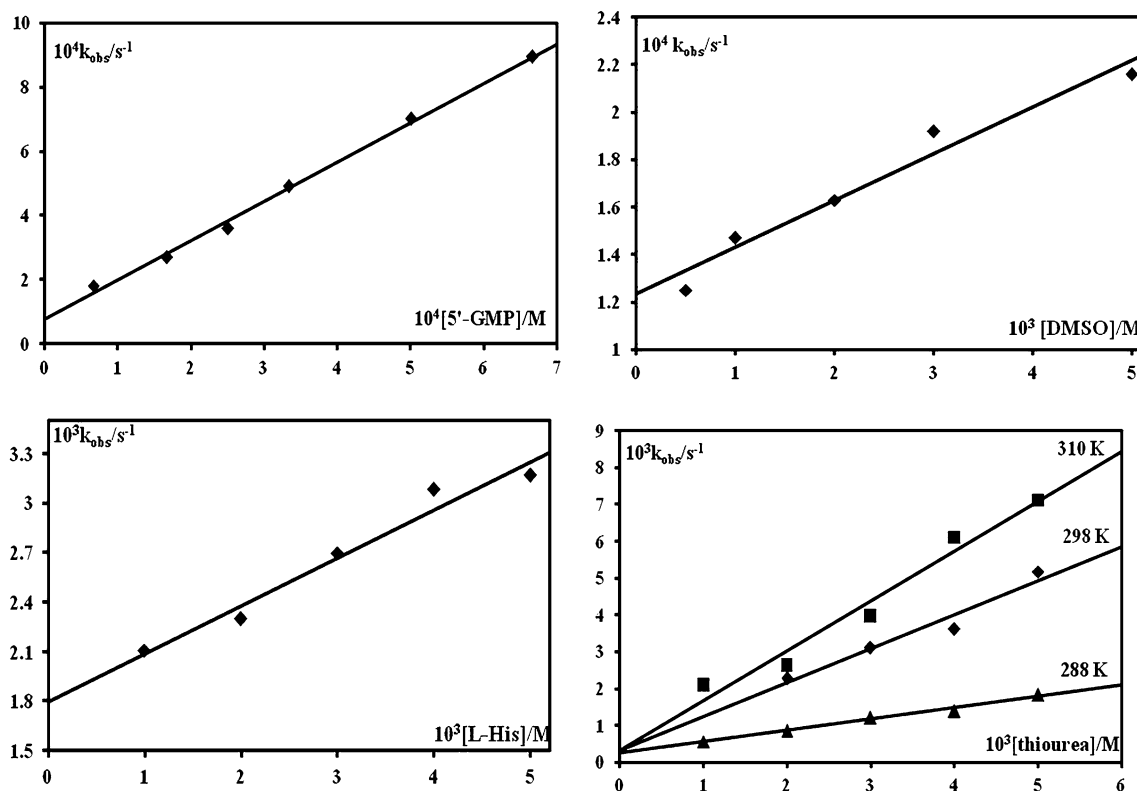


Fig. 2 Pseudo-first-order rate constants as a function of nucleophile concentrations for the substitution reactions of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ in 0.1 M NaClO_4 , 20 mM NaCl at 310 K

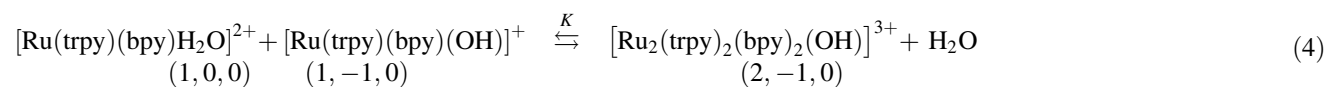
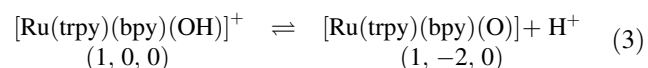
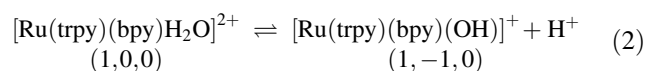
“harder” than platinum(II) complexes [47]. This clearly explains and supports the bond formation via oxygen atoms rather than via sulfur or nitrogen, as was the case with anti-tumor “soft” platinum complexes.

For determination of the values for thermodynamic parameters to define a mechanism of substitution, the substitution reaction between $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ and thiourea was studied at three different temperatures. Values for k_{obsd} as a function of different ligand concentrations and temperature are given in the Supplementary material (Table 4S). Calculated values for the rate constants at 288 and 298 K are $k_1^{288} = 0.31 \pm 0.02 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_1^{298} = 0.92 \pm 0.04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Finally, a negative value for the entropy of activation, $\Delta S^\ddagger = -105 \pm 5 \text{ K}^{-1}\text{M}^{-1}$, confirms the fact that the substitution reaction between $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ and thiourea undergoes an associative mechanism.

