



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

Снежана Јовановић

**МЕХАНИЗАМ НУКЛЕОФИЛНИХ СУПСТИТУЦИОНИХ
РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА Pt(IV) И ДИНУКЛЕАРНИХ
КОМПЛЕКСА Pt(II)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2013

I. Аутор

Име и презиме: **Снежана Јовановић**

Датум и место рођења: **18. 08. 1982., Параћин**

Садашње запослење: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

II. Докторска дисертација

Наслов: **Механизам нуклеофилних супституционих реакција комплекса Pt(IV) и динуклеарних комплекса Pt(II)**

Број страница: **117**

Број слика: **50**

Број библиографских јединица: **157**

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

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

Ментор: **др Живадин Д. Бугарчић**

III. Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: **11. 01. 2012. год.; 10. 10. 2012. год.**

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

- 1. Др Живадин Д. Бугарчић, ментор, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 2. Др Милош И. Ђуран, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 3. Др Биљана Петровић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 4. Др Тања Солдатовић, доцент, Универзитет у Новом Пазару, Нови Пазар,
Ужа научна област: Хемија**

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: **370/X-1; 29. 05. 2013. год.**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

- 1. Др Живадин Д. Бугарчић, ментор, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 2. Др Милош И. Ђуран, редовни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 3. Др Тибор Сабо, редовни професор, Хемијски факултет, Београд,
Ужа научна област: Неорганска хемија**
- 4. Др Биљана Петровић, ванредни професор, ПМФ, Крагујевац,
Ужа 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 И. Ђурану и др Тибору Сабоу на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе.

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

Захвалност дугујем др Тањи Солдатовић на помоћи током израде експеримената и обраде добијених резултата. Сарадницима из групе проф. Бугарчића захваљујем на указаном разумевању и заједничком раду. Др Јовани Богојески се захваљујем на великој помоћи и подршци у изради и завршном кориговању тезе.

Велику захвалност дугујем породици и Милану на указаној подршци и разумевању. Посебно се захваљујем родитељима што су ми увек били велики ослонац у животу, на безусловној љубави и поверењу.

СПИСАК РАДОВА

1. Jovanović Snežana, Petrović Biljana and Bugarčić D. Živadin
The UV-Vis, HPLC and ¹H NMR studies of the substitution reactions of some Pt(IV) complexes with 5'-GMP and L- histidine;
Journal of Coordination Chemistry, 2010, **63**, 2419-2430
2. Jovanović Snežana, Petrović Biljana, Čanović Dragan and Bugarčić D. Živadin
Kinetics of the substitution reactions of some Pt(II) complexes with 5'-GMP and L- histidine;
International Journal of Chemical Kinetics, 2011, **43**, 99-106
3. Soldatović Tanja, Jovanović Snežana, Bugarčić D. Živadin and van Eldik Rudi
Substitution behaviour of novel dinuclear Pt(II) complexes with bio-relevant nucleophiles;
Dalton Transactions, 2012, **41**, 876-884
4. Arsenijević Miloš, Milovanović Marija, Volarević Vladislav, Čanović Dragan, Arsenijević Nebojša, Soldatović Tanja, Jovanović Snežana and Bugarčić D. Živadin
Cytotoxic properties of platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes and their ligand substitution reactions with guanosine-5'-monophosphate
Transition Metal Chemistry, 2012, **37**, 481-488
5. Jovanović Snežana, Petrović Biljana, Bugarčić D. Živadin and van Eldik Rudi
Reduction of some Pt(IV) complexes with biologically important sulfur-donor ligands
Dalton Transactions, 2013, **42**, 8890 - 8896

Саопштења на међународним научним конференцијама

1. Jovanović Snežana, Petrović Biljana and Bugarčić D. Živadin
The UV-Vis, HPLC and NMR studies of the substitution reactions of [Pt(dach)Cl₄] complex with 5'-GMP and L-His
10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2009,
Debrecen, Hungary, September 25-28, Abstract P-12
2. Petrović Biljana, Jovanović Snežana and Bugarčić D. Živadin
Mechanism of the substitution reactions of some Pt(IV) complexes with 5'-GMP and L-histidine
10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2010,
Thessaloniki, Greece, June 22-26, Abstract P-197
3. Jovanović Snežana, Soldatović Tanja and Bugarčić D. Živadin
The study of kinetics and mechanism between dinuclear Pt(II) complex with some biologically relevant nucleophiles
3rd EuCheMS Chemistry Congress, 2010,
Nurnberg, Germany, August 29 - September 02, Abstract P-20

Саопштења на националним научним конференцијама

1. Jovanović Snežana, Soldatović Tanja i Bugarčić D. Živadin
Kinetika i mehanizam supstitucionih reakcija dinuklearnih kompleksa platine(II) sa biološki važnim ligandima
XLIX savetovanje srpskog hemijskog društva, 2011,
Kragujevac, Srbija, Maj 13-14, Abstrakt-NH05-O

ИЗВОД

Испитивање комплекса платине значајно је са биолошког и медицинског аспекта. Добро је познато да се неки комплекси платине(II) јона, као што су цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина, интензивно користе у хемиотерапији као антитуморски реагенси. Последњих 40 година велики број других једињења платине(II) синтетисано је са циљем да се постигне боља активност и мања токсичност у односу на цисплатину. Ова истраживања су проширена и на синтезу и карактеризацију неklasичних комплекса платине, као што су комплекси платине(IV) или полинуклеарни комплекси платине(II). Механизам на основу кога комплекси платине испољавају антитуморску активност још увек није потпуно јасан. Сматра се да је то последица интеракције комплекса са молекулом ДНК. Експерименти су показали да је координовање цисплатине за молекул ДНК кинетички контролисан процес. Са друге стране, употреба антитуморских једињења платине у медицини ограничена је појавом многобројних споредних ефеката и резистентности. Такође, мала растворљивост у води је додатни проблем који умањује клиничку употребу ових једињења.

У живим системима, поред молекула ДНК који представљају главну мету комплекса платине, постоји велики број других биомолекула који потенцијално могу да реагују са комплексима платине(II) и платине(IV). Ту спадају аминокиселине, пептиди, протеини и ензими. Већ у крви, када антитуморско једињење на бази комплекса платине доспева парентерално или инфузијом, присутни су биомолекули који се могу везати за јон платине. Сумпор-донорски биомолекули имају велики афинитет према јону платине, а настала једињења су јако стабилна. Управо се интеракција између комплекса платине и биомолекула који садрже атом сумпора доводе у везу са појавом споредних негативних ефеката приликом терапије, као што су: нефротоксичност, гастротоксичност, ототоксичност, кардиотоксичност и неуротоксичност.

На основу великог броја публикованих радова у овој области бројни истраживачи су увидели проблеме везане за структуру, хемијско и биолошко понашање комплекса платине. У циљу проналаска везе између структуре и потенцијалне антитуморске активности комплекса платине, као и у циљу превазилажења многобројних споредних

ефеката, у оквиру ове докторске дисертације представљени су резултати испитивања реакција различитих комплекса платине(II) и платине(IV) са биолошки значајним лигандима. Добијени резултати представљени су следећим редоследом:

- Резултати испитивања супституционих реакција $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса са биолошки значајним азот-донорским лигандима, као што су 5'-GMP и L-His. Реакције су изучаване помоћу Uv-Vis спектрофотометрије, ^1H NMR спектроскопије и HPLC методе. Uv-Vis спектрофотометријски ове реакције су изучаване као реакције *псеудо*-првог реда, на 37 °C у 25 mM хепес пуферу (pH = 7,2) и 10 mM NaCl, како би се спречила хидролиза комплекса. Резултати су показали да комплекс $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ реагује брже у односу на $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ комплекс, што потврђује чињеницу да реактивност испитиваних платина(II) комплекса јако зависи од структуре инертног бидентатног лиганда. Такође, L-His је реактивнији од 5'-GMP. Реакције $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса са L-His су испитиване помоћу ^1H NMR спектроскопије. Добијене константе брзина су у сагласности са вредностима које су добијене помоћу Uv-Vis спектрофотометријске методе. На основу резултата испитивања помоћу HPLC методе може се закључити да је у свим изучаваним системима присутан само један производ реакције.
- Резултати испитивања супституционих реакција комплекса платине(IV), $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$, са 5'-GMP и L-His помоћу различитих експерименталних метода. Uv-Vis спектрофотометријски ове реакције су испитиване под условима реакције *псеудо*-првог реда на 37 °C у 25 mM хепес пуферу (pH = 7,2) и 10 mM NaCl. Реакција супституције комплекса $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$ са 5'-GMP је испитивана под истим експерименталним условима. У реакцији са 5'-GMP реактивност комплекса опада у низу: $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$. Понашање $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$ комплекса у реакцијама супституције зависи, пре свега, од π -акцепторских особина инертног 2,2'-бипиридин лиганда, који повећава електрофилност јона метала, а самим тим и реактивност комплекса. Комплекс $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ реагује брже у односу на $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ комплекс. Такође, L-His је бољи нуклеофил од 5'-GMP. На основу резултата добијених ^1H NMR спектроскопијом потврђена је претпоставка да се полазни

комплекс платине(IV) редукује у току процеса супституције до одговарајућег комплекса платине(II). Реакције су такође испитиване помоћу HPLC методе. Добијене промене у интензитету сигнала и њихово ретенционо време показују да на крају процеса супституције у систему постоји само један производ реакције.

- Резултати испитивања процеса редукције платина(IV) комплекса, $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$, у реакцији са GSH, L-Cys и L-Met помоћу stopped-flow спектрофотометријске методе на $\text{pH} = 2,0$ (у $0,01 \text{ M HClO}_4$) и на $\text{pH} = 7,2$ (у 25 mM хепес пуферу). Све реакције су испитиване на $37 \text{ }^\circ\text{C}$ у присуству $0,2 \text{ M NaCl}$. Кинетичка мерења су вршена под условима реакције *псеудо*-првог реда. Добијени резултати су показали да тенденција за редукцију комплекса опада у низу: $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$. Редослед реактивности изучаваних лиганата је исти за сваки изучавани комплекс и опада у низу: $\text{GSH} > \text{L-Cys} > \text{L-Met}$. Овакав редослед реактивности лиганата се може повезати са различитим протолитичким облицима лиганата у киселој и неутралној средини. Све реакције између испитиваних платина(IV) комплекса и сумпор-донорских биомолекула подлежу процесу редуктивне елиминације. Процес укључује нуклеофилни напад редуктанта на један од могућих *trans* координованих хлоридо лиганата, преко кога се врши трансфер електрона. Коначни производ реакције је одговарајући комплекс платине(II) и оксидовани облик лиганата. Присуство оксидованог облика глутатиона, GSSG, у реакционој смеси између $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса и GSH потврђено је помоћу $^1\text{H NMR}$ спектроскопије.
- Синтетисани су нови динуклеарни платина(II) комплекси, $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-пиразин})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt1**), $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-4,4' -бипиридин})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{DMF}$ (**Pt2**) и $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**). Резултати добијени испитивањем реакција супституције поменутих комплекса са лигандима као што су Tu, GSH и 5'-GMP на $\text{pH} = 2,5$ и $\text{pH} = 7,2$ су приказани. Реакције су праћене под условима реакције *псеудо*-првог реда помоћу stopped-flow и класичне Uv-Vis спектрофотометрије. $^1\text{H NMR}$ спектроскопија је коришћена за изучавање процеса супституције хлоридо јона у $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-4,4' -$

бипиридин)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) комплексу помоћу молекула 5'-GMP под условима реакције другог реда. Резултати су показали да мостни лиганд има значајан утицај на реактивност динуклеарног комплекса платине(II) према одабраним нуклеофилима. Супституција хлоридо јона у [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-1,2-бис(4-пиридил)етан)](ClO₄)₂ (**Pt3**) комплексу са 5'-GMP је испитивана помоћу ¹H NMR спектроскопије. Добијене су веома сличне вредности за константу брзине у односу на вредности добијене Uv-Vis спектрофотометријски.

- Испитивана је цитотоксичност [Pt(bipy)Cl₄], [Pt(dach)Cl₄], [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-пиразин)](ClO₄)₂ (**Pt1**), [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-4,4'-бипиридин)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) и [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-1,2-бис(4-пиридил)етан)](ClO₄)₂ (**Pt3**) комплекса. Резултати су показали да ова једињења испољавају велику цитотоксичну активност према ћелијској линији тумора јајника TOV21G, а нижу активност према ћелијској линији тумора дебелог црева HCT116 при истим концентрацијама.

SUMMARY

The chemistry of platinum complexes is important from biological and medical point of view. It is well known that some complexes of platinum(II), such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, are frequently used in chemotherapy as anticancer reagents. In the last 40 years a large number of other platinum(II) compounds are synthesized in order to achieve higher activity and lower toxicity in relation to cisplatin. These studies were extended to the synthesis and characterization of some non-classical platinum complexes, such as platinum(IV) complexes or polynuclear platinum(II) complexes. Based mechanism in which platinum complexes exhibit antitumor activity is not clear yet. But, a number of published results explain that the antitumor activity of platinum compounds is a result of complex interactions with DNA molecule. Experiments have shown that the coordination of cisplatin to DNA molecule is kinetically controlled process. On the other hand, the application of platinum anticancer compounds in medicine is limited by the numerous side effects and resistance. Also, low solubility in water is another problem which reduces the clinical use of these compounds.

In living systems, except DNA molecules which are the main target for platinum complexes, there are a number of other molecules that can potentially react with platinum(II) and platinum(IV) complexes as well. These include amino acids, peptides, proteins and enzymes. When the antitumor platinum-based compound reaches parenteral or by infusion, present biomolecules in the blood can bind to the platinum ion. Sulfur donor biomolecules have great affinity for platinum ion and resulting compounds are very stable. Namely, the interaction between platinum complexes and biomolecules which contain sulfur atom are associated with negative side effects during treatment, such as nephrotoxicity, gastrotoxicity, ototoxicity, cardiotoxicity and neurotoxicity.

Based on the large number of published papers in this area, a lot of researchers have realized numerous issues associated with the structure, chemical and biological behaviour of platinum complexes. For the purpose to find the connection between the structure and potential antitumor activity of platinum complexes and in order to overcome many side effects that occur, here we presented the results of investigation the reactions of different platinum(II) and

platinum(IV) complexes with biologically relevant ligands. The results are presented in the following order:

- The results of investigation of substitution reactions of [Pt(dach)Cl₂] and [Pt(en)Cl₂] complexes with biologically important nitrogen-donor ligands, such as 5'-GMP and L-His. The reactions are studied using Uv-Vis spectrophotometry, ¹H NMR spectroscopy and HPLC method. By Uv-Vis spectrophotometry these reactions were followed as *pseudo*-first order reactions at 37 °C in 25 mM hepes buffer (pH = 7,2) and 10 mM NaCl, in order to prevent hydrolysis of the complexes. The results showed that complex [Pt(en)Cl₂] reacts faster than [Pt(dach)Cl₂] complex, what confirms the fact that reactivity of platinum(II) complexes strongly depends on the structure of inert bidentate ligands. Also, L-His is more reactive than 5'-GMP. The reactions of [Pt(dach)Cl₂] and [Pt(en)Cl₂] complexes with L-His were investigated using ¹H NMR spectroscopy. The obtained rate constants are in good agreement with the values determined by Uv-Vis spectrophotometry. Based on the results obtained by HPLC can be concluded that in all of studied systems is present only one final product.
- The results of substitution reactions of platinum(IV) complexes, [Pt(en)Cl₄] and [Pt(dach)Cl₄], with 5'-GMP and L-His using different experimental methods. By Uv-Vis spectrophotometry these reactions were studied under *pseudo*-first order conditions at 37 °C in 25 mM hepes buffer (pH = 7,2) and 10 mM NaCl. Substitution reaction of [Pt(bipy)Cl₄] complex with 5'-GMP was investigated under the same experimental conditions. In the reaction with 5'-GMP the reactivity of complexes decreases in order: [Pt(bipy)Cl₄] > [Pt(en)Cl₄] > [Pt(dach)Cl₄]. The behaviour of [Pt(bipy)Cl₄] complex in substitution reactions depends, above all, on the π-acceptor properties of inert 2,2'-bipyridine ligand, which increases electrophilicity of metal ion and simultaneously its reactivity. The complex [Pt(en)Cl₄] reacts faster than [Pt(dach)Cl₄] complex. Also, L-His is a better nucleophile than 5'-GMP. Based on the results obtained by ¹H NMR spectroscopy can be confirmed the assumption that the starting platinum(IV) complexes undergo reduction in the process of substitution to the corresponding platinum(II) complex. Reactions were also examined by HPLC method. Observed changes in signal

intensities and their retention times show that at the end of substitution in all systems is present only one final product.

- The results of investigation of reduction of platinum(IV) complexes, [Pt(bipy)Cl₄], [Pt(dach)Cl₄] and [Pt(en)Cl₄], in the reactions with GSH, L-Cys and L-Met by stopped-flow spectrophotometry at pH = 2,0 (in 0,01 M HClO₄) and at pH = 7,2 (in 25 mM hepes buffer). All reactions were studied at 37 °C in the presence of 0,2 M NaCl. Kinetic measurements were monitored under *pseudo*-first order conditions. The obtained results showed that the tendency for reduction of selected complexes decreases in the order: [Pt(bipy)Cl₄] > [Pt(dach)Cl₄] > [Pt(en)Cl₄]. The order of reactivity of the studied ligands is the same for each studied complex and follow the order: GSH > L-Cys > L-Met. This can be associated with different protolytic forms of ligands in acidic and neutral media. All of studied reactions between platinum(IV) complexes and sulfur donor biomolecules undergo reductive elimination process. This process involves the nucleophilic attack of reductant to the *trans* chloride ligand, through which the transfer of electrons occurs. The final products of the reaction are the corresponding platinum(II) complex and oxidized forms of ligand. The presence of oxidized form of glutathione, GSSG, in the reaction mixture between [Pt(en)Cl₄] complex and GSH, was confirmed by ¹H NMR spectroscopy.
- A new dinuclear platinum(II) complexes, [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-pyrazine)](ClO₄)₂ (**Pt1**), [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-4,4'-bipyridine)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) and [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-1,2-*bis*(4-pyridyl)ethane)](ClO₄)₂ (**Pt3**) were synthesized. The obtained results for substitution reactions these complexes with ligands such as Tu, GSH and 5'-GMP at pH = 2,5 and pH = 7,2 are shown. Reactions were monitored under the *pseudo*-first order conditions by stopped-flow and conventional Uv-Vis spectrophotometry. ¹H NMR spectroscopy was used to study the process of substitution of chloride ion in [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-4,4'-bipyridine)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) complex with 5'-GMP under second order reaction conditions. The results showed that the bridging ligand has a significant effect on the reactivity of dinuclear platinum(II) complexes toward selected nucleophiles. Substitution of chloride ion in

[{*trans*-PtCl(NH₃)₂}₂(μ -1,2-*bis*(4-pyridyl)ethane)](ClO₄)₂ (**Pt3**) complex with 5'-GMP was investigated by ¹H NMR spectroscopy. The obtained values for the rate constant are very similar with values determined by Uv-Vis.

- The cytotoxicity of the following complexes [Pt(bipy)Cl₄], [Pt(dach)Cl₄], [{*trans*-PtCl(NH₃)₂}₂(μ -pyrazine)](ClO₄)₂ (**Pt1**), [{*trans*-PtCl(NH₃)₂}₂(μ -4,4'-bipyridine)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) and [{*trans*-PtCl(NH₃)₂}₂(μ -1,2-*bis*(4-pyridyl)ethane)](ClO₄)₂ (**Pt3**) is investigated as well. The results showed that these compounds exhibit high cytotoxic activity against ovarian cancer cell line TOV21G and a lower activity against the tumor cell line HCT116 at the same concentrations.

СКРАЋЕНИЦЕ И ОЗНАКЕ

Uv-Vis	ултраљубичаста и видљива спектрофотометрија
$^1\text{H NMR}$	нуклеарно магнетна резонантна спектроскопија
HPLC	течна хроматографија високих перформанси, (течна хроматографија под високим притиском)
IR	инфрацрвена спектрографија
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 ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{M}^{-1}$)
T	температура у Келвиновим степенима (K)
ΔH^\ddagger	промена енталпије активирања
ΔS^\ddagger	промена ентропије активирања
ΔG^\ddagger	промена слободне (Гибсове) енергије
ΔV^\ddagger	промена запремине активирања
N	Авогадров број ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
h	Планкова константа ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$)
P	притисак
k_1	константа брзине хемијске реакције која се одиграва по солволитичком путу
k_2	константа брзине директне реакције супституције
k	константа брзине хемијске реакције
k_o	фактор учестаности
bipy	2,2'-бипиридин
dach	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-диаминциклохексан
en	етилендиамин
ox	оксалато лиганд
цисплатина	<i>cis</i> -диаминдихлоридоплатина(II)
трансплатина	<i>trans</i> -диаминдихлоридоплатина(II)
карбоплатина	<i>cis</i> -диамин(1,1-циклобутандикарбоксилато)платина(II)
оксалиплатина	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-диаминциклохексан(оксалато)платина(II)
тетраплатина	тетрахлоридо(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-диаминциклохексан платина(IV)
ипроплатина	дихидроксодихлоридобис(изопропиламин) платина(IV)
сатраплатина	бис(ацетато) амин(циклохексиламин) дихлоридоплатина(IV)
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
5'-dGMP	деокси гуанозин-5'-монофосфат
3'-dGMP	деокси гуанозин-3'-монофосфат
1,2-(GpG)	1,2-гуанилил(3' - 5')гуанозин
1,2-(ApG)	1,2-аденозил(3' - 5')гуанозин
1,3-(GpG)	1,3-гуанилил(3' - 5')гуанозин
1,4-(GpG)	1,4-гуанилил(3' - 5')гуанозин
DMSO	диметил сулфоксид
azn	азин
pzn	пиразин
2,3-pzn	2,3-пиразин
2,5-pzn	2,5-пиразин
DDTC	диетилдитиокарбамат
EDTA	анјон етилендиаминтетрасирћетне киселине
GSSG	глутатион дисулфид
DMF	диметилформаид
Tu	тиоуреа
A	апсорбција раствора
t	време у секундама (s)
k _{obsd}	константа брзине реакције <i>псеудо</i> -првог реда
TSP	натријум-триметилсилилпропан-3-сулфат
K _a	константа киселости

САДРЖАЈ

Увод	1
1. Општи део	
1.1. Супституционе реакције комплексних једињења.....	4
1.2. Активациони параметри.....	6
1.3. Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса.....	9
1.4. Утицај различитих фактора на брзину супституције квадратно-планарних комплекса.....	12
1.4.1. Ефекат улазног и одлазећег лиганда.....	12
1.4.2. <i>Trans</i> -ефекат.....	13
1.5. Јони прелазних метала у медицини.....	13
1.6. Комплекси платине(II) као антитуморски агенси.....	15
1.7. Реакције супституције октаедарских комплекса.....	18
1.7.1. Утицај одлазећег лиганда.....	18
1.7.2. Утицај инертног лиганда.....	19
1.7.3. Стерне сметње.....	20
1.7.4. Редокс-реакције октаедарских комплекса.....	20
1.8. Комплекси платине(IV) као антитуморски агенси.....	20
1.9. Структура и редукциони потенцијал комплекса платине(IV).....	24
1.10. Редукциони потенцијал и биолошка активност комплекса платине(IV).....	25
1.11. Липофилност комплекса платине(IV).....	25
1.12. Интеракције комплекса платине(IV) са азот-донорским лигандима.....	26
1.13. Интеракције комплекса платине(IV) са сумпор-донорским лигандима.....	30
1.14. Полинуклеарни комплекси платине(II).....	32
Задатак рада	39
2. Експериментални део	
2.1. Реагенси и раствори.....	40
2.1.1. Синтеза комплекса.....	41

2.2.	Инструменти.....	44
2.3.	Кинетичка мерења.....	44
2.3.1.	Супституционе реакције комплекса платине(II) и платине(IV).....	44
2.3.2.	Редокс-реакције комплекса платине(IV).....	45
2.3.3.	Реакције динуклеарних комплекса Pt1, Pt2 и Pt3 и њихових диаква аналога Pt1a, Pt2a и Pt3a са тиоуреом, глутатионом и гуанозин-5'- монофосфатом.....	46
2.4.	¹ H NMR мерења.....	46
2.5.	HPLC метода.....	47
2.6.	Спектрофотометријска титрација јона Pt1a, Pt2a и Pt3a.....	48
2.7.	Испитивање цитотоксичности - МТТ тест.....	48
3. Резултати и дискусија резултата		
3.1.	Испитивање кинетике супституционих реакција [Pt(dach)Cl ₂] и [Pt(en)Cl ₂] комплекса са гуанозин- 5'-монофосфатом и L- хистидином.....	50
3.1.1.	Uv-Vis спектрофотометријска мерења.....	50
3.1.2.	¹ H NMR кинетичка мерења.....	55
3.1.3.	HPLC метода.....	58
3.2.	Испитивање супституционих реакција [Pt(bipy)Cl ₄], [Pt(dach)Cl ₄] и [Pt(en)Cl ₄] комплекса са азот-донорским лигандима.....	60
3.2.1.	Uv-Vis спектрофотометријска мерења.....	60
3.2.2.	¹ H NMR спектроскопска мерења.....	65
3.2.3.	HPLC метода.....	69
3.3.	Редукција комплекса [Pt(bipy)Cl ₄], [Pt(dach)Cl ₄] и [Pt(en)Cl ₄] помоћу глутатиона, L-цистеина и L-метионина.....	71
3.3.1.	Stopped-flow спектрофотометријска мерења.....	71
3.3.2.	¹ H NMR мерења.....	83
3.4.	Испитивање супституционих реакција нових динуклеарних платина(II) комплекса са тиоуреом, глутатионом и гуанозин-5'-монофосфатом.....	84
3.4.1.	¹ H NMR кинетичка мерења.....	95

3.4.2.	Одређивање pK_a вредности $[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-пиразин})]^{4+}$ (Pt1a), $[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-4,4' -бипиридин})]^{4+}$ (Pt2a), $[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2$ $(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})]^{4+}$ (Pt3a) комплексних јона.....	99
3.5.	Испитивање цитотоксичности комплекса платине(IV) и динуклеарних комплекса платине(II).....	102
	Закључак	105
	Литература	108
	Биографија	117

УВОД

Прелазни метали и њихове реакције имају важну улогу у техничким процесима (катализа, екстракција, итд.), у биологији и медицини (биолошки трансфер електрона, токсикологија, коришћење комплекса јона метала као лекова). Јони метала налазе све већу примену у биолошким системима како за терапеутску апликацију тако и као дијагностичка средства. Познато је да се комплекси неких јона метала користе за лечење болести (канцер, артритис, дијабетес, Алцхајмерова болест, итд.), али је механизам њиховог деловања у биолошким системима још увек непознат.^{1,2} Један од главних циљева бионеорганске хемије је разјашњавање механизма деловања комплекса јона метала у биолошким система.¹⁻³

Открићем антитуморских карактеристика комплекса цисплатине крајем шездесетих година прошлог века започела су интензивна истраживања у области једињења платине.⁴ Успех цисплатине изазвао је велико интересовање за развој нових комплекса платине(II). Тако се данас цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина интензивно користе као антитуморски лекови. Након тога су многобројна истраживања била усмерена на синтезу нових комплекса платине, са циљем добијања једињења које би имало боље карактеристике, већу антитуморску активност, а мању токсичност у односу на цисплатину.

Комплекси платине(II) су типични представници квадратно-планарних комплекса, док платина(IV) јон гради октаедарске комплексе. За неке комплексе платине(IV) се показало да имају бољу антитуморску активност од цисплатине. Њихова предност у односу на комплексе платине(II) се огледа у већој стабилности и нижој токсичности.⁵

Поред мононуклеарних комплекса платине(II), последњих година велика пажња је усмерена према комплексима који у својој структури имају више јона метала. Разлог за великим интересовањем према полинуклеарним комплексима платине је њихова способност да са молекулом ДНК формирају производе који се структурно разликују од оних које формирају цисплатина и слични комплекси, што истовремено подразумева потпуно другачије антитуморско понашање.

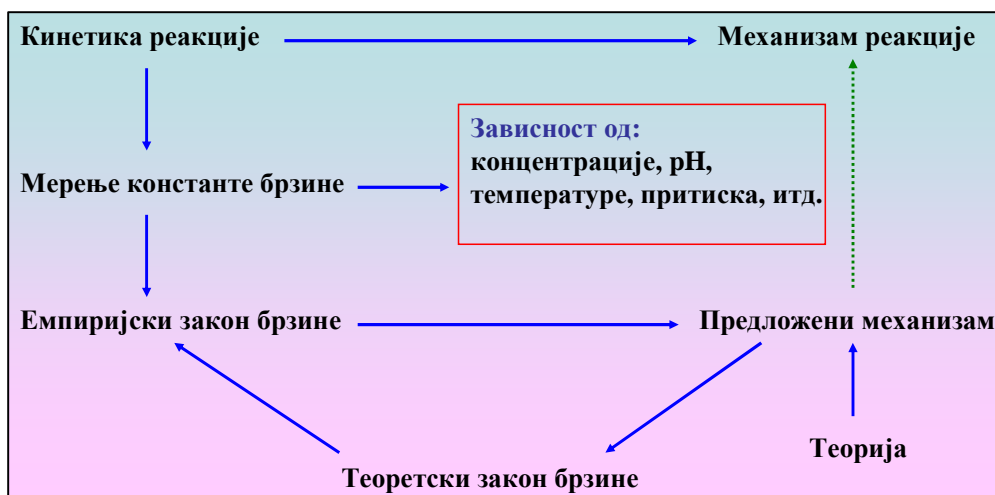
Из поменутих разлога неопходно је детаљно познавање механизма хемијских реакција комплекса платине(II) и платине(IV) са биомолекулима. У оквиру ове докторске дисертације испитивани су мононуклеарни и динуклеарни комплекси платине(II), као и неки комплекси платине(IV) у реакцијама са различитим биомолекулима. У *Општем делу* детаљно су описане супституционе реакције квадратно-планарних комплекса са посебним освртом на бројне факторе који утичу на процес супституције. Такође, описан је начин антитуморског дејства комплекса платине(II). Представљен је детаљан опис комплекса платине(IV), као и низ фактора који утичу на механизам реакције и антитуморску активност ових једињења. Дат је преглед досадашњих публикованих резултата на пољу интеракција комплекса платине(IV) са различитим сумпор- и азот-донорским биомолекулима. Приказане су особине полинуклеарних комплекса платине(II) и описане њихове интеракције са различитим сумпор- и азот-донорским биомолекулима. У *Експерименталном делу* су поред начина припреме коришћених реагенаса и раствора, описане методе коришћене приликом испитивања реакција, као и методе за изучавање хидролизе динуклеарних комплекса платине(II). У поглављу *Резултати и дискусија резултата* приказани су резултати испитивања кинетике и механизма супституционих реакција комплекса $[Pt(dach)Cl_2]$ и $[Pt(en)Cl_2]$ са L-His и 5'-GMP, као и резултати испитивања супституционих реакција $[Pt(dach)Cl_4]$ и $[Pt(en)Cl_4]$ комплекса са L-His и 5'-GMP, применом различитих експерименталних метода. Резултати испитивања кинетике и механизма супституционе реакције $[Pt(bipy)Cl_4]$ комплекса са 5'-GMP су такође приказани у овом делу. Детаљно су описани резултати добијени испитивањем кинетике редокс-реакција комплекса $[Pt(bipy)Cl_4]$, $[Pt(dach)Cl_4]$ и $[Pt(en)Cl_4]$ са сумпор-донорским лигандима GSH, L-Cys, L-Met на различитим рН вредностима. У току израде ове тезе синтетисана су три нова динуклеарна комплекса платине(II), $[{trans-PtCl(NH_3)_2}_2(\mu\text{-пиразин})](ClO_4)_2$ (**Pt1**), $[{trans-PtCl(NH_3)_2}_2(\mu\text{-4,4'-бипиридин})](ClO_4)_2 \cdot DMF$ (**Pt2**) и $[{trans-PtCl(NH_3)_2}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})](ClO_4)_2$ (**Pt3**). Одређене су њихове константе киселости и испитане су реакције супституције поменутих комплекса са различитим биомолекулима Tu, GSH, 5'-GMP, на рН = 2,5 и рН = 7,2. На крају се налазе резултати испитивања цитотоксичности одабраних комплекса.

Резултати ове докторске дисертације објављени су у оквиру 5 научних радова.

1. ОПШТИ ДЕО

Изучавање механизма реакције има за циљ утврђивање елементарних реакционих корака који воде ка настанку производа реакције, затим утврђивање брзине којом од реактаната настаје производ реакције и на крају утврђивање утицаја реакционих услова (промена концентрације реактаната, промена температуре и притиска, увођење катализатора, рН, јонска јачина раствора, итд.) на брзину реакције. Одређивање механизма реакције такође подразумева анализу начина на који се хемијска веза раскида и начина на који се нова веза формира. Пошто сваки елементарни корак реакције има свој механизам, комплетно објашњење реакционог механизма је тешко достижан циљ.

У Шеми 1.1 су приказани сви чиниоци које треба узети у обзир приликом одређивања механизма хемијске реакције.⁶



Шема 1.1. Кораци у одређивању механизма хемијске реакције

Проучавање механизма неорганских реакција нагло започиње са развојем нових експерименталних техника (Uv-Vis спектрофотометрије, NMR спектроскопије, stopped-flow спектрофотометрије, HPLC методе, итд.).

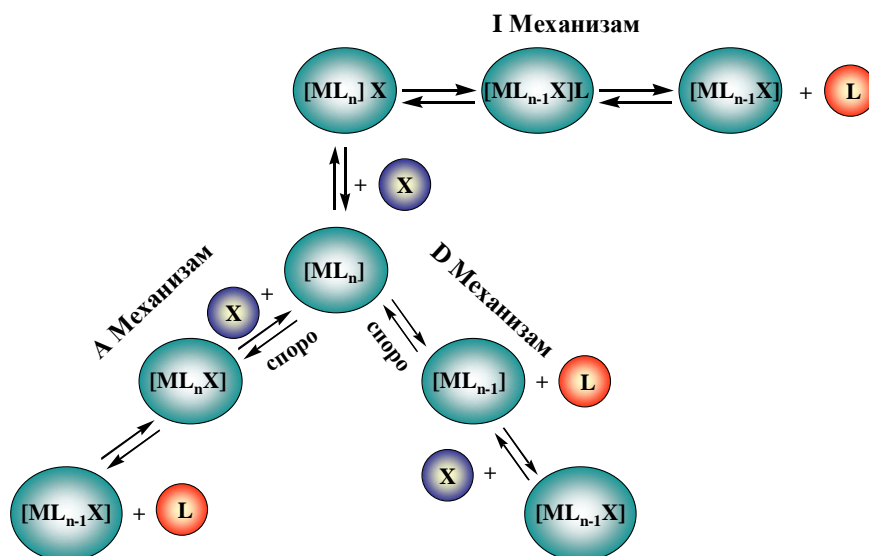
1.1. Супституционе реакције комплексних једињења

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 лиганата. Уколико се у току реакције супституише јон метала тј. електрофил, у питању је реакција електрофилне супституције, једначина (1.1.1), а уколико се врши замена лиганата, комплекс подлеже реакцији нуклеофилне супституције, једначина (1.1.2).



Нуклеофилне супституционе реакције, према Лангфорду (Langford) и Греју (Gray),⁷ одвијају се по три различита механизма (Шема 1.2):

- Дисоцијативном механизму (D),
- Асоцијативном механизму (A) и
- Механизму измене (I)



Шема 1.2. Механизми нуклеофилне супституције комплексних једињења

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

Механизам измене (I) је процес код кога се, у првој фази, улазни лиганд X везује електростатичким силама за спољашњу координациону сферу комплекса. Потом долази до миграције улазног лиганда из спољашње у унутрашњу координациону сферу уз истовремену миграцију одлазећег лиганда L из унутрашње у спољашњу координациону сферу. 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 .^{7,8}

1.2. Активациони параметри

Одређивање механизма хемијске реакције заснива се на анализи добијених вредности термодинамичких параметара (ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔV^\ddagger) који карактеришу одређени процес. Један од битних података је вредност константе брзине хемијске реакције k , за чије одређивање постоји велики број експерименталних метода. Избор одговарајуће методе зависи како од брзине процеса који се проучава, тако и од особина учесника хемијске реакције.⁹ Један од критеријума 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 дефинисање механизма супституције. У случају D механизма пошто настаје интермедијер са смањеним координационим бројем, односно, повећава се неуређеност система, ΔS^\ddagger има позитивну вредност. Код асоцијативног механизма настаје интермедијер са повећаним координационим бројем, односно, смањује се неуређеност система, па ΔS^\ddagger има негативну вредност. У случају I механизма ΔS^\ddagger је приближно једнака нули.

Да би се одредила вредност за ΔS^\ddagger неопходно је познавање вредности константе брзине хемијске реакције на различитим температурама. Прво се одређује вредност енергије активирања, E_a , помоћу Аренијусове (Arrhenius) једначине (1.2.1).⁹⁻¹³

$$k = k_0 \exp(-E_a/RT) \quad (1.2.1)$$

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 (1.2.1) добија се израз

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT \quad (1.2.2)$$

у коме постоји линеарна зависност $\ln k$ у функцији $1/T$. Ова зависност је линеарна у ужем температурном интервалу од 30 – 40 °С. То значи да познавањем вредности константе брзине хемијске реакције за најмање три температуре, графичким путем се може одредити вредност члана $-E_a/R$, односно, вредност енергије активирања.^{9,12}

Промена енталпије активирања, ΔH^\ddagger , одређује се из једначине (1.2.3).

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (1.2.3)$$

Промена ентропије активирања, ΔS^\ddagger , представља промену слободне Гибсове (Gibbs) енергије, ΔG^\ddagger , са променом температуре T , што се може се изразити помоћу једначине (1.2.4)

$$\left(\frac{d(\Delta G^\ddagger)}{dT} \right) = -\Delta S^\ddagger \quad (1.2.4)$$

Вредност за ΔS^\ddagger одређује се на основу Ејрингове (Eyring) једначине (1.2.5)

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \right) \quad (1.2.5)$$

С обзиром да се ΔG^\ddagger може изразити преко ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger , једначина (1.2.6)

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (1.2.6)$$

заменом у изразу (1.2.5) добија се једначина (1.2.7)

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \quad (1.2.7)$$

Логаритмовањем једначине (1.2.7) добија се израз

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{R}{Nh}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (1.2.8)$$

На основу израза (1.2.8) види се да постоји линеарна зависност члана $\ln(k/T)$ у функцији $1/T$, тј. графички, на основу ове једначине, из нагиба добијене праве одређује се вредност за ΔH^\ddagger , а из одсечка праве израчунава се вредност за ΔS^\ddagger . Први члан у једначини, $\ln(R/Nh)$, је константа и на 25 °C износи 23,8.^{14,15}

Најпоузданији критеријум за одређивање механизма је вредност промене запремине активирања, ΔV^\ddagger .^{10,11} Узимајући у обзир врсту интермедијера код различитих механизма, повећање притиска ће убрзавати реакције које се дешавају по А механизму, а успоравати реакције по D механизму. Зато, негативна вредност за ΔV^\ddagger указује на А или I_a механизам, а позитивна вредност ΔV^\ddagger указује на D или I_d механизам супституције. У случају I механизма, притисак не утиче значајније на брзину супституције.

Повезаност константе брзине хемијске реакције и ΔV^\ddagger дата је Вант Хофовом (Van't Hoff) једначином (1.2.9)

$$\left(\frac{d(\ln k)}{dP}\right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.2.9)$$

Вредност за ΔV^\ddagger добија се праћењем промене константе брзине хемијске реакције у зависности од притиска, на основу једначине (1.2.10)

$$\Delta V^\ddagger = -bRT \quad (1.2.10)$$

у којој b представља нагиб праве $\ln k$ у функцији притиска, P . Запремина активирања, ΔV^\ddagger , састоји се из два члана, једначина (1.2.11).

$$\Delta V^\ddagger = \Delta V_{\text{int}}^\ddagger + \Delta V_{\text{sol}}^\ddagger \quad (1.2.11)$$

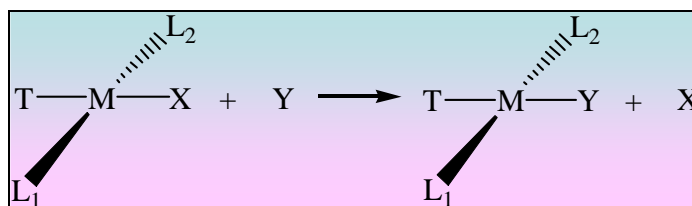
Први члан $\Delta V_{\text{int}}^\ddagger$ односи се на промене у интернуклеарним растојањима и угловима веза приликом настајања активираниог комплекса, док други члан $\Delta V_{\text{sol}}^\ddagger$ описује промене у наелектрисању, као и диполне интеракције у активираниом комплексу. Уколико реагују наелектрисани јони допринос другог члана може бити већи од првог, па вредност за ΔV^\ddagger није поуздан критеријум за одређивање механизма. Међутим, када у току процеса супституције нема промена у наелектрисању, други члан у изразу (1.2.11) се може занемарити, тј. тада запремина активирања зависи само од $\Delta V_{\text{int}}^\ddagger$. У том случају је вредност за ΔV^\ddagger најпоузданији критеријум за одређивање механизма супституције.^{10,11}

1.3. Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса

Квадратно-планарне комплексе граде јони метала са d^8 електронском конфигурацијом. У ову групу спадају јони Pt(II), Pd(II), Au(III), Ir(I), Rh(I) и Ni(II) (у појединим случајевима). Општа формула квадратно-планарних 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.¹³

Супституционе реакције комплекса Ir(I), Rh(I), Pd(II) и Au(III) одигравају се веома брзо за разлику од супституционих реакција комплекса платине(II), које су знатно спорије. Из тог разлога су супституционе реакције комплекса платине(II) највише проучаване, јер се одигравају довољно споро да би се могле применити различите експерименталне методе за њихово праћење.¹⁶

Реакција супституције лиганда код квадратно-планарних комплекса^{7,8} приказана је на Шеми 1.3.



Шема 1.3. Реакција супституције лиганда код квадратно-планарних комплекса

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

Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса одвијају се по два кинетичка пута. Један је директна нуклеофилна супституција окарактерисана константом брзине k_2 , једначина (1.3.1).



Други пут је солволитички пут, окарактерисан константом брзине k_1 , по коме се у првој фази врши супституција лиганда X растварачем S, а потом се, у другој фази, молекула растварача супституише лигандом Y.



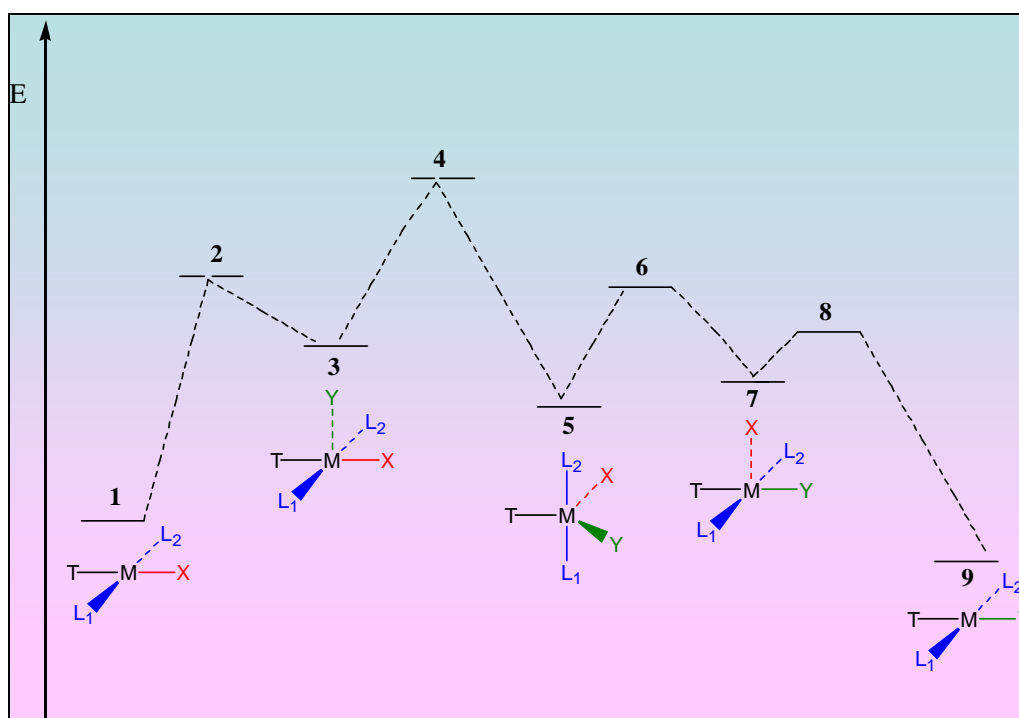
Израз за укупну брзину супституционе реакције, који обухвата оба кинетичка пута, приказан је једначином (1.3.4).

$$\text{BRZINA} = k_1[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}] + k_2[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}][\text{Y}] \quad (1.3.4)$$

односно

$$\text{BRZINA} = (k_1 + k_2[\text{Y}])[\text{ML}_1\text{L}_2\text{TX}] \quad (1.3.5)$$

На Шеми 1.4 приказан је механизам супституције лиганда и енергетски профил реакције супституције квадратно-планарних комплекса.



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

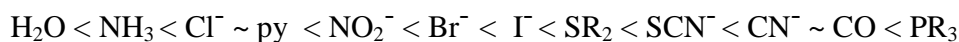
Из Шеме 1.4 може се видети да улазни лиганд Y прилази полазном квадратно-планарном комплексу под нормалним углом, формирајући квадратну пирамиду (3). Настала квадратна пирамида се трансформише у тригоналну бипирамиду (5), а потом поново у квадратну пирамиду (7), али са одлазећим лигандом X на врху пирамиде.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

1.4. Утицај различитих фактора на брзину супституције квадратно-планарних комплекса

На процес супституције квадратно-планарних комплекса утиче већи број фактора, као што су: ефекат одлазећег лиганда, ефекат улазног лиганда, утицај лиганда који се налази у *trans*-положају у односу на одлазећи лиганд (*trans*-ефекат) и др.