Hydrolysis of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$

Potentiometric measurements

The hydrolysis constants of the complex were determined by titration of 1.0, 1.5, and 2.0 mM solutions of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ with NaOH. The acid-base chemistry was characterized by fitting the potentiometric data to various acid-base models. The best model, selected according to the above-mentioned method of calculation, was consistent with the deprotonation of water molecules and formation of hydroxo and μ -hydroxo complexes, as given in Eqs. (2–4). The calculated values of hydrolysis constants are given in Table 2.



Proton dissociation from an $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ complex proceeded in two steps ($pK_{a1} = 4.27$ and $pK_{a2} = 10.11$). The first step simply produced $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{OH})]^+$ species, while the second one gave an unusual $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{O})]^+$. The formation of complex with oxyl radical (O^-) has already been published [29, 48]. The equilibrium constant (K) for the dimerization reaction (Eq. 4) was determined to be $\log K = 3.45$ ($=\log \beta_{20-1} - \log \beta_{10-1}$).

A distribution diagram for $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ hydrolytic species is shown in Fig. 3. The complex ion $[\text{Ru}_2(\text{trpy})_2(\text{bpy})_2(\text{OH})]^{3+}$ is present in the system in a pH range between 2.0 and 7.0, with the maximum in concentration at pH = 4. This ion is assumed to form through the dimerization of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{OH})]^+$ complexes via the hydroxo group as shown in Eq. (4). The $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{OH})]^+$ ion begins to form at pH = 2 and reaches the maximum in concentration at pH = 8. The complex ion $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{O})]^+$ begins to form at pH = 8, and its concentration increases with further increasing of pH. Very important is the fact that at physiological pH the aqua complex is completely converted into a hydroxo form.

Spectrophotometric titration

Spectral measurements were performed on $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ solutions in which the concentration of complex was kept constant while pH was varied by the addition of standard HCl or NaOH solutions, as appropriate. All UV–Vis spectra show evidence of an intensive band between 280 and 300 nm and another lower energy broad band between 450 and 470 nm (Fig. 4).

The spectral data were first evaluated with the aid of the computational program pHAb 2006 [49]. The calculations were carried out in the following way: the complexes found by potentiometry were included in pHAb calculations, and their stability constants were allowed to float. When the best fit of the spectra was achieved, the stability constants were varied one at a time simultaneously with variation of molar absorptivities. The accepted results of the calculation are given in Table 2. Along with the stability constants, in spectral calculations, the molar absorptivities of the complexes were calculated. Finally, the calculated spectra of different hydrolytic species are presented in Fig. 5.

The obtained values confirm a good agreement between potentiometric and spectrophotometric measurements.

Complex formation of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ with HL (where HL = 5'-GMP or L-His)

The complex formation of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ with ligands 5'-GMP or L-His, symbolized by HL, was studied

Table 2 Stability constants of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ -HL complexes (HL = 5'-GMP or L-His) formed in a 0.1 M NaClO_4 ionic medium at 298 K

Complexes	$\text{Log } \beta_{p,q,r} \pm \sigma$			
	Potentiometric	Spectrophotometric	Potentiometric	
	OH^-	OH^-	5'-GMP	L-His
$[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{OH})]^+$	-4.27(2)	-4.19(6)		
$[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{O})]^+$	-14.38(4)	-14.29(6)		
$[\text{Ru}_2(\text{trpy})_2(\text{bpy})_2(\text{OH})]^{3+}$	-0.82(6)	-		
$[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{L})]^+$	-	-	8.69(9)	7.53(7)
$[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{HL})]^{2+}$	-	-	15.62(6)	14.20(6)
$[[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})]_2(\text{HL})]^{4+}$	-	-	-	18.69(13)
Statistics	$\chi^2 = 13.32$ $s = 1.96$	$\chi^2 = 10.32$ $s = 1.73$	$\chi^2 = 13.06$ $s = 1.51$	$\chi^2 = 12.79$ $s = 2.73$