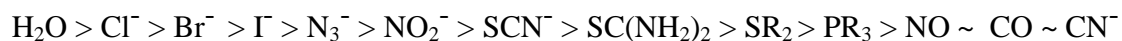
1.4.1. Ефекат улазног и одлазећег лиганда

Брзина супституционе реакције квадратно-планарних комплекса зависи од врсте, односно нуклеофилности улазног лиганда. Када су у питању комплекси платине(II) јона нуклеофилност улазног лиганда јако зависи од његових „тврдо-меких” карактеристика. Јасно је да ће већу реактивност према платини(II) јону, као „мекој” киселини, имати „меке” базе.^{13,14} За одабрану серију лиганата нуклеофилност расте у низу:



Уколико је улазни лиганд „мека” база, то је и његова нуклеофилна реактивност већа. На пример, у случају халогенида нуклеофилна реактивност расте у низу $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$, а то је уједно и смер у коме расте „мекоћа” ових лиганата.

Брзина реакције супституције квадратно-планарних комплекса зависи и од природе одлазећег лиганда.^{14,15} Што је веза метал-одлазећи лиганд слабија, то ће одлазећи лиганд бити лабилнији. У случају комплекса платине(II) јона лабилност лиганата опада у низу:



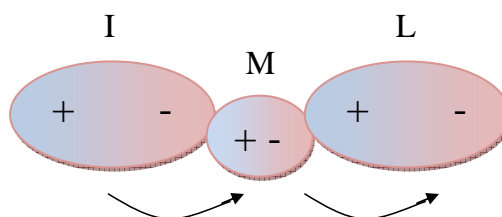
Молекул воде, као и халогени, лако се супституишу, док се сумпор-донорски лиганди и цијанидни јон супституишу знатно теже.

1.4.2. *Trans*-ефекат

Код квадратно-планарних комплекса на брзину реакције супституције велики утицај има инертни лиганд који се налази у *trans*-положају у односу на одлазећи лиганд. Тај ефекат је познат као *trans*-ефекат.^{7-9,12,14} На основу експерименталних података лиганди се могу поређати по јачини *trans*-ефекта на следећи начин:



Поларизабилност лиганда у *trans*-положају доводи до појаве *trans*-ефекта.¹³ Што је поларизабилност 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 лиганди σ -донори испољавају *trans*-ефекат.



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. Тада се у екваторијалној равни активираниог комплекса налазе одлазећи лиганд, улазни лиганд и лиганд који је био у *trans*-положају у односу на одлазећи, чиме је олакшана π -електронска комуникација.^{14,17}

1.5. Јони прелазних метала у медицини

Јони прелазних метала имају значајну примену у техничким процесима, биологији и медицини. Данас је познато да се велики број комплекса јона прелазних метала користи у лечењу различитих болести (канцера, артритиса, дијабетеса, Алцхајмерове болести,

итд.). Међутим, механизам деловања већине комплексних једињења у биолошким системима још увек није детаљно разјашњен.^{1,2}

Главни циљ при дизајнирању биолошки активних комплексних једињења је постизање контроле токсичних (споредних) ефеката и усмеравање дејства јона метала на одређено ткиво, орган или ћелију. Најчешће се јони метала уводе у биолошке системе како би испољили терапеутско дејство. Неки се примењују и у дијагностичке сврхе. Биомедицинска неорганска хемија има за циљ синтезу нових терапеутских комплексних једињења који могу ступити у интеракцију са различитим биомолекулима и испољити потенцијалну биолошку активност.¹⁸⁻²²

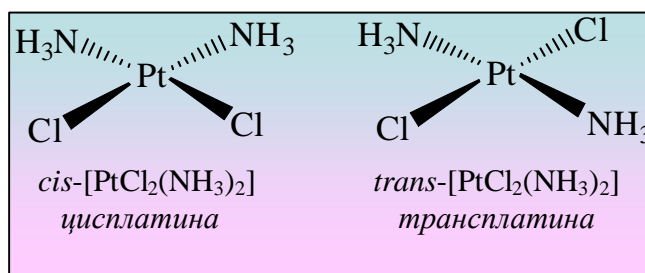
На Слици 1.1 су означени јони метала чија су једињења нашла значајну примену у медицинске сврхе, пре свега у лечењу канцера.

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																			
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	64	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 1.1. Периодни систем елемената у коме су обојени елементи чија једињења показују антитуморску активност

Открићем антитуморских карактеристика *cis*-диаминдихлоридоплатине(II) комплекса, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], познатијег као цисплатина пре око 40 година, започиње развој медицинске неорганске хемије.^{4,23,24} Такође је познато да применом цисплатине, као антитуморског агенса, долази до појаве низа нежељених ефеката, па се последњих година

доста ради на синтези нових комплекса платине који би испољавали већу антитуморску активност, а мању токсичност. За разлику од цисплатине, њен изомер *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂], трансплатина, не показује антитуморску активност. На Слици 1.2 су приказане структурне формуле ова два геометријска изомера.



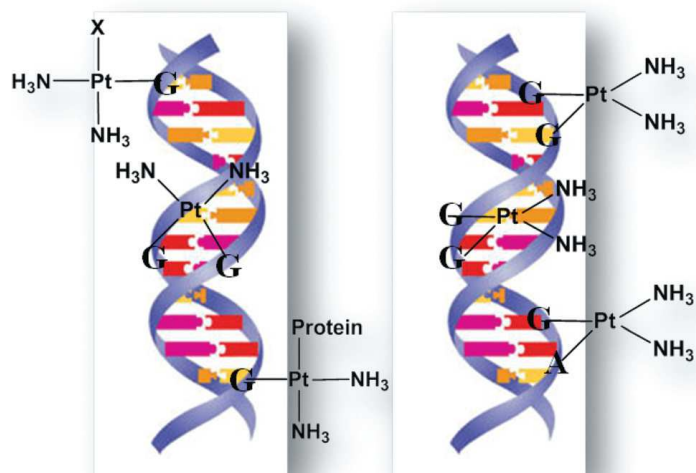
Слика 1.2. Структурне формуле цисплатине и трансплатине

1.6. Комплекси платине(II) као антитуморски агенси

Антитуморска активност комплекса платине(II) заснива се на њиховој интеракцији са молекулом ДНК, и то првенствено са генетском ДНК, која се налази у нуклеусу, док је интеракција са митохондријалном ДНК мање одговорна за антитуморску активност.²⁵ Прво, када комплекс платине(II) доспе у ћелију, као последица различите концентрације хлоридо јона у екстрацелуларној и интрацелуларној течности, долази до хидролизе.²⁴⁻²⁸ У процесу хидролизе формира се аква комплекс који је реактивнији у односу на полазни хлоридо комплекс. Након хидролизе могућности за координацију са молекулом ДНК су различите. Везивање комплекса цисплатине за ДНК се првенствено дешава преко N7 атома гуанина, док је мање заступљено везивање за N7 и N1 атоме аденина и N3 атом цитозина.^{26,27}

С обзиром да молекул ДНК у својим комплементарним спиралним структурама садржи различиту секвенцу пуринских и пиримидинских база, установљено је да је са 60% заступљена координација комплекса типа 1,2-(GpG), односно, веза преко два молекула гуанозин-5'-монофосфата, 5'-GMP, који се налазе на супротним ланцима ДНК молекула. Око 25% је заступљена веза типа 1,2-(ApG), тј. веза са аденозин-5'-монофосфатом,

5'-AMP, и 5'-GMP смештеним на супротним ДНК ланцима. Остали начини везивања су мање заступљени. На Слици 1.3 приказани су различити начини координовања цисплатине за молекулу ДНК.^{28,29}



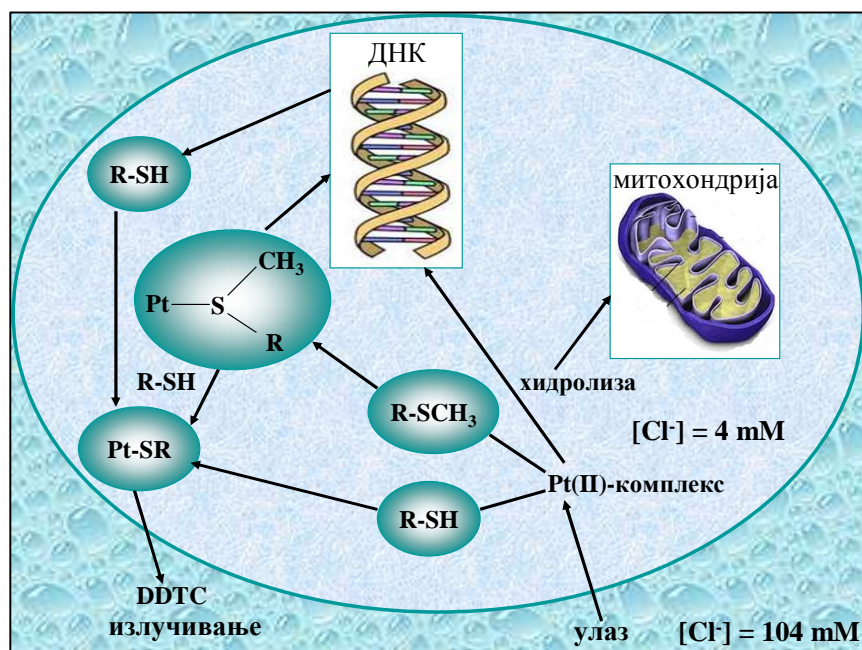
Слика 1.3. Начини координовања цисплатине за ДНК спиралу

Међутим, у ћелији се налазе и други биомолекули који такође могу да реагују са комплексима платине(II). Посебно велики афинитет комплекси платине(II) показују према биомолекулима који садрже сумпор, како у тиолном тако и у тиоетарском облику. Наиме, платина(II) јон као „мека” киселина гради јако стабилна једињења са сумпор донорима („меким” базама). Настала једињења су управо одговорна за појаву токсичних ефеката (нефротоксичност, неуротоксичност, резистентност, итд.). Пошто је концентрација тиола, укључујући глутатион, GSH, и L-цистеин, L-Cys, у интрацелуларној течности око 10 mM, претпоставља се да је већи део комплекса платине(II) везан за сумпор из биомолекула пре него што доспе до молекула ДНК.^{26,28,29}

Координовање комплекса платине(II) за атом сумпора из тиоетра је кинетички фаворизован процес. Настала Pt-S(тиоетар) веза може се раскинути у присуству молекула ДНК, тј. N7 атом из 5'-GMP може да супституише молекул тиоетра из насталог једињења.³⁰ Из тих разлога се једињења типа Pt-S(тиоетар) сматрају „резервоаром” комплекса платине у организму, тј. они су погодни интермедијери у реакцији комплекса платине(II) и ДНК. Pt-S(тиоетар) веза може се раскинути и у присуству молекула тиола, тј.

сумпор из тиола може да супституише сумпор из тиоетра, при чему је настала Pt-S(тиол) веза термодинамички стабилнија. Такође, може доћи и до директног везивања платине(II) јона за атом сумпор из молекула тиола, а настала Pt-S(тиол) веза је јако стабилна и тешко раскидива. Сматра се да је грађење једињења типа Pt-S(тиол) одговорно за појаву токсичних ефеката током примене комплекса платине(II) као антитуморских реагенаса. За раскидање Pt-S(тиол) везе данас се користе једињења позната као „заштитни агенси”, а то су једињења која садрже атом сумпора и која су врло јаки нуклеофили (диетилдитиокарбамат, тиоуреа, биотин, итд.).^{25,28,30}

Процеси који се одигравају у ћелији у току примене антитуморских агенаса на бази комплекса платине(II) приказани су на Слици 1.4.



Слика 1.4. Унутарћелијски процеси до којих долази приликом примене антитуморских агенаса на бази комплекса платине(II)

1.7. 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.

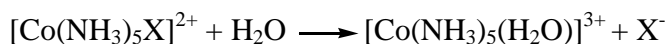
Тако, јони Na и Mg, који спадају у групу s-елемената, граде октаедарске комплексе, као и неки p-елементи попут сумпора и силицијума (SF_6 и $[SiF_6]^{2-}$).^{7,8,12} Међутим, најбројнији су октаедарски комплекси прелазних d-елемената.

Процес супституције лиганда код октаедарских комплекса разликује се од процеса супституције 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.⁸

Реакције супституције октаедарских комплекса могу се, такође, одвијати по D, A 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. Међутим, за спољашње-орбиталне октаедарске комплексе (sp^3d^2 хибридизација) се очекује D механизам супституције. Највећи број супституционих реакција октаедарских комплекса дешава се по D или I_d механизму, док на брзину супституције велики утицај имају природа одлазећег лиганда и природа инертног лиганда. У случају ових комплекса, стерне сметње су мање значајне.

1.7.1. Утицај одлазећег лиганда

Утицај одлазећег лиганда на брзину супституције октаедарских комплекса може се објаснити на примеру киселе хидролизе комплекса типа $[Co(NH_3)_5X]^{2+}$:

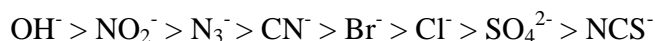


Брзина којом одлазећи лиганд X напушта координациону сферу зависи од јачине хемијске везе између јона метала и посматраног лиганда. Уколико су у питању лиганди истог наелектрисања, брзина реакције супституције расте са порастом величине лиганда. Међутим, ако посматрамо лиганде различитог наелектрисања,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

1.7.2. Утицај инертног лиганда

На брзину реакције супституције октаедарских комплекса значајно утиче и 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, може се објаснити овај ефекат. Наиме, лиганд X може да утиче на лабилност одлазећег Cl^- лиганда, по следећем редоследу:

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 $X = \text{NO}_2^-$ или N_3^- . У принципу, разлике у реактивности поменута два геометријска изомера су врло мале.³¹

1.7.3. Стерне сметње

Уколико постоје стерне сметње око централног јона метала реакције супституције октаедарских комплекса се одвијају по D механизму, док се А механизам подразумева за стерно незаштићене комплексе. На пример, реакција хидролизе за *mezo* облик комплекса $[\text{Co}(\text{bn})_2\text{Cl}_2]^+$, (bn је бутилендиамин), је око 30 пута бржа у односу на смешу *d* и *l* облика, зато што је *mezo* облик више стерно заштићен.³¹

1.7.4. Редокс-реакције октаедарских комплекса

Октаедарски комплекси, поред реакција супституције, 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 реактанта буде супституционо лабилан и да оксидант поседује лиганд погодан за улогу мостног лиганда. Константа брзине ове реакције зависи од природе мостног лиганда.¹³

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.

1.8. Комплекси платине(IV) као антитуморски агенси

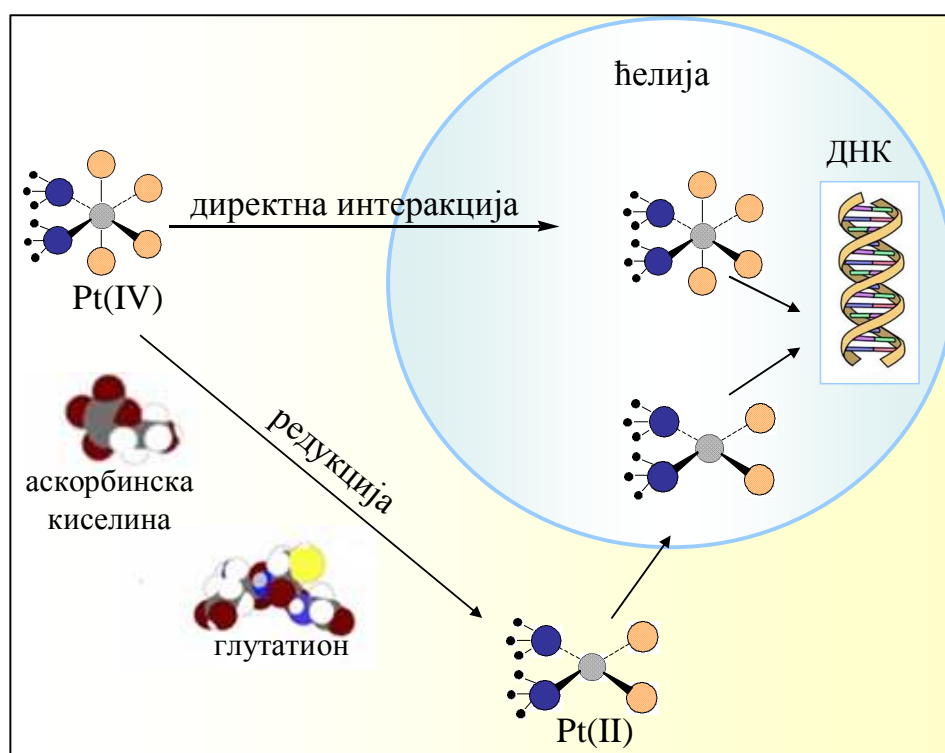
Упркос великом успеху једињења платине(II) у лечењу канцера, појава резистентности и других нежељених споредних ефеката (повраћање, нефротоксичност, кардиотоксичност, ототоксичност, итд.) ограничила је њихову даљу примену.^{32,33} У циљу проналаска једињења са што бољим антитуморским карактеристикама, али и са мањим

споредним ефектима, велики број истраживања усмерен је ка развоју комплексних једињења који ће у организму имати улогу прекурсора, тзв. про-лека. Ова једињења у процесу метаболизма имају способност да се трансформишу до облика који ће показивати антитуморску активност. Активација про-лека најчешће се врши фотохемијским процесима,³⁴ оксидацијом или редукцијом, а у неким случајевима и супституционим реакцијама. Зато је за дизајнирање нових једињења неопходно познавање константе брзине супституционих реакција, редокс потенцијала, фотохемијских карактеристика, као и познавање ефекта координованих лиганата у структури комплекса.³⁵⁻³⁷ У ову групу једињења сврстана су фотоактивна комплексна једињења платине(IV),³⁸⁻⁴¹ комплексна једињења платине(IV) која редукцијом прелазе у активне комплексе платине(II),⁴²⁻⁴⁴ као и полинуклеарни комплекси платине(II) јона.³

До сада је синтетисано и испитано око 3000 различитих комплекса платине са циљем да се пронађе једињење са добрим антитуморским карактеристикама, смањеном токсичношћу, као и са повећаним опсегом деловања, тј. смањеном резистентношћу после дуже употребе. Међутим, само око 30 комплекса је нашло примену у клиничком лечењу.⁴⁵⁻⁴⁷ Комплекси платине(IV) имају огроман потенцијал као антитуморски агенси, у смислу високе активности и ниске токсичности. Генерално, верује се да су ови комплекси инертнији у супституционим реакцијама у односу на аналогне комплексе платине(II).^{48,49} Њихова повећана стабилност се може објаснити стабилном ниско-спинском d^6 електронском конфигурацијом. Такође, познато је да су ови комплекси стабилнији у односу на аналогне комплексе платине(II) у киселој средини, што омогућава њихову оралну примену. На основу клиничких испитивања примећено је да се оралном применом антитуморских лекова на бази комплекса платине(IV) веома мала количина једињења деактивира после уласка у ћелију.^{39,49} То је потврђено у случају сатраплатине, *trans,cis,cis*-[Pt(OCOCH₃)₂Cl₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)], која је тренутно ушла у трећу фазу клиничког испитивања.⁵⁰ Потенцијална предност комплекса платине(IV) се заснива и на чињеници да, због њихове мање реактивности они у крвотоку остају у непромењеном саставу, што смањује низ нежељених реакција које могу довести до токсичних ефеката. Поред њихове стабилности, предност ових једињења се огледа и у томе да присуство два додатна координациона места омогућава модификацију фармакокинетичких особина комплекса.⁵¹ На основу публикованих резултата доказано је да се варирањем аксијалних и

екваторијалних лиганата у структури комплекса платине(IV) мењају редокс својства ових комплексних једињења, што значајно утиче на њихову биолошку активност.⁵²

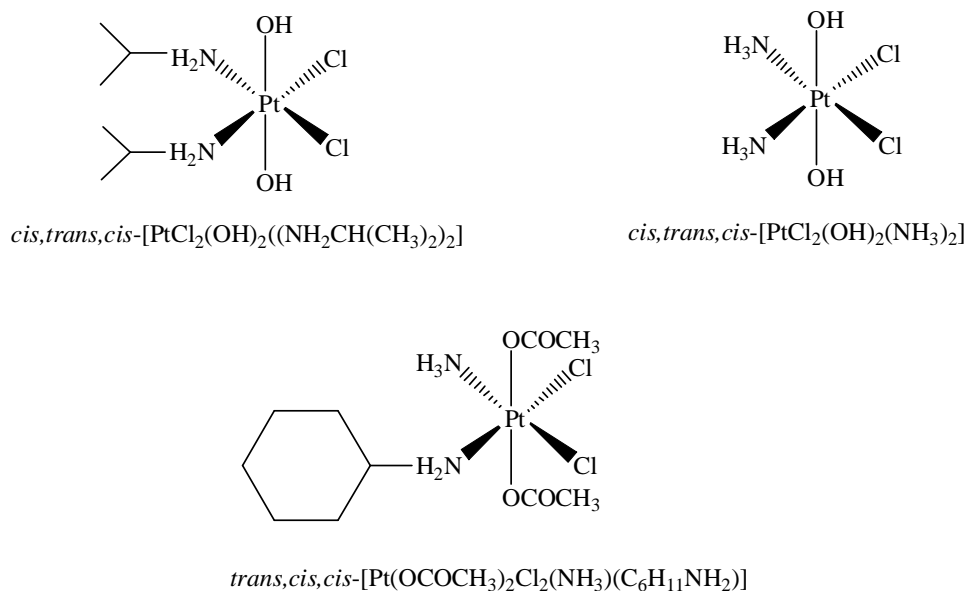
Након уласка у ћелију постоје два метаболичка пута за комплексе платине(IV) (Слика 1.5). Први пут представља директну интеракцију са молекулом ДНК у језгру,⁵³ док други пут описује редукцију комплекса до одговарајућег комплекса платине(II), која се одвија у присуству редукционих агенаса као што су: GSH, L-Cys, аскорбинска киселина, итд. После редукције метаболизам комплекса се одвија на већ описан начин за комплексе платине(II).⁵⁴



Слика 1.5. Два метаболичка пута комплекса платине(IV)

Верује се да је редукција комплекса платине(IV) до комплекса платине(II) кључна за њихово антитуморско дејство.^{55,56} С тим у вези, биолошка активност јако зависи од лакоће којом се комплекси платине(IV) редукују.

Велики број комплекса платине(IV) је синтетисано и испитивано је њихово понашање у *in vitro* условима. Структурне формуле комплекса платине(IV) који су укључени у хемиотерапијска испитивања су приказане на Слици 1.6.



Слика 1.6. Структуре комплекса платине(IV) укључених у хемиотерапијска испитивања

Ипроплатина, *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂((NH₂CH(CH₃)₂)₂), је октаедарски комплекс који се одликује високом растворљивошћу. Захваљујући томе, ипроплатина је ушла у клиничка фармакокинетичка и метаболичка испитивања, али је утврђено да поседује антитуморску активност мању од цисплатине.⁵⁷ Ипроплатина садржи хидроксо лиганде у аксијалном положају и поседује негативнији редукциони потенцијал. Већа количина овог лека се не мења у *in vitro* и *in vivo* условима, што је у складу са ниском токсичношћу комплекса. Претпоставља се да се део ипроплатине лакше редукује у интрацелуларној течности него у крвној плазми.

Сатраплатина, *trans,cis,cis*-[Pt(OCOCH₃)₂Cl₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)], је први орално употребљен лек у клиничком лечењу. Има повољне физичко-хемијске особине укључујући растворљивост у води и стабилност у киселој средини. Ефикасан је код лечења тумора који су резистентни на употребу цисплатине.⁵⁸ Испитивања су показала да се као главни метаболит овог комплекса добија аналогни платина(II) комплекс. Међутим,

у току метаболизма овог једињења идентификовано је и присуство неколико других платина(IV) комплекса.

Оксоплатина, *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)₂], је такође октаедарски комплекс структурно сличан цисплатини. Испитивања су показала да се овај комплекс метаболише у четири различита производа, од којих је један цисплатина.⁵⁹ Одликује се високом стабилношћу што омогућава његову оралну употребу. Инертност и низак редокс потенцијал узрокују споро везивање за протеине у плазми, тако да један велики део комплекса доспева у ћелију у непромењеном стању. То подразумева да се комплекс може директно везати за молекул ДНК, мада се овај процес одвија јако споро.⁶⁰

1.9. Структура и редукциони потенцијал комплекса платине(IV)

Утврђено је да редукциони потенцијал диаминских комплекса платине(IV) зависи од природе аксијалних и екваторијалних лиганата.⁶¹ Такође је примећено да врста аксијалних лиганата има већи утицај на вредност редокс потенцијала. У Табели 1.1 су приказане бројне вредности редокс потенцијала у зависности од врсте лиганата (X) у аксијалном положају за комплекс типа *cis,trans*-[Pt(en)Cl₂X₂]. Редукција се најлакше одвија у случају када су аксијално координовани хлоридо лиганди, а теже када се ради о карбоксилато или хидроксо лигандима у аксијалном положају. Мале промене у дужини карбоксилато лиганата незнатно утичу на редукциони потенцијал комплекса, док природа донорског атома лиганата има знатно већи утицај.⁴⁷

Табела 1.1. Вредности редокс потенцијала у зависности од врсте аксијалног лиганата (X) за комплексе типа *cis,trans*-[Pt(en)Cl₂X₂]⁴⁷

Лиганд (X)	E _p (mV)
Cl	-4
OC(O)CH ₃	-326
OC(O)CH ₂ CH ₃	-301
OC(O)CH ₂ CH ₂ CH ₃	-273
OH	-664

Промена екваторијалних аминских лиганада у комплексима опште формуле *cis*-[PtCl₄(NRH₂)₂] (R = H, Me, Et, Pr, Bu, CH₂Ph) има мерљиве, али не и значајне ефекте на брзину редукције комплекса.

Пошто структурне промене екваторијалних лиганада имају мали ефекат на редукциони потенцијал комплекса, при будућем дизајнирању комплекса на бази платина(IV) јона већу пажњу треба посветити избору аксијалних лиганада.

1.10. Редукциони потенцијал и биолошка активност комплекса платине(IV)

На основу публикованих резултата примећено је да не постоји једноставна и општа повезаност између редукционог потенцијала комплекса платине(IV) и њихове *in vitro* и *in vivo* антитуморске активности. Тако, на пример, тетраплатина, са аксијалним хлоридо лигандима и високим редукционим потенцијалом, редукује се врло брзо у *in vivo* условима дајући врло активне комплексе платине(II). Са друге стране, комплекс ипроплатина се далеко теже редукује, али поседује значајну активност.⁶²

Утврђено је да ако се само аксијални лиганди у комплексу мењају, а екваторијални остају непромењени, цитотоксичност комплекса расте са повећањем њиховог редукционог потенцијала.⁵²

Резултати указују да фармакокинетика комплекса платине(IV), пре свега, зависи од брзине њихове редукције, али и од карактеристика аналога платине(II) који настају у процесу редукције.

1.11. Липофилност комплекса платине(IV)

У низу истраживања примећено је да је велика ћелијска пропустљивост сатраплатине (JM216) повезана са високом липофилношћу овог комплекса платине(IV).⁶³ Са друге стране, брза редукција поменутог комплекса у *in vivo* условима, праћена губитком аксијалних лиганада, смањује његову липофилност, чиме се управо објашњава разлика у активности у *in vitro* и *in vivo* условима.

Липофилност (или хидрофобност) антитуморских једињења се, након открића активности цисплатине, проучава као важан фактор за хемиотерапеутску примену комплекса платине(II). Претпоставља се да је један од разлога резистентности управо смањена акумулација лека у ћелији. Мера за липофилност је партициони коефицијент, $\log P$, који представља релативну растворљивост комплекса у систему вода-октанол. Подаци за растворљивост неких платина(IV) комплекса објављени су релативно рано.⁶⁴ Модификацијом аксијалних лиганда у структури платина(IV) комплекса мења се растворљивост комплекса и његова способност да уђе у туморске ћелије, пре него што се редукује до активног платина(II) једињења.

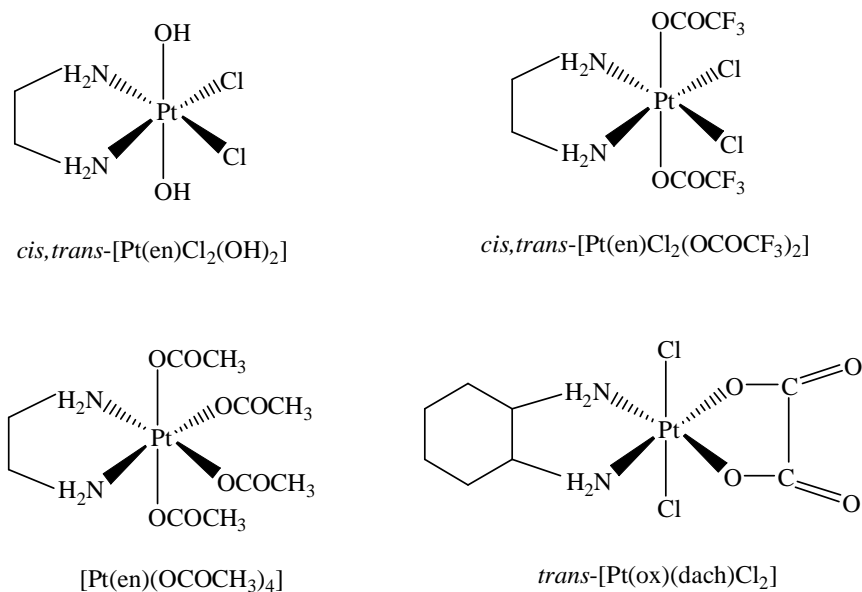
Показано је да када се један аксијални карбоксилато лиганд замени хлоридо лигандом у серији (диамин)*тетракис*(карбоксилато)платина(IV) комплекса, $\log P$ се смањује.^{65,66} Очекивано, $\log P$ расте са повећањем дужине ланца карбоксилато лиганда у карбоксилато комплексима платине(IV).⁶⁵ Испитивана је антитуморска активност комплекса (1,2-диаминциклохексан)*тетракис*(карбоксилато)платина(IV) и (1,2-диаминциклохексан)*бис*(карбоксилато)дихидроксоплатина(IV) комплекса на различитим $\log P$ вредностима.⁶⁷ Генерално, не може се успоставити јасна веза између вредности за $\log P$ и активности комплекса, јер липофилност није једини параметар који утиче на антитуморско дејство. Липофилност је фактор о којем треба водити рачуна при дизајнирању нових једињења на бази платина(IV) јона, али се морају узети у обзир и сви претходно напоменути ефекти.

1.12. Интеракције комплекса платине(IV) са азот-донорским лигандима

Биомолекули присутни у крви и ћелијама разликују се у структури и хемијској реактивности. Бројни биомолекули, попут протеина и ензима, могу да реагују са комплексима платине(IV) и да доведу до њихове редукције. Са друге стране, пошто су комплекси платине(IV) релативно инертни у процесима супституције, њихове реакције су ретко проучаване. Међутим, због потенцијалне антитуморске активности ипак је било интересантно испитивање могућности координације комплекса платине(IV) за молекул ДНК.

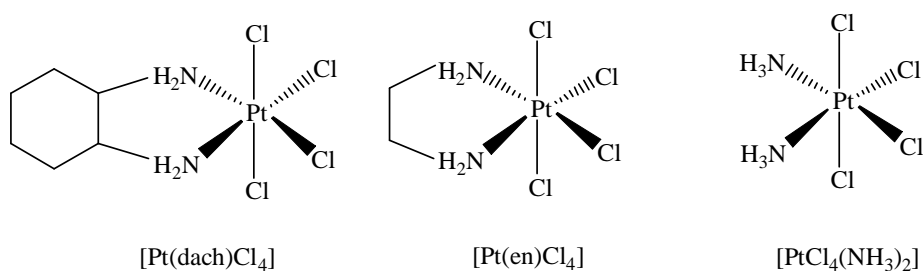
ДНК се сматра крајњим циљем цисплатине и њених аналога. Вероватноћа да комплекси платине(IV) дођу до молекула ДНК зависи од њихове стабилности. Велики број биомолекула може да редукује или да се у различитом степену координује за платина(IV) јон, тако да количина платина(IV) једињења која остаје расположива за реакцију са ДНК је мања у односу на унету количину.

Познато је да се неки комплекси платине(IV) могу везати за ДНК фрагменте без претходне редукције до комплекса платине(II).⁶⁸ Истраживања су показала да се сви комплекси платина(IV) јона не понашају на исти начин и да њихова реактивност зависи пре свега од природе лиганда и реакционих услова. Метаболички производ комплекса *trans,cis,cis*-[Pt(OCOCH₃)₂Cl₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)] није само његов платина(II) аналог, *cis*-[PtCl₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)], већ и неколико других комплекса платине(IV).⁶⁹ За разлику од њега *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)] не реагује са молекулом 5'-GMP. Разлог је присуство аксијалних хидроксо лиганда који снижавају вредност редокс потенцијала, а самим тим и реактивност.⁷⁰ Исти ефекат је примећен и код комплекса *cis,trans*-[Pt(en)Cl₂(OH)₂], као и код *cis,trans*-[Pt(en)Cl₂(OCOCF₃)₂], који у аксијалном положају има два трифлуороацетатна лиганда.⁷¹ Такође су испитивани комплекси платине(IV) који у својој структури садрже хелатни лиганд 1,2-диаминциклохексан (dach) и различите анјонске лиганде. Њихова реактивност према фрагментима ДНК зависи од природе анјонских лиганда, као и од модела ДНК базе. У реакцији *trans*-[Pt(ox)(dach)Cl₂] са молекулом 5'-GMP настаје само супституисани платина(II) продукт, [Pt(dach)(5'-GMP)₂]. Међутим, ако се један хлоридо лиганд замени са капронил групом, дајући *trans*-[Pt(ox)(dach)Cl(OCOC₅H₁₁)] комплекс, редукција се одвија брже, док комплекс *trans*-[Pt(ox)(dach)(OCOC₄H₉)₂] не реагује у значајној мери.⁵⁵ Нешто инертнији комплекс [Pt(en)(OCOCH₃)₄] са истим азот-донорским лигандом после неколико недеља формира [Pt(en)(OCOCH₃)₃(5'-GMP)].⁷² Структурне формуле неких од поменутих комплекса приказане су на Слици 1.7.



Слика 1.7. Структурне формуле различитих комплекса платине(IV)

Такође је примећено да врста инертног лиганда има велики утицај на брзину којом се одвија процес супституције комплекса платине(IV) са 5'-dGMP. Упоредивањем бројних вредности константи брзина примећено је да реактивност опада у следећем низу: [PtCl₄(NH₃)₂] > [Pt(en)Cl₄] > [Pt(dach)Cl₄], што је у складу са стерним сметњама које проузрокују инертни лиганди.⁷¹ На Слици 1.8 су приказане структурне формуле наведених комплекса.



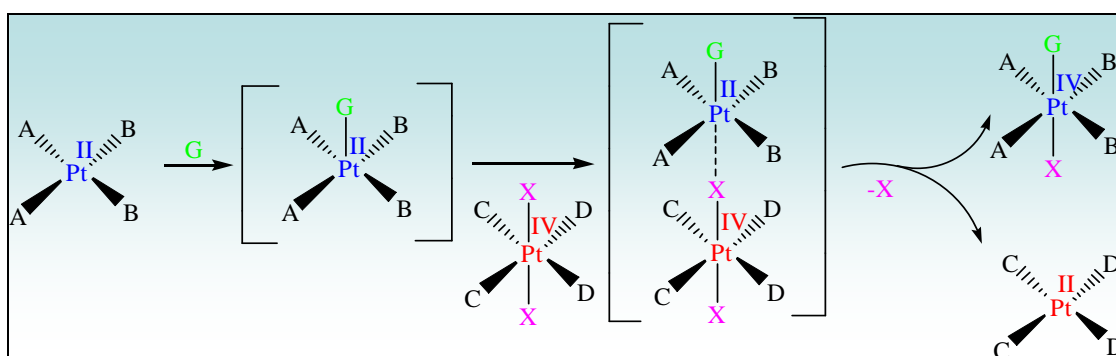
Слика 1.8. Структуре платина(IV) комплекса са различитим инертним лигандима

Испитивано је понашање комплекса [Pt(dach)Cl₄] у реакцијама са различитим азот-донорским биомолекулима. На основу публикованих резултата показало се да овај

комплекс оксидује 5'-dGMP и 3'-dGMP, а да се при томе сам редукује у комплекс [Pt(dach)Cl₂]. Механизам реакције укључује два корака: супституцију и трансфер електрона. Слично комплексима платине(II), и комплекси платине(IV) се координују преко N7 атома азота из гуанозина. При томе настаје Pt(IV)-G интермеђијер у коме се врши трансфер два електрона до финалног платина(II) комплекса. Електрони потребни за процес редукције потичу из шећерне компоненте, тачније из нуклеофилне групе на 5'-позицији у молекулу нуклеотида.⁷³

Упоређивањем константи брзине реакције супституције уочена је два пута већа реактивност 3'-dGMP у односу на 5'-dGMP. У молекулу 5'-dGMP фосфатна група изазива веће стерне сметње у поређењу са 5'-хидроксилном групом код 3'-dGMP. Исти редослед реактивности нуклеотида је доказан и у процесу електронског трансфера.⁷¹

Реакције супституције комплекса платине(IV) изучаване су и у присуству веома мале количине комплекса платине(II), чија је улога у овим реакцијама каталитичка. Сматра се да тзв. Басоло-Пирсонов (Basolo-Pearson, BP) механизам, који описује једну аутокатализовану реакцију, подразумева формирање моста између два јона платине преко аксијалног лиганда из комплекса платине(IV). При томе долази до преноса два електрона од нуклеотида преко платине(II) до платине(IV) јона, док 5'-dGMP прелази у свој оксидовани облик. Наиме, електрони потребни за редукцију потичу из шећерне компоненте нуклеотида. Важно је напоменути да комплекси платине(II) не морају бити аналогни са комплексима платине(IV) да би ефикасно убрзали овај процес. Механизам ове реакције је приказан на Шеми 1.5.



Шема 1.5. Basolo-Pearson механизам

Успостављање моста између два јона метала је најбрже када су јони халогенида аксијално координовани у октаедарском комплексу. Наиме, комплекси платине(IV) који поседују аксијалне бромидо лиганде реагују брже са азот-донорским лигандима у односу на комплексе који аксијално садрже хлоридо лиганде. Ово се може објаснити чињеницом да волуминознији и поларизабилнији бромидо лиганди поседују орбитале на нешто нижим енергијама које могу учествовати у формирању моста за пренос електрона. Поред утицаја природе аксијалних лиганда на механизам реакције, доста је изучаван и утицај инертних лиганда у комплексима платине(IV). На вредност константе брзине најбитнију улогу има њихова структура. Наиме, мање волуминозни инертни лиганди стварају мање стерне сметње за формирање моста између платине(II) и платине(IV) јона. Зато су комплекси са мање волуминозним инертним лигандима реактивнији у реакцијама супституције.

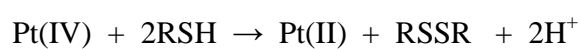
1.13. Интеракције комплекса платине(IV) са сумпор-донорским лигандима

Као што је поменуто раније, други метаболички пут комплекса платине(IV) је њихова редукција која се може одвијати у присуству унутарћелијских редукујућих агенаса (GSH, L-Cys, L-Met, аскорбинска киселина, итд.). На овај начин као коначни производи настају аналогни комплекси платине(II) који затим испољавају антитуморску активност интеракцијом са молекулом ДНК на већ описан начин. Због тога су интеракције комплекса платине(IV) са различитим биомолекулима, који имају улогу редукујућих агенаса, биле предмет многих истраживања.

Глутатион (GSH) је унутарћелијски тиол који брани организам од токсина и оксиданата и који може деактивирати електрофилне лекове укључујући и лекове хемиотерапеутског типа. На пример, цисплатина реагује са глутатионом, чиме се смањује активна количина једињења која доспева до ДНК молекула.⁷⁴ У случају комплекса платине(IV) испитивања су показала да је реакција тетраплатине са молекулом ДНК спора. Међутим, уколико се додају два еквивалента GSH реакција постаје знатно бржа, што указује на присуство процеса редукције платине(IV) комплекса до платина(II) аналога.⁴⁷ Такође је примећено да брзина координације комплекса платине(IV) за молекул ДНК опада при концентрацијама GSH већим од оне која је стехиометријски потребна за

редукцију комплекса. Ова појава се објашњава деактивацијом насталих платина(II) аналога везивањем за вишак GSH.⁷⁵ Показано је да додаток GSH у систем са тетраплатином повећава њену цитотоксичност до вредности које одговарају цитотоксичности њеног платина(II) аналога.⁷⁶ Такође, утврђено је да постоји веза између унутарћелијске концентрације GSH и цитотоксичности комплекса платине(IV) (ипроплатине и тетраплатине), али не и платина(II) комплекса (цисплатине и карбоплатине).⁷⁷ Ово опажање иде у прилог теорији да *in vivo* редукцијом комплекса платине(IV) настају активни платина(II) аналози.⁷⁸

Елдингова (Elding) група сарадника^{79,80} је детаљно испитивала редукцију различитих комплекса платине(IV) у присуству тиола (GSH, L-Cys, DL-хомоцистеина, итд.). Наиме, доказано је да се највећи број ових реакција одвија преко механизма редуктивне-елиминације, који је праћен губитком два аксијална лиганда. Као главни производ реакције добија се аналоган комплекс платине(II), као што је приказано следећом једначином:



Брзина којом се неки комплекс платине(IV) редукује највише зависи од његове структуре.^{81,82} На пример, редукцијом *trans,trans,trans*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)] (JM335) са GSH настаје *trans*-[Pt(OH)₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)], док се његов изомер *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)] (JM149) под истим условима не редукује.⁸⁰ То је и очекивано зато што су у комплексу JM149 хлоридо лиганди у *trans*-положају у односу на тешко одлазеће групе (амино лиганде). У том случају би редуктивна елиминација преко хлорида била енергетски неповољна. То подразумева да је за ефикасну редукцију комплекса платине(IV) неопходно постојање два халогена лиганда у *trans*-положају.

Испитиван је утицај природе аксијалних и екваторијалних лиганда на брзину редукције низа комплекса платине(IV) са аскорбинском киселином.⁵² Резултати су показали да се брзина редукције повећава у низу испитиваних аксијалних лиганда на следећи начин: OH⁻ < CH₃COO⁻ < Cl⁻ < CF₃COO⁻, што уједно прати редослед њихових редокс потенцијала. Овакво понашање се доводи у везу са електронегативношћу доносних атома лиганда, јер електронегативнији лиганди дестабилизују комплексе

платине(IV) и омогућавају лакшу редукцију до комплекса платине(II). Такође, екваторијални лиганди могу имати утицаја на брзину редукције, али у знатно мањој мери. Наиме, волуминознији екваторијални молекули стварају веће стерне сметње и на тај начин дестабилизују октаедарске комплексе платине(IV).

Генерално, може се рећи да постоји велики број фактора које треба узети у обзир при синтези нових комплекса платине(IV), јер погодним избором лиганата се могу превазићи тешкоће у смислу њихове растворљивости и потенцијалних токсичних ефеката.

1.14. Полинуклеарни комплекси платине(II)

У трећу генерацију комплекса платине који испољавају антитуморску активност поред комплекса платине(IV) спадају и полинуклеарни комплекси платине(II).⁸³ Ова једињења у својој структури могу да садрже два или више јона метала који су међусобно повезани помоћу мостних лиганата.⁸⁴⁻⁹¹ Као мостни лиганди највише су заступљени флексибилни алифатични диамини или крути мостни лиганди, као што су молекули азола и азина.^{84,85,92-94} Прве идеје о увођењу другог јона метала у молекуле који су антитуморски активни јавиле су се пре више година од стране Фарела (Farrell).⁹⁵ Разлог великог интересовања за изучавањем полинуклеарних комплекса платине је њихова способност да са молекулом ДНК формирају производе који се структурно разликују од оних које формирају цисплатина и слични комплекси.⁹⁶⁻⁹⁹

Иако је познато да се данас у терапијске сврхе при лечењу различитих врста тумора највише користе мононуклеарни комплекси платине(II), појава резистентности ограничава њихову клиничку употребу. За разлику од мононуклеарних комплекса платине, динуклеарни комплекси могу умањити појаву отпорности ћелија тумора.¹⁰⁰ Приликом интеракције цисплатине и молекула ДНК заступљена је координација комплекса преко два молекула 5'-GMP који се налазе на истом ДНК ланцу. Конформационе промене, настале као последица овог начина координације су управо одговорне за појаву резистентности. То значи да комплекси који са молекулом ДНК реагују на другачији начин могу превазићи појаву резистенције.¹⁰¹ Тако, динуклеарни комплекси, с обзиром на величину молекула, се могу везати за молекуле ДНК на још два начина, а то су: 1,3-(GpG) 1,4-(GpG) координација. Оба начина подразумевају везивање преко два молекула 5'-GMP

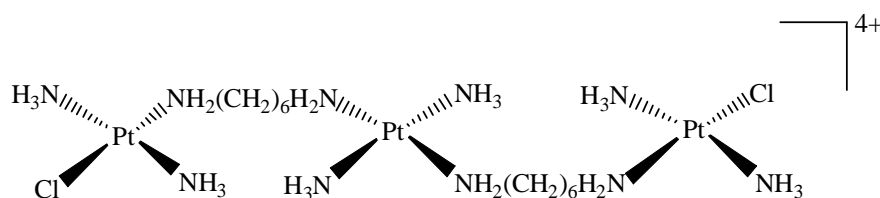
која се налазе на супротним ланцима ДНК.^{92,102-104} Пошто дужина мостног лиганда динуклеарног комплекса значајно повећава флексибилност насталог производа, полинуклеарни комплекси показују високу активност према ћелијама тумора које су отпорне на цисплатину.¹⁰⁵

Динуклеарни комплекси који у свом молекулу имају координоване исте монофункционалне групе за сваки јон метала могу да постоје као *cis* и *trans* геометријски изомери. Доказано је да су *cis* изомери кинетички инертнији у реакцијама са ДНК.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Важно је напоменути да се код цисплатине и структурно сличних комплекса пре координације за фрагменте ДНК врши хидролиза Pt-Cl везе и да овај процес значајно утиче на брзину супституције.¹⁰⁹ Код динуклеарних комплекса брзина реакције супституције са 5'-GMP није у коорелацији са брзином хидролизе. Овде је доминантан фактор, који диктира брзину реакције код оба изомера, стерни ефекат групе која се налази у *cis* положају у односу на мостни лиганд.^{106,110}

Пошто полинуклеарни комплекси у растворима постоје у катјонском облику њихова растворљивост у води је већа у односу на неутралне мононуклеарне комплексе.¹¹¹

С обзиром да ови полинуклеарни комплекси платине представљају новију класу једињења, да би се постигла што боља стратегија у процесу дизајнирања нових лекова неопходно је познавати начин на који они реагују са различитим биомолекулима при различитим експерименталним условима. Значајне информације о њиховим интеракцијама добијене су из великог броја публикованих резултата спроведених у *in vitro* условима, међу којима је испитивање супституционих реакција полинуклеарних комплекса платине са различитим сумпор- и азот-донорским биомолекулима. Испитиване су супституционе реакције тринуклеарног комплекса који је ушао у другу фазу клиничког испитивања, $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\{\mu\text{-trans-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)_2\}](\text{NO}_3)_4$, BBR3464 (Слика 1.9) са азот- и сумпор-донорским биомолекулима, при различитим експерименталним условима.¹¹² У реакцији са 5'-GMP координација се остварује преко N7 атома гуанина. Ова реакција се одвија тако што се прво замењује један хлоридо лиганд нуклеофилом, а затим се супституише и други хлоридни лиганд. За разлику од тога, реакције са тиоуреом и L-Met, као сумпор-донорским лигандима, су праћене разлагањем комплекса до мононуклеарних јединица. У првом кораку супституције замењују се оба лабилна хлоридо лиганда нуклеофилом, док у другом кораку долази до лабилизације

мостног лиганда, која настаје као резултат снажног *trans*-ефекта координованих сумпор-донорских лиганата. Примећено је да се овај комплекс брже везује за молекулу ДНК у односу на цисплатину. У том процесу се граде флексибилни ДНК производи са високим процентом заступљености везе типа 1,2-(GpG).^{113,114} На основу ових резултата се претпоставило да овај тринуклеарни комплекс испољава високу цитотоксичност према ћелијама које су отпорне на цисплатину. Међутим, клиничка испитивања су показала да комплекс BBR3464 не испољава активност према људским канцерогеним ћелијама и зато су даља испитивања обустављена.¹¹⁵



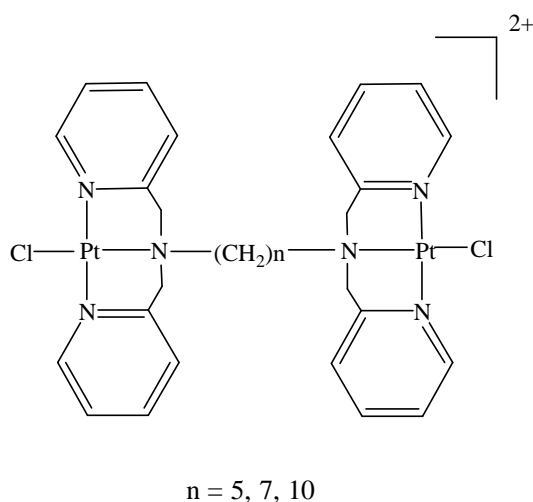
Слика 1.9. Структурна формула тринуклеарног комплекса BBR3464

Понашање динуклеарних комплекса у супституционим реакцијама је идентично понашању тринуклеарних комплекса. Наиме, примећено је да реактивност једног платина(II) јона зависи од околине другог платина(II) јона, што доводи до различитих термодинамичких и кинетичких карактеристика у првом и другом реакционом кораку. Интеракције динуклеарних комплекса платине веома зависе од растојања између јона метала, док у знатно мањој мери утиче природа ароматичног или алифатичног мостног лиганда.¹¹⁶

Синтетисани су и испитивани комплекси типа $[\text{Pt}_2(\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'\text{-тетракис (2-пиридилметан)диамин}(\text{Cl})_2)(\text{ClO}_4)_2]$ и њихови диаква аналози. Ови комплекси у својој структури имају мостне лиганде са различитом дужином алифатичног ланца (Слика 1.10).⁹⁶ Тако, комплекси са мостним лигандима који садрже 5 или 7 метиленских група тј. код којих је краће растојање између јона метала, имају већу реактивност од оних са дужим ланцем. Уочено је и да се после супституције једног лабилног лиганда укупно наелектрисање комплекса смањује, што такође утиче на њихово даље понашање. Смањење укупног наелектрисања комплексног јона узрокује смањење брзине реакције

супституције другог лабилног лиганда. Поред тога, код комплекса са већим растојањем између јона метала је уочена супституција само једног лабилног лиганда, као последица слабе интеракције између јона метала. У овом случају, смањење укупног наелектрисања комплекса нема значајан ефекат.^{117,118}

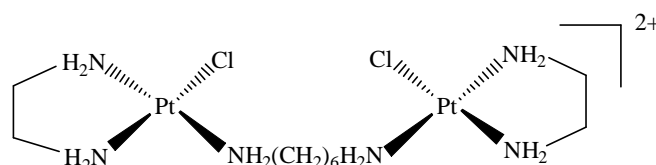
Резултати показују да комплекси типа $[\text{Pt}_2(\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}')$ -тетракис (2-пиридилметан)диамин(Cl) $)_2](\text{ClO}_4)_2$ реагују са азот-донорским лигандима на исти начин као и тринуклеарни комплекс BBR3464, тј. врши се супституција оба лабилна лиганда помоћу N7 атома из гуанина. За разлику од тога, сумпор-донорски лиганди, као што су тиоуреа и L-Met, замењују оба лабилна хлоридо лиганда истовремено, а затим због израженог *trans*-ефекта долази до дехелатизације координованог терцијарног амина, при чему је искључена лабилизација мостног лиганда.



Слика 1.10. Динуклеарни комплекси платине са различитим алифатичним низом као мостним лигандом

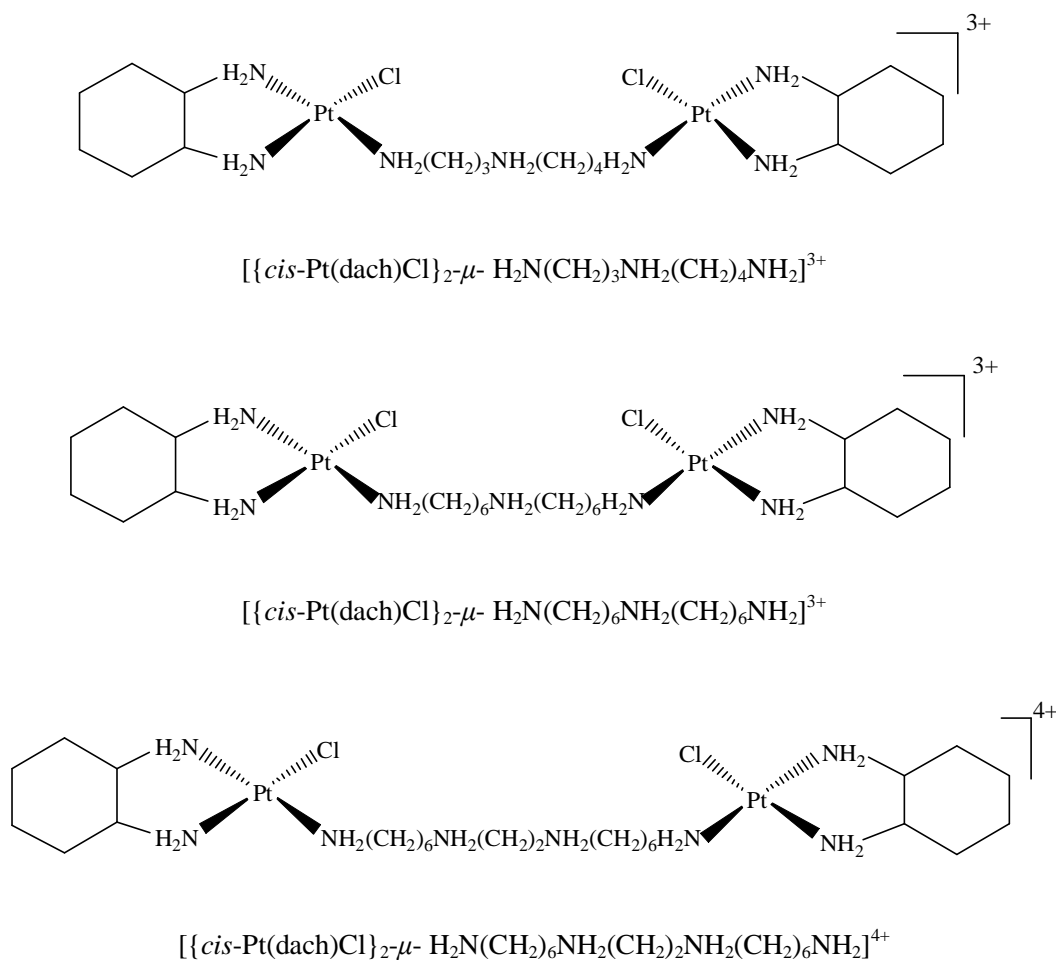
Динуклеарни комплекси платине који у својој структури имају бидентатне инертне лиганде су такође испитивани у реакцијама са неким биомолекулима при физиолошким условима. Тако, комплекс $[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2\text{-}\mu\text{-}\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}]\text{Cl}_2$ (Слика 1.11) са GSH у стехиометријском односу 1:1 као главни продукт даје макрохелат $[\{\text{Pt}(\text{en})\}_2\text{-}\mu\text{-}\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}\text{-}\mu\text{-}\text{SG}]$. Овај макрохелат се формира преко хексадиенског моста и тиолатног облика GSH. У присуству вишка GSH као главни производ настаје

$[\{Pt(en)SG\}_2-\mu-\{H_2N(CH_2)_6NH_2\}]$, у коме се за сваки платина(II) јон везује GSH.¹¹⁹ За разлику од *trans* динуклеарних комплекса, код комплекса са *cis* конфигурацијом супституционе реакције са сумпор-донорским лигандима нису праћене деградацијом структуре комплекса.¹²⁰



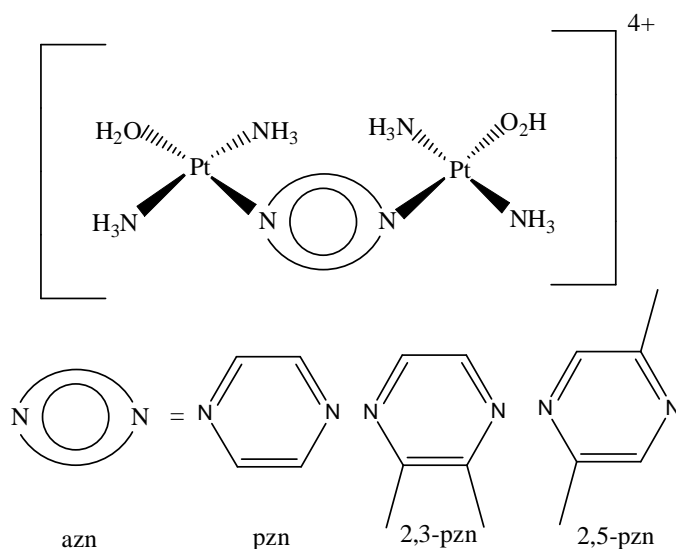
Слика 1.11. Структурна формула комплекса $[\{Pt(en)Cl\}_2-\mu-\{H_2N(CH_2)_6NH_2\}]^{2+}$

Важно место у групи антитуморских једињења на бази платине имају комплекси који у својој структури поседују молекул 1,2-диаминциклохексан (dach). Dach лиганд је специфичан по томе што садржи два асиметрична угљеникова атома и може да постоји у облику три изомера: *cis-R,S-dach*, *trans-R,R-dach* и *trans-S,S-dach*. Комплекси платине(II) са *cis-R,S-dach* лигандом су показали најмању, а са *trans-S,S-dach* највећу антитуморску активност. Испитивано је понашање бифункционалних динуклеарних комплекса типа $[\{Pt(dach)Cl\}_2-\mu-Y]^{n+}Cl_n$ ($Y = H_2N(CH_2)_3NH_2(CH_2)_4NH_2$, $H_2N(CH_2)_6NH_2(CH_2)_6NH_2$, $H_2N(CH_2)_6NH_2(CH_2)_2NH_2(CH_2)_6NH_2$) (Слика 1.12) у присуству 5'-GMP при различитим рН вредностима. При томе је запажено да при физиолошким условима долази до супституције оба хлоридо јона, док се после извесног времена јавља могућност циклизације која је фаворизована при вишим рН. У процесу циклизације један јон платине се хелатно везује за централну и терминалну аминок групу мостног лиганда.¹²¹



Слика 1.12. Динуклеарни комплекси типа $[\{Pt(dach)Cl\}_2\text{-}\mu\text{-Y}]^{n+}$

Као што је раније наведено, у синтези динуклеарних комплекса као крути мостни лиганди су често коришћени молекули азина.¹²² Структурне формуле неких динуклеарних комплекса платине(II) са пиразином и његовим супституисаним дериватима приказане су на Слици 1.13. Упоредиване су вредности за константе брзине реакција супституције наведених комплекса са тиоуреом и њеним дериватима. На основу добијених резултата може се рећи да увођењем метил група у молекулу пиразина, с обзиром на њихов σ -индуктивни ефекат, долази до смањења реактивности платина(II) јона. Као разлог се може навести повећање електронске густине око јона метала и повећање стерних сметњи, чиме је улазном лиганду отежано да приђе до централног јона метала.¹⁰¹



Слика 1.13. Динуклеарни комплекси платина $[{trans-Pt(NH_3)_2(H_2O)}]_2(\mu-azn)]^{4+}$

На основу свега наведеног може се видети да су истраживања у области синтезе и карактеризације комплексних једињења на бази платине врло заступљена међу истраживачима. Поред тога, на основу великог броја публикованих резултата могу се на неки начин предвидети карактеристике нових комплекса. Међутим, велики број ефеката се мора узети у обзир приликом избора инертних и лабилних лиганда, јер они значајно дефинишу особине (растворљивост, редокс потенцијал, липофилност и др.) нових једињења. С обзиром да су истраживања у области октаедарских комплекса платине(IV) и полинуклеарних платина(II) комплекса мање заступљена у односу на мононуклеарне комплексе платине(II), наша истраживања су управо била усмерена ка синтези и детаљном испитивању реакција супституције и редукције неких комплекса платине(IV), као и упоређивању њихових карактеристика са платина(II) аналозима. Поред тога, у овој тези су приказани и резултати испитивања неких динуклеарних комплекса платине(II) у реакцијама са биолошки значајним лигандима. Сматрамо да резултати добијени у оквиру ове тезе могу значајно допринети бољем разумевању карактеристика комплекса платине и механизма њихових интеракција са примарним биомолекулима.

ЗАДАТАК РАДА

Предмет ове докторске дисертације био је испитивање супституционих реакција мононуклеарних и динуклеарних комплекса платине(II), као и испитивање реакција супституције и редукције комплекса платине(IV) са биолошки значајним лигандима. Наведена испитивања могу се поделити на следећи начин:

- ❖ Испитивање супституционих реакција комплекса $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ са азот-донорским лигандима L-His и 5'-GMP помоћу Uv-Vis спектрофотометрије, ^1H NMR спектроскопије и HPLC методе.
- ❖ Испитивање механизма супституционих реакција комплекса $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ са азот-донорским лигандима применом Uv-Vis спектрофотометрије, ^1H NMR спектроскопије и HPLC методе.
- ❖ Испитивање кинетике и механизма редокс-реакција $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са сумпор-донорским лигандима GSH, L-Cys и L-Met помоћу Uv-Vis stopped-flow спектрофотометрије на pH = 2,0 и pH = 7,2.
- ❖ Синтеза, карактеризација и механизам супституционих реакција динуклеарних комплекса платине(II) са азот- и сумпор-донорским лигандима.
- ❖ Испитивање цитотоксичности комплекса платине(IV) и динуклеарних комплекса платине(II).

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1. Реагенси и раствори

Комплекси $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ су синтетисани по раније публикованим поступцима.^{61,73,123,124} Чистоћа добијених једињења потврђена је елементалном анализом, Uv-Vis спектрофотометријом, IR и ^1H NMR спектроскопијом.

K_2PtCl_4 (Strem Chemicals), *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (Acros Organics), D_2O (Deutero GmbH 99 %), NaOH (Merck), NaCl (Zorka Šabac), хепес пуфер (N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфидна киселина) (Aldrich), H_2O_2 (Zorka Šabac) 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, bipy, (Aldrich), етилендиамин, en, (Merck), 1,2-диаминциклохексан, dach, (Acros Organics), L-цистеин, L-Cys, (Aldrich), L-метионин, L-Met, (Aldrich), диметилформаид, DMF, (Acros Organics) и анјон етилендиаминтетрасирћетне киселине, EDTA, (Acros Organics), коришћени су, такође, без предходног пречишћавања.

При синтези нових динуклеарних комплексних једињења као мостни лиганди употребљени су пиразин, 4,4'-бипиридин и 1,2-*бис*(4-пиридил)етан (Acros Organics).

Реакције комплекса $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ као и динуклеарних комплекса платине(II) су изучаване у 25 mM хепес пуферу. Поред тога, реакције комплекса $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ изучаване су у 0,01 M HClO_4 (Merck), док су супституционе реакције динуклеарних комплекса платине(II) извођене у 0,01 M NaClO_4 (Merck). Перхлоратна средина је одабрана за изучавање реакција јер је познато да се перхлоратни јон не координује за платину(II) јон.¹²⁵ Сви водени раствори припремани су у бидестилованој води. За HPLC методу као елуенти су коришћени ацетонитрил, MeCN, (J. S. Baker) и вода HPLC чистоће.

За испитивање цитотоксичности комплекса коришћене су ћелијске линије хуманог тумора јајника (TOV21G) и дебелог црева (HCT-116) (American Type Culture Collection).

Хумане мезенхималне матичне ћелије (MSC) из периферне крви су добијене од др Диане Бугарски (Медицински факултет, Универзитет у Београду, Србија).

2.1.1. Синтеза комплекса

1. Синтеза комплекса [Pt(bipy)Cl₂]: У водени раствор комплекса K₂PtCl₄ (0,1 g, 0,24 mmol) додат је један еквивалент лиганда 2,2'-бипиридина (bipy) (0,037 g, 0,24 mmol). Тако добијена суспензија је мешана на собној температури 2 сата, а затим је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,073 g (72 %). Израчунато за PtCl₂N₂C₁₀H₈: C, 28,45; H, 1,91; N, 6,64; Нађено: C, 27,98; H, 1,87; N, 6,53.

2. Синтеза комплекса [Pt(dach)Cl₂]: У водени раствор комплекса K₂PtCl₄ (0,1 g, 0,24 mmol) додат је један еквивалент лиганда 1,2-диаминциклохексана (dach) (0,027 g, 0,24 mmol). Тако добијена суспензија је мешана на собној температури 2 сата, а затим је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,068 g (74 %). Израчунато за PtCl₂N₂C₆H₁₄: C, 18,98; H, 3,71; N, 7,37; Нађено: C, 18,87; H, 3,67; N, 7,35.

3. Синтеза комплекса [Pt(en)Cl₂]: У водени раствор комплекса K₂PtCl₄ (0,1 g, 0,24 mmol) додат је један еквивалент лиганда етилендиамина (en) (16 μ l, 0,014 g, 0,24 mmol). Тако добијена суспензија је мешана на собној температури 2 сата, а затим је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,059 g (75 %). Израчунато за PtCl₂N₂C₂H₈: C, 7,37; H, 2,47; N, 8,59; Нађено: C, 7,28; H, 2,39; N, 8,30.

4. Синтеза комплекса [Pt(bipy)Cl₄]: Комплекс [Pt(bipy)Cl₂] (0,073 g, 0,17 mmol) је растворен у 0,1 M NaCl на pH = 2 (0,01 M HCl), а затим је додато 5 cm³ 30 % H₂O₂. Тако добијена смеша је мешана на собној температури 30 минута, а затим је рефлукована 10 минута уз загревање. После хлађења, суспензија је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,068 g (80 %). Израчунато за PtCl₄N₂C₁₀H₈: C, 24,36; H, 1,64; N, 5,68; Нађено: C, 23,98; H, 1,76; N, 5,64.

5. Синтеза комплекса [Pt(dach)Cl₄]: Комплекс [Pt(dach)Cl₂] (0,068 g, 0,179 mmol) је растворен у 0,1 М NaCl на рН = 2 (0,01 М HCl), а затим је додато 5 cm³ 30 % H₂O₂. Тако добијена смеша је мешана на собној температури 30 минута, а затим је рефлугована 10 минута уз загревање. После хлађења, суспензија је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,065 g (82 %). Израчунато за PtCl₄N₂C₆H₁₄: C, 15,98; H, 3,13; N, 6,21; Нађено: C, 15,68; H, 3,11; N, 6,18.

6. Синтеза комплекса [Pt(en)Cl₄]: Комплекс [Pt(en)Cl₂] (0,059 g, 0,180 mmol) је растворен у 0,1 М NaCl на рН = 2 (0,01 М HCl), а затим је додато 5 cm³ 30 % H₂O₂. Тако добијена смеша је мешана на собној температури 30 минута, а затим је рефлугована 10 минута уз загревање. После хлађења, суспензија је процеђена кроз Millipore филтере. Добијени талог жуте боје је испран етанолом и етром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,046 g (64 %). Израчунато за PtCl₄N₂C₂H₈: C, 6,05; H, 2,03; N, 7,06; Нађено: C, 6,14; H, 2,05; N, 6,99.

Динуклеарни комплекси [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-пиразин)](ClO₄)₂ (**Pt1**), [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-4,4'-бипиридин)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) и [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-1,2-бис(4-пиридил)етан)](ClO₄)₂ (**Pt3**) су синтетисани према процедури коју је објавио Ридајк (Reedijk).⁹² Као полазни комплекс за синтезу поменутих динуклеарних комплекса платине(II) коришћен је *trans*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)](ClO₄).

1. Синтеза комплекса *trans*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)](ClO₄): У раствор комплекса *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂] (0,1 g, 0,33 mmol) у 5 cm³ DMF додат је један еквивалент AgClO₄ (0,069 g, 0,33 mmol) такође у DMF. Тако добијени раствор је мешан преко ноћи у мраку и настали бели талог AgCl је процеђен кроз Millipore филтере. Настали раствор *trans*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)](ClO₄) жуте боје је коришћен као полазни комплекс за синтезу динуклеарних комплекса платине(II).

2. Синтеза комплекса [{*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ-пиразин)](ClO₄)₂ (**Pt1**): У раствор комплекса *trans*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)](ClO₄) (0,145 g, 0,33 mmol) је додат у капима раствор мостног лиганда пиразина (0,013 g, 0,165 mmol) у DMF у односу 2 : 1 (комплекс : мостни лиганд). Тако добијени раствор је мешан на собној температури 3 сата у мраку. После упаравања на вакуум упаривачу настали талог светло жуте боје је испран диетилетром, а затим остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,141 g (52,80%). Израчунато за

$C_4H_{16}N_6Pt_2Cl_4O_8$: С, 5,94; Н, 2,00; N, 10,40; Нађено: С, 6,38; Н, 2,10; N, 9,95; 1H NMR (D_2O , 25 °C) δ (ppm) 2,0 (m, 2H, NH_2), 8,63 (m, 1H, CH, пиразин).

3. Синтеза комплекса [$\{trans-PtCl(NH_3)_2\}_2(\mu-4,4'$ -бипиридин)](ClO_4) $_2 \cdot DMF$ (**Pt2**): У раствор комплекса $trans-[PtCl(NH_3)_2(DMF)](ClO_4)$ (0,145 g, 0,33 mmol) је додат у капима раствор мостног лиганда 4,4'-бипиридина (0,025 g, 0,165 mmol) у DMF у односу 2 : 1 (комплекс : мостни лиганд). Тако добијени раствор је мешан на собној температури 3 сата у мраку. После упаравања на вакуум упаривачу настали талог светло жуте боје је испран диетилетром и остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,220 g (69,64%). Израчунато за $C_{13}H_{27}N_7Pt_2Cl_4O_9$: С, 16,31; Н, 2,84; N, 10,24; Нађено: С, 16,79; Н, 2,80; N, 10,08; 1H NMR (D_2O , 25 °C) δ (ppm) 2,0 (m, 2H, NH_2), 2,93 (s, 1H, CH_3 , DMF), 7,28 (m, 1H, CH, 4-пиридин), 8,02 (s, 1H, CHO , DMF), 8,59 (m, 1H, CH, 4- пиридин).

4. Синтеза комплекса [$\{trans-PtCl(NH_3)_2\}_2(\mu-1,2$ -бис(4-пиридил)етан)](ClO_4) $_2$ (**Pt3**): У раствор комплекса $trans-[PtCl(NH_3)_2(DMF)](ClO_4)$ (0,145 g, 0,33 mmol) је додат у капима раствор мостног лиганда 1,2-бис(4-пиридил)етана (0,030 g, 0,165 mmol) у DMF у односу 2 : 1 (комплекс : мостни лиганд). Тако добијени раствор је мешан на собној температури 3 сата у мраку. После упаравања на вакуум упаривачу настали талог светло жуте боје је испран диетилетром, а затим остављен да се суши на ваздуху. Принос: 0,195 g (64,78%). Израчунато за $C_{12}H_{24}N_6Pt_2Cl_4O_8$: С, 15,80; Н, 2,65; N, 9,21; Нађено: С, 15,16; Н, 2,71; N, 9,06; 1H NMR (D_2O , 25 °C) δ (ppm) 2,0 (m, 2H, NH_2), 2,88 (m, 2H, CH_2 , етан), 7,28 (m, 1H, CH, 4-пиридин), 8,59 (m, 1H, CH, 4- пиридин).

Превођење динуклеарних комплекса **Pt1**, **Pt2** и **Pt3** у диаква јоне [$\{trans-Pt(NH_3)_2(H_2O)\}_2(\mu$ -пиразин)] $^{4+}$ (**Pt1a**), [$\{trans-Pt(NH_3)_2(H_2O)\}_2(\mu-4,4'$ -бипиридин)] $^{4+}$ (**Pt2a**) и [$\{trans-Pt(NH_3)_2(H_2O)\}_2(\mu-1,2$ -бис(4-пиридил)етан)] $^{4+}$ (**Pt3a**) је постигнуто додатком по два еквивалента $AgClO_4$ у растворе хлоридо комплекса и загревањем смеше 8 сати на 50 °C уз непрестано мешање. Настали талог $AgCl$ је процеђен кроз Millipore филтере, при чему се нарочито водило рачуна да у филтрату нема трагова Ag^+ јона, тј. да су дихлоридо комплекси потпуно преведени у диаква честице.

Синтеза аква комплекса платине(IV), $[Pt(en)Cl_3(H_2O)]^+$, је постигнута додатком једног еквивалента $AgClO_4$ у раствор комплекса $[Pt(en)Cl_4]$ у перхлорној киселини на $pH = 3,0$, мешањем у мраку на собној температури, 2 сата. Настали бели талог $AgCl$ је процеђен кроз Millipore филтере.

2.2. 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.

HPLC анализа вршена је на апарату Shimadzu LC са SDP-M20A diode array детектором. За раздвајање је коришћена аналитичка колона NUCLEOSIL 100–5 C₁₈ (250 × 4, 5 μm).

2.3. Кинетичка мерења

2.3.1. Супституционе реакције комплекса платине(II) и платине(IV)

Кинетика реакција супституције [Pt(dach)Cl₂], [Pt(en)Cl₂], [Pt(dach)Cl₄] и [Pt(en)Cl₄] комплекса са 5'-GMP и L-His, као и [Pt(bipy)Cl₄] комплекса са 5'-GMP изучаване су Uv-Vis спектрофотометријски. Све реакције су проучаване као реакције *pseudo*-првог реда на температури од 37 °C у 25 mM хепес пуферу (рН = 7,2) уз додатак 10 mM NaCl.

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 *псеудо*-првог реда. Спектрофотометријско одређивање константе брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , врши се праћењем промене апсорбције раствора A_t са временом t на одређеној таласној дужини,⁸ на основу једначине (2.3.1.1).

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obsd}} t \quad (2.3.1.1)$$

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

2.3.2. Редокс-реакције комплекса платине(IV)

Редукција комплекса $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ помоћу сумпор-донорских лиганата (GSH, L-Cys, L-Met) праћена је помоћу Uv-Vis stopped-flow спектрофотометрије. Реакције су изучаване на $\text{pH} = 2,0$ (0,01 M HClO_4) и на $\text{pH} = 7,2$ (25 mM хепес пуфер) у присуству 0,2 M NaCl. Поменуте реакције су испитиване и у одсуству NaCl, док су реакције са GSH на $\text{pH} = 7,2$ изучаване у присуству различитих концентрација NaCl. Сва кинетичка мерења су вршена праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена на 37 °C. Радна таласна дужина за сваки проучавани систем је одређена на начин као што је описано у делу 2.3.1. Реакције су започете мешањем истих запремина раствора комплекса и лиганата директно у апарату. Кинетика испитиваних реакција је праћена под условима реакција *псеудо*-првог реда (концентрација лиганата је била 10-30 пута већа у односу на концентрацију комплекса).

2.3.3. Реакције динуклеарних комплекса **Pt1**, **Pt2** и **Pt3** и њихових диаква аналога **Pt1a**, **Pt2a** и **Pt3a** са тиуреом, глутатионом и гуанозин-5'- монофосфатом

Кинетика и механизам супституционих реакција динуклеарних комплекса [*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ -пиразин)](ClO₄)₂ (**Pt1**), [*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ -4,4'-бипиридин)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) и [*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ -1,2-бис(4-пиридил)етан)](ClO₄)₂ (**Pt3**) и њихових диаква аналога [*trans*-Pt(NH₃)₂(H₂O)]₂(μ -пиразин)]⁴⁺ (**Pt1a**), [*trans*-Pt(NH₃)₂(H₂O)]₂(μ -4,4'-бипиридин)]⁴⁺ (**Pt2a**) и [*trans*-Pt(NH₃)₂(H₂O)]₂(μ -1,2-бис(4-пиридил)етан)]⁴⁺ (**Pt3a**) са Tu, GSH и 5'-GMP изучаване су спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора са временом на радној таласној дужини. Реакција комплекса **Pt1a** са Tu изучавана је помоћу stopped-flow методе. У свим системима концентрација лиганда била је у великом вишку (најмање 10 пута) у односу на концентрацију полазног комплекса, како би се обезбедили услови реакције *псеудо*-првог реда. Реакције су праћене на 37 °C, изузев реакција са 5'-GMP, које су изучаване и на 25 °C и 45 °C. Реакције хлоридо комплекса изучаване су на pH = 7,2 (25 mM хепес пуфер) уз додатак 20 mM NaCl, док су реакције аналогних диаква комплекса испитиване у 0,01 M NaClO₄ на pH = 2,5 (HClO₄).

2.4. ¹H NMR мерења

Реакције супституције [Pt(dach)Cl₂] и [Pt(en)Cl₂] комплекса са L-His, као и реакције супституције [Pt(en)Cl₄] и [Pt(dach)Cl₄] комплекса са L-His и 5'-GMP изучаване су ¹H NMR спектроскопијом у моларном односу 1 : 1. Почетне концентрације реактаната биле су 5 mM. Супституционе реакције динуклеарних комплекса **Pt2** и **Pt3** са 5'-GMP праћене су у моларном односу 1 : 2, при чему је почетна концентрација комплекса била 10 mM, а лиганда 20 mM. Реакција између [Pt(en)Cl₄] комплекса и GSH је такође изучавана у моларном односу 1 : 2, али је у овом случају почетна концентрација комплекса била 2 mM, а лиганда 4 mM.

Раствори комплекса и лиганда су припремани у 300 μ L D₂O непосредно пре почетка снимања спектра. Киселост раствора, pD (pD = pH + 0,4),¹²⁶ подешавана је додатком 0,01-0,05 M раствора NaOD или DCl. Сва хемијска померања дата су у односу на TSP (натријум-триметилсилилпропан-3-сулфат). Сви спектри су снимани на 22 °C, а

добијени резултати су анализирани помоћу компјутерских програма Origin 6.1 и Microsoft Excel 2003.

2.5. HPLC метода

HPLC метода је облик хроматографије на колони и користи се за раздвајање компоненти из смесе на основу хемијских интеракција између супстанце која се анализира и стационарне фазе у колони. Принцип рада HPLC методе се заснива на расподели анализираних супстанци између растварача (мобилне фазе) и адсорбенса (стационарне фазе). Мала запремина узорка се убацује у ток мобилне фазе. Време задржавања компоненти смеше на колони (ретенционо време) зависи од природе супстанце која се анализира, врсте стационарне фазе и састава мобилне фазе. HPLC метода има велике предности у односу на друге хроматографске методе због брзине анализе, могућности раздвајања великих молекула и јонских врста, вишеструке употребе колоне и велике осетљивости UV детектора. Могуће је користити изократско елуирање, када се састав мобилне фазе не мења у току хроматографије, и градијентно елуирање, што подразумева промену састава мобилне фазе у току елуирања.

Реакције $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са L-His су изучаване изократски. Пре почетка мерења систем је калибрисан елуентом MeCN и H₂O у различитом запреминском односу, где је почетни однос био MeCN : H₂O = 100% : 0%. Као мобилна фаза је коришћена вода. Сви други параметри као што су притисак, брзина протока и радна таласна дужина подешени су у зависности од испитиваног система.

За сваку реакцију раствори комплекса концентрације 5 mM и лиганда 100 mM су припремани у 25 mM хепес пуферу уз додаток 10 mM NaCl. Реакције су праћене неколико дана, а хроматограми су снимани у тачно дефинисаним временским интервалима. У међувремену раствори су чувани у термоблоку на 37 °C.

2.6. Спектрофотометријска титрација јона Pt1a, Pt2a и Pt3a

У циљу одређивања pK_a вредности, раствори динуклеарних комплекса Pt1a, Pt2a и Pt3a титровани су помоћу стандардног раствора NaOH на 25 °C у опсегу pH од 2 до 10, а 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 (250 cm³). Промена pH из 2 у 3 постигнута је додатком тачно одмерене количине чврстог NaOH, а затим је раствор титрован стандардним раствором NaOH концентрације 0,1 M помоћу микропипете. Ради спречавања контаминације раствора комплекса услед урањања стаклене електроде, за свако мерење узимани су аликвоти од по 2 cm³ раствора.

2.7. Испитивање цитотоксичности - МТТ тест

МТТ тест је метода којом се индиректно одређује проценат преживелих ћелија. МТТ или 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама се МТТ редукује до нерастворних љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија. Број ћелија у експоненцијалној фази раста је одређен коришћењем *Neubauer*-ове коморе уз искључење мртвих ћелија, тј., ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена.

Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Продуковани формазан се раствара у органским растварачима и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 595 nm. Процент преживелих ћелија је израчунат помоћу формуле (2.7.1):

$$\% \text{ преживелих ћелија} = (E-B)/(K-B) \times 100 \quad (2.7.1)$$

у којој Е-означава отвор са испитиваним супстанцама, Б-бланк, а К-отвор са нетретираним ћелијама.

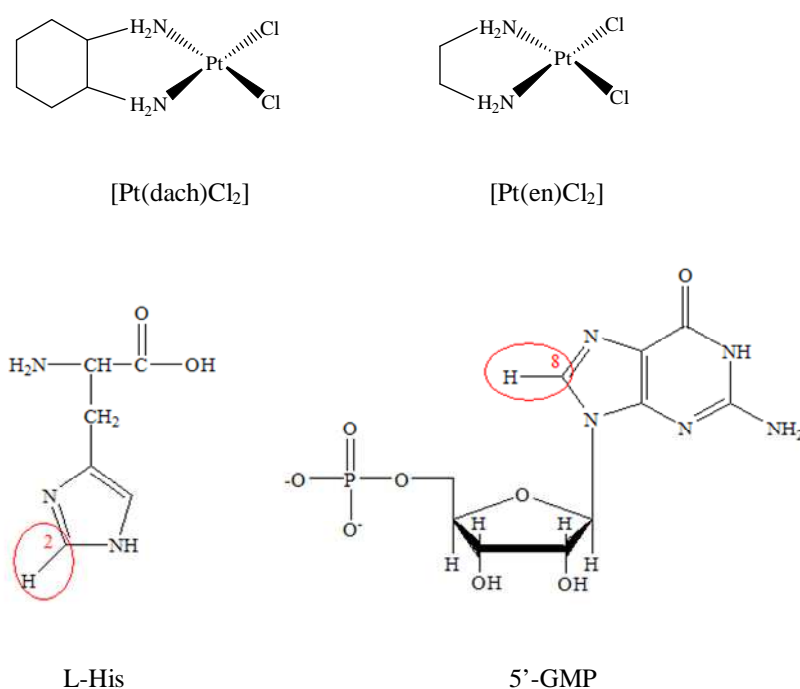
Тестови су извођени на хуманим туморским ћелијским линијама (TOV-21G и НСТ-116), а као контрола коришћене су хумане матичне мезенхималне ћелије. Културе су одгајане у 1 : 1 смеси MCDB105 и Medium 199 (TOV-21G) и DMEM (НСТ-116) која је допуњена са 10-15 % говеђег серума, 100 јединица/cm³ пеницилина и 100 mg/cm³ стрептомицина. Залеђена крио вајлица са 1 cm³ ћелијске суспензије је одлеђена и садржај је пребачен у епрувету са 9 cm³ комплетног медијума и центрифугиран 10 минута на 125 G. Супернатант је одливен, исталожене ћелије су ресуспендоване у 5 cm³ комплетног медијума и пребачене у Т-25 фласк. Ћелије су гајене у инкубатору са стандардним условима (температура 37 °C и процентуални удео CO₂ у ваздуху 5%). После 24 сата ћелије су третиране са изабраним концентрацијама комплекса 3 дана. У посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума. После инкубације медијум који је садржао лек је бачен и замењен серумом без медијума који је садржао 15 % МТТ (5 mg/cm³) боје. После инкубације од 4 сата на 37 °C медијум са МТТ је уклоњен и додат је DMSO (150 µl) са глицин пуфером (20 µl), да би се растворили плави кристали формазана. Плоче су мућкане до растварања кристала формазана 10 минута. Оптичка густина узорака је одређена мултифункционалним читачем микротитар плоча, Zenyth 3100.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

3.1. Испитивање кинетике супституционих реакција $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса са гуанозин-5'-монофосфатом и L-хистидином

3.1.1. Uv-Vis спектрофотометријска мерења

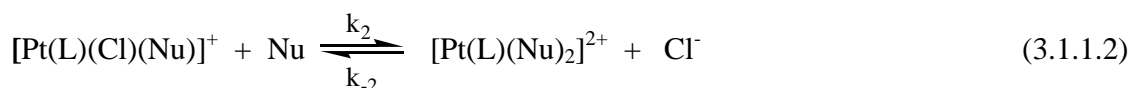
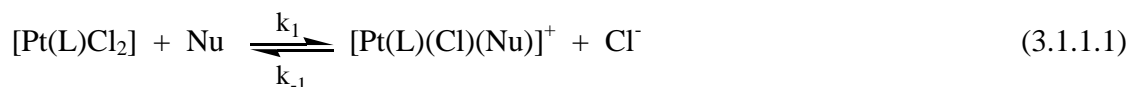
Кинетика супституционих реакција $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса са 5'-GMP и L-His испитивана је Uv-Vis спектрофотометријски. Реакције су изучаване као реакције *pseudo*-првог реда на 37 °C у 25 mM хепес пуферу (pH = 7,2). Хепес пуфер је најчешће коришћен пуфер при ћелијском тестирању везивања ДНК и антитуморских агенаса на бази комплекса платине(II). Погодан је јер је стерно заштићен и не координује се за платину(II) јон.¹²⁷ Све супституционе реакције изучаване су у присуству 10 mM NaCl, како би се сузбила хидролиза комплекса. Структурне формуле испитиваних комплекса и лиганата дате су на Слици 3.1.



Слика 3.1. Структурне формуле испитиваних комплекса и лиганата

Реакције су изучаване мерењем промене апсорбанце раствора са временом на одговарајућој радној таласној дужини. Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција другог реда помоћу компјутерског програма Origin 6.1. На тај начин, за сваки изучавани систем су израчунате две вредности за констану брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd1} и k_{obsd2} .

На основу добијених резултата закључено је да се супституционе реакције изучаваних комплекса $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ са 5'-GMP и L-His одигравају у два узастопна корака. У првом кораку улазни лиганд супституише један хлоридни јон из координационе сфере полазног комплекса, док се у другом кораку врши супституција другог хлоридног јона. Сваки корак је реверзибилна реакција, што је приказано једначинама (3.1.1.1) и (3.1.1.2), у којима L означава бидентатни инертни лиганд (dach или en), а Nu улазни лиганд (5'-GMP или L-His). Реакције директне супституције окарактерисане су константама k_1 , за први корак, и k_2 , за други корак супституције, док су реверзибилни процеси окарактерисани константама k_{-1} и k_{-2} .

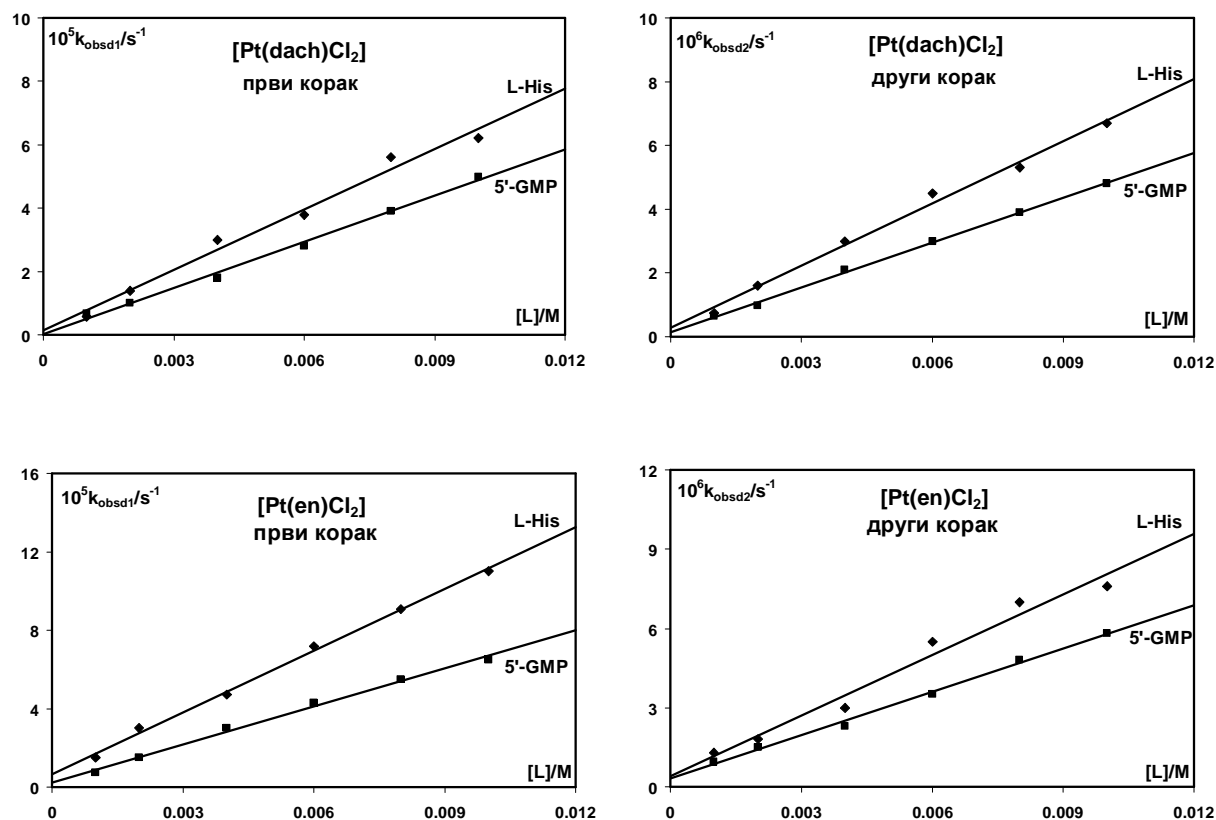


Повезаност константе брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd1} и k_{obsd2} , са поменутиим константама за директне и повратне процесе супституције дате су једначинама (3.1.1.3 и 3.1.1.4):

$$k_{\text{obsd1}} = k_{-1} + k_1[\text{Nu}] \quad (3.1.1.3)$$

$$k_{\text{obsd2}} = k_{-2} + k_2[\text{Nu}] \quad (3.1.1.4)$$

На Слици 3.2, приказане су експериментално добијене зависности константи брзине реакција *псеудо*-првог реда за први, k_{obsd1} , и за други, k_{obsd2} , корак супституције у односу на концентрацију улазног лиганда.