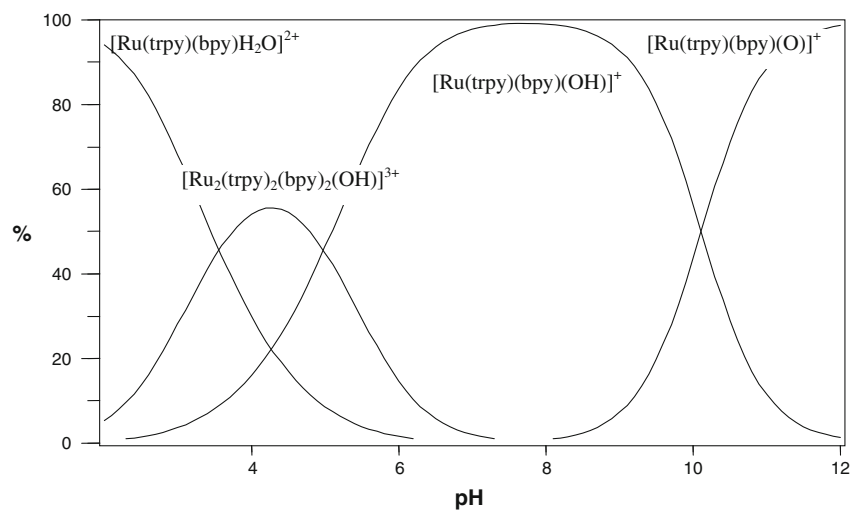
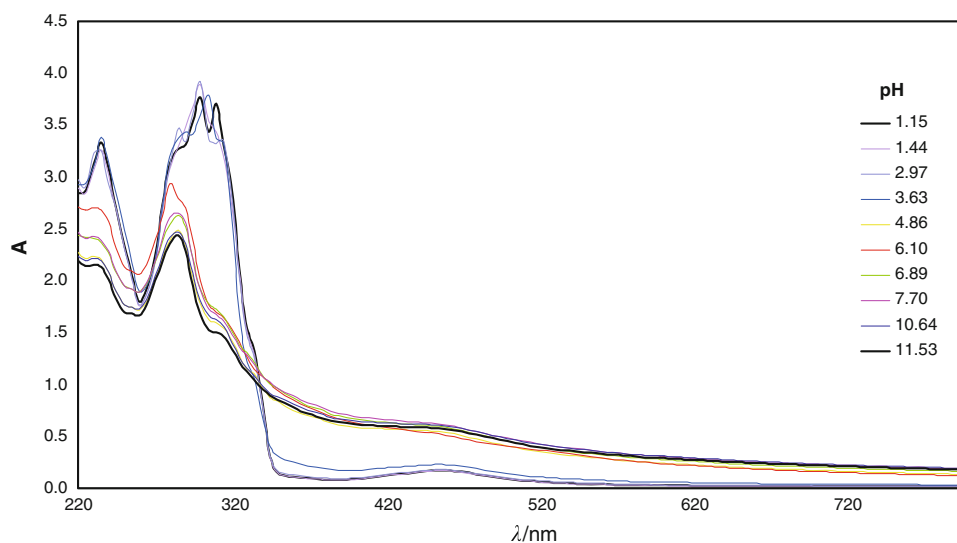
Fig. 3 Distribution diagram of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ hydrolytic species in 0.1 M NaClO_4 ionic medium at 298 K ($C_{[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}} = 2.00\text{mM}$)**Fig. 4** The UV-Vis spectra of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ at different pH values

Fig. 5 The calculated spectra of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ hydrolytic species

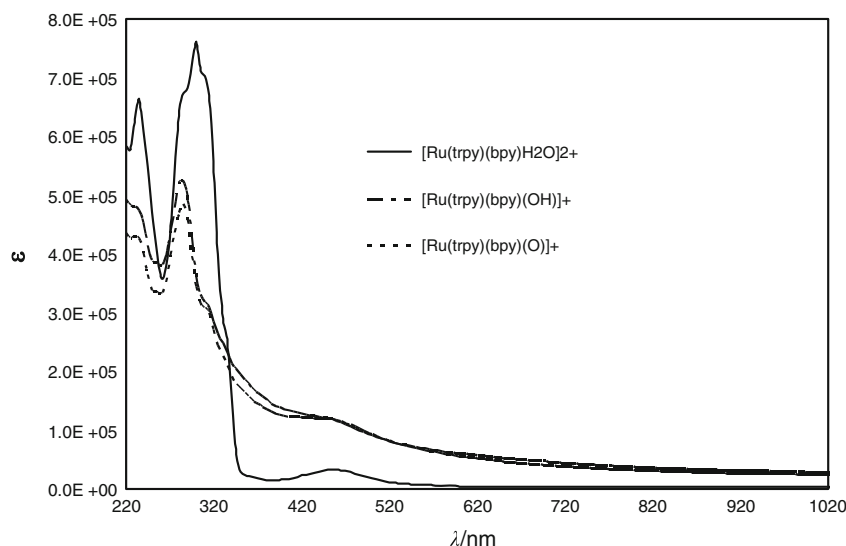
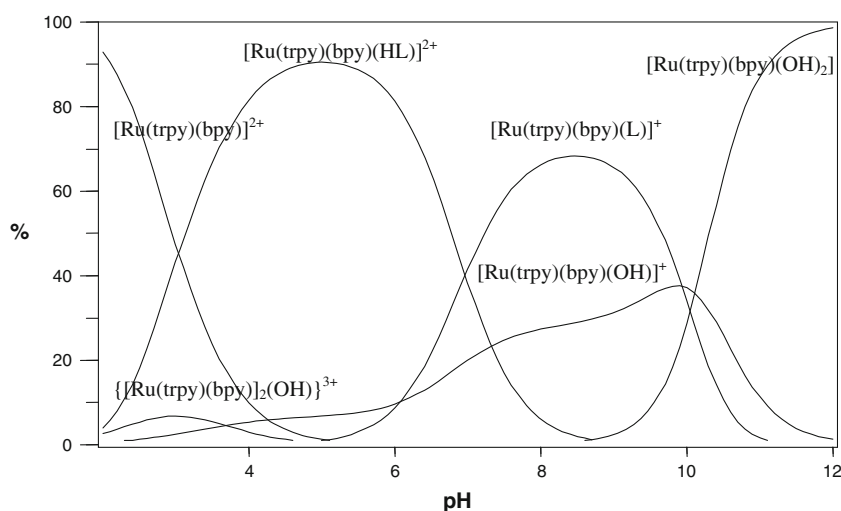


Fig. 6 Distribution diagram of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ -HL (where HL = 5'-GMP) species at a ligand-to-metal concentration ratio = 1:2 and total $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ concentration 1.0 mM



by potentiometric titrations in aqueous 0.1 M NaClO_4 at 298 K in concentration ratios of 1:1, 1:2, and 2:1 (metal:ligand). The composition of the species of the general formula $\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r$ (where $\text{M} = [\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, HL = 5'-GMP or L-His) was calculated using the computer program Hyperquad 2006 [50]. The formation constants calculated for the selected systems are given in Table 2, while the distributions are shown in Figs. 6 and 7 (Supplementary Material, Figs. 3S and 4S).

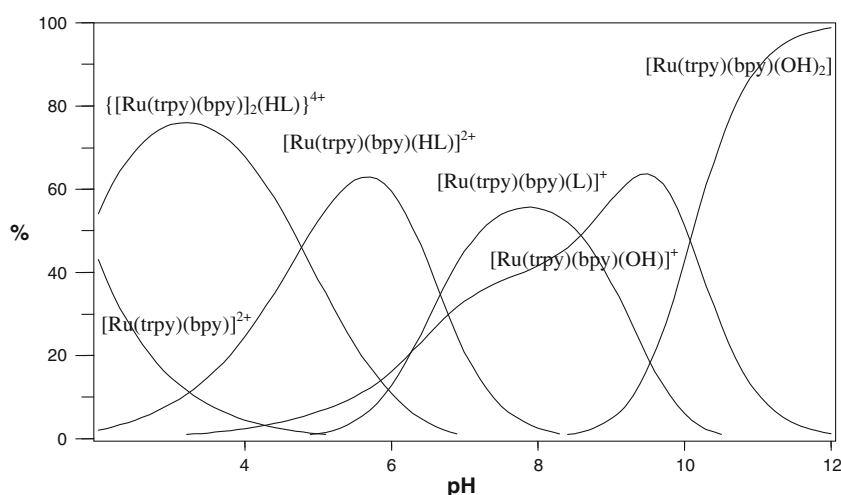
It is well known that 5'-GMP can coordinate to metal ions via N1 and N7 positions, but binding through the N7 position in a neutral or weakly acidic medium has been verified. Also, depending mainly on the type of metal ion 5'-GMP has the possibility to coordinate via phosphate oxygen. However, the product formed usually undergoes isomerization to an N7 bounded form. L-His could be coordinated to metal ions via amino, imidazole, and carboxylate groups. In biological systems, there are numerous

metalloproteins in which metal ions are bound to an L-histidine through N1 or N3 atoms of imidazole. However, this amino acid can coordinate some metal ions via carboxylate oxygen but the thermodynamically more stable product is always N3 or N1 bounded.

Figure 6 shows that complex formation between $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ and nucleotide 5'-GMP starts almost at the beginning of the potentiometric titration giving $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{HL})]^{2+}$ (HL = 5'-GMP) complex with the maximum in concentration at a pH of about 5. The complex with deprotonated nucleotide $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{L})]^+$ starts to form at pH 5, and its maximum in concentration is reached at a pH of about 8.5. The pure hydrolytic complexes of $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bipy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ are present in solution in considerable amounts (Supplementary Material, Fig. 3S).