Слика 3.2. Зависност константе брзине реакција псеудо-првог реда за први, k_{obsd1} , и за други, k_{obsd2} , корак супституције од концентрације лиганда на 37 °C, $pH = 7,2$ и 10 mM NaCl

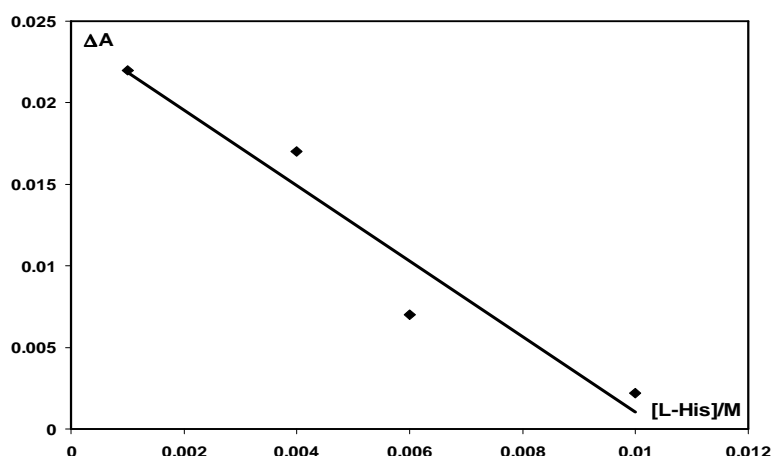
На основу Сlike 3.2 може се видети да је у свим случајевима добијена линеарна зависност константе брзине реакција псеудо-првог реда од концентрације улазног лиганда. Константе брзине директне реакције супституције (k_1 и k_2) су израчунате из нагиба добијених права, док су константе које карактеришу повратне процесе (k_{-1} и k_{-2}) израчунате из одсечка. Добијене вредности за константе брзине дате су у Табели 3.1.

Табела 3.1. Константе брзине за први и други корак реакције супституције [Pt(dach)Cl₂] и [Pt(en)Cl₂] комплекса са 5'-GMP и L-His на 37 °C, pH = 7,2 и 10 mM NaCl

Први корак						
L-His				5'-GMP		
	λ/nm	$10^3 k_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^6 k_{-1}/\text{s}^{-1}$	λ/nm	$10^3 k_1/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^6 k_{-1}/\text{s}^{-1}$
[Pt(en)Cl ₂]	360	$10,5 \pm 0,3$ $0,75 \pm 0,06^a$	$7,0 \pm 2,0$	380	$6,5 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,4$
[Pt(dach)Cl ₂]	360	$6,4 \pm 0,4$ $0,68 \pm 0,02^a$	$1,5 \pm 0,1$	325	$4,9 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$
Други корак						
L-His				5'-GMP		
	λ/nm	$10^4 k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^7 k_{-2}/\text{s}^{-1}$	λ/nm	$10^4 k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^7 k_{-2}/\text{s}^{-1}$
[Pt(en)Cl ₂]	360	$7,7 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,2$	380	$5,5 \pm 0,2$	$3,2 \pm 1,0$
[Pt(dach)Cl ₂]	360	$6,5 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,1$	325	$4,7 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,6$

^aКонстанте брзине одређене помоћу ¹H NMR спектроскопије на 22 °C

Добро је познато да се супституционе реакције квадратно-планарних комплекса одвијају по два паралелна кинетичка пута: директна нуклеофилна супституција и солволитички пут. У нашим изучаваним системима солволитички пут је елиминисан због додатка 10 mM NaCl. Међутим, на графицима приказаним на Слици 3.2 добијен је значајан одсечак, који се, у овом случају, може објаснити појавом равнотежних процеса. Наиме, праћењем промене апсорбанце ΔA у функцији концентрације улазног лиганда потврђено је присуство равнотежних процеса, јер промена апсорбанце са повећањем концентрације улазног лиганда опада значајније код прве реакције, у односу на спорију другу реакцију. На Слици 3.3 је приказана промена апсорбанце са повећањем концентрације L-His за први корак реакције супституције комплекса [Pt(en)Cl₂]. На овај начин је потврђена реверзибилност оба супституциона корака, као и чињеница да је први корак супституције знатно бржи од другог корака.^{124,128,129}



Слика 3.3. Промена апсорбанце, ΔA , у функцији концентрације лиганда за реакцију $[Pt(en)Cl_2]$ комплекса и *L-His* на $37^\circ C$, $pH = 7,2$ и 10 mM NaCl

Молекул $5'$ -GMP може да се координује за јоне метала преко N1 и N7 доносних атома. У неутралној и слабо киселој средини N1 атом у молекулу $5'$ -GMP је протонан, $pK_a(N1) = 9,3^{124}$, док је N7 атом, чија је константа киселости $pK_a(N7) = 2,48^{124}$ у тим условима депротонан. На тај начин се објашњава фаворизовано везивање јона метала преко N7 атома из $5'$ -GMP у биолошким системима.¹³⁰⁻¹³³ Аминокиселина *L-His* се може координовати за јоне метала преко N1 и N3 атома имидазолног прстена. На $pH = 7,2$ координација се преваходно врши преко N3 атома ($pK_a(N3) = 6,5$).^{134,135}

На основу добијених вредности за константу брзине k_1 (Табела 3.1) може се видети да $[Pt(en)Cl_2]$ показује већу реактивност према одабраним лигандима у односу на $[Pt(dach)Cl_2]$ комплекс. Разлика у реактивности ова два комплекса се може објаснити геометријом и волуминозношћу инертних лиганда. Комплекс $[Pt(dach)Cl_2]$ поседује волуминознији инертни лиганд, па је самим тим отежан прилаз улазног лиганда у процесу супституције. Са друге стране, мања реактивност $[Pt(dach)Cl_2]$ комплекса може се објаснити присуством позитивног индуктивног ефекта циклохексановог прстена, који смањује електрофилност јона метала.¹²⁴

Други корак супституције је знатно спорији (око 10 – 15 пута) у односу на први корак (Табела 3.1). С обзиром да је у структури полазног комплекса један хлоридни јон

већ замењен волуминозним улазним лигандом, супституција другог хлоридног јона је у овом ступњу знатно отежана.

Редослед реактивности коришћених улазних лиганда је исти у процесу супституције [Pt(dach)Cl₂] и [Pt(en)Cl₂] комплекса. Аминокиселина L-His је у свим случајевима показала већу реактивност у односу на молекул 5'-GMP. Разлика у реактивности ова два лиганда се може објаснити разликом у њиховој волуминозности, која је у случају молекула 5'-GMP знатно израженија. Такође, N3 атом из молекула L-His је знатно базнији у односу на N7 атом из молекула 5'-GMP, па је самим тим јачи нуклеофил.

Константе брзине повратних реакција, k_{-1} и k_{-2} , су око три реда величине мање у односу на константе брзине директних реакција и веома мало доприносе укупној брзини.

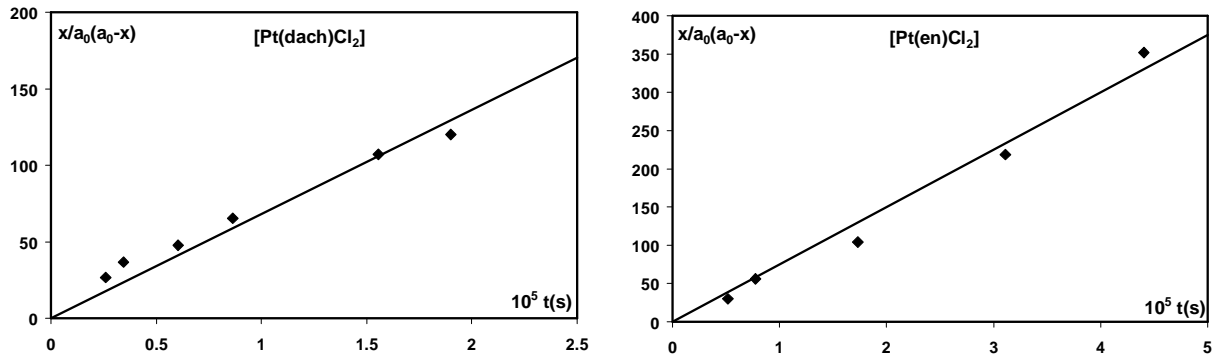
3.1.2. ¹H NMR кинетичка мерења

Кинетика супституционих реакција [Pt(dach)Cl₂] и [Pt(en)Cl₂] комплекса са L-His испитивана је и ¹H NMR спектроскопијом. Реакције су праћене у еквимоларном односу комплекса и лиганда на рD = 8,42 у временском интервалу од 5 дана. Константа брзине реакције другог реда, k_1 , у овом случају, одређена је на основу једначине (3.1.2.1):

$$k_1 t = \frac{x}{a_0(a_0 - x)} \quad (3.1.2.1)$$

у којој a_0 представља почетну концентрацију реактанта, а x концентрацију производа супституционе реакције.⁸ Израчунавање концентрације производа реакције је вршено на основу интензитета одговарајућих сигнала у ¹H NMR спектру који потичу од координованог и слободног лиганда (грешка процене је 5%). Вредности за константе брзине (Табела 3.1) добијају се из нагиба Гугенхајмове (Guggenheim) праве,^{13,136} која представља зависност $x/a_0(a_0-x)$ у функцији од времена t (Слика 3.4). На основу израчунатих константи може се потврдити исти редослед реактивности испитиваних комплекса. Поред тога, константе добијене ¹H NMR спектроскопијом су 8-12 пута мање од

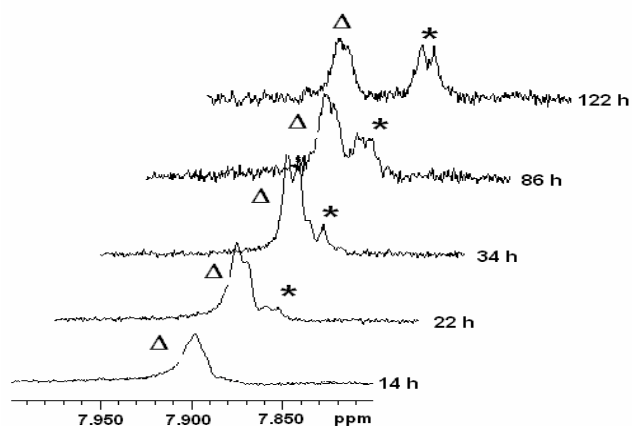
вредности добијених помоћу Uv-Vis спектрофотометрије, што се може приписати утицају температуре, имајући у виду да су ^1H NMR експерименти извођени на $22\text{ }^\circ\text{C}$.



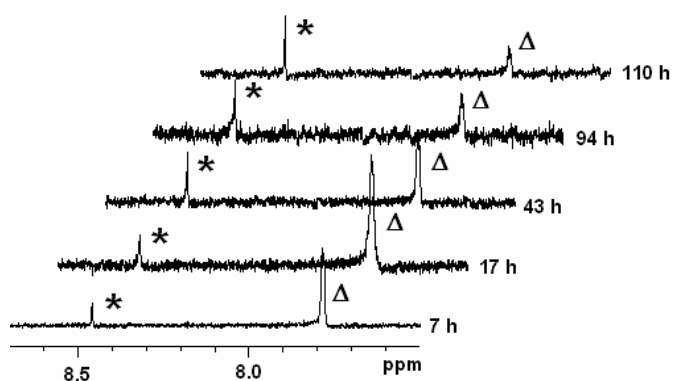
Слика 3.4. Guggenheim-ова зависност $x/a_0(a_0-x)$ у функцији од времена t за реакције супституције (5 mM) $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса са (5 mM) L-His на $22\text{ }^\circ\text{C}$ и на $pD = 8,42$

Анализом добијених спектра за реакцију супституције $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса и L-His (Слика 3.5) може се видети да интензитет сигнала који потиче од H_2 протона слободног L-His на $\delta = 7,930$ ppm опада, док се после 22 сата у спектру појављује сигнал H_2 протона координованог L-His на $\delta = 7,878$ ppm, чији интензитет са временом расте. После 5 дана, интензитети ова два сигнала су приближно исти.

За реакцију $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ комплекса и L-His (Слика 3.6) на хемијском померању $\delta = 8,462$ ppm појављује се сигнал који потиче од H_2 протона координованог лиганда и његов интензитет расте са временом. Истовремено, интензитет сигнала H_2 протона слободног лиганда на $\delta = 7,878$ ppm опада.



Слика 3.5. ¹H NMR спектар реакције супституције (5 mM) [Pt(en)Cl₂] комплекса и (5 mM) L-His на 22 °C и pD = 8,42; (Δ) - H2 протон слободог L-His; (*) - H2 протон координаног L-His

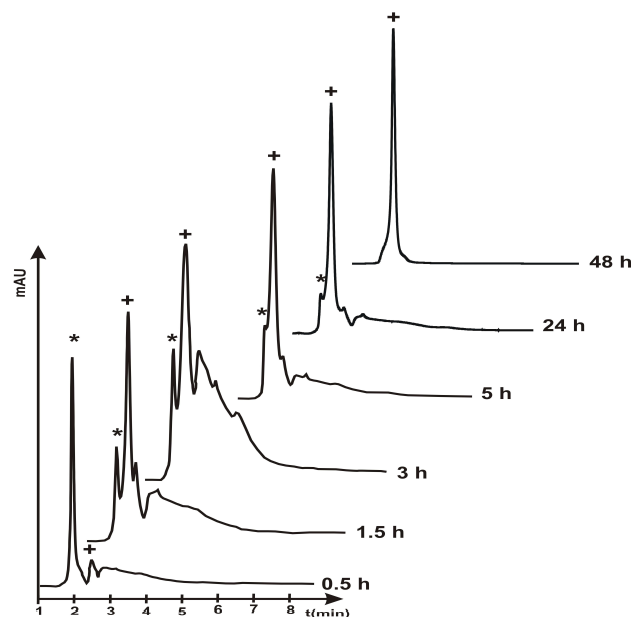


Слика 3.6. ¹H NMR спектар реакције супституције (5 mM) [Pt(dach)Cl₂] комплекса и (5 mM) L-His на 22 °C и pD = 8,42; (Δ) - H2 протон слободог L-His; (*) - H2 протон координаног L-His

3.1.3. HPLC метода

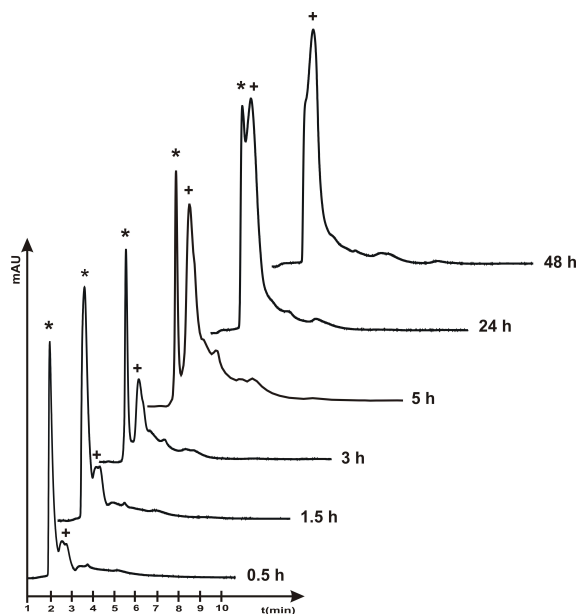
Супституционе реакције $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса са L-His изучаване су HPLC методом. Сва испитивања вршена су у води у присуству 25 mM хепес пуфера ($\text{pH} = 7,2$) уз додаток 10 mM NaCl на 37 °C. Реакције супституције су започете мешањем истих запремина раствора комплекса (5 mM) и лиганда (100 mM). У тачно дефинисаним временским интервалима (30, 90, 150, 300, 1440, 2880 минута) у колону је ињектовано по 20 μl термостатираних реакционих смеша.

Након пола сата од почетка реакције између $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ комплекса и L-His на хроматограму су примећена два сигнала чија су ретенциона времена на 2,1 и 2,5 минута (Слика 3.7). Интензитет сигнала на 2,1 минута, који потиче од полазног комплекса, временом опада, док интензитет сигнала производа супституције на 2,5 минута временом расте. Након два дана процес супституције је потпуно завршен, јер се на последњем хроматограму појављује само сигнал производа реакције.



Слика 3.7. HPLC хроматограм за реакцију супституције (5 mM) $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ комплекса и (100 mM) L-His на 37 °C, $\text{pH} = 7,2$ и $\lambda = 360 \text{ nm}$; (*) - $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ комплекс; (+) - производ реакције

На основу анализе хроматограма за реакцију $[Pt(en)Cl_2]$ комплекса и L-His (Слика 3.8) после пола сата од почетка реакције примећени су следећи сигнали: сигнал са ретенционим временом 2,0 минута, који потиче од полазног комплекса, и сигнал са ретенционим временом 2,4 минута, који потиче од продукта реакције. После 24 сата, интензитети поменутих сигнала су готово идентични, док се после два дана у систему може идентификовати само производ реакције.



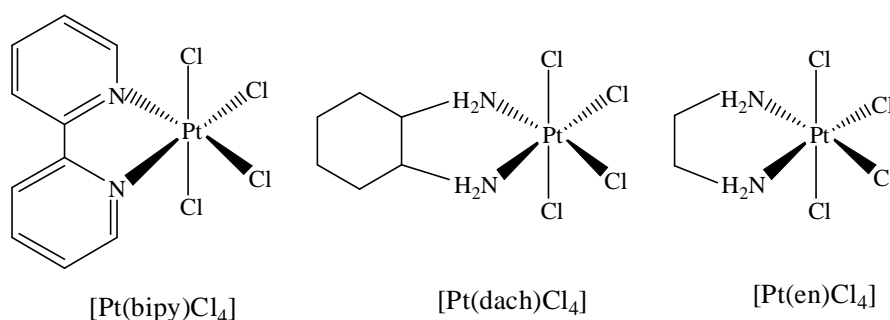
Слика 3.8. HPLC хроматограм за реакцију супституције (5 mM) $[Pt(en)Cl_2]$ комплекса и (100 mM) L-His на 37 °C, pH = 7,2 и $\lambda = 360$ nm; (*) - $[Pt(en)Cl_2]$ комплекс; (+) - производ реакције

На основу резултата добијених применом HPLC методе потврђено је да се у испитиваним системима добија само један крајњи производ супституције.

3.2. Испитивање супституционих реакција $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са азот-донорским лигандима

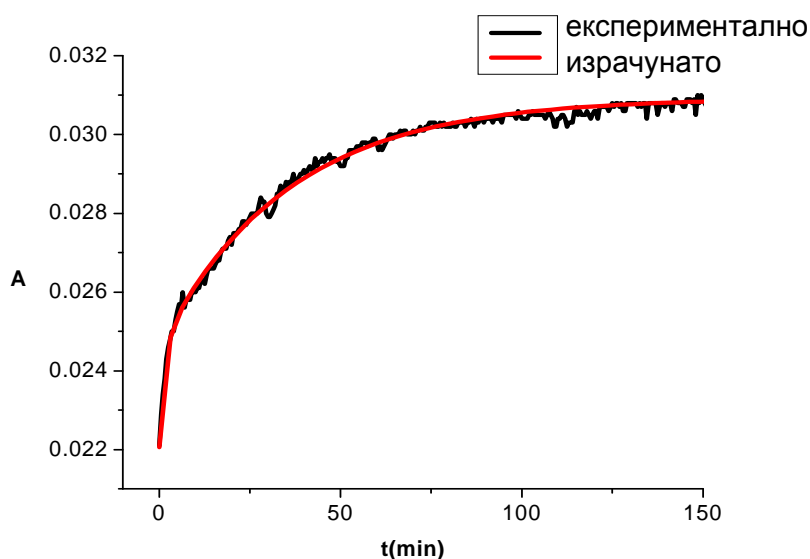
3.2.1. Uv-Vis спектрофотометријска мерења

Испитивање супституционих реакција комплекса $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$ са 5'-GMP и комплекса $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ са L-His и 5'-GMP вршена су Uv-Vis спектрофотометријски праћењем промене апсорбанце раствора на одговарајућој радној таласној дужини у функцији времена. Реакције су започете мешањем истих запремина раствора комплекса и лиганда (по $1,5 \text{ cm}^3$) у кварцној кивети. Концентрација лиганда је увек била у вишку (најмање 10 пута) у односу на концентрацију комплекса, како би се обезбедили услови реакције *псеудо*-првог реда. Структурне формуле испитиваних комплекса дате су на Слици 3.9.



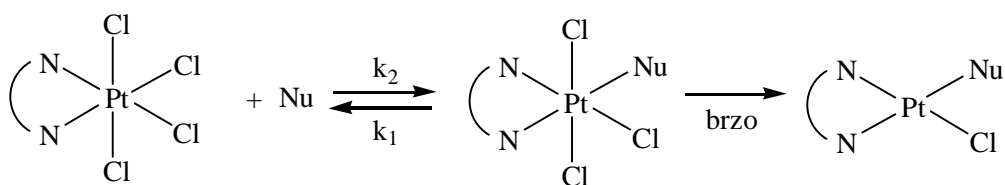
Слика 3.9. Структурне формуле испитиваних комплекса

Реакције су испитиване на $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и $\text{pH} = 7,2$ у присуству 25 mM хепес пуфера уз додатак 10 mM NaCl . Добијена промена апсорбанце је показала најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда помоћу компјутерског програма Origin 6.1, што је приказано на Слици 3.10.



Слика 3.10. График зависности апсорбанце од времена за реакцију између (0,2 mM) $[Pt(bipy)Cl_4]$ комплекса и (10 mM) 5'-GMP на 37 °C, $\lambda = 320$ nm, pH = 7,2, и 10 mM NaCl

Генерално, супституција одабраних октаедарских комплекса платине(IV) се може представити помоћу Шеме 3.1. У првом кораку се један од хлоридних јона из координационе сфере полазног комплекса супституише улазним лигандом. Овај корак је јако спор и окарактерисан је константом брзине k_2 . Након тога следи брза реакција редуктивне елиминације, а константа брзине овог процеса није одређена.



N-N = dach, en, bipy

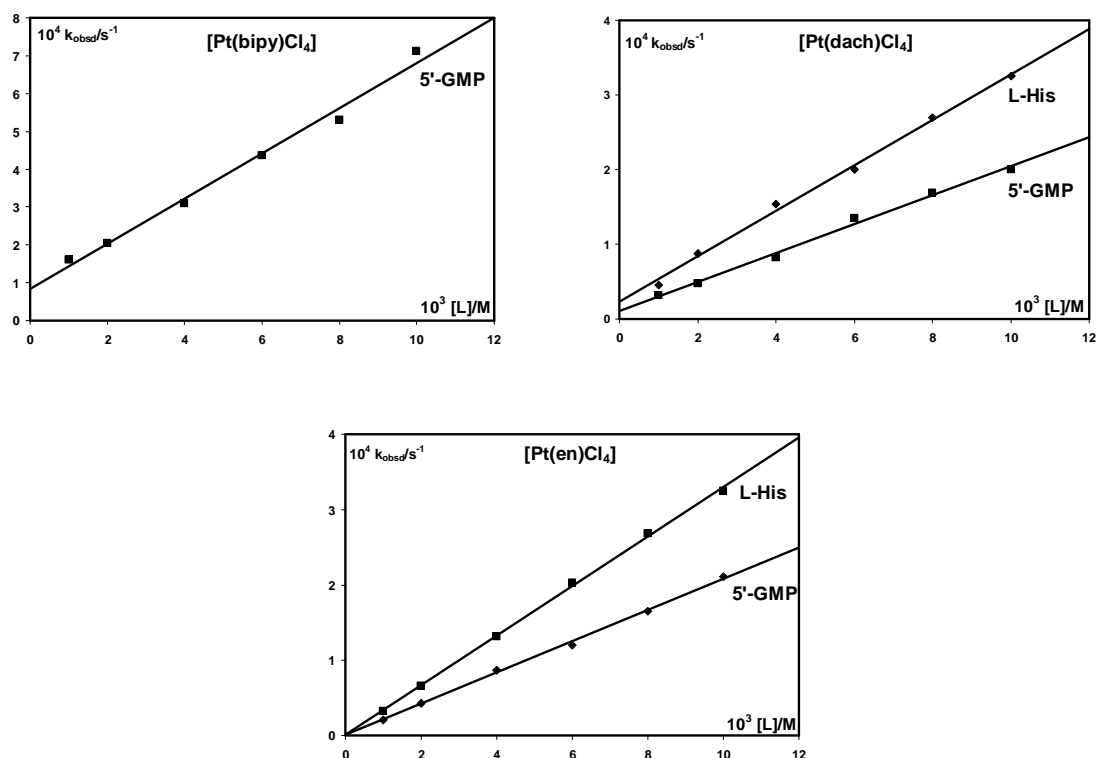
Nu = 5'-GMP, L-His

Шема 3.1.

Константа брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , одређена помоћу програма Origin 6.1, посматрана је у зависности од концентрације лиганда. Резултати су приказани на Слици 3.11, на основу којих се може видети да је зависност константе k_{obsd} од концентрације лиганда линеарна у свим случајевима. Вредност константе брзине директне реакције (k_2) одређује се из нагиба праве $k_{\text{obsd}} = f([L])$, на основу једначине (3.2.1.1).

$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Cl}^-] + k_2[\text{L}] \quad (3.2.1.1)$$

Константа k_1 , која описује повратну реакцију, одређује се из одсечка и она је у свим случајевима приближно једнака нули. Израчунате вредности за константе k_2 и k_1 дате су у Табели 3.2.



Слика 3.11. Зависност константе брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} од концентрације лиганда за реакције супституције $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса на $37\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$, и 10 mM NaCl

Табела 3.2. Константе брзине за супституционе реакције комплекса [Pt(bipy)Cl₄] са 5'-GMP и комплекса [Pt(dach)Cl₄] и [Pt(en)Cl₄] са L-His и 5'-GMP на 37 °C, pH = 7,2 и 10 mM NaCl

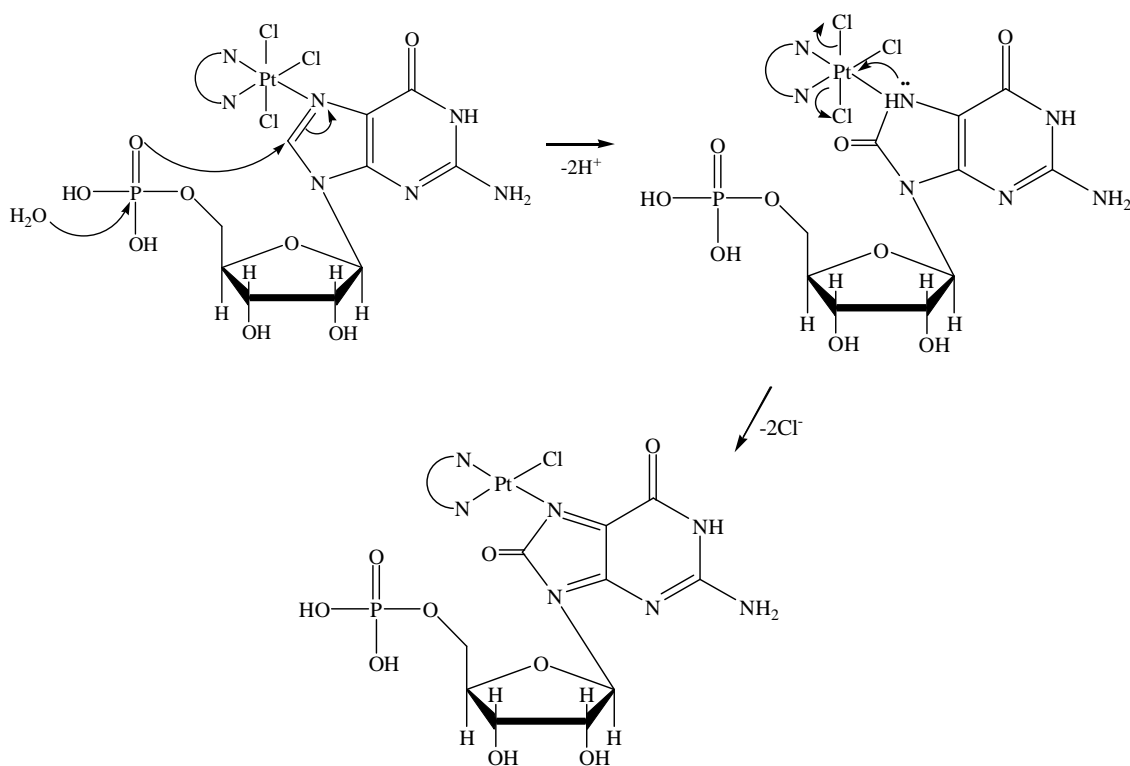
	L-His			5'-GMP		
	λ/nm	$10^2 k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 k_1/\text{s}^{-1}$	λ/nm	$10^2 k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 k_1/\text{s}^{-1}$
[Pt(bipy)Cl ₄]	-	-	-	320	5,9 ± 0,3	84 ± 20
[Pt(en)Cl ₄]	250	3,29 ± 0,05	1,1 ± 0,3	360	2,04 ± 0,04	0,7 ± 0,03
[Pt(dach)Cl ₄]	360	3,04 ± 0,09	23 ± 6	360	1,93 ± 0,08	12 ± 5

На основу добијених вредности константи брзина може се уочити да реактивност испитиваних комплекса према нуклеотиду опада у низу [Pt(bipy)Cl₄] > [Pt(en)Cl₄] > [Pt(dach)Cl₄]. Понашање [Pt(bipy)Cl₄] комплекса у реакцијама супституције зависи од π -акцепторских особина инертног 2,2'-бипиридин лиганда.^{137,138} Као резултат поменутог ефекта повећава се електрофилност јона метала, а са тим и његова реактивност. Такође, може се уочити незнатно већа реактивност [Pt(en)Cl₄] комплекса у односу на [Pt(dach)Cl₄] комплекс. То се може објаснити упоређивањем структуре инертних азот-донорских лиганда en и dach. С обзиром да је dach волуминознији у односу на en, отежан је прилаз улазног лиганда јону метала, па је процес супституције спорији. Са друге стране, мања реактивност [Pt(dach)Cl₄] комплекса може бити последица присуства позитивног индуктивног ефекта циклохексановог прстена, који смањује електрофилност јона метала.¹²⁴ Добијени резултати се у потпуности слажу са раније публикованим подацима.⁷¹

На основу добијених резултата може се приметити да је L-His бољи нуклеофил у односу на 5'-GMP. Разлика у реактивности ова два лиганда је последица различите волуминозности ова два молекула. Поред тога, N3 атом из L-His је базнији ($\text{pK}_a(\text{N3}) = 6,5$ ^{134,135}) у односу на N7 атом из 5'-GMP ($\text{pK}_a(\text{N7}) = 2,48$ ¹²⁴), чиме се такође објашњава разлика у реактивности поменутих биомолекула.

Механизам супституције испитиваних комплекса платине(IV) са 5'-GMP је приказан на Шеми 3.2. Реакције су изучаване на pH = 7,2, а већ је у одељку 3.1 објашњено да се молекул 5'-GMP у неутралној и слабо киселој средини координује за јоне метала

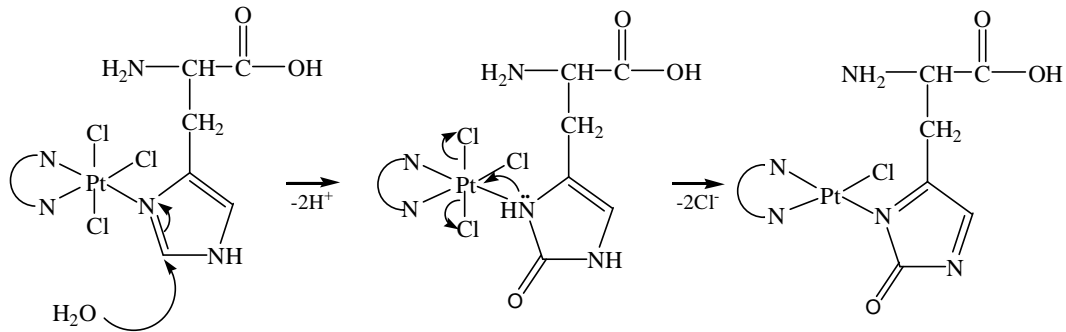
преко N7 атома. У случају комплекса платине(IV) координација се остварује на исти начин. После везивања молекула 5'-GMP за платина(IV) јон долази до напада кисеониковог атома фосфатне групе на C8 положај пуринске базе. Овај напад узрокује трансфер електронског пара двогубе везе на N7 атом, услед чега долази до редуктивне елиминације и формирања квадратно-планарног платина(II) комплекса, који је супституисан молекулом 8-охо-5'-GMP. Овај механизам реакције је у сагласности са механизмом који је раније предложен.⁵³



Шема 3.2. Механизам супституције платина(IV) комплекса са 5'-GMP

Механизам супституције комплекса платине(IV) са L-His приказан је на Шеми 3.3. У овом случају, након координације молекула аминокиселине преко N3 атома за платина(IV) јон, долази до преноса електронског пара двогубе везе преко атома азота на јон метала, по механизму унутрашње сфере. Примајући електроне платина(IV) јон се

редукује у платину(II) јон и као крајњи производ реакције настаје квадратно-планарни платина(II) комплекс супституисан имидазолонским дериватом L-His.¹³⁹



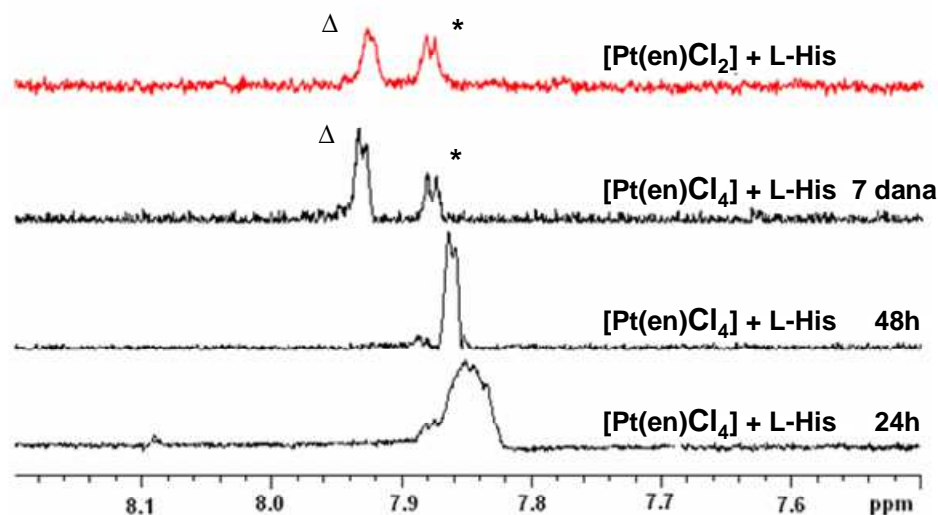
Шема 3.3. Механизам супституције платина(IV) комплекса са L-His

3.2.2. ¹H NMR спектроскопска мерења

Супституционе реакције [Pt(dach)Cl₄] и [Pt(en)Cl₄] комплекса са L-His и 5'-GMP изучаване су применом ¹H NMR спектроскопије на 22 °C у D₂O. Реакције су изучаване као симетричне реакције другог реда, коришћењем еквимоларних концентрација комплекса и лиганда (5 mM). На ¹H NMR спектру за реакцију супституције [Pt(en)Cl₄] комплекса са L-His (Слика 3.12), снимљеном после 24 сата од мешања полазних раствора, уочава се широк сигнал у области δ = 7,8 - 7,9 ppm, који одговара H₂ протону аминокиселине. Након 48 сати поменут сигнал се раздваја на два сигнала, један који потиче од слободног и други који потиче од координованог L-His. После 7 дана сигнал H₂ протона координованог лиганда налази се на δ = 7,878 ppm, а сигнал H₂ протона слободног лиганда на δ = 7,930 ppm. Анализом спектра приказаних на Слици 3.12 може се, такође, приметити да се у току реакције сви сигнали померају ка вишим вредностима хемијског померања. То се дешава као последица промене киселости раствора. У овом случају рD раствора опада од 8,0 на 7,5.

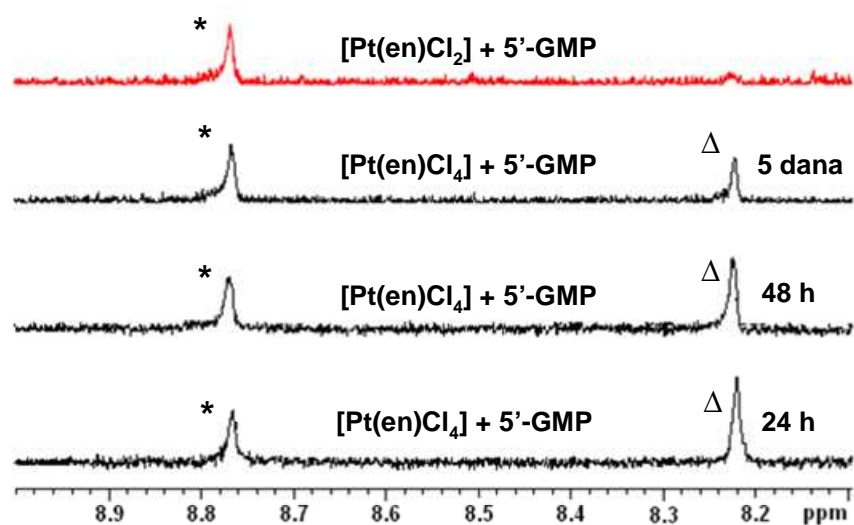
На Слици 3.12 црвеном бојом је означен спектар добијен испитивањем реакције супституције [Pt(en)Cl₂] комплекса са L-His (Одељак 3.1). На овај начин је потврђена

претпоставка да се у току реакције $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са L-His, поред супституције, дешава и редукција до одговарајућег платина(II) комплекса.



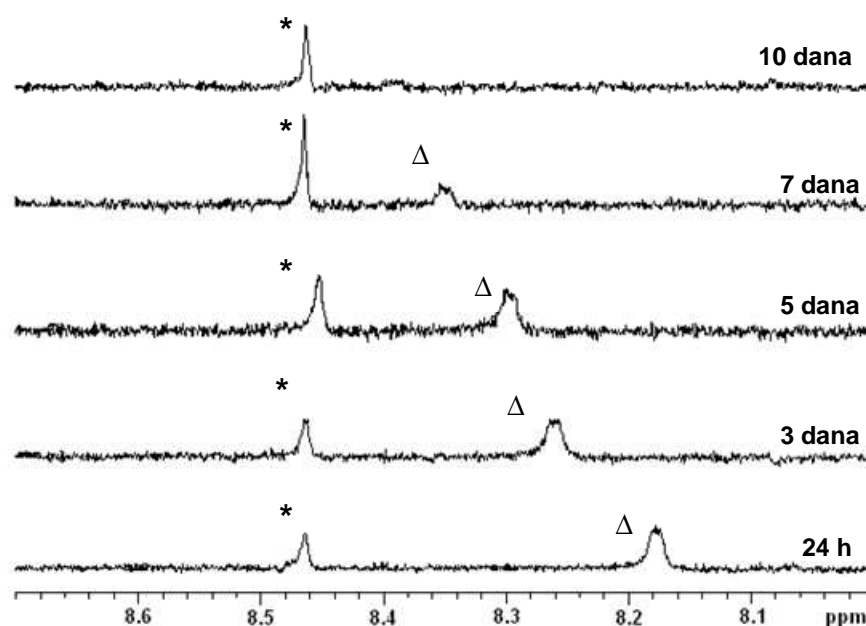
Слика 3.12. ^1H NMR спектар за реакцију (5 mM) $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са (5 mM) L-His у D_2O на $22\text{ }^\circ\text{C}$; црвеном бојом је приказан спектар за реакцију $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса и L-His у D_2O на $22\text{ }^\circ\text{C}$, после 7 дана; (Δ) - слободан L-His; (*) - координовани L-His

Снимањем ^1H NMR спектра еквимоларне смеше $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса и 5'-GMP може се уочити сигнал на $\delta = 8,225$ ppm, који одговара Н8 протону из некоординованог молекула 5'-GMP, и сигнал на $\delta = 8,768$ ppm, који одговара Н8 протону из координованог молекула 5'-GMP (Слика 3.13). На Слици 3.13 црвеном бојом је обележен спектар добијен праћењем супституције квадратно-планарног $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса и 5'-GMP под истим експерименталним условима. Сигнали слободног и координованог лиганда налазе се на истим хемијским померањима у оба система, што потврђује чињеницу да је супституција $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са 5'-GMP праћена редуктивном елиминацијом.



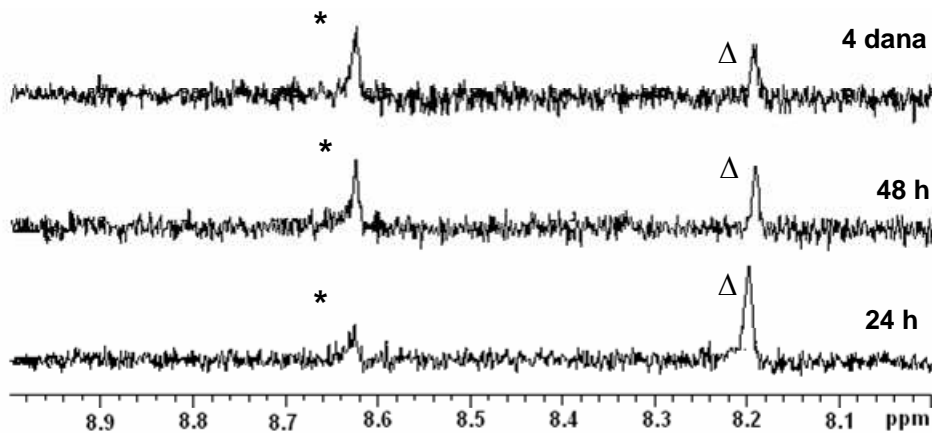
Слика 3.13. ^1H NMR спектар за реакцију (5 mM) $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са (5 mM) 5'-GMP у D_2O на $22\text{ }^\circ\text{C}$; црвеном бојом је приказан спектар за реакцију $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ комплекса и 5'-GMP под истим условима после 5 дана; (Δ) - слободан 5'-GMP; (*) - координовани 5'-GMP

^1H NMR спектроскопијом је изучавана и реакција $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ комплекса са L-His. На Слици 3.14 су приказани добијени спектри. На хемијском померању $\delta = 8,462$ ppm налази се сигнал који потиче од H_2 протона координованог лиганда и његов интензитет расте са временом. Такође, сигнал H_2 протона слободног лиганда на $\delta = 8,180$ ppm се у току реакције помера ка слабијем пољу, па се после 7 дана налази на $\delta = 8,360$ ppm, што је последица промене pD система од 8,0 на 7,5. У одељку 3.1 су приказани резултати испитивања реакције супституције $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ комплекса и L-His, под истим реакционим условима (Слика 3.6). Присуство сигнала на $\delta = 8,462$ ppm, који одговара H_2 протону координованом лиганду, потврђује да је супституција октаедарског комплекса праћена редукцијом.



Слика 3.14. ¹H NMR спектар за реакцију (5 mM) [Pt(dach)Cl₄] комплекса са (5 mM) L-His у D₂O на 22 °C; (Δ) - слободан L-His; (*) - координовани L-His

За реакцију између [Pt(dach)Cl₄] комплекса и 5'-GMP (Слика 3.15) интензитет сигнала на $\delta = 8,200$ ppm, који одговара H8 протону слободног лиганда током реакције опада, док интензитет сигнала на $\delta = 8,630$ ppm, који одговара H8 протону координованог лиганда расте са временом. На почетку реакције сигнал координованог лиганда је знатно шири, што може бити последица чињенице да је молекул 5'-GMP парцијално координован за платина(IV) и платина(II) комплекс.⁵³ Већ после неколико дана овај сигнал поприма изглед јасног синглета. И у овом случају је потврђено да је у току реакције, поред супституције, заступљена и редукција полазног комплекса.

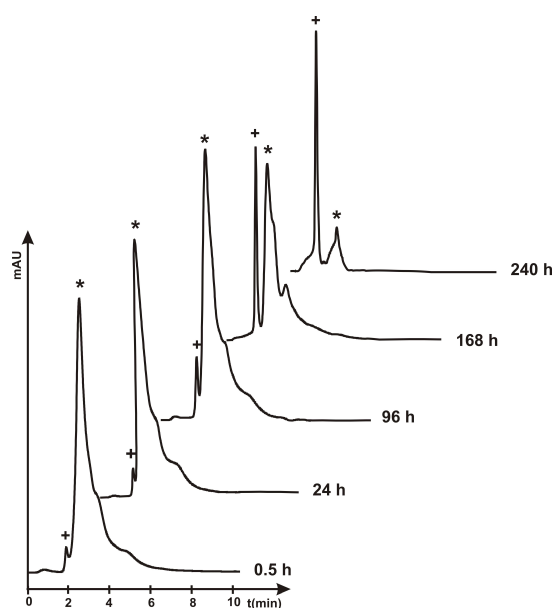


Слика 3.15. ^1H NMR спектар за реакцију (5 mM) $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ комплекса са (5 mM) 5'-GMP у D_2O на $22\text{ }^\circ\text{C}$; (Δ) - слободан 5'-GMP; (*) - координовани 5'-GMP

3.2.3. HPLC метода

Реакције супституције $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са L-His изучаване су HPLC методом. Испитивања су вршена у води на $\text{pH} = 7,2$ у присуству 25 mM хепес пуфера и 10 mM NaCl. Раствори комплекса, концентрације 5 mM, и лиганда, концентрације 100 mM, су чувани у термоблоку на $37\text{ }^\circ\text{C}$ за време реакције. У колону је ињектован раствор добијен мешањем истих запремина раствора комплекса и лиганда.