The distribution diagram of the $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ + L-His system, shown in Fig. 7, indicates that in highly acidic solution the complex $[\text{Ru}(\text{trpy})$

Fig. 7 Distribution diagram of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ -HL (where HL = L-His) species at a ligand-to-metal concentration ratio = 1:2 and total $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ concentration 1.0 Mm



$(\text{bpy})_2(\text{HL})]^{4+}$ (HL = L-His) is dominant. Formation of the complex $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{HL})]^{2+}$ starts at $\text{pH} = 2$ and reaches its maximum concentration at $\text{pH} \approx 6$. The complex $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{L})]^+$ starts to form at $\text{pH} = 5$ and reaches its maximum concentration at $\text{pH} \approx 8$. The pure hydrolytic complexes $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{OH}]^+$ and $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ are also present in considerable amounts at $\text{pH} > 9$ (Supplementary Material, Fig. 4S).

Calculated stability constants for the species (Table 2) show that complexes with 5'-GMP are more stable than complexes with L-His. Taking into account the voluminosity of 5'-GMP and L-His as well as the bulkiness of inert ligands in the structure of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, it can be concluded that here intramolecular hydrogen bonds play a significant role for the stability of products. In both systems studied, mixtures of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{HL})]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})(\text{L})]^+$ complexes are present at physiological pH. This observation could be very important for further understanding of interactions between Ru(II) complexes and bio-molecules structurally similar to those investigated in this work.

Conclusions

We present results for the rate constants of the substitution reactions between $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ with the nucleophiles 5'-GMP, L-His, Tu, and DMSO obtained by conventional spectrophotometry. The best nucleophile is thiourea. The order of reactivity for selected ligands is: $\text{Tu} > 5'\text{-GMP} > \text{L-His} > \text{DMSO}$. This is in a good agreement with their electronic, structural, and chemical characteristics. The associative mode of substitution is confirmed for the substitution reaction with Tu. The monofunctional complex $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ with 5'-GMP and L-His forms very stable products, especially with 5'-GMP.

Finally, knowledge of the composition and stability of the species in the studied systems, especially at physiological pH, could contribute to a better understanding of some interactions in biological systems.

Experimental

$\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, a starting salt for other synthesis, was purchased from Acros Organics. The ligands thiourea (Tu), dimethylsulfoxide (DMSO), guanosine-5'-monophosphate sodium salt (5'-GMP), 2,2'-bipyridine (bpy) (Acros Organics), L-histidine (L-His) (Merck), and 2,2':6',2''-terpyridine (trpy) (Sigma Aldrich) were used without further purification. All other chemicals were of the highest purity commercially available.

The solutions of complex and ligands for kinetic measurements were prepared in 0.1 M NaClO_4 . To prevent hydrolysis of the Ru(II) complex 20 mM NaCl was added to the solution. Ligand stock solutions were prepared shortly before use by dissolving the chemicals in purified, deionized water. The ionic strength of the solutions was adjusted to 0.10 M using NaClO_4 (Merck, p.a.). The pH of the solutions was adjusted using HClO_4 and NaOH. The sodium hydroxide solution was prepared from concentrated volumetric solution (Merck, p.a.) by diluting with freshly boiled double-distilled water, cooled under constant flow of purified nitrogen. The alkali concentration was checked by titration against potassium hydrogenphthalate. For the preparation of perchloric acid solution, HClO_4 (Merck, "Suprapure", p.a.) was used. The concentration of the resulting solution was determined by potentiometric titration against tris(hydroxymethyl)aminomethane. The concentration of HClO_4 solution was 0.0923 M, and the concentration of NaOH solution was 0.0982 M. Nitrogen gas, used for the stirring of solutions and providing an inert

atmosphere during the titrations, was purified by passing it through 10 % NaOH, then 10 % H₂SO₄, and finally distilled water. Ultrapure water was used for preparation of all solutions.

Preparation of the complexes

The complex [Ru(trpy)(bpy)Cl]Cl was prepared according to the published procedures [29, 30, 51]. Ruthenium salt RuCl₃·xH₂O (assuming x = 3; 0.20 g, 0.89 mmol) was dissolved with stirring and heating in 30 cm³ absolute ethanol. After dissolution, 0.21 g ligand 2,2':6',2''-terpyridine (0.89 mmol) was added and the mixture refluxed about 3 h. Then, an equimolar amount of 2,2'-bipyridine (0.14 g, 0.89 mmol) was injected into the flask. The system was refluxed for 4 h with the addition of an excess of LiCl (1.5 mmol) and triethylamine (0.4 mmol) as a reductant. Under this procedure, the reduction of Ru(III) occurs, and the final product is the Ru(II) complex. Finally, when the mixture was cooled to room temperature, the red-orange precipitate that formed was filtered, washed with ethanol and ether, and air-dried. The chemical analysis, ¹H NMR and UV–Vis spectroscopic data were in good agreement with previously published results.

The chlorido complex was converted into the aqua analog [Ru(trpy)(bpy)H₂O]²⁺ by addition of two equivalents of AgClO₄, heating the mixture to 50–60 °C for 1 h and removing the formed precipitate AgCl by filtration through a 0.10-μm pore membrane filter. Great care was taken to ensure that the resulting solution was free of Ag⁺ ions and that the chlorido complex had been converted completely into the aqua species.