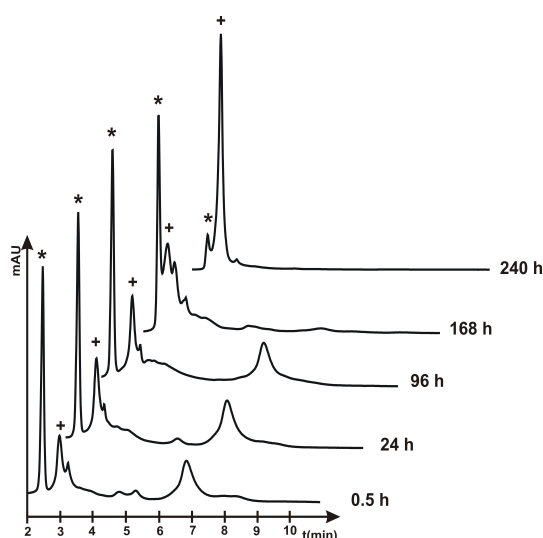
На Слици 3.16 је приказан хроматограм добијен за реакцију $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са L-His, сниман у тачно дефинисаним временским интервалима (0,5, 24, 96, 168, 240 h). После пола сата на хроматограму се уочава мали сигнал са ретенционим временом 2,0 минута, који се приписује продукту реакције, док је истовремено доминантан сигнал полазног комплекса на 2,5 минута. Временом интензитет сигнала на 2,0 минута расте да би након 7 дана (168 h) његов интензитет био готово идентичан интензитету сигнала полазног комплекса. Такође, на хроматограму се може уочити и мали сигнал на 3,0 минута. Овај сигнал одговара производу првог корака реакције супституције. После 10 дана (240 h) у систему је присутан само један крајњи производ и веома мала концентрација неизреагованог комплекса.



Слика 3.16. HPLC хроматограм за реакцију (5 mM) $[Pt(en)Cl_4]$ комплекса и (100 mM) L-His на $pH = 7,2$, $37\text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 250\text{ nm}$; (*) - $[Pt(en)Cl_4]$ комплекс; (+) - производ реакције

На Слици 3.17 је приказан хроматограм добијен за реакцију супституције $[Pt(dach)Cl_4]$ комплекса са L-His. Ова реакција је изучавана под истим експерименталним условима као реакција $[Pt(en)Cl_4]$ комплекса са L-His. Анализом хроматограма уочен је сигнал на 2,5 минута, који одговара полазном комплексу, и сигнал на 2,8 минута, од продукта реакције. После 10 дана, у реакционом систему је детектован само један производ реакције, као и веома мала концентрација неизреагованог комплекса.

HPLC методом је потврђено да у испитиваним реакцијама платина(IV) комплекса са L-His настаје само један производ реакције.

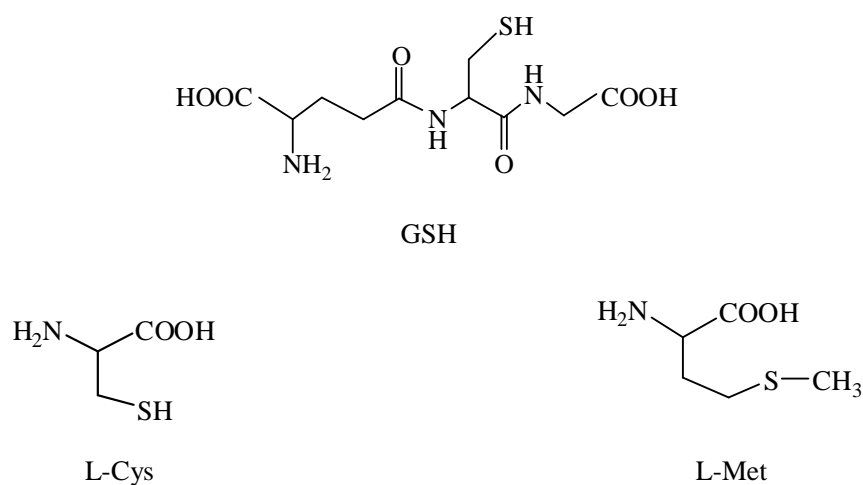


Слика 3.17. HPLC хроматограм за реакцију (5 mM) $[Pt(dach)Cl_4]$ и (100 mM) L-His на $pH = 7,2$, $37\text{ }^\circ C$, $\lambda = 360\text{ nm}$; (*) - $[Pt(dach)Cl_4]$ комплекс; (+) - производ реакције

3.3. Редукција комплекса $[Pt(bipy)Cl_4]$, $[Pt(dach)Cl_4]$ и $[Pt(en)Cl_4]$ помоћу глутатиона, L-цистеина и L-метионина

3.3.1. Stopped-flow спектрофотометријска мерења

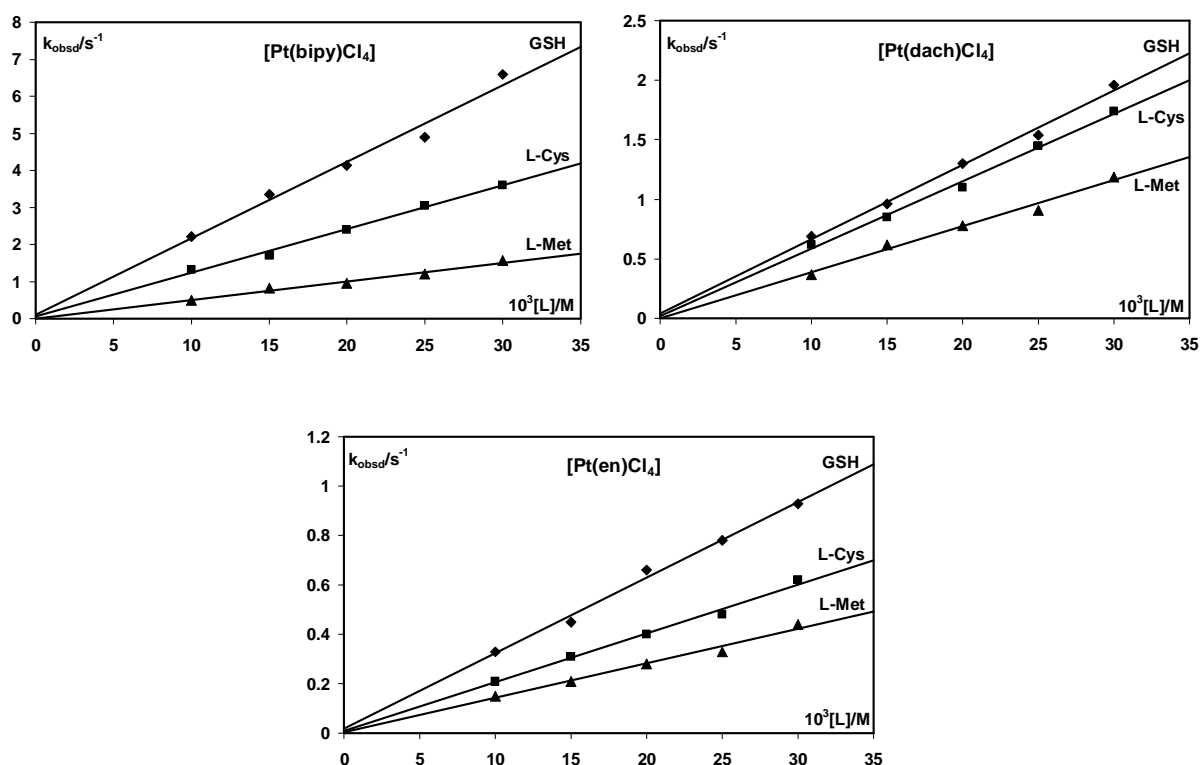
Редокс реакције комплекса $[Pt(bipy)Cl_4]$, $[Pt(dach)Cl_4]$ и $[Pt(en)Cl_4]$ са GSH, L-Cys и L-Met изучаване су на $pH = 2,0$ (0,01 M $HClO_4$) у присуству 0,2 M NaCl помоћу stopped-flow спектрофотометрије. Реакције су изучаване праћењем промене апсорбције раствора на одговарајућој таласној дужини у функцији времена. Сва кинетичка мерења су извођена на температури од $37\text{ }^\circ C$, као реакције *псеудо*-првог реда. Структурне формуле испитиваних лиганата су приказане на Слици 3.18, док су структурне формуле комплекса $[Pt(bipy)Cl_4]$, $[Pt(dach)Cl_4]$ и $[Pt(en)Cl_4]$ приказане у одељку 3.2, Слика 3.9.



Слика 3.18. Структурне формуле испитиваних лиганата

Вредности за константе брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , израчунате су помоћу компјутерског програма Origin 6.1. Зависност апсорбанце са временом дала је најбоље слагање када је посматрана као експоненцијална функција првог реда.

Добијене зависности константе брзине реакције *псеудо*-првог реда, k_{obsd} у функцији концентрације лиганата приказане су на Слици 3.19.



Слика 3.19. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда, k_{obsd} , од концентрације лиганда на $pH = 2,0$ ($0,01 M HClO_4$) и $0,2 M NaCl$ на $37^\circ C$

Са Сlike 3.19 може се видети да је у свим проучаваним системима добијена линеарна зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда, k_{obsd} , од концентрације лиганда. Све праве пролазе кроз координативни почетак, што искључује могућност постојања паралелних или повратних реакција. Повезаност константе брзине реакције псеудо-првог реда, k_{obsd} , и константе брзине реакције другог реда, k_2 , дата је једначином (3.3.1.1).

$$k_{obsd} = k_2[L] \quad (3.3.1.1)$$

Константе брзине реакција другог реда, k_2 , одређене су из нагиба добијених права и приказане су у Табели 3.3.

Табела 3.3. Константе брзине реакција другог реда, k_2 , изучаваних $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са GSH, L-Cys и L-Met на 37 °C

Комплекс	pH	GSH	L-Cys	L-Met
$k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$				
[Pt(bipy)Cl ₄]	2,0 ^a	210 ± 20	118 ± 6	50 ± 4
	2,0 ^b	190 ± 20	107 ± 5	48 ± 5
	7,2 ^c	980 ± 40	350 ± 50	150 ± 20
	7,2 ^d	10 ± 1	-	-
[Pt(dach)Cl ₄]	2,0 ^a	62 ± 3	57 ± 3	39 ± 3
	2,0 ^b	60 ± 3	54 ± 1	35 ± 2
	7,2 ^c	920 ± 70	340 ± 40	134 ± 5
	7,2 ^d	1,5 ± 0,5	-	-
[Pt(en)Cl ₄]	2,0 ^a	31 ± 2	20 ± 1	14 ± 1
	2,0 ^b	30 ± 2	19 ± 2	13 ± 1
	7,2 ^c	870 ± 90	330 ± 40	130 ± 20
	7,2 ^d	1,1 ± 0,1	-	-

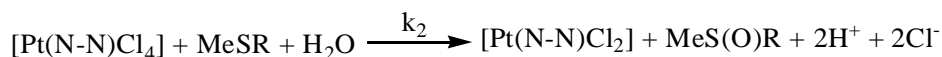
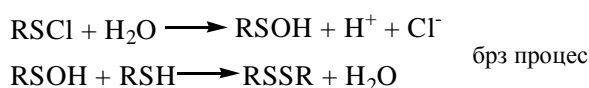
^a0,01 M HClO₄ и 0,2 M NaCl; ^b0,01 M HClO₄; ^c25 mM хепес пуфер и 0,2 M NaCl; ^d25 mM хепес пуфер

На основу података из табеле може се закључити да реактивност испитиваних комплекса опада у низу: $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$, док реактивност лигананда у свим случајевима опада у низу: $\text{GSH} > \text{L-Cys} > \text{L-Met}$.

Да би се утврдио утицај промене концентрације хлоридних јона на брзину редукције све реакције су испитиване и у одсуству хлорида на pH = 2,0. Израчунате вредности за константу брзине реакција другог реда, k_2 , су такође дате у Табели 3.3. На основу добијених вредности може се уочити да константе брзине редукције, k_2 , у присуству и одсуству хлорида имају приближно исте вредности и да хлоридни јони немају утицај на брзину редукције, што се у потпуности слаже са литературним подацима.¹⁴⁰

С обзиром да су комплекси платине(IV) јако инертни према супституционим реакцијама, они радије подлежу реакцијама преноса електрона по механизму унутрашње сфере. Редукцију комплекса платине(IV) уједно прати и промена геометрије комплекса, тј. долази до процеса редуктивне елиминације. Механизам укључује нуклеофилни напад редуктанта на један од *trans*-координованих хлоридо јона у комплексу платине(IV), када се формира мостна веза преко које се врши трансфер електрона. Потом, долази до елиминације аксијалних лиганата што води до формирања квадратно-планарног комплекса платине(II).^{79,80,141-143}

На Шеми 3.4 је приказан реакциони механизам за редокс-реакције комплекса платине(IV) са тиолима и тиоетрима на pH = 2,0. У првом реакционом кораку редуктивне елиминације помоћу тиола, RSH, настаје сулфенил хлорид, RSCl, који веома брзо хидролизује до RSOH. Он затим реагује са још једним молекулом тиола и даје коначан производ RSSR, оксидовани облик тиола.⁷⁹ Први реакциони корак је спор процес и он одређује брзину реакције. У реакцији са тиоетром, L-Met, у процесу редукције добија се одговарајући комплекс платине(II) и сулфоксид, оксидовани облик лиганда.



N-N = bipy, dach, en; RSH = GSH, L-Cys; MeSR = L-Met

Шема 3.4.

Брзина којом се комплекси платине(IV) редукују јако зависи од особина аксијалних и екваторијалних лиганата, при чему је утицај лиганата у аксијалном положају знатно израженији. Редукција се веома брзо одвија уколико су аксијални лиганди хлоридо јони,

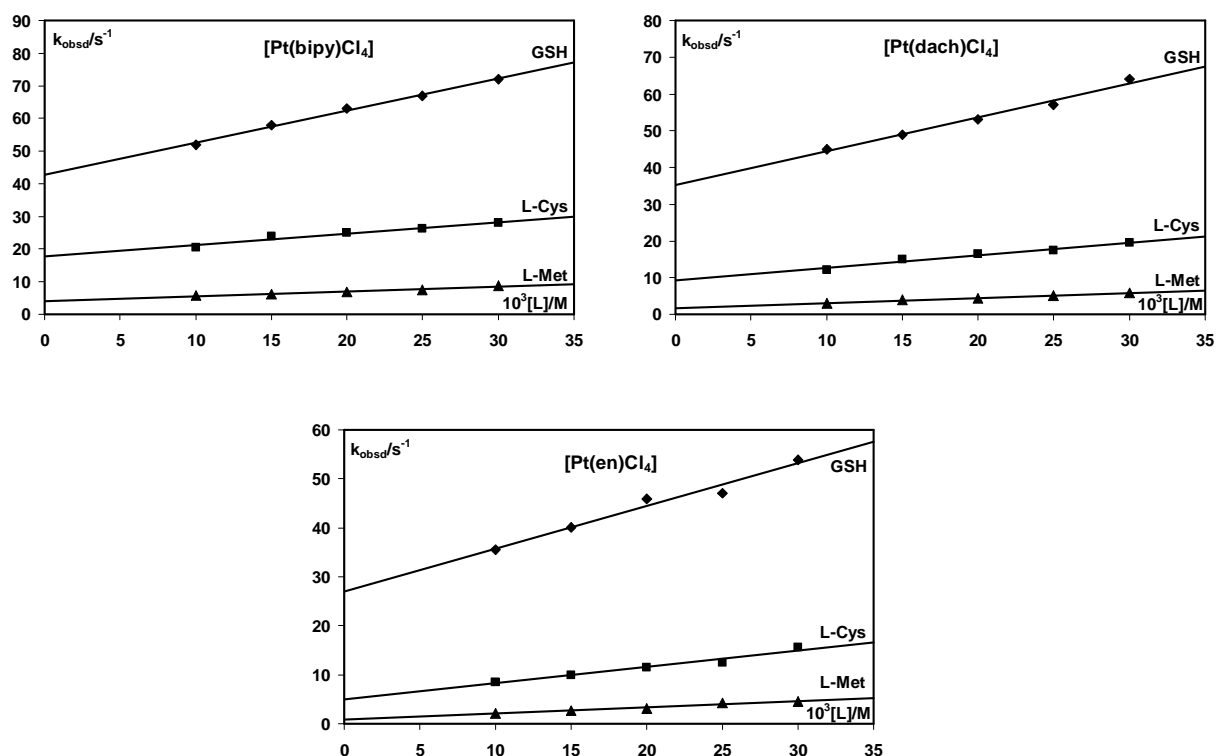
што се доводи у везу са њиховом електронегативношћу. Електронегативнији лиганди лакше дестабилизују комплексе платине(IV), што омогућава брзу редукцију до одговарајућих комплекса платине(II).^{52,144}

Такође, познато је да волуминозни инертни лиганди дестабилизују платина(IV) комплексе у процесима редукције,⁵² што је потврђено резултатима приказаним у овој дисертацији. Наиме, упоређивањем структуре инертних екваторијалних лиганада (bipy, dach, en), може се рећи да је етилендиамин најмање волуминозан у односу на друга два лиганда, па је то разлог најмање реактивности комплекса [Pt(en)Cl₄] у процесу редукције, а уједно и највеће реактивности [Pt(bipy)Cl₄] комплекса.

Брзина редукције комплекса платине(IV) зависи од њиховог редокс-потенцијала.^{52,53,71,73,145} Истовремено, редокс-потенцијал ових комплекса јако зависи од електрон-привлачних сила аксијалних лиганада и величине инертних екваторијалних лиганада. Вредност редокс-потенцијала за комплекс [Pt(en)Cl₄] је -160 mV, а за комплекс [Pt(dach)Cl₄] је -90 mV.⁵² Ове вредности су у сагласности са добијеним редом реактивности за ова два комплекса. То подразумева да ако је редокс-потенцијал комплекса платине(IV) већи, процес редукције је бржи, што је у складу са већ публикованим резултатима.^{47,52}

Редослед реактивности испитиваних лиганада се може објаснити упоређивањем структуре тиоетра (L-Met) са тиолима (GSH, L-Cys). Тиоетри су слабији редуктанти у односу на тиоле. Поред тога, тиоетри у својој структури поседују метил групу директно везану за атом сумпора која отежава прилаз и нуклеофилни напад лиганда на аксијални хлоридо лиганд у молекулу комплекса.^{47,80} На овај начин се може објаснити најмања реактивност L-Met.

Редукција комплекса [Pt(bipy)Cl₄], [Pt(dach)Cl₄], [Pt(en)Cl₄] са GSH, L-Cys и L-Met испитивана је и на pH = 7,2 (25 mM хепес пуфер) у присуству 0,2 M NaCl помоћу stopped-flow спектрофотометрије. Реакције су изучаване на 37 °C, под условима реакција *псеудо*-првог реда, праћењем промене апсорбције раствора у функцији времена на одређеним таласним дужинама. Добијени резултати су дали најбоље слагање када су посматрани као експоненцијална функција првог реда. За све испитиване системе израчунате вредности за константе брзине реакција *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , су приказане графички у зависности од концентрације лиганада (Слика 3.20).



Слика 3.20. Зависност константе брзине реакција псеудо-првог реда, k_{obsd} , од концентрације лиганда на $pH = 7,2$ (25 mM хепес пуфер) и 0,2 М NaCl на 37 °C

У свим случајевима постоји линеарна зависност константе брзине реакција псеудо-првог реда, k_{obsd} , од концентрације лиганда. Такође, у свим случајевима се примећује значајан одсечак на графицима, који одговара константи k_1 . Из нагиба права, на основу једначине (3.3.1.2), израчунава се вредност константе брзине процеса редукције, k_2 . Вредности су приказане у Табели 3.3. На основу ових вредности може се закључити да је редослед реактивности испитиваних комплекса и лиганда идентичан редоследу који је добијен на $pH = 2,0$.

$$k_{obsd} = k_1 + k_2[L] \quad (3.3.1.2)$$

Познато је да молекули који садрже тиолну групу (GSH, L-Cys) имају склоност ка аутооксидацији која је катализована јонима Cu(II) и Fe(III).¹⁴⁶ У циљу одређивања утицаја

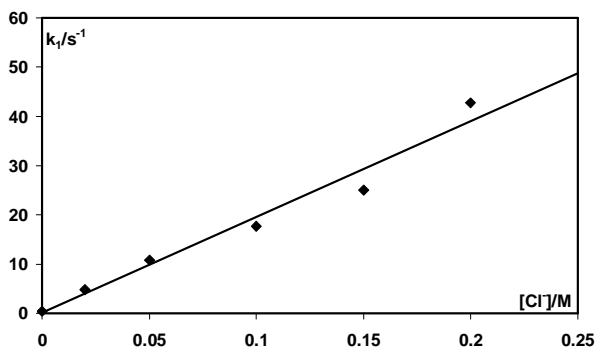
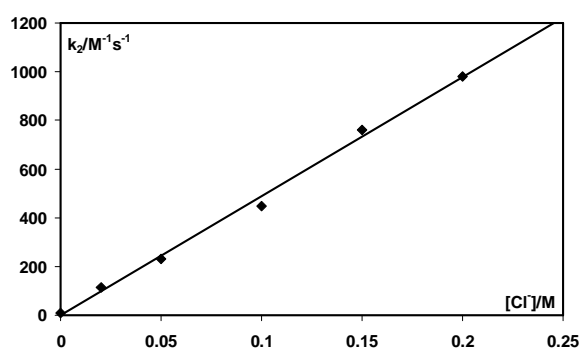
аутоксидације на кинетичка мерења, извршен је контролни експеримент за реакцију [Pt(bipy)Cl₄] комплекса са GSH, на рН = 7,2. У овом експерименту у раствор комплекса и лиганда додато је 0,5 mM EDTA да би се елиминисао могући каталитички ефекат јона метала. Пре почетка реакције, кроз раствор комплекса и лиганда је пропуштен гасовити азот најмање 30 минута да би се из раствора уклонио кисеоник. Може се рећи да не постоје значајне разлике у вредностима за константу брзине k_{obsd} добијене на овај начин ($k_{\text{obsd}} = 51,46 \text{ s}^{-1}$) и у одсуству EDTA ($k_{\text{obsd}} = 52,00 \text{ s}^{-1}$) за најмањи однос концентрација комплекса и лиганда, док вредности за константу k_{obsd} за највећи однос концентрација комплекса и лиганда износе $k_{\text{obsd}} = 72,36 \text{ s}^{-1}$ и $k_{\text{obsd}} = 72,00 \text{ s}^{-1}$. Дакле, искључена је могућност аутоксидације GSH што се у потпуности слаже са резултатима које је објавио Елдинг (Elding).¹⁴³

За боље разумевање реакционог механизма, као и порекла одсечка на графицима (Слика 3.20), реакције испитиваних комплекса са GSH су проучаване и у присуству различитих концентрација хлорида, на рН = 7,2. У Табели 3.4 су дате вредности за константе брзине реакција другог реда, k_2 , и одсечка, k_1 , у присуству различитих концентрација хлорида, док је њихова зависност у односу на концентрацију хлорида за комплекс [Pt(bipy)Cl₄] приказана на Слици 3.21. На основу ових резултата може се уочити да се бројне вредности за константу повећавају са порастом концентрације хлорида у раствору. То значи да већа концентрација хлорида посредује у редуктивно-елиминационом процесу у оба реакциона пута, означена као k_2 и k_1 . Једначина (3.3.1.2) је проширена са једначином (3.3.1.3) за реакцију [Pt(bipy)Cl₄] комплекса са GSH. Вредности за k_3 и k_4 су израчунате из нагиба правих зависности са графика на Слици 3.21 и износе $k_3 = (2,4 \pm 0,1) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $k_4 = (5,7 \pm 0,5) \cdot 10^3 \text{ M}^{-2}\text{s}^{-1}$.

$$k_{\text{obsd}} = k_3[\text{Cl}^-] + k_4[\text{Cl}^-][\text{GSH}] \quad (3.3.1.3)$$

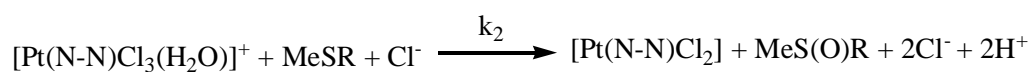
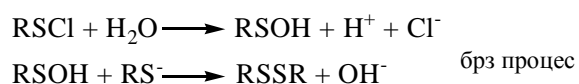
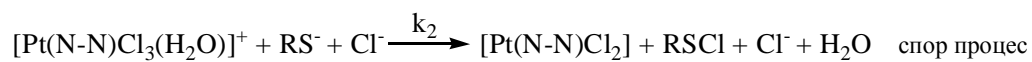
Табела 3.4. Вредности константе брзине k_2 и одсечка, k_1 , у присуству различитих концентрација хлорида за реакције испитиваних комплекса платине(IV) са GSH на $pH = 7,2$ (25 mM хепес пуфер) и $37\text{ }^\circ\text{C}$

	[Cl ⁻]/M	$k_2/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_1/s^{-1}
[Pt(bipy)Cl ₄]	без NaCl	10 ± 1	$0,51 \pm 0,02$
	0,02	114 ± 9	$4,9 \pm 0,2$
	0,05	230 ± 40	$10,8 \pm 0,5$
	0,10	450 ± 20	$17,7 \pm 0,5$
	0,15	760 ± 80	25 ± 2
	0,20	980 ± 40	$42,8 \pm 0,5$
[Pt(dach)Cl ₄]	без NaCl	$1,5 \pm 0,5$	$0,038 \pm 0,005$
	0,02	91 ± 7	$3,7 \pm 0,2$
	0,05	-	-
	0,10	-	-
	0,15	-	-
	0,20	920 ± 70	$35,2 \pm 0,5$
[Pt(en)Cl ₄]	без NaCl	$1,1 \pm 0,1$	$0,0034 \pm 0,0005$
	0,02	87 ± 8	$2,8 \pm 0,1$
	0,05	-	-
	0,10	-	-
	0,15	-	-
	0,20	870 ± 90	27 ± 2

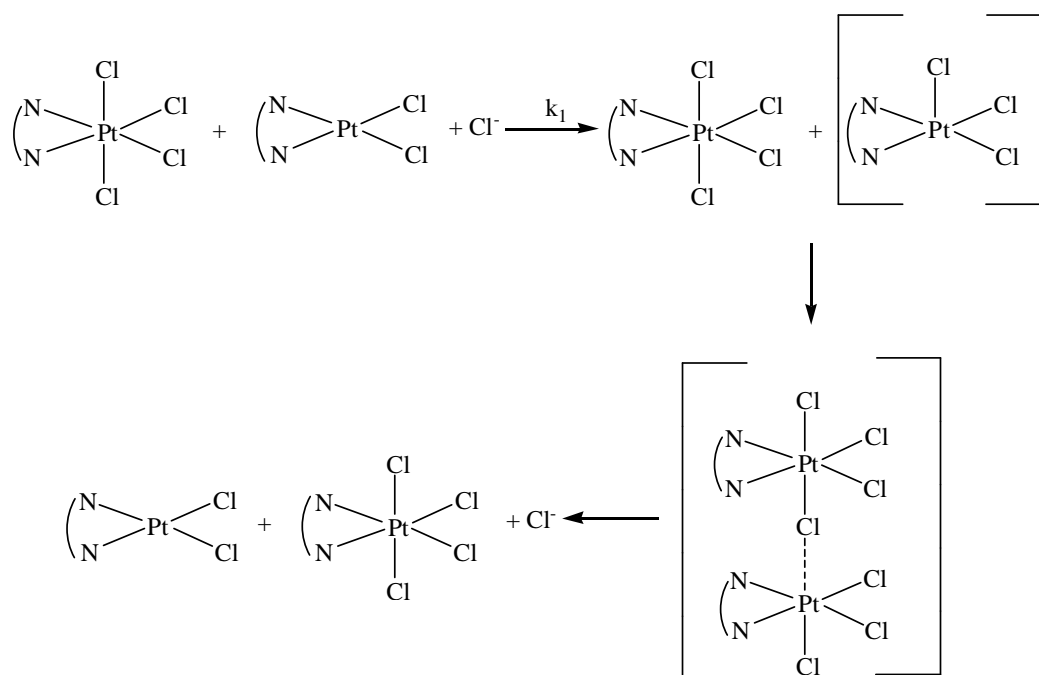
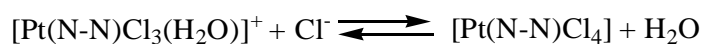


Слика 3.21. Зависност константе брзине k_2 и одсечка k_1 од концентрације хлорида за реакцију [Pt(bipy)Cl₄] комплекса са GSH, $pH = 7,2$ и $37\text{ }^\circ\text{C}$

Механизам реакција за све испитиване системе на рН = 7,2 може се представити помоћу Шеме 3.5, где k_2 карактерише константу брзине процеса редукције.



Где је:

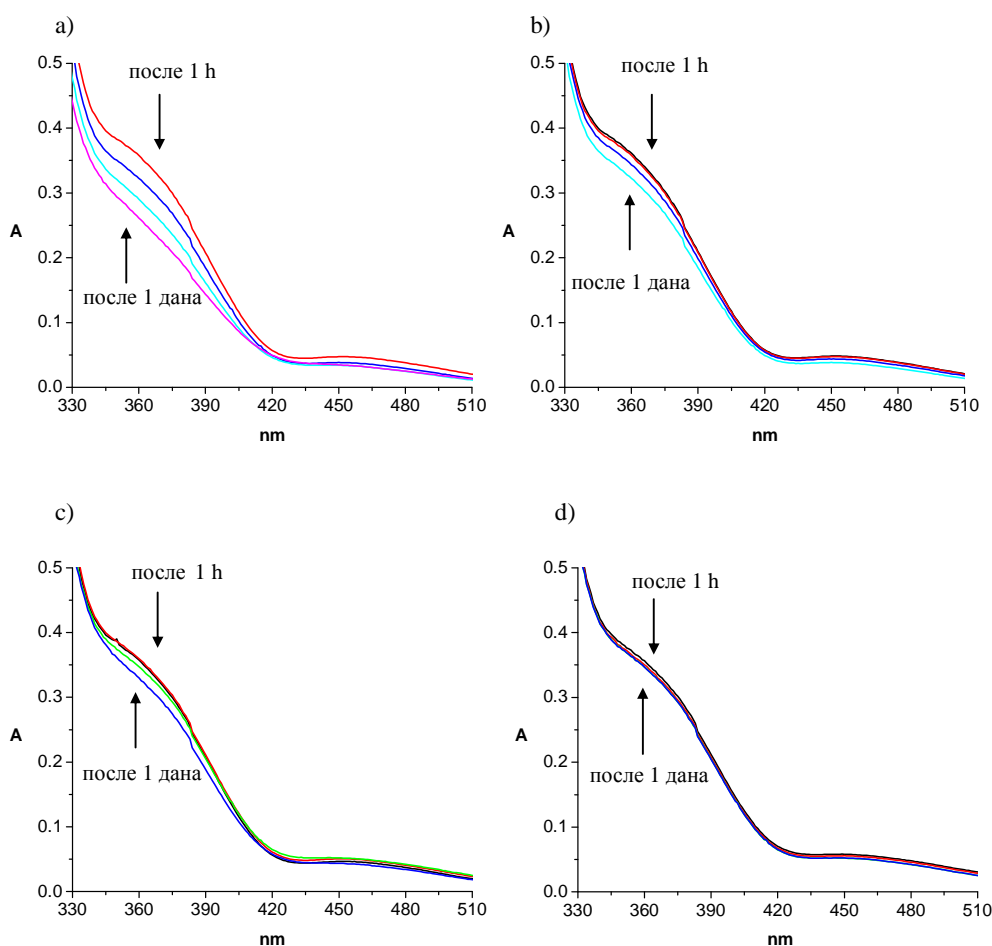


N-N = bipy, dach, en; RS^- = депротоновани GSH, L- Cys; MeSR = L-Met

Шема 3.5.

У првом реакционом кораку, који одређује брзину реакције, у систему је присутан аква комплекс, $[\text{Pt}(\text{N-N})\text{Cl}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$, који затим реагује са хлоридним јонима и гради комплекс $[\text{Pt}(\text{N-N})\text{Cl}_4]$. Овај комплекс даље ступа у реакцију са редукујућим агенсом што доводи до процеса редукције и формирања одговарајућег комплекса платине(II). Већа концентрација хлорида у раствору повећава стабилност комплекса $[\text{Pt}(\text{N-N})\text{Cl}_4]$.

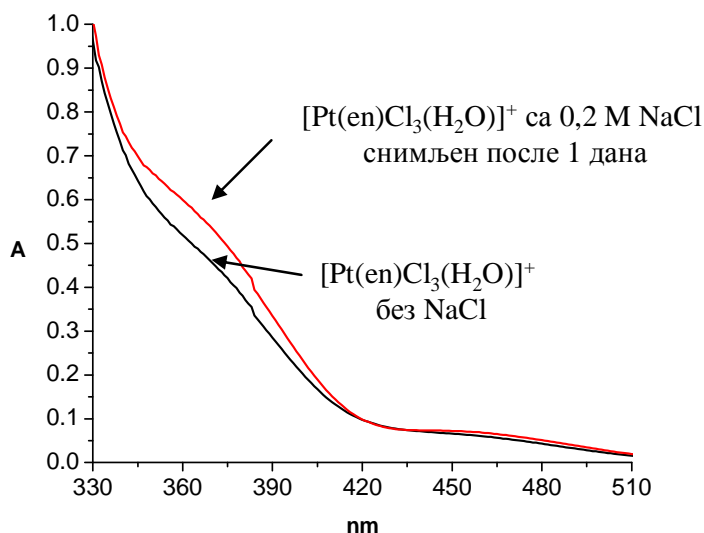
Да би се потврдило присуство аква комплекса у систему, тј. процес хидролизе полазног комплекса, посматрана је промена апсорбције раствора у функцији таласне дужине за серију раствора комплекса $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$, у одсуству хлорида и у присуству различитих концентрација хлорида (Слика 3.22).



Слика 3.22. *Uv-Vis спектри раствора комплекса $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) на $\text{pH} = 7,2$ и 37°C снимани а) у одсуству NaCl после 1 h, 3 h, 4 h, 1 дана; б) у присуству $0,05 \text{ M NaCl}$ после 1 h, 3 h, 4 h, 1 дана; в) у присуству $0,1 \text{ M NaCl}$ после 1 h, 3 h, 4 h, 1 дана; д) у присуству $0,2 \text{ M NaCl}$ после 1 h, 3 h, 4 h, 1 дана*

Испитивања су вршена при концентрацијама од 0,05, 0,1 и 0,2 М NaCl, а Uv-Vis спектри су снимани после тачно дефинисаног временског интервала (1 h, 3 h, 4 h и 1 дана). На основу добијених резултата може се видети да апсорбанца значајно опада у систему без додатог NaCl, где је хидролиза најзаступљенија. У системима у којима је додат NaCl са порастом концентрације додатог NaCl сузбија се процес хидролизе и промене апсорбанце су мање.

Такође, снимљен је Uv-Vis спектар раствора аква комплекса $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ у који је потом, директно у кивету, додат чврст NaCl до концентрације 0,2 М. Спектар је снимљен поново након 1 дана, а затим су упоређивани (Слика 3.23). Додатком NaCl у раствор апсорбција се повећава, што значи да је комплекс $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ преведен у $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$. На овај начин је још једном потврђена чињеница да се додатком NaCl сузбија хидролиза комплекса, као и да концентрација NaCl има утицаја на константу брзине редукције, k_2 .



Слика 3.23. Uv-Vis спектри раствора комплекса $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ (2×10^{-3} М) у одсуству NaCl (обележен црном бојом) и у присуству 0,2 М NaCl снимљен после 1 дана (обележен црвеном бојом)

Појава одсечка се, са друге стране, може објаснити стварањем динуклеарног прелазног стања између комплекса платине(IV) и платине(II) са хлоридним јоном као мостним лигандом. Као резултат трансфера електрона комплекс платине(IV) губи два аксијална лиганда и прелази у комплекс платине(II), док се полазни платина(II) комплекс оксидује до платине(IV). Са порастом концентрације хлорида у раствору лакше је успостављање моста.

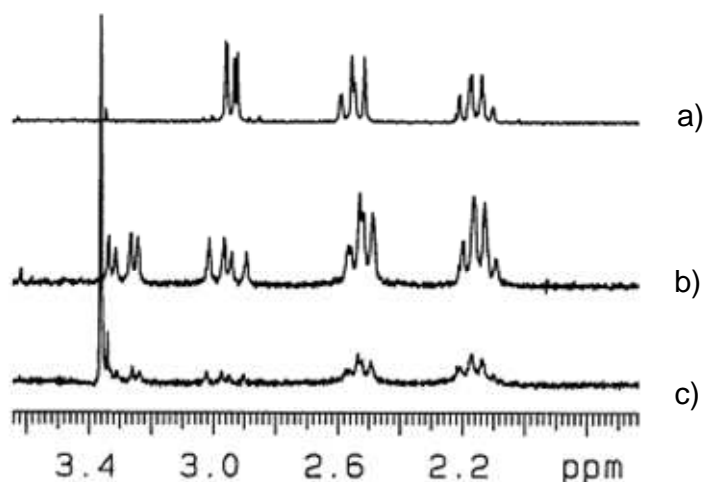
Резултати у Табели 3.3 показују да брзина којом се одвија редукција комплекса платине(IV) до комплекса платине(II) зависи и од киселости раствора. На $pH = 7,2$ редукција је око 5-30 пута бржа него на $pH = 2,0$, што се доводи у везу са различитим протолитичким облицима лиганда. Из литературних података су познате константе киселости за GSH ($pK_{a1} = 2,05$ $pK_{a2} = 3,40$ $pK_{a3} = 8,79$ $pK_{a4} = 9,49$), L-Cys ($pK_{a1} = 1,9$ $pK_{a2} = 8,1$ $pK_{a3} = 10,9$) и L-Met ($pK_{a1} = 2,65$ $pK_{a2} = 9,08$).¹⁴⁷ На основу ових података може се закључити да је на $pH = 2,0$ тиолна група у молекулима GSH и L-Cys протонвана, па је формирање активирајућег комплекса отежано. На $pH = 7,2$ тиолне групе GSH и L-Cys су парцијално депротонване што утиче на повећање брзине реакције. Реактивност тиолата (RS^-) директно зависи од базности протона, док стерни ефекти немају велики утицај на брзину реакције. Вредности за константу брзине редукције неких комплекса платине(IV) које укључују све протолитичке облике тиола су раније дефинисане⁸⁰ и оне су у сагласности са резултатима у Табели 3.3.

Оксидација тиоетра, L-Met, је такође фаворизирана на вишим pH вредностима раствора. Трансформација тиоетра до сулфоксида се одвија нападом хидроксилне групе на атом сумпора, након чега следи депротонација добијеног производа. Процес депротонације се теже одвија на $pH = 2,0$. На овај начин се објашњава већа реактивност L-Met на $pH = 7,2$.

3.3.2. 1H NMR мерења

Редукцијом комплекса платине(IV) као крајњи производи настају одговарајући комплекс платине(II) и оксидовани облик редуктаната.¹⁴⁸ Да би се потврдила чињеница да се као главни производ реакције између комплекса платине(IV) и глутатиона добија комплекс платине(II) и оксидовани облик глутатиона, GSSG, испитивана је реакција $[Pt(en)Cl_4]$ комплекса и GSH помоћу 1H NMR спектроскопије. Реакција је изучавана у D_2O

на 22 °C и $pD = 6,4$ ($pD = pH + 0,4$).¹²⁶ Ради анализе резултата упоређивани су спектри (a) (4 mM) редукованог облика GSH, (b) (2 mM) оксидованог облика GSSG и (c) смеше (2 mM) $[Pt(en)Cl_4]$ комплекса са (4 mM) GSH (Слика 3.24).



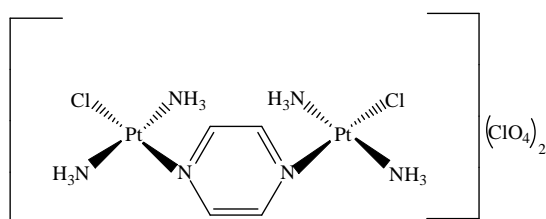
Слика 3.24. 1H NMR спектри у D_2O на 22 °C и $pD = 6,4$ за a) 4 mM GSH, b) 2 mM GSSG, c) производ реакције 2 mM $[Pt(en)Cl_4]$ комплекса и 4 mM GSH

Формирање оксидованог облика глутатиона, GSSG, у току реакције је потврђено одсуством мултиплета на хемијском померању $\delta = 3$ ppm, који потиче од протона Cys- βCH_2 групе из молекула GSH. На хемијском померању $\delta = 3,06$ ppm и $\delta = 3,36$ ppm настаје дублет дублета који се, такође, могу приметити у спектру оксидованог GSSG. У спектру је примећен и сигнал на хемијском померању $\delta = 3,35$ ppm, који одговара метиленским протонима платина(II) комплекса, док сигнал на $\delta = 3,37$ ppm одговара метиленским протонима платина(IV) комплекса. На овај начин потврђена је редукција комплекса платине(IV), као и оксидација молекула GSH.

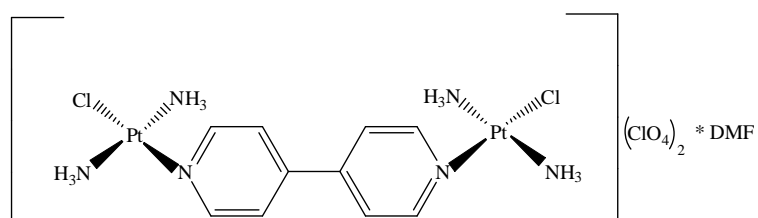
3.4. Испитивање супституционих реакција нових динуклеарних платина(II) комплекса са тиоуреом, глутатионом и гуанозин-5'-монофосфатом

Супституционе реакције динуклеарних $[{trans-PtCl(NH_3)_2}_2(\mu\text{-пиразин})](ClO_4)_2$ (**Pt1**), $[{trans-PtCl(NH_3)_2}_2(\mu\text{-4,4'-бипиридин})](ClO_4)_2 \cdot DMF$ (**Pt2**) и $[{trans-PtCl(NH_3)_2}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})](ClO_4)_2$ (**Pt3**) комплекса са Tu, GSH и 5'-GMP проучаване су

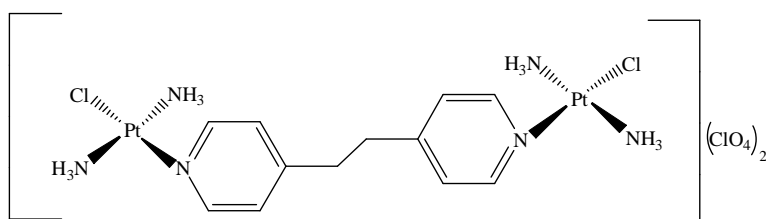
Uv-Vis спектрофотометријски на 37 °C. Реакције су испитиване на pH = 7,2 у 25 mM хепес пуферу уз додатак 20 mM NaCl. Реакције супституције аналогних диаква комплексних јона $[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2\}_2(\mu\text{-пиразин})]^{4+}$ (**Pt1a**), $[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2\}_2(\mu\text{-4,4' -бипиридин})]^{4+}$ (**Pt2a**) и $[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2\}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})]^{4+}$ (**Pt3a**) изучаване су на pH = 2,5 у 0,01 M NaClO₄. На Сликама 3.25, 3.26 и 3.27 приказане су структурне формуле испитиваних комплекса и лигананда.



$[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-пиразин})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt1**)

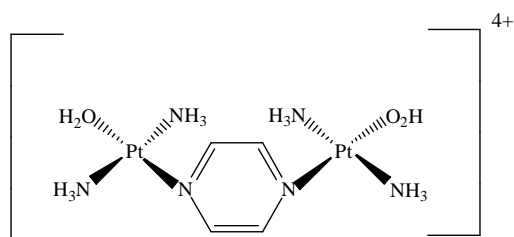


$[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-4,4' -бипиридин})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{DMF}$ (**Pt2**)

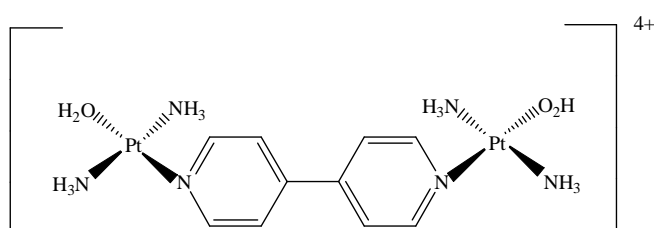


$[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**)

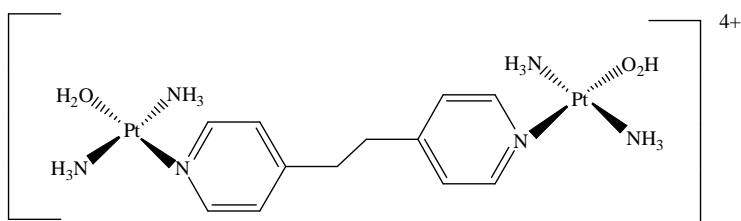
Слика 3.25. Структурне формуле комплекса **Pt1**, **Pt2**, **Pt3**



$[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-пиразин})]^{4+}$ (**Pt1a**)

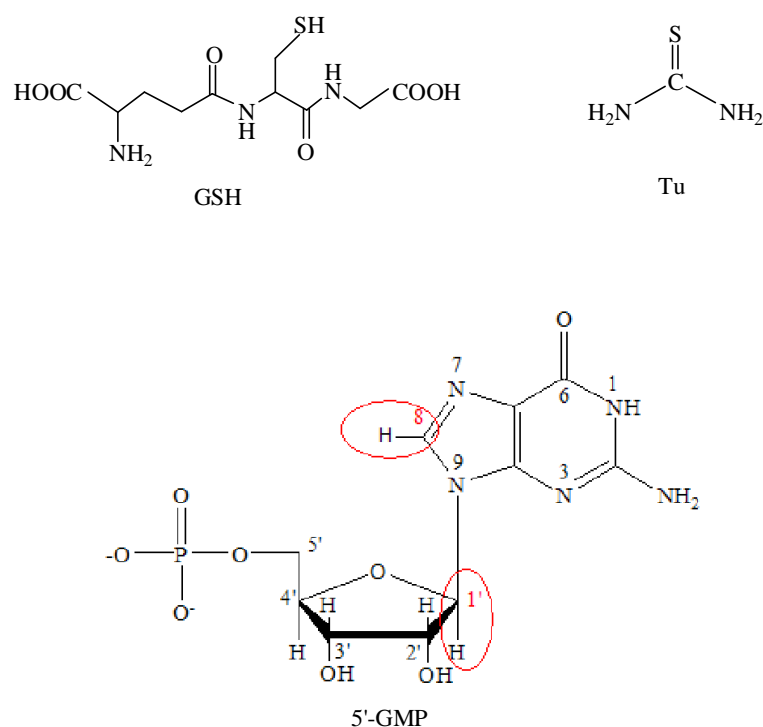


$[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-4,4'}\text{-бипиридин})]^{4+}$ (**Pt2a**)



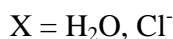
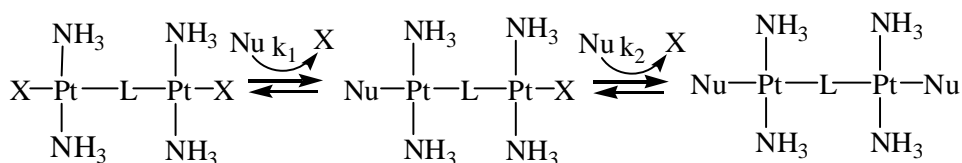
$[\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})]^{4+}$ (**Pt3a**)

Слика 3.26. Структурне формуле јона **Pt1a**, **Pt2a**, **Pt3a**



Слика 3.27. Структурне формуле испитиваних лиганата

Супституционе реакције динуклеарних платина(II) комплекса са биолошки значајним нуклеофилима (Шема 3.6) дешавају се у два узастопна корака. Први корак подразумева супституцију једног од лабилних (хлоридо или аква) лиганата из координационе сфере полазног комплекса. У другом кораку се врши супституција још једног од лабилних лиганата из координационе сфере динуклеарног комплекса. Процес је окарактерисан двема константама брзине: константом k_1 , која представља константу брзине реакције другог реда за први корак супституције, и константом k_2 , која представља константу брзине реакције другог реда за други корак супституције.