Kinetic measurements

UV–Vis kinetic measurements were carried out on a Perkin-Elmer Lambda 35 double-beam spectrophotometer equipped with thermostated 1.00-cm quartz Suprasil cells. The kinetics of the substitution reactions of [Ru(trpy)(bpy)Cl]⁺ with nucleophiles 5'-GMP, L-His, Tu, and DMSO were studied by following the changes in absorbance at a suitable wavelength as a function of time. The working wavelength for each reaction system was determined by recording the spectra of the reaction mixture over the wavelength range between 220 and 450 nm. These values are presented in the Supplementary material (Tables 1S–4S). The reactions were initiated by mixing equal volumes of complex and nucleophile solutions (1.5 cm³) in the quartz cuvette. The concentration of ligand was always large enough (at least a tenfold excess) to provide pseudo first-order conditions. The kinetic traces

gave an excellent fit to a single exponential (Supplementary Material Fig. 2S).

Potentiometric measurements

Potentiometric titrations were carried out in a double-walled glass vessel, thermostated at 298 ± 0.1 K. Measurements were made by a Mettler Delta 350 digital pH meter (precision ± 0.01 mV or ± 0.002 pH units) equipped with a combination glass electrode. This electrode was calibrated using standard buffer solutions of pH 4 and 7, obtained from Sigma. The Metrohm Dosimat model 665 automatic burette with an anti-diffusion tip was used for delivery of the titrant. The ionic strength of all test solutions was adjusted to 0.1 M with NaClO₄.

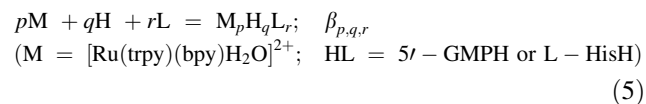
To reduce the concentration of the hydrogen ions, the alkali was added stepwise from an autoburette in small aliquots (0.005–0.01 cm³). The potential was monitored after each addition of titrant. The titration protocol was chosen in such a way that the hydrolysis and complex formation reactions would proceed in conditions as close as possible to true equilibrium. The potential readings were taken every 2 min until steady values to ± 0.1 mV min⁻¹ were obtained. The average equilibration time for each point was 5 min at the beginning of the titration and 10 min when the complexation occurred. Stability constants were determined by titrating 1.0 and 2.0 mM solutions of complex with standard NaOH solution. The formation constants of complexes formed were determined by titrating the solution mixture of Ru(II) complex (2 mM) and ligand (5'-GMP or L-His) in concentration ratios of 1:1 and 1:2 (complex:ligand). The titration solution mixtures had a volume of 20.0 cm³. All titrations were carried out in duplicate. The agreement between duplicate titration was better than 1 %.

Spectrophotometric titrations

Spectral measurements were made on a model Lambda 35 double-beam UV–Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer, USA). Operational parameters were: scan speed: 2 nm/s; slit width: 0.3 nm; photometric sensitivity: 0.2 abs. units. Matching pairs of 1-cm quartz cuvettes were used for measuring the spectra. Spectral measurements were made on solutions in which the concentration of [Ru(trpy)(bpy)H₂O]²⁺ complex was 0.02 mM while the pH was varied between 1.15 and 11.53. The pH of the test solutions was measured with a combined electrode, which was calibrated using standard buffer solutions of pH 4 and 7 obtained from Sigma. Spectra of the test solutions were recorded in 220–1.020-nm wavelength intervals.

Data treatment

The species formed in the studied systems were characterized by the general equilibrium:



and the corresponding constants are given by:

$$\beta_{p,q,r} = \frac{[M_pH_qL_r]}{[M]^p[H]^q[L]^r} \quad (6)$$

where L is the deprotonated molecule of the ligand.

In this study, the convention has been adopted whereby a complex containing a metal ion, M, proton, H, and ligand, L, takes the general formula $M_pH_qL_r$, where p , q , and r are the stoichiometric indices of the components in the complex. A negative value for q refers to proton removal or hydroxide ion addition during formation of the complex. Thermodynamically, these two processes are equivalent and cannot be distinguished by potentiometry. The equilibrium constant for the formation of this complex from its components is then designated by the symbol $\beta_{p,q,r}$. For simplicity, the charges of these species are omitted.

Three kinds of equilibria should be considered in the present study: (a) protonation of the ligand anion, (b) hydrolysis of the $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ ion, and (c) general three-component equilibria, which include the case $q = 0$, i.e., the formation of pure binary complexes of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$. The overall protonation constants of 5'-GMP and L-His anion were taken from the literature [52]. The stability constants of hydrolytic complexes of $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ ion were determined in separate experiments. Thus, in evaluation of three-component equilibria (c), the binary models (a) and (b) were considered as known. The concentration stability constants of the complexes, $\beta_{p,q,r}$ were calculated with the aid of the suite of computer programs Hyperquad 2006 [50]. In Hyperquad calculations, the identity and stability of complexes that give the best fit to the experimental data were determined by minimizing the objective function U , defined by:

$$U = \sum_i W_i (E_{\text{obs}} - E_{\text{calc}})^2 \quad (7)$$

where E_{obs} and E_{calc} refer to the measured potential calculated from Eq. 5. The weighting factor W_i is defined as the reciprocal of the estimated variance of the measurement.

$$W_i = 1/\sigma^2 = 1/[\sigma_E^2 + (\delta E/\delta V)^2 \sigma_V^2] \quad (8)$$

where σ_E and σ_V are the estimated variances of the potential and volume readings, respectively. The quality of the fit was judged by the values of the sample standard

deviation S and the goodness of fit χ^2 (Pearson's test). At $\sigma_E = 0.1$ mV (0.001 pH error) and $\sigma_V = 0.005$ cm³, the values of S in different sets of titrations were between 1.0 and 1.8, and χ^2 was between 11.0 and 13.0. The scatter of residuals ($E_{\text{obs}} - E_{\text{calc}}$) versus pH was reasonably random, without any significant systematic trends, indicating a good fit of the experimental data. The finally accepted sets of complexes are given in Table 2. Statistical parameters, which determine the quality of the fit, are also given.

The spectrophotometric data were evaluated with the aid of the program pHAb 2006 [49] (which also belongs to the Hyperquad family but possesses some additional and improved features) and the program Hyperquad 2006, which can treat spectral data. Potentiometric and spectrometric data were made consistent by concomitantly evaluating both kinds of data with the aid of the Hyperquad 2006 suite of programs using the best model obtained in separate treatments. Distribution of species in solution was calculated by the program Hyss 2006 [53].

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

References

1. Reedijk J (1999) Chem Rev 99:2499
2. Wang D, Lippard SJ (2005) Nat Rev Drug Disc 4:307
3. Lippert B (1999) Cisplatin, chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Wiley VCH, Zurich
4. Jakubec MA, Galanski M, Keppler BK (2003) Rev Physiol Biochem Pharmacol 146:1
5. Door RT (1996) In: Pinedo HM, Schornagel JH (eds) Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. Plenum, New York
6. Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR (1999) Chem Rev 99:2511
7. Clarke MJ (2002) Coord Chem Rev 232:69
8. Moucheron C (2009) New J Chem 33:235
9. Ronconi L, Sadler PJ (2007) Coord Chem Rev 251:1633
10. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK (2008) Dalton Trans 183
11. Durig JR, Danneman J, Behnke WD, Mercer EE (1976) Chem Biol Interact 13:287
12. Novakova O, Kasparkova J, Vrana O, Vanvliet PM, Reedijk J, Brabec V (1995) Biochemistry 34:12369
13. Vanvliet PM, Toekimin SMS, Haasnoot JG, Reedijk J, Novakova O, Vrana O, Brabec V (1995) Inorg Chim Acta 231:57
14. Vilaplana R, Romero M, Quiros M, Salas J, Gonzalez-Vilches F (1995) Met-Based Drugs 2:211
15. Chatterjee D, Mitra A, De GS (2006) Platinum Met Rev 50:2
16. Alessio E, Mestroni G, Nardin G, Attia WM, Calligaris M, Sava G, Zorzet S (1988) Inorg Chem 27:4099
17. Sava G, Pacor S, Zorzet S, Alessio E, Mestroni G (1989) Pharmacol Res 21:617
18. Coluccia M, Sava G, Loseto F, Nassi A, Bocarelli A, Giordano D, Alessio E, Mestroni G (1993) Eur J Cancer 29:1873
19. Velders AH, Kooijman H, Spek AL, Haasnoot JG, de Vos D, Reedijk J (2000) Inorg Chem 39:2966