Шема 3.6.

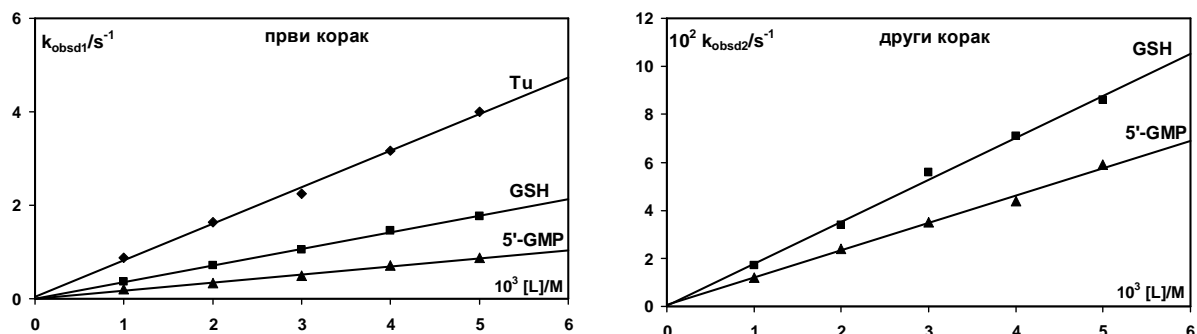
Све реакције су изучаване као реакције *псеудо*-првог реда, при чему је концентрација лиганата била у великом вишку у односу на концентрацију полазног комплекса. Повезаност константе брзине реакције *псеудо*-првог реда за први и други корак супституције, k_{obsd1} и k_{obsd2} , са константама k_1 и k_2 дата је једначинама (3.4.1) и (3.4.2):

$$k_{\text{obsd1}} = k_1[\text{Nu}] \quad (3.4.1)$$

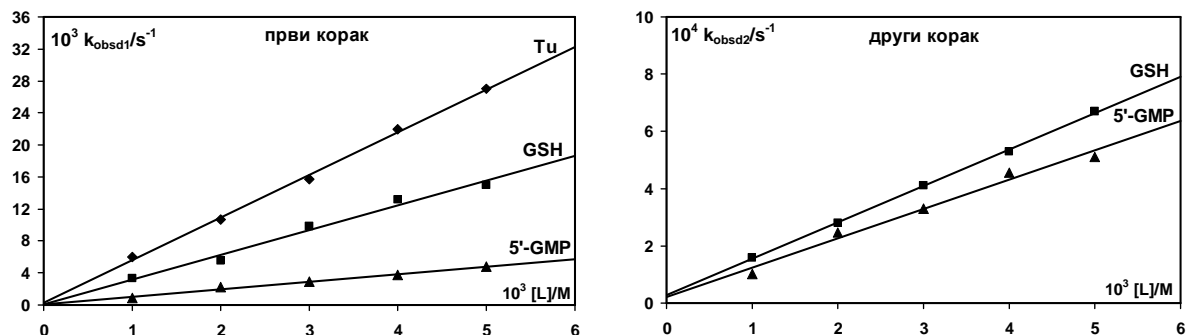
$$k_{\text{obsd2}} = k_2[\text{Nu}] \quad (3.4.2)$$

На слици 3.28 приказани су експериментално добијени резултати зависности k_{obsd1} и k_{obsd2} од концентрације лиганата за реакције супституције испитиваних диаква **Pt1a**, **Pt2a** и **Pt3a** комплекса на $\text{pH} = 2,5$ у $0,01 \text{ M NaClO}_4$. Као што се може видети у свим сличајевима је добијена линеарна зависност. Такође, све добијене праве полазе из координативног почетка, што значи да је постојање повратних или паралелних реакција искључено.

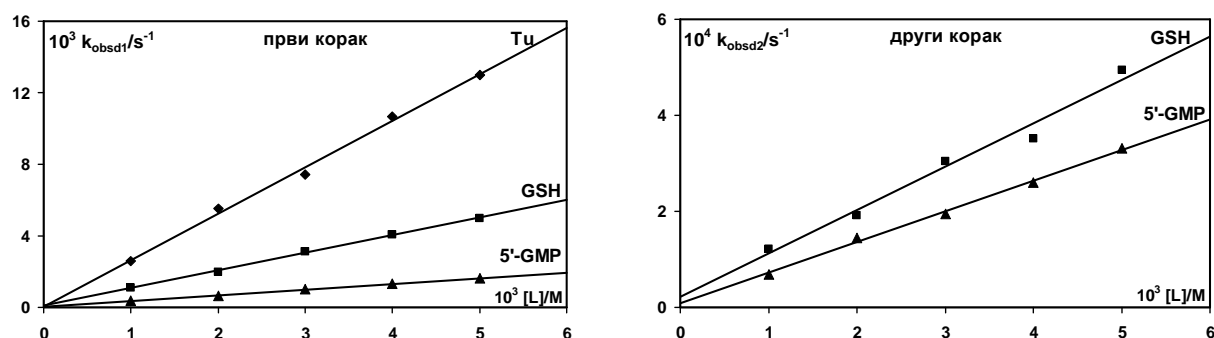
Pt1a



Pt2a



Pt3a



Слика 3.28. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда за први, k_{obsd1} , и за други, k_{obsd2} , корак супституције Pt1a, Pt2a и Pt3a комплексних јона од концентрације лиганда на 37 °C, pH = 2,5 у 0,01 M NaClO₄

Вредности за константе брзине реакција другог реда, k_1 и k_2 , израчунате из нагиба добијених права, приказане су у Табели 3.5.

Табела 3.5. Константе брзине другог реда за супституционе реакције диаква **Pt1a**, **Pt2a** и **Pt3a** комплексних јона на 37 °C, pH = 2,5 у 0,01 M NaClO₄

Pt1a			
<i>Први корак</i>	$10^2 k_1 / M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / kJ mol^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / J K^{-1} mol^{-1}$
Tu	78000 ± 2800	-	-
GSH	35600 ± 800	-	-
5'-GMP	17300 ± 800	46 ± 2	-56 ± 5
<i>Други корак</i>	$10^2 k_2 / M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / kJ mol^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / J K^{-1} mol^{-1}$
Tu	-	-	-
GSH	1800 ± 100	-	-
5'-GMP	1140 ± 50	41 ± 1	-94 ± 3
Pt2a			
<i>Први корак</i>	$10^2 k_1 / M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / kJ mol^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / J K^{-1} mol^{-1}$
Tu	540 ± 20	-	-
GSH	310 ± 20	-	-
5'-GMP	94 ± 5	77 ± 2	-23 ± 5
<i>Други корак</i>	$10^2 k_2 / M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / kJ mol^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / J K^{-1} mol^{-1}$
Tu	-	-	-
GSH	12,7 ± 0,2	-	-
5'-GMP	10,3 ± 0,9	113 ± 2	-89 ± 5
Pt3a			
<i>Први корак</i>	$10^2 k_1 / M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / kJ mol^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / J K^{-1} mol^{-1}$
Tu	260 ± 10	-	-
GSH	99 ± 3	-	-
5'-GMP	32,0 ± 0,5	64 ± 3	-48 ± 8
<i>Други корак</i>	$10^2 k_2 / M^{-1} s^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / kJ mol^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / J K^{-1} mol^{-1}$
Tu	-	-	-
GSH	9,1 ± 0,8	-	-
5'-GMP	6,4 ± 0,2	53 ± 1	-95 ± 3

На основу добијених података јасно се види да ред реактивности испитиваних диаква комплекса опада у низу: **Pt1a** > **Pt2a** > **Pt3a**. Највећа реактивност **Pt1a** комплекса се може приписати смањењу електронске густине на платина(II) јону, што је изазвано π -акцепторским особинама мостног лиганда пиразина, када метал постаје електрофилнији, па је везивање улазног нуклеофила брже.¹⁴⁹

Комплексни јони **Pt2a** и **Pt3a** показују око 100 пута мању реактивност у поређењу са **Pt1a**. Природа 4,4'-бипиридина и 1,2-бис(4-пиридил)етана као мостних лиганда не омогућава добру електронску комуникацију између два јона метала, па су они мање електрофилни.

Ред реактивности изучаваних лиганда опада у низу: $Tu > GSH > 5'-GMP$. У случају *Tu* као нуклеофила, први супституциони корак је јако брза реакција, у којој долази до супституције оба лабилна молекула воде.¹⁵⁰ Други корак супституције је знатно спорији и он представља супституцију мостног лиганда молекулом *Tu*, што је последица снажног *trans*-ефекта већ координоване *Tu* у првом кораку реакције. Код азот-донорских лиганда овај ефекат је знатно слабији.¹⁵¹

Поред тога, комплекс **Pt1a** реагује са *Tu* два реда величине брже у односу на друге испитиване диаква комплексе, што је у сагласности са публикованим резултатима за реакције сродних динуклеарних комплекса платине(II) са *Tu*.^{116-118,152}

Реактивност *GSH* према изучаваним комплексима је знатно мања. Узимајући у обзир pK_a вредности за *GSH* ($pK_{a1} = 2,05$ $pK_{a2} = 3,40$ $pK_{a3} = 8,79$ и $pK_{a4} = 9,49$)¹⁴⁷ на $pH = 2,5$ тиолна група је протонована, што доводи до отежане координације атома сумпора за јон метала.

Реакције супституције са *GSH* се такође одвијају у два корака. Први корак представља супституцију једног лабилног молекула воде трипептидом, док се у другом кораку врши замена другог лабилног молекула воде. На основу података датих у Табели 3.5, може се видети да је други реакциони корак 30-50 пута спорији у односу на први. То се може објаснити повећањем стерних сметњи које настају након координације првог молекула *GSH*. Поред тога, други реакциони корак је спорији и због промене укупног наелектрисања комплекса. Наиме, након везивања једног молекула *GSH* наелектрисање комплекса се смањује од 4+ на 3+, чиме се истовремено смањује електрофилност платина(II) јона.

Испитивање интеракција *GSH* са динуклеарним комплексима платине(II) могу имати велики биолошки значај, узимајући у обзир да је *GSH* најзаступљенији интрацелуларни тиол. Добро је познато да платина(II) јон лако реагује са *GSH*, тако да се око 67% унете цисплатине у организам везује управо за молекул *GSH*. Из тих разлога *GSH* се користи као заштитни реагенс, при чему се уноси у организам пре и након употребе цисплатине.⁷⁴ Његова улога је двострука, јер он има способност активације, али и деактивације цисплатине.¹⁵³ Такође, примећено је да се реактивност цисплатине повећава

уколико се у организам уноси заједно са GSH. Механизам овог процеса још увек није потпуно разјашњен и предмет је многобројних истраживања.

Реакције супституције испитиваних диаква **Pt1a**, **Pt2a** и **Pt3a** комплекса са 5'-GMP се такође дешавају у два узастопна корака. Под изабраним експерименталним условима (pH = 2,5), координација за платина(II) јон се одвија преко N7 атома нуклеотида, јер је N1 атом под овим условима протонан (pKa = 9,3). Први корак реакције представља супституцију једног молекула воде молекулом 5'-GMP, док се у другом кораку супституише и други молекул воде. Стерне сметње мостних лиганата се у првом кораку могу занемарити, јер је присутна слободна ротација око Pt-N веза. Међутим, у другом кораку стерне сметње, настале као последица везивања једног молекула нуклеотида, се морају узети у обзир. Наелектрисање комплекса може имати важну улогу у разумевању реактивности комплекса према нуклеотиду. Након координације првог молекула 5'-GMP наелектрисање комплекса се смањује на 2+, што за последицу има повећање електронске густине јона метала, чиме се значајно успорава други корак.

На основу података из Табеле 3.5 може се видети да је процес супституције изучаваних аква комплекса са 5'-GMP најспорији у односу на остале. Од одабраних лиганата једино молекул 5'-GMP спада у групу азот-донорских лиганата, а добро је познато да је у процесу супституције комплекса платине(II) формирање Pt-S везе кинетички фаворизовано, док су једињења са Pt-N везом термодинамички стабилнија.¹⁵⁴

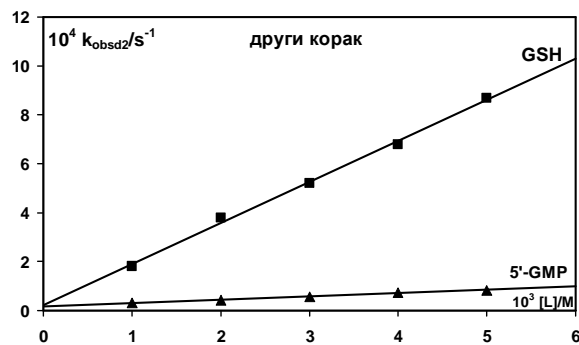
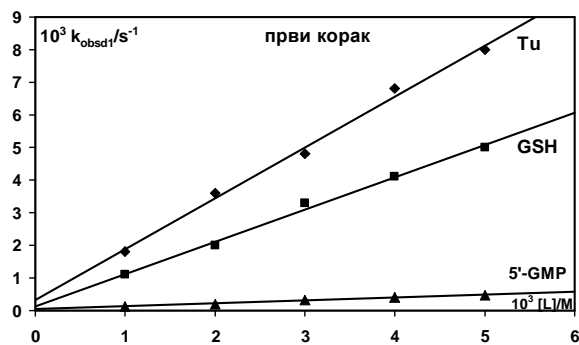
Реакције супституције дихлоридо **Pt1**, **Pt2** и **Pt3** комплекса су испитиване на 37 °C и pH = 7,2 (25 mM хепес пуфер) у присуству 20 mM NaCl. Све реакције су праћене под условима реакција *псеудо*-првог реда, при чему је концентрација лиганда била најмање 10 пута већа у односу на концентрацију полазног комплекса. Повезаност константе брзине реакције *псеудо*-првог реда за први и други корак супституције, k_{obsd1} и k_{obsd2} , са константама k_1 и k_2 дата је једначинама (3.4.3) и (3.4.4):

$$k_{obsd1} = k_1[Nu] \quad (3.4.3)$$

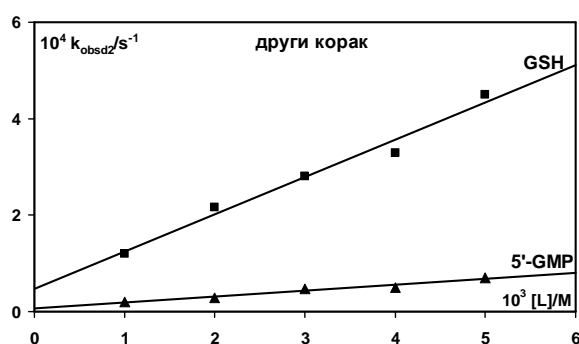
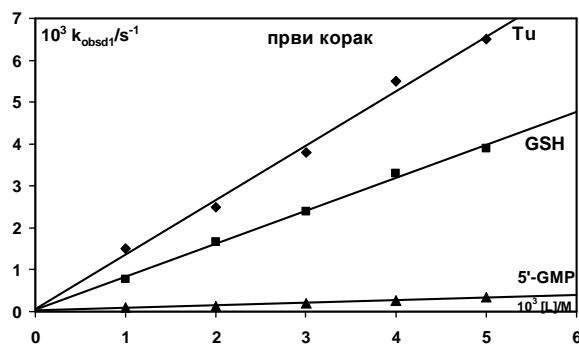
$$k_{obsd2} = k_2[Nu] \quad (3.4.4)$$

Супституциони процес дихлоридо **Pt1**, **Pt2** и **Pt3** комплекса се такође врши у два узастопна корака, као што је приказано на Шеми 3.6. На Слици 3.29 приказана је линеарна зависност константе брзине реакције *псеудо*-првог реда за први и други корак супституције, k_{obsd1} и k_{obsd2} , у функцији концентрације лиганата. Израчунате вредности за константе k_1 и k_2 дате су у Табели 3.6.

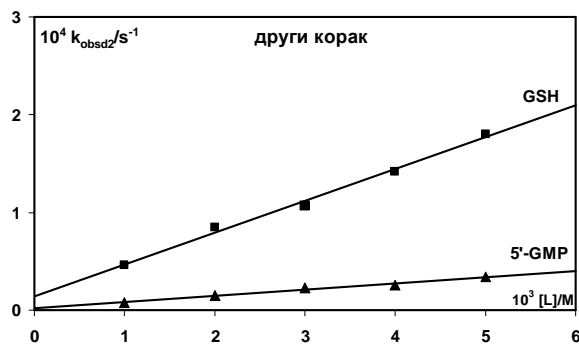
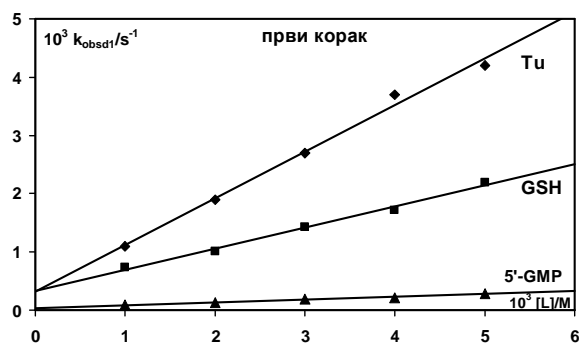
Pt1



Pt2



Pt3



Слика 3.29. Зависност константе брзине реакције псеудо-првог реда за први, k_{obsd1} , и за други, k_{obsd2} , корак супституције Pt1, Pt2 и Pt3 комплекса од концентрације лиганда на $37^\circ C$, $pH = 7,2$, 20 mM NaCl

Табела 3.6. Константе брзине другог реда за супституционе реакције дихлоридо **Pt1**, **Pt2** и **Pt3** комплекса на 37 °C, рН = 7,2 и 20 mM NaCl

Pt1			
<i>Први корак</i>	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	156 ± 7	-	-
GSH	99 ± 4	-	-
5'-GMP	8,7 ± 0,6	72 ± 2	-32 ± 5
<i>Други корак</i>	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	-	-	-
GSH	16,8 ± 0,5	-	-
5'-GMP	1,4 ± 0,1	68 ± 6	-57 ± 19
Pt2			
<i>Први корак</i>	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	130 ± 7	-	-
GSH	79 ± 3	-	-
5'-GMP	6,1 ± 0,4	73 ± 2	-33 ± 5
	0,71 ± 0,03 ^a		
<i>Други корак</i>	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	-	-	-
GSH	7,7 ± 0,6	-	-
5'-GMP	1,2 ± 0,1	63 ± 5	-75 ± 15
Pt3			
<i>Први корак</i>	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	80 ± 4	-	-
GSH	36 ± 2	-	-
5'-GMP	4,9 ± 0,3	75 ± 2	-35 ± 6
	0,57 ± 0,01 ^a		
<i>Други корак</i>	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	-	-	-
GSH	3,3 ± 0,2	-	-
5'-GMP	0,63 ± 0,04	77 ± 2	-32 ± 5

^aКонстанта одређена помоћу ¹H NMR спектроскопије

На основу добијених резултата може се уочити да редослед реактивности испитиваних комплекса опада у низу: **Pt1** > **Pt2** > **Pt3**. Овај редослед реактивности је у сагласности са редоследом који је добијен за испитиване аналогне диаква комплексе на рН = 2,5.

Редослед реактивности коришћених лиганата је исти као у случају реакција супституције диаква комплекса: $Tu > GSH > 5'-GMP$. За реакцију са *Tu* други корак је изузетно спор, јер везивањем једног молекула *Tu* долази до повећања лабилности мостног лиганда, као последица снажног *trans*-ефекта. За разлику од тога, *GSH* и *5'-GMP* са испитиваним комплексима реагују тако што се у првом кораку супституише један, а у другом реакционом кораку други хлоридни јон.

Упоређивањем реактивности **Pt1**, **Pt2** и **Pt3** комплекса са њиховим диаква аналозима може се уочити значајно мања реактивност хлоридо комплекса. Смањена реактивност се доводи у везу са лабилношћу одлазећих лиганата, као и са смањеном електрофилношћу металног центра, која настаје као последица смањења укупног наелектрисања комплекса.

Испитивањем реакција супституције изучаваних комплекса са *5'-GMP* на различитим температурама омогућило је одређивање вредности термодинамичких параметара, Табеле 3.5 и 3.6. Негативне вредности за ΔS^\ddagger указују на асоцијативни механизам супституције, који представља опште прихваћен механизам за супституционе реакције квадратно-планарних комплекса платине(II).^{13,155}

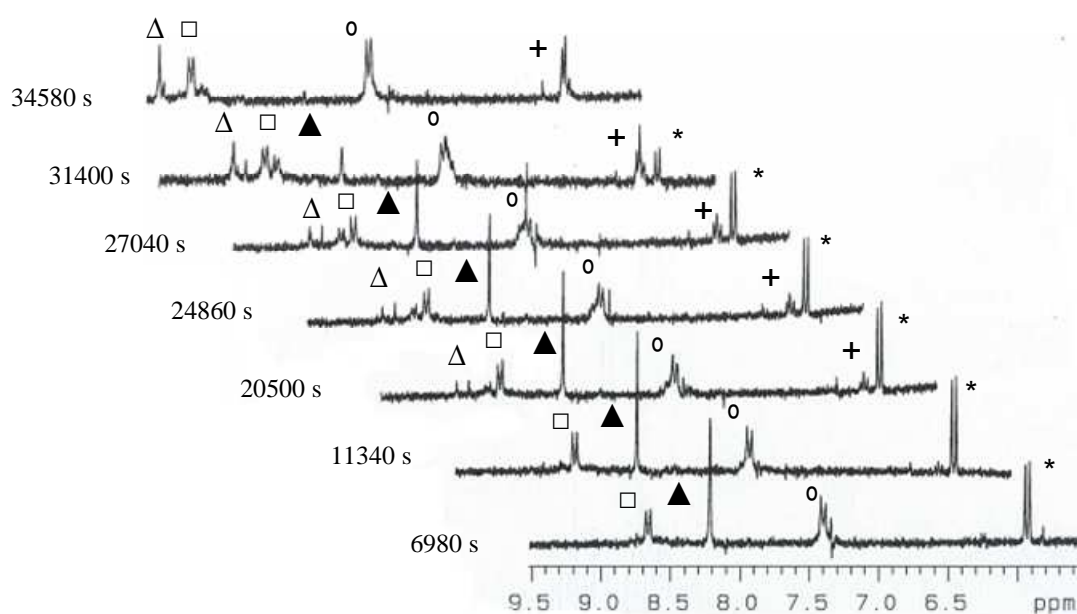
3.4.1. ¹H NMR кинетичка мерења

Кинетика супституционих реакција дихлоридо комплекса [*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ -4,4'-бипиридин)](ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) и [*trans*-PtCl(NH₃)₂]₂(μ -1,2-бис(4-пиридил)етан)](ClO₄)₂ (**Pt3**) са *5'-GMP* испитивана је ¹H NMR спектроскопијом у D₂O на 22 °C. Реакције су праћене у моларном односу 1 : 2 (комплекс : лиганд), док је рD вредност раствора била 6,7.

За изучавање кинетике са *5'-GMP* овом методом најчешће се користе сигнали за H1' и H8 протоне из молекула нуклотида, јер се на основу промена њихових хемијских

померања најбоље може пратити координација преко N7 атома нуклеотида за платину(II) јон.

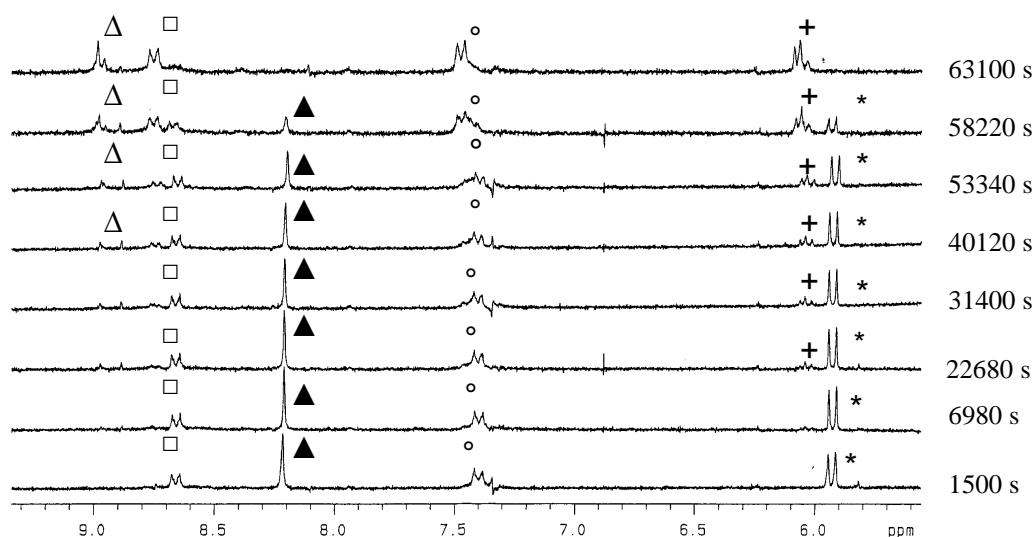
У случају реакције супституције **Pt2** комплекса (Слика 3.30) синглет који потиче од H8 протона се преклапа са мултиплетом насталог производа реакције, тако да овај сигнал није коришћен за израчунавања. У случају ове реакције посматран је дублет H1' протона из молекула 5'-GMP, који се код слободног (некоординованог) лиганда налази на $\delta = 5,95$ ppm. Интензитет овог сигнала се током реакције смањује, док се истовремено појављује сигнал на $\delta = 6,12$ ppm од координованог 5'-GMP, чији интензитет са временом расте.



Слика 3.30. ^1H NMR спектри за реакцију (10 mM) **Pt2** комплекса и (20 mM) 5'-GMP на 22 °C, $pD = 6,7$, (*) - H1' сигнал слободног 5'-GMP; (+) - H1' сигнал координованог 5'-GMP; (°) - CH сигнал из 4-пиридина; (▲) - H8 сигнал слободног 5'-GMP; (□) - H8 сигнал првог координованог 5'-GMP; (Δ) - H8 сигнал другог координованог 5'-GMP

На Слици 3.31 приказани су ^1H NMR спектри за реакцију супституције **Pt3** комплекса и молекула 5'-GMP. Такође, у овом случају сигнал од H8 протона из молекула 5'-GMP није било могуће пратити из претходно поменутих разлога. Интензитет дублета H1' протона из 5'-GMP за слободан лиганд на $\delta = 5,90$ ppm се временом смањује, док се на

хемијском померању $\delta = 6,05$ ppm појављује сигнал координаног 5'-GMP, чији интензитет временом расте.



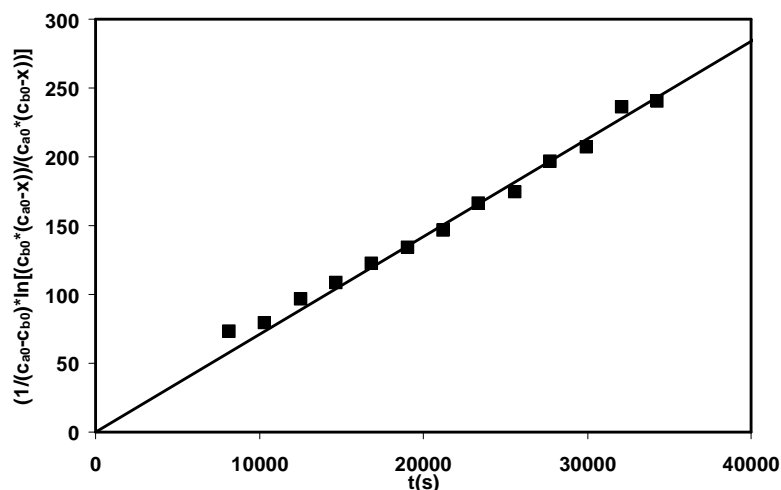
Слика 3.31. ^1H NMR спектри за реакцију (10 mM) **Pt3** комплекса и (20 mM) 5'-GMP на 22 °C, $pD = 6,7$, (*) - $\text{H}1'$ сигнал слободног 5'-GMP; (+) - $\text{H}1'$ сигнал координаног 5'-GMP; (°) - CH сигнал из 4-пиридина; (▲) - $\text{H}8$ сигнал слободног 5'-GMP; (□) - $\text{H}8$ сигнал првог координаног 5'-GMP; (Δ) - $\text{H}8$ сигнал другог координаног 5'-GMP

С обзиром да су у току реакције почетне концентрације лиганда (c_{a0}) и комплекса (c_{b0}) различите, вредност за константу брзине k_1 одређена је на основу једначине (3.4.1.1). Концентрација производа реакције првог корака супституције означена је са x , а израчуната је на основу површине сигнала координаног 5'-GMP.

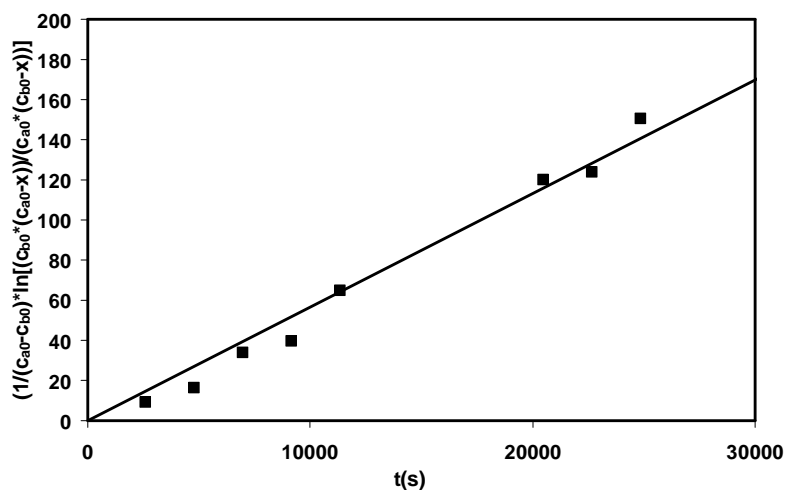
$$k_1 t = \frac{1}{c_{a0} - c_{b0}} \ln \frac{c_{b0}(c_{a0} - x)}{c_{a0}(c_{b0} - x)} \quad (3.4.1.1)$$

На Сликама 3.32 и 3.33 приказане су графичке зависности члана $(1/(c_{a0}-c_{b0})) \cdot \ln[(c_{b0} \cdot (c_{a0}-x))/(c_{a0} \cdot (c_{b0}-x))]$ у функцији времена t за реакције комплекса **Pt2** и **Pt3** са 5'-GMP. Ова зависност је линеарна, а добијена права пролази кроз координатни

почетак. Вредности за константу k_1 , одређене из нагиба праве, дате су у Табели 3.6. Константа брзине другог корака супституције није одређена, јер у оквиру периода изучавања реакција, супституција није била завршена.



Слика 3.32. Зависност $(1/(c_{a0}-c_{b0})) \cdot \ln[(c_{b0} \cdot (c_{a0}-x))/(c_{a0} \cdot (c_{b0}-x))]$ у функцији времена t за реакцију супституције **Pt2** комплекса и 5'-GMP на 22 °C и $pD = 6,7$

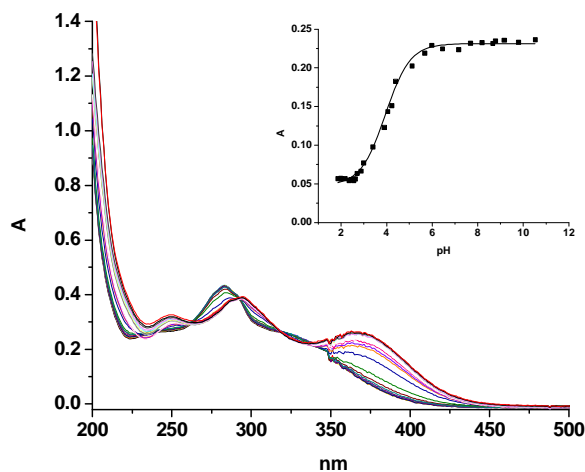


Слика 3.33. Зависност $(1/(c_{a0}-c_{b0})) \cdot \ln[(c_{b0} \cdot (c_{a0}-x))/(c_{a0} \cdot (c_{b0}-x))]$ у функцији времена t за реакцију супституције **Pt3** комплекса и 5'-GMP на 22 °C и $pD = 6,7$

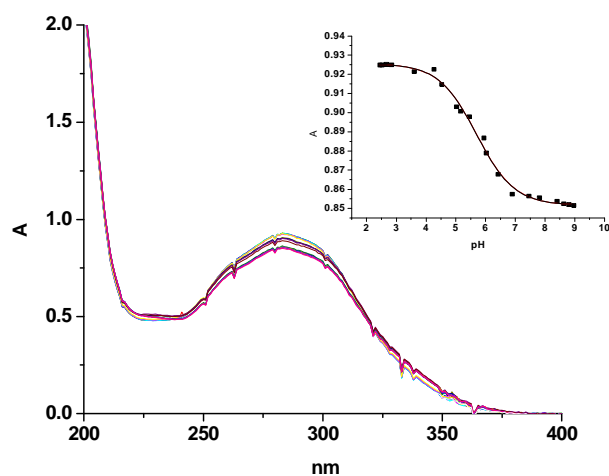
Константе брзине реакција супституције k_1 одређене ^1H NMR спектроскопијом су око 10 пута мање у односу на константе брзине истих реакција добијене Uv-Vis спектрофотометријски. Један од разлога је тај што су реакције праћене помоћу Uv-Vis спектрофотометра изучаване на $37\text{ }^\circ\text{C}$, док су ^1H NMR спектроскопијом изучаване на $22\text{ }^\circ\text{C}$. С друге стране, киселост раствора такође има утицаја, јер су реакције праћене спектрофотометријски изучаване на $\text{pH} = 7,2$. Добијене вредности за константе k_1 се у доброј мери слажу са литературним подацима за сродне динуклеарне комплексе.^{112,156}

3.4.2. Одређивање pK_a вредности $[\{\textit{trans}\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2\}(\mu\text{-пиразин})]^{4+}$ (Pt1a), $[\{\textit{trans}\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2\}(\mu\text{-4,4'}\text{-бипиридин})]^{4+}$ (Pt2a) и $[\{\textit{trans}\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2\}(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})]^{4+}$ (Pt3a) комплексних јона

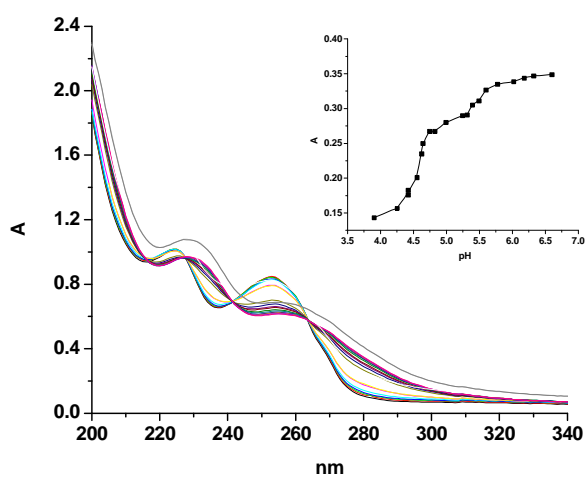
pK_a вредности Pt1a, Pt2a и Pt3a комплексних јона одређене су Uv-Vis спектрофотометријски на $25\text{ }^\circ\text{C}$ у присуству $0,01\text{ M NaClO}_4$. Спектралне промене настале након сваког додатка стандардног раствора NaOH приказане су на Сликама 3.34, 3.35 и 3.36.



Слика 3.34. Uv-Vis спектри добијени током титрације диаква Pt1a комплексног јона у рН области од 2 до 10 у $0,01\text{ M NaClO}_4$ на $25\text{ }^\circ\text{C}$. Уметнути график: Зависност апсорбанце од рН на $\lambda = 380\text{ nm}$



Слика 3.35. Uv-Vis спектри добијени током тирације диаква **Pt2a** комплексног јона у рН области од 2 до 10 у 0,01 М NaClO₄ на 25 °С. Уметнути график: Зависност апсорбанце од рН на $\lambda = 285 \text{ nm}$



Слика 3.36. Uv-Vis спектри добијени током тирације диаква **Pt3a** комплексног јона у рН области од 2 до 10 у 0,01 М NaClO₄ на 25 °С. Уметнути график: Зависност апсорбанце од рН на $\lambda = 280 \text{ nm}$

На основу графика зависности рН раствора од апсорбанце на одређеној таласној дужини, одређује се рK_a вредност координованих молекула воде, на основу једначине (3.4.2.1).

$$y = a + (b - a)/(1 + 2,718*((x - pK_{a1}/m) + (c - b)/(1 + 2,718*((x - pK_{a2})/n))) \quad (3.4.2.1)$$

У овој једначини x се односи на рН, а y на апсорбанцу. Параметар a представља вредност апсорбанце на почетку титрације, b је апсорбанца у току титрације, док c означава вредност апсорбанце на крају титрације. Параметри m и n су узети као оптималне вредности апсорбанце у току титрације. С обзиром да су изучавани комплекси диаква јони, израчунате вредности за рK_{a1} и рK_{a2} сваког од њих дате су у Табели 3.7.

Табела 3.7. рK_a вредности за **Pt1a**, **Pt2a** и **Pt3a** комплексне јоне

	рK _{a1}	рK _{a2}
Pt1a	3,94 ± 0,07	5,0 ± 0,5
Pt2a	4,6 ± 0,2	5,69 ± 0,05
Pt3a	4,58 ± 0,06	5,5 ± 0,3
Pen ^a	3,93 ± 0,03	5,69 ± 0,03
Нер ^a	4,07 ± 0,02	5,27 ± 0,06
Dec ^a	4,03 ± 0,04	5,06 ± 0,06

^a Реф. 117

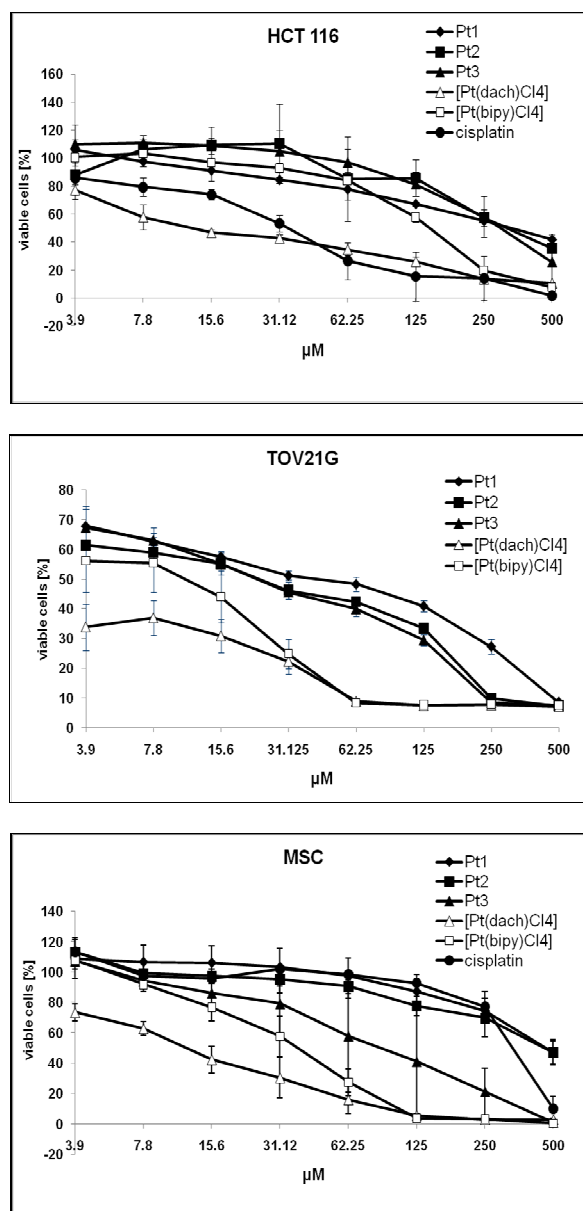
Испитивани динуклеарни комплекси садрже два платина(II) јона који су међусобно повезани различитим мостним лигандима (Слика 3.26). Њихове рK_a вредности првенствено зависе од растојања јона метала и њихове електронске густине. Претходно је поменуто да коњуговани π-електронски системи у мостним лигандима подржавају електронску комуникацију између два јона метала код динуклеарних комплекса.^{96,117} То подразумева да краће растојање између јона метала повећава њихову електрофилност, а самим тим и киселост. Зато су рK_{a1} и рK_{a2} вредности за **Pt1a** ниже у односу на вредности добијене за **Pt2a** и **Pt3a**. После депротонације првог координованог молекула воде, у свим

испитиваним динуклеарним комплексима, укупно наелектрисање комплекса се смањује од 4+ на 3+. То доводи до опадања електрофилности другог металног центра, па су вредности за pK_{a2} у свим случајевима веће у односу на вредности за pK_{a1} .

У Табели 3.7 приказане су литературне вредности за pK_{a1} и pK_{a2} динуклеарних комплекса типа $[Pt_2(N,N,N',N'-тетракус(2-пиридилметан)диамин(H_2O)_2)]^{4+}$, који у својој структури имају мостни лиганд са 5, 7 и 10 метиленских група. Структурна формула дихлоридо аналога овог комплекса је приказана раније на Слици 1.10. На основу литературних података може се потврдити да на pK_a вредност велики утицај има растојање између два метална центра. На то указује и мања разлика између pK_{a1} и pK_{a2} вредности код комплекса који као мостни лиганд има угљоводонични низ од 10 метиленских група у односу на оне комплексе код којих је мање растојање између два метална центра.

3.5. Испитивање цитотоксичности комплекса платине(IV) и динуклеарних комплекса платине(II)

Цитотоксичност октаедарских комплекса платине(IV), $[Pt(bipy)Cl_4]$, $[Pt(dach)Cl_4]$ и динуклеарних комплекса платине(II) **Pt1**, **Pt2** и **Pt3**, испитивана је према хуманим ћелијским линијама тумора јајника (TOV21G), дебелог црева (HCT-116) и мезенхималним матичним ћелијама добијеним из периферне крви (MSC). На Слици 3.37 приказани су резултати испитивања. Добијени резултати су упоређивани са цитотоксичношћу цисплатине према истим ћелијским линијама.



Слика 3.37. Цитотоксичност тестираних комплекса мерена помоћу МТТ теста

Сви испитивани комплекси показују цитотоксичност према тестираним ћелијским линијама. Њихова активност зависи од врсте, дозе комплекса и времена излагања. Највећи цитотоксични ефекат је примећен према TOV21G ћелијама. Од испитиваних комплекса, [Pt(dach)Cl₄] на нижим концентрацијама испољава знатно већи цитотоксични ефекат.

НСТ-116 ћелије су отпорније него остале ћелијске линије према цитотоксичном ефекту испитиваних комплекса. И у овом случају најефикаснији је $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ комплекс, који показује сличну цитотоксичност као и цисплатина.

Комплекси **Pt2** и **Pt3** показују значајну цитотоксичност према MSC ћелијама, али у поређењу са њима комплекси **Pt1**, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$ су показали већи цитотоксични ефекат.

На основу литературних података може се упоредити цитотоксичност $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ комплекса у односу на структурно сличне комплексе према L1210/0 ћелијским линијама леукемије. Она опада у низу: $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{en})(\text{OCOCH}_3)_2\text{Cl}_2] > [\text{Pt}(\text{ipa})\text{Cl}_2(\text{OH})_2] > [\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2(\text{OH})_2]$.⁵² Динуклеарни комплекси платине(II), структурно слични са испитиваним комплексима у овој дисертацији, $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-пиразин})](\text{NO}_3)_2$ и $[\{\text{cis-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-пиридазин})](\text{NO}_3)_2$, су показали значајну цитотоксичност према ћелијама тумора јајника, а знатно нижу према ћелијама тумора дебелог црева у поређењу са цисплатином.⁹² Серија нових динуклеарних комплекса платине(II) са дикарбоксилатима или сулфатима као мостним лигандима су показали велику активност према НСТ-116 ћелијама, слично оксалиплатини.¹⁵⁷

ЗАКЉУЧАК

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

1. Резултати испитивања кинетике супституционих реакција $[Pt(en)Cl_2]$ и $[Pt(dach)Cl_2]$ комплекса са 5'-GMP и L-His указују да:

- Испитивани комплекси платине(II) имају велики афинитет према изучаваним азот-донорским лигандима.
- Комплекс $[Pt(en)Cl_2]$ је реактивнији у односу на $[Pt(dach)Cl_2]$ комплекс, што указује да реактивност изучаваних комплекса зависи од структуре инертних бидентатних лиганада.
- L-His је реактивнији улазни лиганд у односу на 5'-GMP.
- На основу 1H NMR и HPLC мерења је доказано присуство само једног финалног производа у реакционом систему.

2. Резултати испитивања супституционих реакција $[Pt(bipy)Cl_4]$, $[Pt(en)Cl_4]$ и $[Pt(dach)Cl_4]$ комплекса са азот-донорским лигандима указују да:

- Изучавани комплекси платине(IV) поседују велики афинитет према одабраним азот-донорским лигандима (L-His, 5'-GMP).
- Редослед реактивности комплекса платине(IV) у реакцијама са 5'-GMP опада у низу: $[Pt(bipy)Cl_4] > [Pt(en)Cl_4] > [Pt(dach)Cl_4]$, што указује да реактивност комплекса зависи од структуре инертних лиганада.
- У супституционим реакцијама са L-His комплекс $[Pt(en)Cl_4]$ је реактивнији у односу на $[Pt(dach)Cl_4]$ комплекс.
- L-His је у свим реакцијама бољи нуклеофил у односу на 5'-GMP.
- Супституционе реакције комплекса платине(IV) праћене су брзим процесом редукције до одговарајућих комплекса платине(II).

- Применом ^1H NMR и HPLC метода утврђено је присуство само једног финалног производа у испитиваним системима.

3. *Резултати испитивања реакција редукције $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4]$, $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4]$ и $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ комплекса са биолошки значајним сумпор-донорским лигандима указују да:*

- Реактивност испитиваних комплекса зависи од структуре инертних лиганата и опада у низу: $[\text{Pt}(\text{bipy})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_4] > [\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$.
- Редослед реактивности изучаваних лиганата је: $\text{GSH} > \text{L-Cys} > \text{L-Met}$.
- Процес редукције комплекса платине(IV) је бржи на физиолошкој $\text{pH} = 7,2$ него у киселој средини на $\text{pH} = 2,0$.
- Редукција комплекса платине(IV) у присуству сумпор-донорских лиганата одвија се по механизму редуктивне елиминације и као финални производи настају одговарајући комплекс платине(II) и оксидовани облик лиганата.

4. *Резултати испитивања супституционих реакција нових динуклеарних платина(II) комплекса, $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-пиразин})](\text{ClO}_4)_2$ (Pt1), $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-4,4'-бипиридин})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{DMF}$ (Pt2) и $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-1,2-бис(4-пиридил)етан})](\text{ClO}_4)_2$ (Pt3) и њихових диаква аналога са биолошки значајним нуклеофилима указују да:*

- Редослед реактивности испитиваних динуклеарних комплекса платине(II) у реакцијама супституције опада и низу: **Pt1 > Pt2 > Pt3**.
- Природа мостног лиганда има велики утицај на реактивност изучаваних динуклеарних комплекса.
- Испитивани динуклеарни диаква комплекси платине(II) су показали већу реактивност на $\text{pH} = 2,5$ у поређењу са реактивношћу њихових дихлоридо аналога на $\text{pH} = 7,2$.
- Реактивност испитиваних лиганата опада у низу: $\text{Tu} > \text{GSH} > 5'\text{-GMP}$.
- Негативне вредности за ΔS^\ddagger указују да се процес супституције ових комплекса одвија по асоцијативном механизму у оба реакциона корака.

- За све изучаване аква комплексе одређене су pK_a вредности.
- pK_{a1} и pK_{a2} вредности за **Pt1a** су ниже у односу на вредности добијене за **Pt2a** и **Pt3a**.

5. Резултати испитивања цитотоксичних особина платина(IV) и динуклеарних платина(II) комплекса указују да:

- Комплекс $[Pt(dach)Cl_4]$ на нижим концентрацијама испољава знатно већи цитотоксични ефекат у односу на друге испитиване комплексе према TOV21G и НСТ-116 ћелијама.
- Комплекси **Pt2** и **Pt3** показују сличну цитотоксичност према MSC ћелијама као и цисплатина, а у поређењу са њима комплекси **Pt1**, $[Pt(dach)Cl_4]$ и $[Pt(bipy)Cl_4]$ показују још већи цитотоксични ефекат.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Ronconi and P. J. Sadler, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1633-1648
2. P. C. A. Bruijninx and P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, 2009, **61**, 1-62
3. M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger and B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2008, 183-194
4. a) B. Rosenberg and L. V. Camp, *Nature*, 1965, **205**, 698-699; b) B. Rosenberg, L. V. Camp, J. E. Trosko and V. H. Mansour, *Nature*, 1969, **222**, 385-386; c) B. Rosenberg and L. V. Camp, *Cancer Res.*, 1970, **30**, 1799-1802; d) B. Rosenberg, L. V. Camp, E. B. Grimley and A. J. Thomson, *J. Biol. Chem.*, 1967, **242**, 1347-1352
5. L. R. Kelland, B. A. Murrer, G. Abel, C. M. Giandomenico, P. Mistry and K. R. Harrap, *Cancer Res.*, 1992, **52**, 822-828
6. R. van Eldik, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1649-1662
7. C. H. Langford and H. B. Gray, in *Ligand Substitution Processes*, Benjamin, New York, 1974, ch. 2
8. M. L. Tobe and J. Burgess, in *Inorganic Reaction Mechanism*, Longman, England, 1999, ch. 2, 4
9. Ž. D. Bugarčić, u *Kinetika i Mehanizam Supsticionih Reakcija*, PMF Kragujevac, 1996, pp. 12-32
10. 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
11. R. van Eldik, T. Asano and W. J. Le Noble, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 549-593
12. I. Gal, u *Mehanizmi Neorganskih Reakcija*, Naučna knjiga, 1979, ch. 2, 3
13. C. E. Housecroft and A. G. Sharpe, in *Inorganic Chemistry*, Prentice Hall, Essex, England, 2001, ch. 6, 19, 20, 25
14. K. J. Laidler, in *Chemical Kinetics*, Harper and Row, New York, 1987, ch. 4, 6
15. J. H. Espenson, in *Chemical Kinetics and Reaction Mechanism*, 2nd Ed., McGraw Hill, New York, 1995, ch. 2, 6
16. S. Ašperger, in *Chemical Kinetics and Inorganic Reaction Mechanisms*, 2nd Ed., Plenum Publishers, New York, 2003, ch. 2

17. J. Burgess and C. D. Hubbard, in *Advances in Inorganic Chemistry*, Eds., R. van Eldik and C. D. Hubbard, Elsevier, Amsterdam, 2003, ch. 2
18. 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
19. B. D. Glišić, U. Rychlewska and M. I. Đuran, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 6887-6901
20. M. Milovanović, A. Đeković, V. Volarević, B. Petrović, N. Arsenijević and Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 944-949
21. V. Volarević, M. Milovanović, A. Đeković, B. Petrović, N. Arsenijević and Ž. D. Bugarčić, *J. BUON*, 2010, **15**, 768-773
22. M. Arsenijević, M. Milovanović, V. Volarević, A. Đeković, T. Kanjevac, N. Arsenijević, S. Đukić and Ž. D. Bugarčić, *Med. Chem.*, 2012, **8**, 2-7
23. P. J. Sadler, in *Metals in Medicine*, University Science Books, 2007, pp. 95-135
24. T. W. Hambley, *Science*, 2007, **318**, 1392-1393
25. A. Fuertes, C. Alonso and J. M. Perez, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 645-662
26. B. Lippert, in *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of Leading Antitumor Drugs*, Wiley-VCH, Zurich, 1999
27. J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499-2510
28. M. A. Jakupec, M. Galanski and B. K. Keppler, *Rev. Physiol. Bioch. P.*, 2003, **146**, 1-54
29. J. Kozelka, F. Legendre, F. Reeder and J. C. Chottard, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **190-192**, 61-81
30. T. Soldatović and Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1472-1479
31. F. Basolo and R. C. Johnson, in *Coordination Chemistry*, 2nd Ed., Science Reviews, London, 1987, ch. 6
32. a) E. Wong and C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2451-2466; b) E. R. Jamieson and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2467-2498; c) J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2467-2498
33. Y. Jung and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 1387-1407
34. N. J. Farrer and P. J. Sadler, *Aust. J. Chem.*, 2008, **61**, 669-674
35. M. D. Hall, C. T. Dillon, M. Zhang, P. Beale, Z. Cai, B. Lai, A. P. J. Stampfl and T. W.

- Hambley, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 726-732
36. A. R. Battle, G. B. Deacon, R. C. Dolman and T. W. Hambley, *Aust. J. Chem.*, 2002, **55**, 699-704
37. P. J. Bednarski, R. Grunert, M. Zielzki, A. Wellner, F. S. Mackay and P. J. Sadler, *Chem. Biol.*, 2006, **13**, 61-67
38. F. S. Mackay, J. A. Woods, H. Moseley, J. Ferguson, A. Dawson, S. Parsons and P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 3155-3161
39. M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan and T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 3403-3411
40. L. Ronconi and P. J. Sadler, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 262-268
41. 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**, 523-533
42. R. P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **27**, 8438-8439
43. 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**, 1259-1268
44. M. Galanski, M. A. Jakupec and B. K. Keppler, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 2075-2094
45. D. Lebowitz and R. Canetta, *Eur. J. Cancer*, 1998, **34**, 1522-1534
46. T. G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.*, 1997, **166**, 313-359
47. M. D. Hall and T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 49-67
48. M. D. Hall, H. L. Daly, J. Z. Zhang, M. Zhang, R. A. Alderden, D. Pursche, G. J. Foran and T. W. Hambley, *Metallomics*, 2012, **6**, 568-575
49. J. Kasparkova, O. Novakova, O. Vrana, F. Intini, G. Natile and V. Brabec, *Mol. Pharmacol.*, 2006, **70**, 1708-1719
50. N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig and R. Oun, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 8113-8127
51. J. J. Wilson and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 3103-3115
52. S. Choi, C. Filotto, M. Bisanzo, S. Delaney, D. Lagasee, J. L. Whitworth, A. Jusko, C. Li, N. A. Wood, J. Willingham, A. Schwenker and K. Spaulding, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 2500-2504
53. S. Choi, S. Mahalingaiah, S. Delaney, N. R. Neale and S. Masood, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 1800-1805

54. M. S. Davies, S. J. Berners-Price and T.W. Hambley, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 5603-5613
55. L. R. Kelland, C. F. J. Barnard, K. J. Mellish, M. Jones, P. M. Goddard, M. Valenti, A. Bryant, B. A. Murrer and K. R. Harrap, *Cancer Res.*, 1994, **54**, 5618-5622
56. N. P. Johnson, J. L. Butour, G. Villani, F. L. Wimmer, M. Defais, V. Pierson and V. Brabec, *Prog. Clin. Biochem. Med.*, 1989, **10**, 1-24
57. M. Gordon and S. Hollander, *J. Med. Chem.*, 1993, **24**, 209-265
58. L. Pendyala, J. W. Cowens, G. B. Chheda, S. P. Dutta and P. J. Creaven, *Cancer Res.*, 1988, **48**, 3533-3536
59. A. S. Singin, A. S. Mas'ko, L. K. Moldovanova, E. A. Lobanova and N. G. Serebryakov, *Khim.-Farm. Zh.*, 1985, **19**, 1046
60. O. Novakova, O. Vrana, V. I. Kiseleva and V. Brabec, *Eur. J. Biochem.*, 1995, **228**, 616-624
61. L. T. Ellis, H. M. Er and T. W. Hambley, *Aust. J. Chem.*, 1995, **48**, 793-806
62. S. C. Chaney, S. Wyrick and G. K. Till, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 4539-4545
63. H. Kawaguchi, N. Maruyama, T. Ama and T. Yasui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1992, **65**, 175
64. M. L. Tobe and A. R. Khokhar, *J. Clin. Hematol. Oncol.*, 1977, **7**, 114-137
65. R. Kidani, M. Kizu, M. Miyazaki, A. Noji, Y. Matsuzawa, N. Takeda, M. Akiyama, H. Eriguchi, M. Pinedo and J. H. Schornagel, in *Cancer Chemotherapy 2, Platinum and Other Metal Coordination Compounds*, New York, 1996, pp. 43
66. Y. A. Lee, S. S. Lee, K. M. Kim, C. O. Lee and Y. S. Sohn, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 1409-1412
67. R. Song, K. M. Kim and Y. S. Sohn, *B. Korean Chem. Soc.*, 2000, **21**, 1000-1004
68. S. Choi, R. B. Cooley, A. S. Hakemian, Y. C. Larrabee, R. C. Bunt, S. D. Maupas, J. G. Muller and C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 591-598
69. G. K. Poon, P. Mistry, F. I. Raynaud, K. R. Harrap, B. A. Murrer and C. F. J. Barnard, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 1995, **13**, 1493-1498
70. a) R. M. Roat and J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **52**, 263-274; b) J. L. van der Veer, A. R. Peters and J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.*, 1986, **26**, 137-142
71. S. Choi, L. Vastag, J. C. Larrabee, M. L. Personick, K. B. Schaberg, B. J. Fowler, R. K. Sandwick and G. Rawji, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 1352-1360
72. M. Galanski and B. K. Keppler, *Inorg. Chim. Acta*, 2000, **783**, 300-302

73. S. Choi, R. B. Cooley, A. Voutchkova, C. H. Leung, L. Vastag and D. E. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1733-1781
74. J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 1303-1312
75. A. Eastman, *Biochem. Pharmacol.*, 1987, **36**, 4177-4178
76. Y. Kido, A. R. Khohkar and Z. H. Siddik, *Biochem. Pharmacol.*, 1994, **47**, 1635-1642
77. L. Pendyala, P. J. Craven, R. Perez, J. R. Zdanowicz and D. Raghaven, *Cancer Chemoth. Pharm.*, 1995, **36**, 271
78. E. G. Talman, Y. Kidani, L. Mohrmann and J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **283**, 251-255
79. K. Lemma, J. Berglund, N. Farrell and L. I. Elding, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 300-306
80. K. Lemma, T. Shi and L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 1728-1734
81. A. R. Battle, R. Choi, D. E. Hibbs and T. W. Hambley, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 6317-6322
82. L. Cubo, T. W. Hambley, P. J. S. Miguel, A. Carnero, C. Navarro-Ranninger and A. G. Quiroga, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 344-347
83. B. P. Esposito and R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 137-149
84. S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, M. Chikuma and J. Reedijk, *J. Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 4230-4236
85. N. J. Wheate, C. Cullinane, L. K. Webster and J. G. Collins, *Anti-Cancer Drug Des.*, 2001, **16**, 91-98
86. B. A. J. Jansen, J. Van Der Zwan, H. Den Dulk, J. Brouwer and J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 245-249
87. S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4738-4746
88. N. A. Kas'yanenko, E. E. F. Aia, A. A. Bogdanov, Y. V. Kosmotynskaya and K. I. Yakovlev, *Mol. Biol.*, 2002, **36**, 745-752
89. N. J. Wheate and J. G. Collins, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **241**, 133-145
90. Y. P. Ho, S. C. F. Au-Yeung and K. K. W. To, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 633-655
91. N. J. Wheate and J. G. Collins, *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 2005, **5**, 267-279
92. S. Komeda, G. V. Kalayda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma and

- J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1210-1219
93. G. V. Kalayda, S. Komeda, K. Ikeda, T. Sato, M. Chikuma and J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003, 4347-4355
94. G. V. Kalayda, B. A. J. Jansen, P. Wielard, H. J. Tanke and J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2005, **10**, 305-315
95. N. Farrell and Y. Qu, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 3416-3420
96. H. Ertürk, J. Maigut, R. Puchta and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2008, 2759-2766
97. T. D. McGregor, Z. Balcarova, Y. Qu, M. C. Tran, R. Zaludova, V. Brabec and N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 43-46
98. J. W. Cox, S. J. Berners-Price, M. S. Davies, Y. Qu and N. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 1316-1326
99. V. Brabec and J. Kasparova, *Drug Resist. Update.*, 2005, **8**, 131-146
100. I. Kostova, *Recent Pat. Anti-Canc.*, 2006, **1**, 1-22
101. D. Reddy and D. Yaganyi, *Int. J. Chem. Kinet.*, 2011, **43**, 161-174
102. N. Farrell, *Comment. Inorg. Chem.*, 1994, **16**, 373-389
103. Y. Zou, B. van Houten and N. Farrell, *Biochemistry*, 1994, **33**, 5404-5410
104. N. Farrell, T. G. Appleton, Y. Qu, J. D. Roberts, A. P. Soares Fontes, K. A. Skov and Y. Zou, *Biochemistry*, 1995, **34**, 15480-15486
105. a) N. Farrell, S. G. de Almeida and K. A. Skov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 5018-5019; b) N. Farrell, Y. Qu and M. P. Hacker, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 2179-2184; c) J. D. Roberts, B. van Houten, Y. Qu and N. Farrell, *Nucleic Acids Res.*, 1989, **17**, 9719-9733; d) A. Kraker, W. Elliott, B. van Houten, N. Farrell, J. Hoeschele and J. Roberts, *J. Inorg. Biochem.*, 1989, **36**, 160
106. M. E. Oehlsen, A. Hegmans, Y. Qu and N. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2005, **10**, 433-442
107. J. Kasparova, O. Novakova, O. Vrana, N. Farrell and V. Brabec, *Biochemistry*, 1999, **38**, 10997-11005
108. K. J. Mellish, Y. Qu, J. N. Scarsdale and N. Farrell, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 1265-1271
109. D. P. Bancroft, C. A. Lepre and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 6860-6861
110. D. Fan, X. Yang, X. Wang, S. Zhang, J. Mao, J. Ding, L. Lin and Z. Guo, *J. Biol. Inorg.*

- Chem.*, 2007, **12**, 655-665
111. Q. Liu, Y. Qu, R. van Antwerpen and N. Farrell, *Biochemistry*, 2006, **45**, 4248-4256
112. N. Summa, J. Maigut, R. Puchta and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 2094-2104
113. J. D. Roberts, J. Peroutka and N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 51-57
114. a) M. B. G. Kloster, J. C. Hannis, D. C. Mudiman and N. Farrell, *Biochemistry*, 1999, **38**, 14731-14737; b) V. Brabec, J. Kasparkova, O. Vrana, O. Novakova, J. W. Cox and N. Farrell, *Biochemistry*, 1999, **38**, 6781-6790; c) J. Kasparkova, J. Zehnulova, N. Farrell and V. Brabec, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 48076-48086; d) Y. Qu, N. J. Scarsdale, M. C. Tran and N. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 19-28; e) Y. Qu, N. J. Scarsdale, M. C. Tran and N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1585-1590; f) A. Hegmans, S. J. Berners-Price, M. S. Davies, D. S. Thomas, A. S. Humphreys and N. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 2166-2180; g) Y. Qu, M. C. Tran and N. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 969-977
115. a) D. J. Jodrell, T. R. J. Evans, W. Steward, D. Cameron, J. Prendiville, C. Aschele, C. Noberasco, M. Lind, J. Carmichael, N. Dobbs, G. Camboni, B. Gatti and F. De Braud, *Eur. J. Cancer*, 2004, **40**, 1872-1877; b) T. A. Hensing, N. H. Hanna, H. H. Gillenwater, M. G. Camboni, C. Allievi and M. A. Socinski, *Anti-Cancer Drug.*, 2006, **17**, 697-704; c) G. Scagliotti, S. Novello, L. Crino, F. De Marinia, M. Tonato, C. Noberasco, G. Selvaggi, F. Massoni, B. Gatti and G. Camboni, *Lung Cancer*, 2003, **41**, 223-225; d) A. H. Calvert, H. Thomas, N. Colombo, M. Gore, H. Earl, L. Sena, G. Camboni, P. Liati and C. Sessa, *Eur. J. Cancer*, 2001, **37**, 260-265
116. A. Hofmann and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2003, 2979-2985
117. H. Ertürk, A. Hofmann, R. Puchta and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2007, 2295-2301
118. A. Mambanda, D. Jaganyi, S. Hochreuther and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 3595-3608
119. M. E. Oehlsen, A. Hegmans, Y. Qu and N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 3004-3006
120. M. E. Oehlsen, Y. Qu and N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 5498-5506
121. J. W. Williams, Y. Qu, G. H. Bulluss, E. Alvorado and N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 5820-5822
122. M. Willermann, C. Mulcahy, R. K. O. Sigel, M. M. Cerda, E. Freisinger, P. J. S. Miguel, M. Roitzsch and B. Lippert, *Inorg. Chem.*, 2006, 2093-2099

123. B. A. Howell, R. Rashidianfar, J. R. Glass, B. J. Hutchinson and D. A. Johnson, *Inorg. Chim. Acta*, 1988, **142**, 181-183
124. N. Summa, W. Schiessl, R. Puchta, N. H. Eikema and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2948-2959
125. T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph and C. S. M. Thompson, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 3521-3525
126. K. Mikkelsen and S.O. Nielsen, *J. Phys. Chem.*, 1960, **64**, 632-637
127. A. R. Khokhar, Q. Xu, S. Al-Baker and J. L. Bear, *Inorg. Chim. Acta*, 1992, **194**, 243-246
128. U. Fekl and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1998, 389-396
129. T. Soldatović, Ž. D. Bugarčić and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2009, 4526-4531
130. Ž. D. Bugarčić, F. W. Heinemann and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2004, 279-286
131. J. Arpalahti and B. Lippert, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 104-110
132. J. P. Caradonna and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 1988, **27**, 1454-1466
133. M. Mikola, K. D. Kilika and J. Arpalahti, *Chem. Eur. J.*, 2000, 3404-3413
134. M. Perutz, *Nature*, 1970, **228**, 726-734
135. J. A. Tainer, E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson and D. C. Richardson, *J. Mol. Biol.*, 1982, **160**, 181-217
136. B. J. Corden, *Inorg. Chim. Acta*, 1987, **137**, 125-130
137. A. Hofmann, D. Jaganyi, O. Q. Munro, G. Liehr and R. Van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 1688-1700
138. D. Jaganyi, A. Hofmann and R. van Eldik, *Angew. Chem.*, 2001, **40**, 1680-1683
139. J. A. Joule and G. F. Smith, in *Heterocyclic Chemistry*, 2nd Ed., Chapman and Hall, London, 1978
140. T. Shi, J. Berglund and L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3498-3503
141. K. Lemma, D. A. House, N. Retta and L. I. Elding, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **331**, 98-108
142. K. Lemma, A. M. Sargeson and L. I. Elding, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 1167-1172
143. T. Shi, J. Berglund and L. I. Elding, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 2073-2077
144. T. Shi and L. I. Elding, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **282**, 55-60
145. S. Choi, L. Vastag, C. H. Leung, A. M. Beard, D. E. Knowles and J. A. Larrabee, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 10108-10114

146. L. Ehrenberg, M. Harms-Ringdahl, I. Fedorcsak and F. Granath, *Acta Chem. Scand.*, 1989, **43**, 177-187
147. R. M. Smith and A. E. Martel, in *Critical Stability Constants*, Vol. 6, 2nd Suppl., Plenum Press, New York, NY, 1989
148. M. Sinisi, F. P. Intini and G. Natile, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 9694-9704
149. S. Hochreuther, R. Puchta and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 8984-8996
150. S. Hochreuther and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 3025-3038
151. T. Soldatović, S. Jovanović, Ž. D. Bugarčić and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 876-884
152. H. Ertürk, R. Puchta and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 1331-1338
153. E. Volckova, L. P. Dudones and R. N. Bose, *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 124-131
154. J. Bogojeski, Ž. D. Bugarčić, R. Puchta and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 5439-5445
155. C. D. Hubbard and R. van Eldik, *J. Coord. Chem.*, 2007, **60**, 1-51
156. Ž. D. Bugarčić, J. Bogojeski, B. Petrović, S. Hochreuther and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 12329-12345
157. T. Boulikas, A. Pantos, E. Bellis and P. Christofis, *Cancer Ther.*, 2007, **5**, 537-583

БИОГРАФИЈА



Снежана Јовановић је рођена 18.08.1982. године у Параћину. Основну школу завршила је у Обрежу, а средњу, Фармацеутски техничар у Ћуприји.

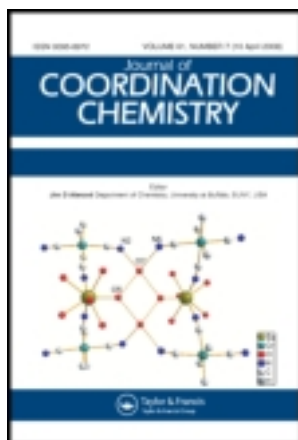
Природно-математички факултет, група хемија, Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2003/2004. године, где је дипломирала 2008. године са просечном оценом 9,41. Докторске студије, смер Неорганска хемија, уписала је школске 2008/2009 године. Од 08.04.2009. године ради на Природно-математичком факултету у Крагујевцу као истраживач-приправник, а од 11.05.2011. године у својству истраживача-сарадника. Ангажована је на пројекту бр. 172011 који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Од 01.08.2010. до 01.10.2010. потом од 01.07.2011. до 01.08.2011. као и од 01.10.2011. до 01.11.2011. године боравила је на Институту за Неорганску хемију Универзитета у Ерлангену, Немачка, у групи професора Руди ван Елдика.

This article was downloaded by: [Narodna Biblioteka Srbije]

On: 22 April 2013, At: 05:39

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Coordination Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gcoo20>

UV-Vis, HPLC, and $^1\text{H-NMR}$ studies of the substitution reactions of some Pt(IV) complexes with 5'-GMP and L-histidine

Snežana Jovanović^a, Biljana Petrović^a & Živadin D. Bugarčić^a

^a Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, PO Box 60, Kragujevac 34000, Serbia

Version of record first published: 02 Jun 2010.

To cite this article: Snežana Jovanović, Biljana Petrović & Živadin D. Bugarčić (2010): UV-Vis, HPLC, and $^1\text{H-NMR}$ studies of the substitution reactions of some Pt(IV) complexes with 5'-GMP and L-histidine, *Journal of Coordination Chemistry*, 63:14-16, 2419-2430

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/00958972.2010.490296>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

UV-Vis, HPLC, and $^1\text{H-NMR}$ studies of the substitution reactions of some Pt(IV) complexes with 5'-GMP and L-histidine

SNEŽANA JOVANOVIĆ, BILJANA PETROVIĆ
and ŽIVADIN D. BUGARČIĆ*

Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac,
R. Domanovića 12, PO Box 60, Kragujevac 34000, Serbia

(Received 31 January 2010; in final form 2 March 2010)

Substitution reactions of $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ with guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) and L-histidine were studied by different experimental methods. By UV-Vis spectrophotometry, these reactions were investigated under pseudo-first-order conditions at 310 K in 25 mmol Hepes buffer ($\text{pH} = 7.2$) and 10 mmol NaCl to prevent the hydrolysis of the complexes. $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ reacts slightly faster than the $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$. Also, L-histidine is a better nucleophile than 5'-GMP. Final $^1\text{H-NMR}$ spectra of the substitution of Pt(IV) were in a good agreement with the spectra of Pt(II) complexes with the same nucleophiles, confirming the assumption of the reduction of Pt(IV) complexes during substitution. The same reactions were studied by high-performance liquid chromatography comparing the chromatograms during the reaction. The changes in the intensity of signals and their retention time show that at the end of substitution, there is only one dominant product in the system. We conclude that substitution of these Pt(IV) complexes is followed by rapid reductive elimination and final product is substituted Pt(II) complex.

Keywords: Pt(IV); Kinetics; Histidine; 5'-GMP

1. Introduction

Platinum complexes are recognized to be biologically very important since Rosenberg's discovery of the antitumor activity of *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ [1–3]. About 3000 platinum(II) complexes have been synthesized and investigated in an attempt to improve the antitumor activity, lower toxicity, and to design a drug that is able to overcome resistance [4–6]; only about 30 platinum complexes have entered into clinical trial. Interactions of different platinum complexes toward deoxyribonucleic acid (DNA) as well as interactions with other biomolecules were the major goal of research [7–11].

Platinum(IV) complexes have not been extensively studied because potential reactivity toward DNA was not expected for such inert molecules [12]. Pt(IV) complexes are stable in acidic conditions, so they could be applied orally as a drug. Now, there is growing interest in Pt(IV) complexes because of their anticancer activity,

*Corresponding author. Email: bugarcic@kg.ac.rs

especially since some of these complexes are toxic to tumors which are resistant to cisplatin [13]. Upon entering into the cell, there are two metabolic pathways for Pt(IV) complexes: reduction by agents present in the cell (glutathione, ascorbic acid) or direct interaction with DNA in the nucleus. The first pathway leads to well-known interactions of Pt(II) complexes, while the second proposes the formation of an adduct between Pt(IV) and DNA [14, 15].

Many papers describe that the reduction of platinum(IV) complexes is essential for their antitumor activity. The kinetic inertness of platinum(IV) complexes increase the opportunity for reaching the cell target. Different modification in their structures, especially changing the axial ligands, could affect the solubility and ability to enter into the cell before being reduced [13].

Published results for the substitution of different Pt(IV) complexes show that their reactivity depends on their reduction potential [13, 16]. For diammine complexes of platinum, the structure variation of diammine ligand has less effect on the rate of reduction, but the nature of axial ligands has higher influence on reduction potential [13, 17]. When axial ligands are chloride, reduction is very fast compared with carboxylate or hydroxide.

Reactivity of Pt(IV) complexes toward nucleotide guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) is frequently studied [16–20]. Nucleotide is coordinated to Pt(IV) *via* N7 of purine base as for Pt(II) complexes. Depending on reaction conditions, there is a possibility to substitute more than one chloride with 5'-GMP, but, usually reductive elimination occurs during substitution. Reduction could be catalyzed in the presence of Pt(II), however, Pt(II) does not need to be an analog to Pt(IV) to accelerate the substitution [17]. Using different methods of analysis confirmed that two electrons needed for the reduction come from the sugar portion of 5'-GMP [16–19].

We report here the study of the substitution between [PtCl₄(en)] and [PtCl₄(dach)] with 5'-GMP and L-histidine using UV-Vis spectrophotometry, ¹H-NMR spectroscopy, and high performance liquid chromatography (HPLC). It was envisaged that this study could throw light on the mechanism of the interactions of platinum(IV) complexes with nitrogen-bonding ligands and also provide a better understanding of the mechanism of platinum metabolism. Structures of studied complexes and ligands are shown in figure 1.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Potassium-tetrachloroplatinate (K₂PtCl₄) was purchased from Strem Chemicals. The ligands, ethylenediamine (en) (Merck) and (1R, 2R)-1,2-diaminocyclohexane (dach) (Acros Organics), as well as nucleophiles, 5'-GMP sodium salt (Acros Organics) and L-histidine (His) (Merck), were used without purification. Hepes buffer (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) obtained from Aldrich and D₂O (Deutero GmbH, 99.9%) were used as received. All other chemicals were of the highest purity that were available commercially. Ultrapure water was used for spectrophotometric measurements while for the liquid chromatography water with HPLC purity was used.

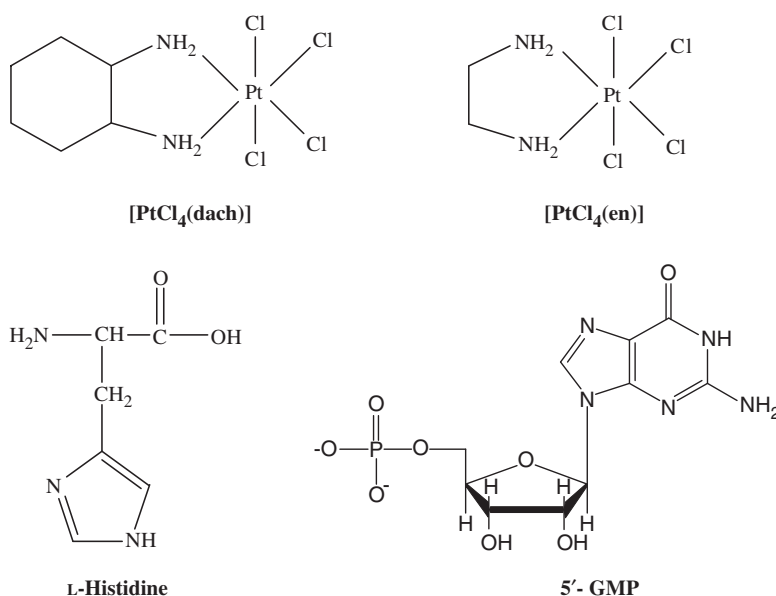


Figure 1. The structures of investigated complexes and ligands.

[PtCl₄(en)] and [PtCl₄(dach)] were prepared according to the published procedures by adding H₂O₂ to the solution of Pt(II) complexes in acidic water with the presence of NaCl to avoid the formation of hydroxo complexes [19, 21]. Chemical analysis, ¹H-NMR, and UV-Vis spectroscopic data were in good agreement with the previously obtained data. Anal. Calcd for PtC₆N₂H₁₄Cl₄: H, 3.10; C, 15.97; N, 6.21. Found: H, 2.82; C, 15.22; N, 5.94. Anal. Calcd for PtC₂N₂H₈Cl₄: H, 2.02; C, 6.04; N, 7.06. Found: H, 1.88; C, 6.82; N, 6.79.

2.2. Instrumentation

Chemical analyses were performed on a Carlo Erba Elemental Analyser 1106. UV-Vis spectra were recorded on Shimadzu UV 250 and Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrophotometers. 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 temperature was controlled throughout kinetic experiments to ±0.1°C. HPLC results were obtained on a Shimadzu LC solution chromatograph with an SDP-M20A diode array detector. 250/4 NUCLEOSIL 100–5 C₁₈ was used as a column CC. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were acquired on a Varian Gemini-2000 spectrometer at 295 K with a commercial 5 mm Bruker broadband probe. All chemical shifts are referenced to trimethylsilylpropionic acid (TSP).

2.3. Kinetics measurements

Kinetics of the substitution reactions of [PtCl₄(en)] and [PtCl₄(dach)] with 5'-GMP and L-histidine were studied spectrophotometrically by following the change in absorbance

Table 1. Rate constants for substitution reactions of Pt(IV) complexes with L-histidine and 5'-GMP at 310 K in 25 mmol L⁻¹ Hepes buffer (pH = 7.2) and 10 mmol L⁻¹ NaCl.

	L-Histidine			5'-GMP		
	λ (nm)	$10^2 k_2(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$10^5 k_1(\text{s}^{-1})$	λ (nm)	$10^2 k_2(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$10^5 k_1(\text{s}^{-1})$
[PtCl ₄ (en)]	250	3.29 ± 0.05	0.11 ± 0.03	360	2.04 ± 0.04	0.070 ± 0.003
[PtCl ₄ (dach)]	360	3.04 ± 0.09	2.3 ± 0.6	360	1.93 ± 0.08	1.2 ± 0.5

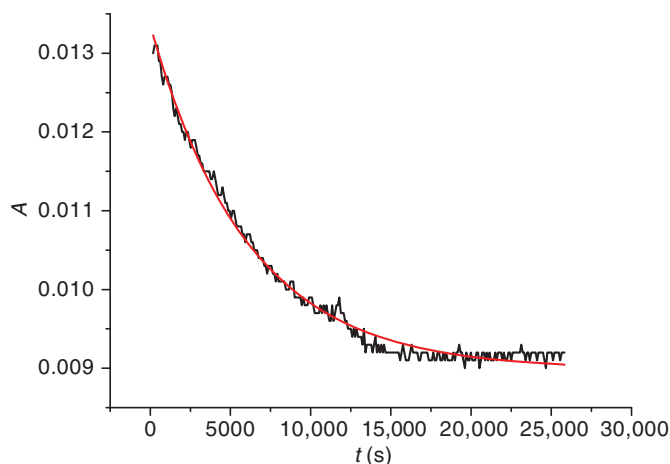
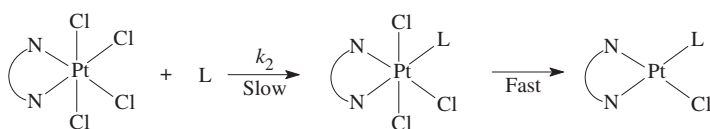


Figure 2. Kinetic traces for the reaction between [PtCl₄(en)] (0.2 mmol L⁻¹) and 5'-GMP (10 mmol L⁻¹) at 310 K, $\lambda = 360$ nm, pH = 7.2, 25 mmol L⁻¹ Hepes, 10 mmol L⁻¹ NaCl.

at suitable wavelengths as a function of time at 310 K [22]. The working wavelength for each reaction system was determined by recording the spectra of reaction mixture over the wavelength range between 220 and 450 nm. These values are presented in the table 1. The reactions were initiated by mixing equal volumes of the complex and nucleophile solutions (1.5 mL) in the quartz cuvette. Concentration of ligand solution was always large enough (at least 10-fold) to provide pseudo-first-order conditions. The kinetic traces gave an excellent fit to a single exponential (an example is shown in figure 2). All reported pseudo-first-order rate constants, k_{obsd} , represent an average of two to four independent kinetic runs (data are given in Supplementary material, tables 1S and 2S).

2.4. ¹H-NMR measurements

¹H-NMR measurements of reactions between complexes and nucleophiles were done with a freshly prepared sample of the reactants. A 5 mmol L⁻¹ solution of the complex was prepared in 300 μ L D₂O approximately 10 min prior to the start of the kinetic experiment. The solution with the same concentration of ligands (300 μ L D₂O, 5 mmol L⁻¹ ligand) was added to the solution of the complex to initiate the reaction. NMR spectra were recorded at 298 K over a period of several days until the completion



N-N = dach, en; L = 5'-GMP, L-Histidine

Scheme 1.

of the reaction. No buffer was used to prevent the increased activation of the complexes due to the coordination of phosphate [23] or interfering signals in the observed peak areas. The pH^* ($\text{pD} = \text{pH} + 0.4$, [24]) changed slightly from 8.0 to 7.5 upon the completion of reaction.

The pH meter was calibrated with Fischer-certified buffer solutions of pH 4.00, 7.00, and 11.00. Meter readings were corrected for deuterium isotope effect by adding 0.4 units to the display readout. The pD was adjusted with 0.01–0.05 mol L⁻¹ solutions of NaOD and DCl.

2.5. HPLC measurements

For HPLC determinations isocratic method was used with water as a mobile phase. Before measurement, the system was calibrated. The calibration was done with eluent which consists of acetonitrile and water, in different ratio, starting from MeCN:H₂O = 100%:0%. The calibration is finished when only the water flows through the column. Then, the other parameters depending on reaction should be specified (pressure, flow rate, and working wavelength).

Reactions between studied Pt(IV) complexes with L-histidine were studied by this method. For each reaction the solutions of complex and ligand in 25 mmol L⁻¹ Hepes per 10 mmol L⁻¹ NaCl were mixed at the beginning and kept in thermo-blocker at 310 K during the reaction. At defined time intervals, a sample of reaction mixture (20 μL) was injected to the column and chromatograms recorded.

3. Results and discussion

Kinetic studies for substitution reactions of [PtCl₄(en)] and [PtCl₄(dach)] complexes with 5'-GMP and L-histidine were followed spectrophotometrically as pseudo-first-order reactions at 310 K in 25 mmol L⁻¹ Hepes buffer (pH = 7.2) and 10 mmol L⁻¹ NaCl to prevent the hydrolysis of complexes. Following the changes in absorbance at suitable wavelengths as a function of time, we calculated the values for pseudo-first-order rate constants, k_{obsd} , using Microsoft Excel and Origin 6.1.

Generally, the substitution of these Pt(IV) complexes can be described by scheme 1, where one of the chlorides from the coordination sphere of starting complex is substituted with entering ligand, characterized by rate constant k_2 .

We obtained the graphs shown in figures 3 and 4 from the experimentally obtained values for k_{obsd} at different ligand concentrations, where linear dependence is confirmed.

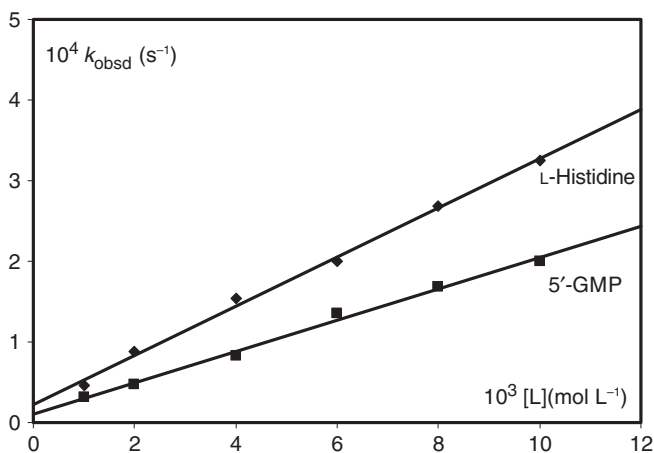


Figure 3. Pseudo-first-order rate constants, k_{obsd} , as a function of ligand concentration for substitution reactions of $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ at 310 K, in 25 mmol L^{-1} Hepes buffer (pH = 7.02) with addition of 10 mmol L^{-1} NaCl.

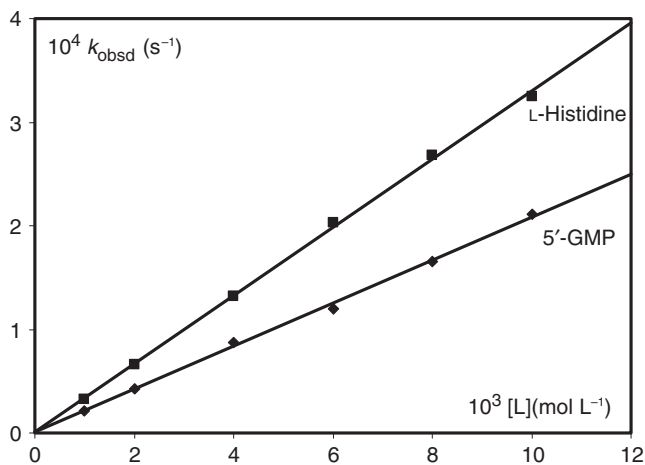
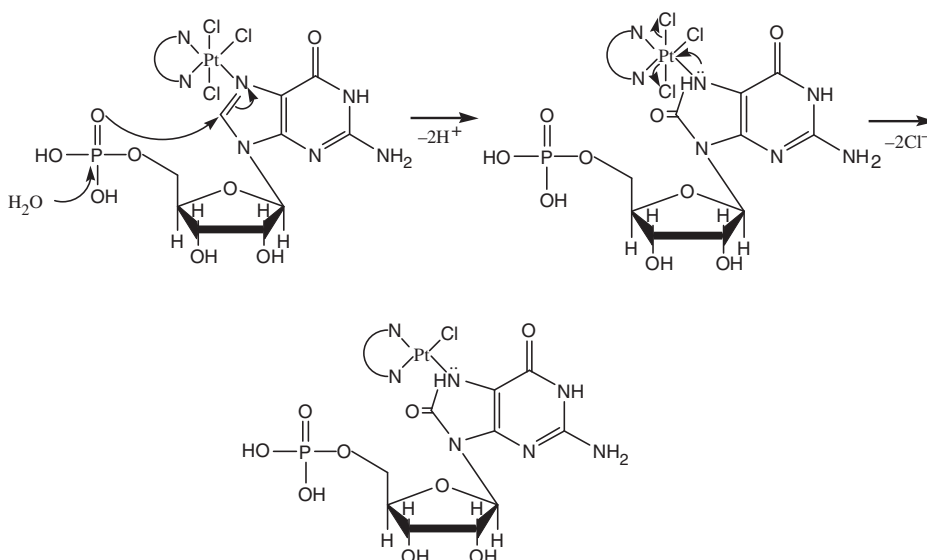


Figure 4. Pseudo-first-order rate constants, k_{obsd} , as a function of ligand concentration for substitution reactions of $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ at 310 K, in 25 mmol L^{-1} Hepes buffer (pH = 7.02) with addition of 10 mmol L^{-1} NaCl.

The value of k_2 could be calculated using equation (1), from the slope of the observed straight line. The rate constants of all studied reactions are summarized in table 1.

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

From the data, $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ reacts slightly faster than $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ and L-histidine is better a nucleophile than 5'-GMP. These results could be easily explained by comparing the structures of en and dach, as well as the structures of the entering ligands. The reactivity of these complexes toward nucleotide was already explained by Choi *et al.* [17].



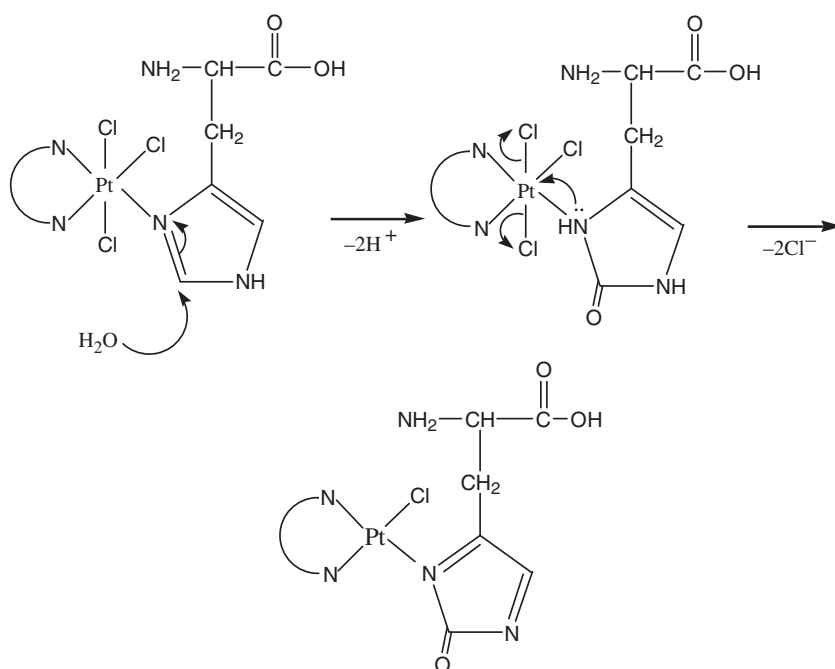
Scheme 2. Proposed mechanism for the reaction of Pt(IV) complexes with 5'-GMP.