20. Hotze ACG, Caspers SE, de Vos D, Kooijman H, Spek AL, Flamigni A, Bacac M, Sava G, Haasnoot JG, Reedijk J (2004) *J Biol Inorg Chem* 9:354
21. Keppler BK, Lipponer KG, Stenzel B, Kratz F (1993) In: Keppler BK (ed) *Metal complexes in cancer chemotherapy*. VCH, Weinheim, Germany
22. Mestroni G, Alessio E, Sava G, Pacor S, Coluccia M (1993) In: Keppler BK (ed) *Metal complexes in cancer chemotherapy*. VCH, Weinheim, Germany
23. Alessio E, Mestroni G, Bergamo A, Sava G (2004) *Curr Top Med Chem* 4:1525
24. Gava B, Zorzet S, Spessotto P, Cocchietto M, Sava G (2006) *J Pharmacol Exp Ther* 317:284
25. Clarke MJ (2003) *Coord Chem Rev* 236:209
26. Chen H, Parkinbison JA, Morris RE, Sadler PJ (2003) *J Am Chem Soc* 125:173
27. Sava G, Bergamo A, Zorzet S, Gava B, Casrs C, Cocchietto M, Furlani A, Scarcia V, Serli B, Iengo E, Alessio E, Mestroni G (2002) *Eur J Cancer* 38:427
28. Corral E, Hotze ACG, den Dulk H, Leczkowska A, Rodger A, Hannon MJ, Reedijk J (2009) *J Biol Inorg Chem* 14:439
29. Kobayashi K, Ohtsu H, Wada T, Kato T, Tanaka K (2003) *J Amer Chem Soc* 125:6729
30. Chanda N, Mobin SM, Puranik VG, Datta A, Niemeyer M, Lahiri GK (2004) *Inorg Chem* 43:1056
31. Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N (2011) *J Med Chem* 54:3
32. Süß-Fink G (2010) *Dalton Trans* 39:1673
33. Morris RE, Aird RE, Murdoch PS, Chen H, Cummings J, Hughes ND, Parsons S, Parkin A, Boyd G, Jodrell D, Sadler PJ (2001) *J Med Chem* 44:3616
34. Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, Delfino R, Cocchietto M, Laurency G, Geldbach TJ, Sava G, Dyson PJ (2005) *J Med Chem* 48:4161
35. Ang WH, Casini A, Sava G, Dyson PJ (2011) *J Organomet Chem* 696:989
36. Rilak A, Brastos I, Zangrando E, Kljun J, Turel I, Bugarcic ZD, Alessio E (2012) *Dalton Trans* 41:11608
37. Rilak A, Petrovic B, Grguric-Sipka S, Tresic Z, Bugarcic ZD (2011) *Polyhedron* 30:2339
38. Tang B, Yu FB, Li P, Tong L, Duan X, Xie T, Wang X (2009) *J Am Chem Soc* 131:3016
39. Gao YH, Wu JY, Li YM, Sun PP, Zhou HP, Yang JX, Zhang SY, Jin BK, Tian YP (2009) *J Am Chem Soc* 131:5208
40. Peterson JR, Smith TA, Thordarson P (2010) *Org Biomol Chem* 8:15141
41. Kelland J (2007) *Nat Rev Cancer* 7:573
42. Dougan SJ, Melchart M, Habtemariam A, Parsons S, Sadler PJ (2006) *Inorg Chem* 45:10882
43. Wang F, Chen H, Parsons S, Oswald IDH, Davidson JE, Sadler PJ (2003) *Chem Eur J* 9:5810
44. Brastos I, Serli B, Zangrando E, Katsaros N, Alessio E (2007) *Inorg Chem* 46:975
45. Ashby MT (1990) *Comments Inorg Chem* 10:297
46. Murray SG, Hartley FR (1981) *Chem Rev* 81:365
47. Pearson RG (1973) In: *Hard and soft acids and bases*. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, PA
48. Vaidyanathan VG, Nair U (2005) *Dalton Trans* 2842
49. Gans P, Sabatini A, Vacca A (1999) *Ann Chim* 89:45
50. Gans P, Sabatini A, Vacca A (1996) *Talanta* 43:1739
51. Sullivan BP, Calvert JM, Mayer TJ (1980) *Inorg Chem* 19:1404
52. Bugarcic ZD, Soldatovic T, Jelic R, Alguero B, Grandas A (2004) *Dalton Trans* 3869
53. Alderighi L, Gans P, Ienco A, Peters D, Sabatini A, Vacca A (1999) *Coord Chem Rev* 184:311

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани – а АЛЕКСАНДАР МИЈАТОВИЋ
број уписа 21/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗАМ СУПСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА
КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА (II) И РУТЕНИЈУМА (II)

- 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 аутора

У Крагујевцу, 09.04.2015.

Aleksandar Mijatovic'

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора АЛЕКСАНДАР МИЈАТОВИЋ
Број уписа 21/08
Студијски програм ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ
Наслов рада КИНЕТИКА И МЕХАНИЗАМ СУБСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) И РУТЕНИЈУМА(II)
Ментор Проф. др. ЖИВАДИН Д. БУГАРЧИЋ

Потписани АЛЕКСАНДАР МИЈАТОВИЋ

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктор 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 Крагујевцу.

Потпис аутора

У Крагујевцу 09.04.2015.

Aleksandar Mijatovic'

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗАМ СУБСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА

КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА (II) И РУТЕНИЈУМА (II)

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 Крагујевцу могу да се 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 – без прераде
3. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
4. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу 09.04.2015.

Aleksandra Mijatović