Scheme 1 also describes that slow substitution of Pt(IV) complex is followed by very fast reduction to corresponding Pt(II) complex; the rate constants for reductive elimination are not determined. However, the proposed mechanism for the reduction of these Pt(IV) complexes in the presence of 5'-GMP is shown in scheme 2.

After coordination to platinum complex *via* N7 of 5'-GMP molecule, the attack of oxygen of phosphate on C8 position of purine base causes the transfer of electron pair of double bond to nitrogen. Further electron transfer leads to the reductive elimination and formation of square-planar Pt(II) complex substituted with 8-oxo-5'-GMP. This mechanism of substitution followed by reduction as well as the presence of final Pt(II) product were confirmed by NMR in solution [16–20].

The substitution and reduction of Pt(IV) complexes with L-histidine is shown in scheme 3. The inner-sphere transfer of electrons of double bond *via* coordinated nitrogen to platinum gives the final square-planar Pt(II) complex substituted with an imidazolone derivative of L-histidine, which is formed as a product of oxidation [25].

The same substitution reactions were studied by $^1\text{H-NMR}$ and the obtained spectra confirm the previous results. In the solution observed by mixing an equimolar concentration of $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ complex and L-histidine, after 24 h the signal between 7.2 and 7.9 ppm is dominant (figure 5). After 48 h, slight separation between the signals of coordinated and free ligand is monitored, while after 7 days these two signals are at 7.930 ppm for coordinated L-histidine and 7.878 ppm for free L-histidine. To confirm that the reduction of Pt(IV) occurs and that the final product is Pt(II) complex, we followed the same conditions as the reaction of $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ and L-histidine (time dependence is shown in figure 4S, Supplementary material). The spectrum of the reaction mixture after 7 days is the red-colored spectrum (figure 3). After 7 days, the two signals, for coordinated and free L-histidine, are at the same chemical shift for the $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ complexes (see figure 5S in “Supplementary material”),



Scheme 3. Proposed mechanism for the reaction of Pt(IV) complexes with L-His.

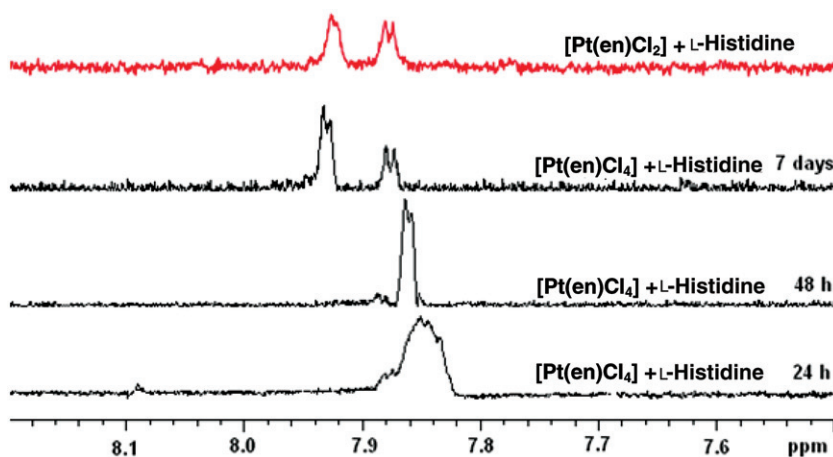


Figure 5. 1H -NMR spectra of the reaction between $[Pt(en)Cl_4]$ and L-histidine.

confirming that during the reactions the reduction of Pt(IV) to Pt(II) occurs in reactions with L-histidine.

In the reaction between $[PtCl_4(en)]$ and 5'-GMP the signal of free ligand is at 8.225 ppm (figure 6). The signal of coordinated 5'-GMP, which intensity increase with the time, is at 8.768 ppm. The red colored spectra in figure 6 is the final spectrum obtained during the reaction of $[PtCl_2(en)]$ with 5'-GMP (stepwise kinetics is shown in

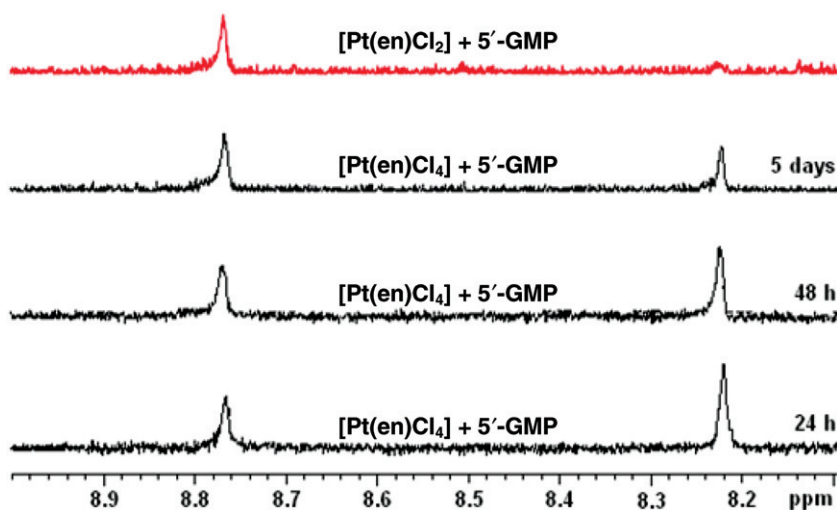


Figure 6. $^1\text{H-NMR}$ spectra of the reaction between $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_4]$ and 5'-GMP.

figure 3S, Supplementary material). The similarity between the final $^1\text{H-NMR}$ spectra provide the conclusion that the final product of the reaction between $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ and 5'-GMP is Pt(II) complex (in figure 6S in Supplementary material are compared just these two final spectra).

The reactions of $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ with 5'-GMP and L-histidine were also studied by $^1\text{H-NMR}$ (figures 1S and 2S, Supplementary material). For the reaction with L-histidine, the signal of coordinated ligand is at 8.462 ppm and its intensity increases with time. In the reaction of $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ with L-histidine, we again obtained the signal at 8.462 ppm (figure 7S, Supplementary material), indicating that in reactions of $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ with L-histidine there is a reduction of Pt(IV) to Pt(II). However, in the spectra (1S Supplementary material) a downfield shift of the signals results from changes in pH.

For reaction with 5'-GMP, the free ligand is at 8.200 ppm. When the nucleotide reacts with the complex, a signal at 8.630 ppm appears with an increase in the intensity during the reaction (2S Supplementary material). After 24 h, this signal exists as a doublet because 5'-GMP is partially coordinated to Pt(IV) and the Pt(II) complex is reduced. But after few days, when the reduction is almost finished, signal at 8.630 ppm becomes a singlet [16].

Reactions of $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ with L-histidine were monitored by HPLC as well. In the column the thermostated solution obtained by mixing appropriate complex and ligand solutions is injected. The chromatograms for the reaction between $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ and L-histidine at different time intervals are shown as figure 7. After mixing, a very small signal at 2.0 min appears while a very broad signal of free L-histidine is dominant. During the reaction, the signal at 2.0 min increases and after about 7 days the signals of product and free L-histidine have the same intensity. Also, a small peak at 3.0 min could be seen in the spectra, possibly a product of the first step. Its concentration is very small and appears in the spectra when the concentration of free L-histidine decreases. After about 10 days, only the final product and a small concentration of free ligand are observed in the solution.

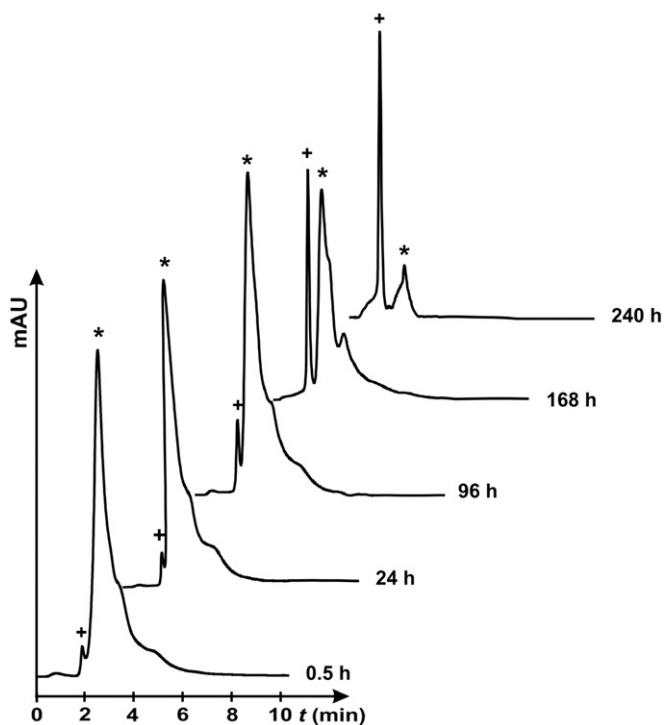


Figure 7. HPLC chromatograms for reaction between $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ and L-histidine at $\text{pH}=7.2$, $T=310\text{ K}$, $\lambda=250\text{ nm}$; [*] – L-histidine (Retention time, $\text{RT}=2.5\text{ min}$); (+) – product ($\text{RT}=2.0\text{ min}$).

Figure 8 shows the results for the reaction between $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ with L-histidine using HPLC method. There is a signal of free L-histidine at 2.5 min and a signal of the product of the reaction at 2.8 min. A signal at 6.9 min is already known as the free complex from the published results [16]. After about 10 days, only one product of the reaction and a small concentration of free ligand exist. Narrowing of the signal at the beginning of the reaction supports the fact that a substituted product of Pt(IV) complex could be present in the solution, but at the end we have only one reduced product.

4. Conclusion

The reactivity of Pt(IV) complexes depend on the structure of inert bidentate ligand as well as the structure of the entering nucleophiles, 5'-GMP and L-histidine. The substitution reactions of $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ are faster than those with $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$, while the smaller L-histidine nucleophile reacts faster than 5'-GMP. The substitution reactions were followed by fast reduction of Pt(IV) to Pt(II) complexes. Using different methods of analysis, the assumption that the final products in these reactions are Pt(II) complexes is confirmed. These results contribute to the understanding of the interactions of Pt(IV) complexes with some biologically important nucleophiles.

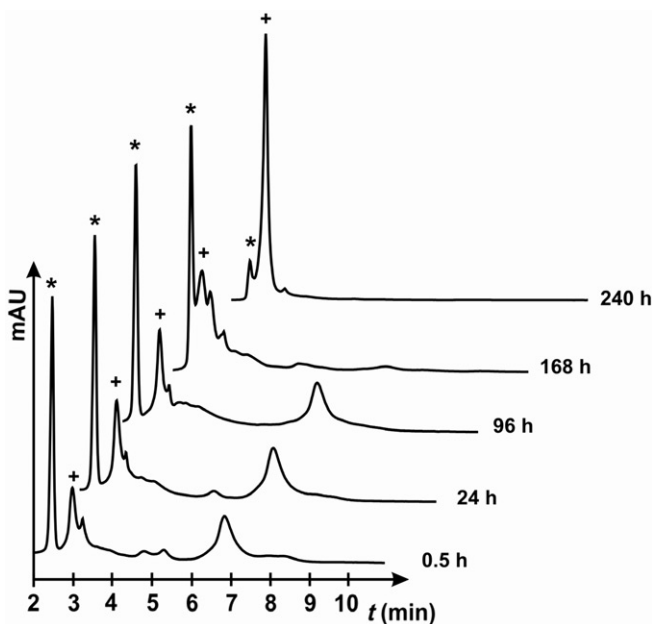


Figure 8. HPLC chromatograms for the reaction between $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ and L-histidine at $\text{pH}=7.2$, $T=310\text{ K}$, $\lambda=360\text{ nm}$; [*] – L-histidine ($\text{RT}=2.5\text{ min}$); (+) – product ($\text{RT}=2.8\text{ min}$).

Acknowledgments

The authors are grateful to the Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia, for providing financial support (Project no. 142008).

References

- [1] M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Pérez. *Chem. Rev.*, **103**, 645 (2003).
- [2] B. Lippert (Ed.). *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VCH, Zürich (1999).
- [3] D. Wang, S.J. Lippard. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **4**, 307 (2005).
- [4] M.A. Jakubec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler. *Dalton Trans.*, 183 (2008).
- [5] E.R. Jamieson, S.J. Lippard. *Chem. Rev.*, **99**, 2467 (1999).
- [6] Y. Jung, S.J. Lippard. *Chem. Rev.*, **107**, 1387 (2007).
- [7] M.A. Jakubec, M. Galanski, B.K. Keppler. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **149**, 1 (2003).
- [8] E. Wong, C.M. Giandomenico. *Chem. Rev.*, **99**, 2451 (1999).
- [9] B.P. Esposito, R. Najjar. *Coord. Chem. Rev.*, **232**, 137 (2002).
- [10] J. Reedijk. *Chem. Rev.*, **99**, 2499 (1999).
- [11] J. Reedijk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3611 (2003).
- [12] F.R. Hartley. *The Chemistry of Platinum and Palladium*, John Wiley and Sons, New York (1973).
- [13] M.D. Hall, T.W. Hambley. *Coord. Chem. Rev.*, **232**, 1 (2002).
- [14] E.G. Talman, Y. Kidani, L. Mohrmann, J. Reedijk. *Inorg. Chim. Acta*, **283**, 251 (1998).
- [15] K. Lemma, D.A. House, N. Retta, L.I. Elding. *Inorg. Chim. Acta*, **331**, 98 (2002).
- [16] S. Choi, S. Mahalingaiah, S. Delaney, N.R. Neale, S. Masood. *Inorg. Chem.*, **38**, 1800 (1999).
- [17] S. Choi, L. Vastag, J.C. Larrabee, M.L. Parsonick, K.B. Schaberg, B.J. Fowler, R.K. Sandwick, G. Rawji. *Inorg. Chem.*, **47**, 1532 (2008).

- [18] S. Choi, C. Filotto, M. Bisanzo, S. Delaney, D. Lagasee, J.L. Whitworth, A. Jusko, C. Li, N.A. Wood, J. Willingham, A. Schwenker, K. Spaulding. *Inorg. Chem.*, **37**, 2500 (1998).
- [19] S. Choi, R.B. Cooley, A. Voutchkova, C.H. Leung, L. Vastag, D.E. Knowles. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1733 (2005).
- [20] S. Choi, L. Vastag, C.H. Leung, A.M. Beard, D.E. Knowles, J.A. Larrabee. *Inorg. Chem.*, **45**, 10108 (2006).
- [21] L.T. Ellis, H.M. Er, T.W. Hambley. *Aust. J. Chem.*, **48**, 793 (1995).
- [22] M.L. Tobe, J. Burgess. *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison Wesley Longman Inc., Essex (1999).
- [23] U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler. *Inorg. Chem.*, **32**, 1333 (1993).
- [24] K. Mikkelsen, S.O. Nielsen. *J. Phys. Chem.*, **64**, 632 (1960).
- [25] J.A. Joule, G.F. Smith. *Heterocyclic Chemistry*, 2nd Edn, Chapman and Hall, London (1978).

Kinetics of the Substitution Reactions of Some Pt(II) Complexes with 5'-GMP and L-Histidine

SNEŽANA JOVANOVIĆ,¹ BILJANA PETROVIĆ,¹ DRAGAN ČANOVIĆ,² ŽIVADIN D. BUGARČIĆ¹

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

²Faculty of Medicine, University of Kragujevac, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

Received 14 June 2010; revised 20 September 2010; accepted 19 October 2010

DOI 10.1002/kin.20537

Published online 16 December 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

ABSTRACT: The reactions of platinum(II) complexes, [PtCl₂(dach)] (dach = (1R,2R)-1,2-diaminocyclohexane) and [PtCl₂(en)] (en = ethylenediamine) with biologically relevant ligands such as 5'-GMP (guanosine-5'-monophosphate) and L-His (L-histidine) were studied by UV-vis spectrophotometry, ¹H NMR spectroscopy, and high-performance liquid chromatography (HPLC). Spectrophotometrically, these reactions were investigated under pseudo-first-order conditions at 310 K in 25 mM Hepes buffer (pH 7.2) and 10 mM NaCl to prevent the hydrolysis of the complexes. The [PtCl₂(en)] complex reacts faster than [PtCl₂(dach)] in the reaction with studied nucleophiles. This confirms the fact that the reactivity of studied Pt(II) complexes depends on the structure of the inert bidentate ligand. Also, the substitution reactions with L-His are always faster than the reactions with nucleotide 5'-GMP. The reactions of [PtCl₂(dach)] and [PtCl₂(en)] complexes with L-histidine are studied by ¹H NMR spectroscopy. The obtained rate constants are in agreement with those obtained by UV-vis. The same reactions were studied by HPLC comparing the obtained chromatograms during the reaction. The changes in intensity of signals of the free and coordinated ligand show that after a few days there is only one dominant product in the system. © 2010 Wiley Periodicals, Inc. *Int J Chem Kinet* 43: 99–106, 2011

INTRODUCTION

The chemistry of platinum(II) complexes is important from a biological and medicinal point of view. Some Pt(II) complexes are extensively used as anticancer drugs in chemotherapy. For instance, *cis*-

diamminedichloroplatinum(II), cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], is one of the most widely used anticancer drugs. Its effectiveness against ovarian and testicular cancer is well established. It is now generally accepted that the interactions of cisplatin with DNA are responsible for the antitumor activity [1–8]. On the other hand, this use has been limited by toxicity to the kidney and other side effects (nausea, vomiting, neurotoxicity, etc.) [5,9,10]. Over the past few decades, about 3000 platinum(II) complexes have been synthesized and investigated in an attempt to improve the better antitumor activity, lower toxicity, and to design a drug that is able to overcome resistance [7,11,12]. So far, only about 30

Correspondence to: Biljana Petrović; e-mail: biljanap@kg.ac.rs.
Contract grant sponsor: Ministry of Science and Technology, Republic of Serbia.

Supporting Information is available in the online issue at wileyonlinelibrary.com.

© 2010 Wiley Periodicals, Inc.

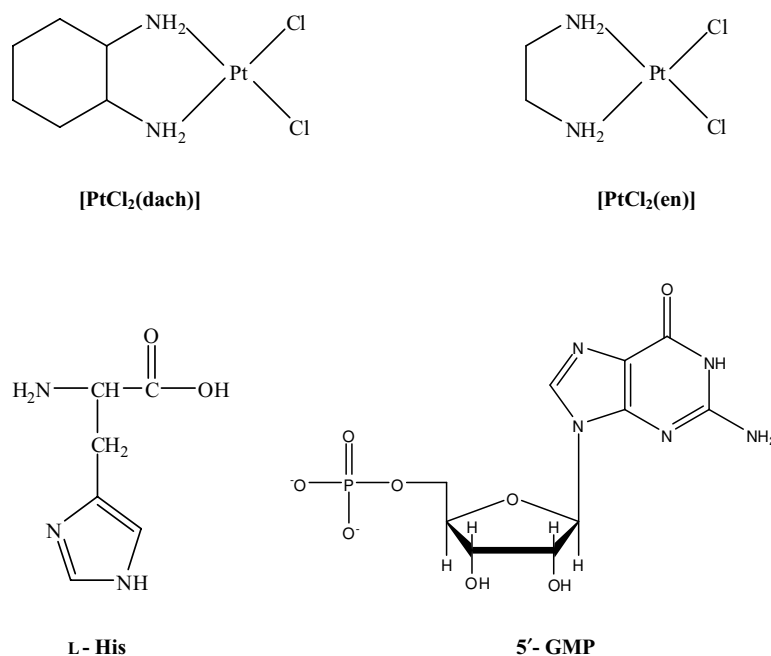


Figure 1 Structures of investigated complexes and ligands.

platinum complexes have entered clinical trial. Primarily, the interactions of different platinum complexes toward DNA as well as the interactions with other biomolecules, which can react with platinum, were the major goal of research [3,4,6,13,14]. Platinum has a strong preference to bind at the N7 atom of guanine on DNA. The binding to DNA eventually leads to an altered protein conformation and changes in biological activity, especially when enzymatic reactions are affected [5,6,10]. Despite its remarkable pharmacological activity, the drug cisplatin presents heavy disadvantages such as relatively limited spectrum of activity and high toxicity [3,4,13].

With the aim to extend our earlier work [15–18], we investigated and reported here study of the substitution reactions between [PtCl₂(dach)] (dach = (1*R*,2*R*)-1,2-diaminocyclohexane) and [PtCl₂(en)] (en = ethylenediamine) complexes with 5'-GMP (guanosine-5'-monophosphate) and L-His (L-histidine) using different experimental methods: UV-vis spectrophotometry, ¹H NMR spectroscopy, and high-performance liquid chromatography (HPLC). Since a bifunctional addition of Pt(II) complexes to DNA found to be critical for their cytotoxicity [1–6], we selected [PtCl₂(dach)] and [PtCl₂(en)] complexes with different combinations of amines as inert ligand in the coordination sphere. The [PtCl₂(en)] complex is usually used as a model complex for cisplatin, whereas the [PtCl₂(dach)] complex is structurally similar to oxaliplatin, a third-generation platinum drug [6]. The study of the interactions of these platinum(II) complexes with

nitrogen-bonding biomolecules, constituents of DNA (5'-GMP), peptides, and proteins (L-His), could provide a better understanding of the mechanism of the platinum(II) drug metabolism. Different experimental methods were used for the kinetic measurement depending on the properties of studied systems. The structures of studied complexes and ligands are presented in Fig. 1.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Potassium-tetrachloroplatinate(II) (K₂PtCl₄), a starting complex for the other synthesis, was obtained from Stream Chemicals, Inc. (Newburyport, MA, USA). The ligands ethylenediamine (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA) and (1*R*, 2*R*)-1,2-diaminocyclohexane (Acros Organics, USA, Morris Plains, NJ, USA) as well as nucleophiles guanosine-5'-monophosphate sodium salt (Acros Organics) and L-histidine (Merck) were used without further purification. HEPES buffer (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) obtained from Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and D₂O (CIL, Inc., Andover, MA, USA; 99.9%) were used as received. Ultrapure water was used for the spectrophotometric measurements, whereas for the liquid chromatography water with HPLC purity was used. Literature procedures were used for the synthesis of [Pt(en)Cl₂] and [Pt(dach)Cl₂] complexes [15,19]. The chemical

analysis, ^1H NMR, and UV–vis spectroscopic data were in good agreement with the previously obtained. Anal. Calcd for $\text{PtC}_2\text{N}_2\text{H}_8\text{Cl}_2$: H, 2.47; C, 7.37; N, 8.59. Found: H, 2.23; C, 7.01; N, 8.31. Anal. Calcd for $\text{PtC}_6\text{N}_2\text{H}_{14}\text{Cl}_2$: H, 3.71; C, 18.96; N, 7.37. Found: H, 3.34; C, 18.02; N, 7.01.

Instrumentation

Chemical analyses were performed on a Carlo Erba elemental analyser 1106. UV–vis spectra were recorded on Shimadzu UV 250 and Hewlett–Packard 8452A diode-array spectrophotometers. 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 temperature was controlled throughout all kinetic experiments to $\pm 0.1^\circ\text{C}$. HPLC results were obtained on a Shimadzu LC solution chromatograph with an SDP-M20A diode array detector. The column CC 250/4 NUCLEOSIL 100–5C₁₈ was used. The NMR spectra were acquired on a Varian Gemini-2000 spectrometer at 298 K. The measurements were performed with a commercial 5-mm Bruker broadband probe. All chemical shifts are referenced to trimethylsilylpropionic acid).

UV–Vis Measurements. The kinetics of the substitution reactions of $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ complexes with 5'-GMP and L-His was studied spectrophotometrically by following the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time at 310 K. The working wavelength for each reaction system was determined by recording the spectra of a reaction mixture over the wavelength range between 220 and 450 nm. These values are presented in the Tables 1S and 2S in the Supporting Information. The reactions were initiated by mixing the equal volumes (1.5 cm³) of the complex and ligand solutions in the quartz cuvette. The reactions were studied under pseudo-first-order conditions with ligand concentration in at least 10-fold excess. The kinetic traces gave an excellent fit to a double exponential (an example is shown in Fig. 1S in the Supporting Information). All reported pseudo-first-order rate constants, k_{obsd} , represent an average value of two to four independent kinetic runs for each experimental condition (data are given in Tables 1S and 2S in the Supporting Information).

^1H NMR Measurements. ^1H NMR measurements of the reactions between $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ complexes and L-His were done with a freshly prepared sample of the reactants. A 5-mM solution of the complex was prepared in 300 μL D₂O approximately

10 min prior to the start of the kinetic experiment. The solution with the same concentration of ligand (300 μL D₂O, 5 mM 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 until completion of the reaction. No buffer was used to prevent increased activation of the complexes due to coordination of phosphate [20] or interfering signals in the observed peak area. The pD ($\text{pD} = \text{pH} + 0.4$, [21]) was adjusted with 0.01–0.05 M solutions of NaOD and DCl.

HPLC Measurements. For the HPLC determinations, the isocratic method was used with water as a mobile phase. Before measurement, the system was calibrated. The calibration was done with eluent, which consist of acetonitrile and water, in different ratios, starting from MeCN : H₂O = 100% : 0%. The calibration is finished when only water flows through the column. Then, the other parameters depending on the reaction should be specified (pressure, flow rate, working wavelength).

Reactions between $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ complexes with L-His were studied by using this method. For each reaction, the solutions of complex and ligand in 25 mM Hepes with 10 mM NaCl were mixed at the beginning and kept in a thermo-blocker at 310 K during all reaction time. At defined time intervals, a sample of reaction mixture (20 μL) was injected to the column and recorded chromatograms.

RESULTS AND DISCUSSION

Here we report the results of kinetic measurements for the substitution reactions of $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ complexes with 5'-GMP and L-His. All reactions were followed spectrophotometrically as pseudo-first-order reactions at 310 K in 25 mM Hepes buffer (pH 7.2) and 10 mM NaCl to prevent the hydrolysis of complexes. We monitored the changes in absorbance at suitable wavelengths as a function of time. Calculation of values for pseudo-first-order rate constants, k_{obsd} , is performed using computational programs Microsoft Excel and Origin 6.1. By fitting these data as a two-exponential model in which the amplitudes have an opposite sign, we obtained the values for the pseudo-first-order rate constants for the first (k_{obsd1}) and the second (k_{obsd2}) steps of the substitution. The values are summarized in Tables 1S and 2S in the Supporting Information. Substitution reactions of square-planar complexes usually proceed according to two parallel pathways, viz. direct nucleophile attack and solvolytic pathway in which a highly labile aqua complex is formed in the rate-determining step

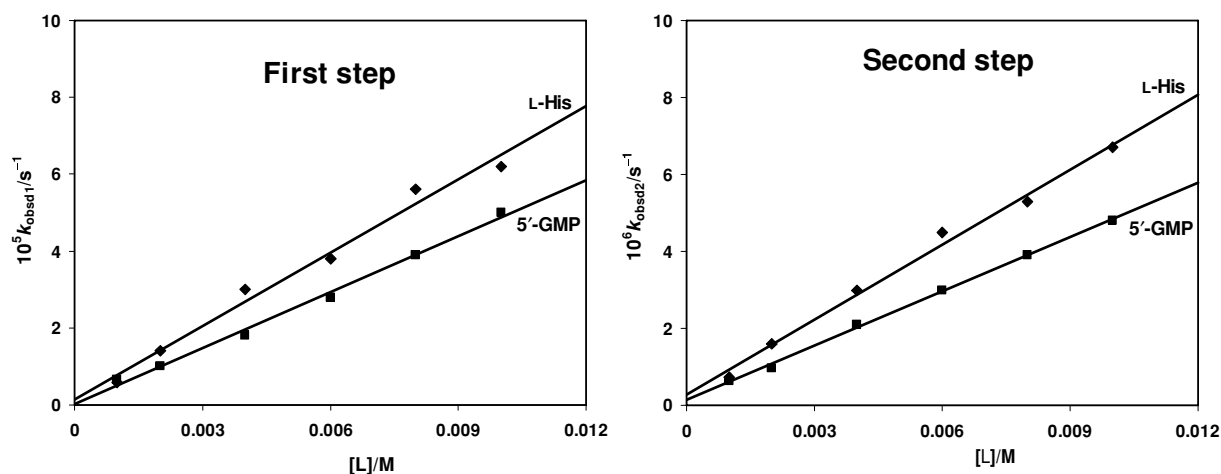
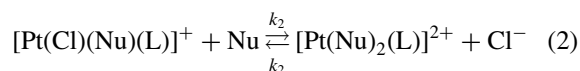
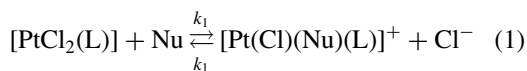


Figure 2 Pseudo-first-order rate constants for the first (k_{obsd1}) and the second (k_{obsd2}) steps of the substitution reactions of the $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ complex with 5'-GMP and L-His as a function of ligand concentration at 310 K, in 25 mM Hepes buffer (pH 7.2) with the addition of 10 mM NaCl.

[22]. However, due to the presence of 10 mM NaCl solvolytic step is eliminated and the reaction goes to equilibrium. Also, the analyses of the changes in absorbance, ΔA , as a function of entering nucleophile concentration supported an equilibrium (see Fig. 2S in the Supporting Information) because the absorbance change associated with the first reaction decreases to a much larger extent than the absorbance change associated with the slower reaction with increasing amount of entering ligand. This provides the evidence that both steps are reversible as well as the evidence that the first reaction is the faster one [19,23,24]

Thus, substitution reactions of the studied complexes with the selected nucleophiles occur in two subsequent reversible steps, according to the reactions given in Eqs. (1) and (2). The first step represents the reversible substitution of one chloride ion from the coordination sphere of the started complex. This step is characterized by the rate constant k_1 for the forward reaction and k_{-1} for the back reaction. The second step is also reversible substitution of another chloride ion, where k_2 is a signed rate constant for a direct process and with k_{-2} rate constant for the back reaction.



where L = dach or en and Nu = 5'-GMP or L-histidine.

The observed rate constants for these two reactions can be expressed as given in Eq. (3)

$$k_{\text{obsd1}} = k_{-1} + k_1[\text{Nu}] \quad k_{\text{obsd2}} = k_{-2} + k_2[\text{Nu}] \quad (3)$$

The obtained pseudo-first-order rate constants first (k_{obsd1}) and the second (k_{obsd2}) steps of the substitution were plotted versus the concentrations of the entering nucleophiles. A linear dependence of the nucleophile concentration was observed for all reactions (Figs. 2 and 3).

The rate constants k_1 and k_2 are calculated according to the Eq. (3) from the slope of the observed straight lines for the first and the second steps, whereas the values for the reverse rate constants (k_{-1} and k_{-2}) were obtained from the intercept. All rate constants are summarized in Table I.

It is well known that 5'-GMP could coordinate to metal ions through N1 and N7 ions, depending on the pH of the solution. At pH 7.2, the N1 atom is protonated ($\text{p}K_a(\text{N1}) = 9.3$, $\text{p}K_a(\text{N7}) = 2.48$) [19], so the coordination to Pt(II) occurs via N7. In the case of substitution with amino acid, the coordination to Pt(II) could occur via N1 and N3 nitrogen atoms of imidazole ring. At pH 7.2, just N3 is completely deprotonated ($\text{p}K_a(\text{N3}) = 6.5$) and the bond forms via N3 [18].

As explained before, the first reaction step occurs via nucleophilic attack of the N7 donor atom of purine base comprising 5'-GMP or N3 donor atom of the imidazole ring in the case of the reaction with L-His, resulting in the formation of a product by departing one chloride ion from the starting complexes. According to the values for k_1 given in Table I, the $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ complex reacts faster than $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ in the reactions with both N-donor biomolecules. This difference in reactivity of the studied complexes can be ascribed to the coordination geometry of the inert ligands [18,19,25]. The reactions with $[\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2]$ were expected to be slower than those with $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$, as the

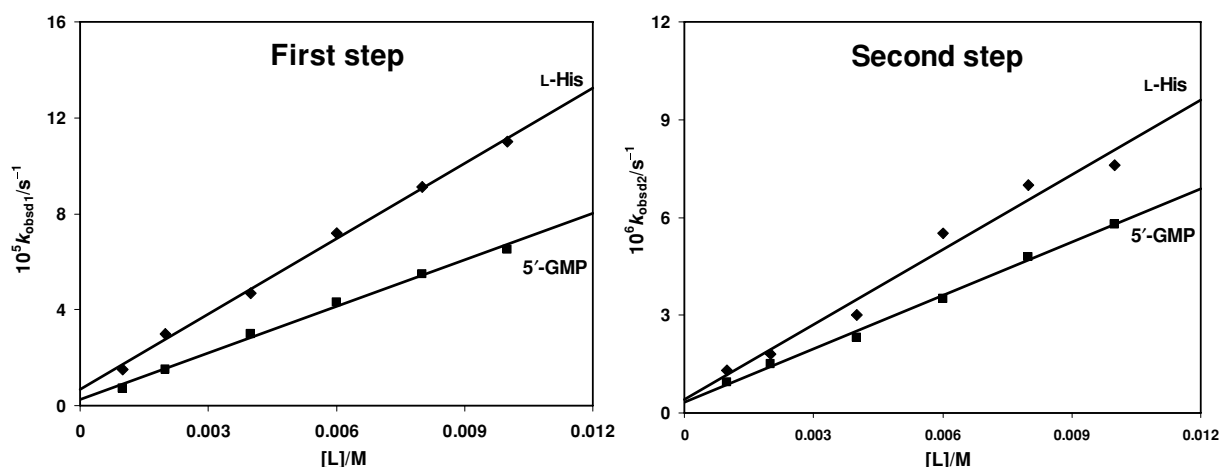


Figure 3 Pseudo-first-order rate constants for the first (k_{obsd1}) and the second (k_{obsd2}) steps of the substitution reactions of the $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ complex with 5'-GMP and L-His as a function of ligand concentration at 310 K, in 25 mM Hepes buffer (pH 7.2) with the addition of 10 mM NaCl.

Pt(II) center should be less electrophilic because of the positive inductive effect of the cyclohexane ring [19].

The reactivity of ligands is the same for both complexes and follows the order: L-His > 5'-GMP. L-His is smaller than 5'-GMP so it could easier to form the bond with a metal ion considering that at pH 7.2 the N3 atom of the imidazole ring of L-histidine and N7 atom of purine base of 5'-GMP are deprotonated [18, 19,25]. Also, the difference in the reactivity of these nucleophiles can be accounted for in terms of steric effects. 5'-GMP is sterically more crowded than L-histidine, and that can be the reason why the reactions with 5'-GMP are a bit slower.

The rate constant k_{-1} , which is independent of nucleophile concentration, is determined from the intercept of the graph of k_{obsd1} vs. $[\text{L}]$. It is very small, about three orders of magnitude smaller than k_1 , and contributes little to the observed rate.

The second step is the substitution of another chloride ion from the coordination sphere of studied Pt(II) complexes, resulting in formation of 1:2 complexes [19]. Rate constants for the forward, k_2 , and reverse reactions, k_{-2} , are also listed in Table I. However, the second step is slower compared to the first step for all substitution reactions, about 10–15 times, respectively, because the formation of a bond with another molecule of nucleotide is prevented. However, the order of reactivity of nucleophiles in the second step is the same as it was in the first step.

The substitution reactions of $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ and $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ complexes with L-His were studied by ^1H NMR spectroscopy. These reactions are followed in a 1:1 molar ratio at pD 8.42 for a period of 5 days. Second-order rate constants, k_1 , were calculated from Eq. (4).

$$k_1 t = \frac{x}{a_0(a_0 - x)} \quad (4)$$

Table I Rate Constants for the First and the Second Steps of the Substitution Reactions of $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ and $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ Complexes with L-His and 5'-GMP at 310 K in 25 mM Hepes Buffer (pH 7.2) and 10 mM NaCl

	L-His		5'-GMP	
	$10^3 k_1 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$10^6 k_{-1} (\text{s}^{-1})$	$10^3 k_1 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$10^6 k_{-1} (\text{s}^{-1})$
	First step			
$[\text{PtCl}_2(\text{en})]$	10.5 ± 0.3 0.75 ± 0.06^a	6.7 ± 1.8	6.5 ± 0.2	2.5 ± 0.4
$[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$	6.4 ± 0.4 0.68 ± 0.02^a	1.5 ± 0.1	4.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2
	Second step			
	$10^4 k_2 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$10^7 k_{-2} (\text{s}^{-1})$	$10^4 k_2 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$10^7 k_{-2} (\text{s}^{-1})$
$[\text{PtCl}_2(\text{en})]$	7.7 ± 0.6	4.2 ± 0.2	5.5 ± 0.2	3.2 ± 1.0
$[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$	6.5 ± 0.3	2.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	1.4 ± 0.6

^aRate constants determined by using ^1H NMR at 295 K.

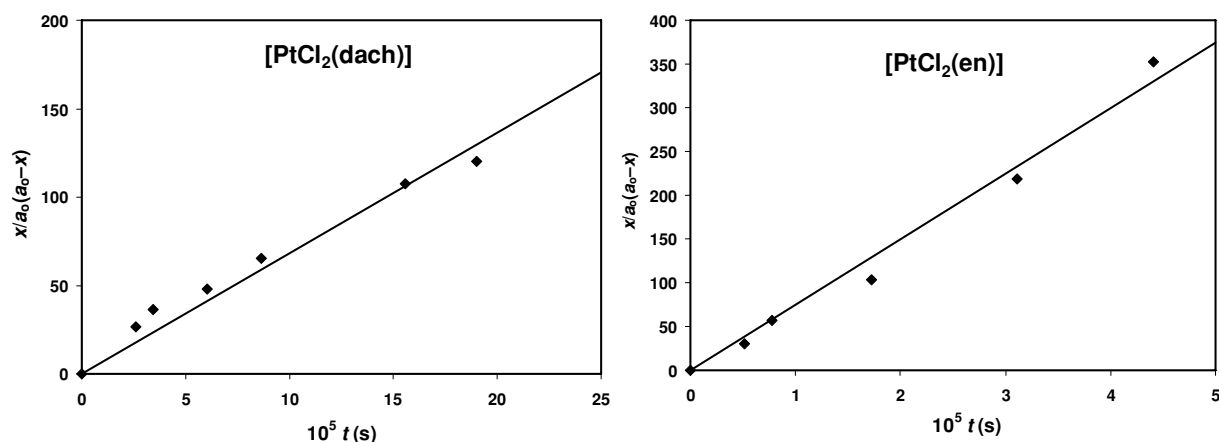


Figure 4 Guggenheim plots for the reaction of $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ and $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ complexes (5 mM) with L- histidine (5 mM) at pD 8.42 and 295 K.

where x is the concentration of the formed product of the substitution reactions, whereas a_0 is an initial concentration of complex (and ligand) [22]. Calculations were performed by relative integration (estimated error

is 5%) of suitable proton signals in NMR spectra of free and coordinated ligand during the reaction time. The values of the rate constants were determined from the Guggenheim plot. The slope of the straight line, which

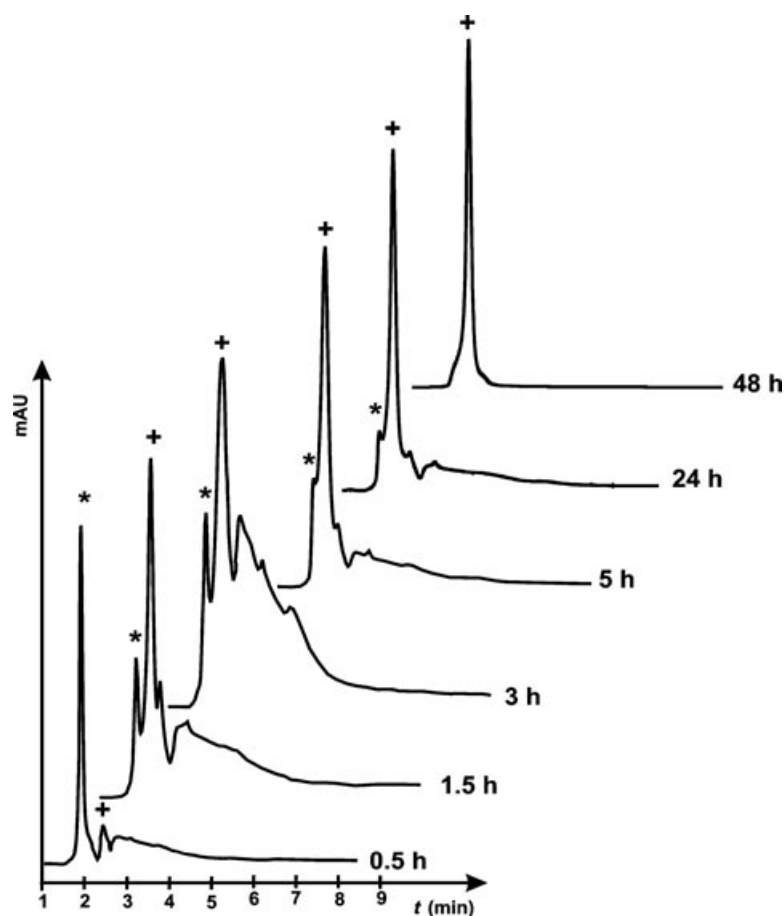


Figure 5 HPLC chromatograms for the reaction between $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ (5 mM) and L-histidine (100 mM) at pH 7.2, $T = 310 \text{ K}$, $\lambda = 360 \text{ nm}$; [*]: L-histidine (retention time = 2.1 min); (+): product (retention time = 2.5 min).

passes through the zero, represents the value of the rate constant k_1 , as shown in Fig. 4. The calculated values are presented in Table I. These values are lower, about 8–12 times, than the rate constants determined by UV–vis because the NMR measurements are performed at 295 K.

The results obtained by NMR confirm the proposed kinetics. However, obtained spectra show that there was only one product of the substitution reaction in all studied systems. Analyzing spectra obtained in the reaction between the [PtCl₂(en)] complex and L-histidine (Fig. 3S in the Supporting Information) two signals could be seen at 7.930 ppm for free and at 7.878 ppm for coordinated L-histidine. The signal of coordinated ligand appears after 24 h of the reaction, and its intensity increases with the time. After 5 days, the concentration of free and coordinated ligand is almost the same.

For the reaction between the [PtCl₂(dach)] complex and L-histidine, the signal of coordinated ligand appears at 8.462 ppm, which increases during the reaction. At the same time, a signal of the free ligand decreases (Fig 4S in the Supporting Information).

For better understanding of kinetics, the reactions of [PtCl₂(en)] and [PtCl₂(dach)] complexes with L-histidine were monitored by HPLC as well. In the column, the thermostated solution obtained by mixing of an appropriate solution of complex and ligand was injected. The chromatograms for the reaction between the [PtCl₂(dach)] complex and L-histidine at different time intervals are shown in Fig. 5. Half an hour after starting the reaction, on the chromatogram a signal appears at 2.1 min, which comes from free L-His and signal at 2.5 min, which originates from the reaction products. The area of peaks of the free ligand at the beginning is much greater than the area of product, which corresponds to their relative concentration in the solution. After 2 days, only one product matches the reaction.

The chromatograms of the reaction between the [PtCl₂(en)] complex and L-His are presented in Fig. 5S in the Supporting Information. At the beginning of the reaction, only the peak of the free ligand at 2 min dominates. After 24 h, the concentration of free ligand and the product are almost the same. After about 2 days, only the signal of the final product at 2.4 min is presented in the solution.

CONCLUSION

This study demonstrates the structure–reactivity relationship of some bifunctional Pt(II) complexes. On the basis of the obtained results, it could be concluded that

the reactivity of [PtCl₂(en)] and [PtCl₂(dach)] complexes depends on the structure of inert bidentate ligand, type of entering ligand, as well as conditions under the substitution reactions. Namely, the substitution reactions of [PtCl₂(en)] and [PtCl₂(dach)] complexes are a two-step process, leading to the formation of the final product where both chloride ions from the starting complexes are substituted with the nucleophile. Complex [PtCl₂(en)] reacts faster than [PtCl₂(dach)] complexes. This can be attributed to the steric and electronic effects of bidentate ligands. All studied substitutions are faster with L-histidine than with 5'-GMP. Since nitrogen-bonding ligands have a high affinity for the Pt(II) complexes, the rate of substitution depends on the type and the structure of entering nucleophile as well as on the pH value of the reactions. Finally, these results could contribute to the better understanding of the interactions of some bifunctional Pt(II) complexes with biologically important nucleophiles, constituents of DNA peptides and proteins.

BIBLIOGRAPHY

1. Wang, D.; Lippard, S. J. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4, 307–320.
2. Lippert, B. (Ed). In: *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Wiley-VCH: Zurich, Switzerland, 1999.
3. Wong, E.; Giandomenico, C. M. *Chem Rev* 1999, 99, 2451–2466.
4. Reedijk, J. *Chem Rev* 1999, 99, 2499–2510.
5. Reedijk, J. *Chem Commun* 1999, 801–803
6. Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Keppler, B. K. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003, 146, 1–53.
7. Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem Rev* 1999, 99, 2467–2498.
8. Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Perez, J. M. *Chem Rev* 2003, 103, 645–662.
9. Krakoff, I. H. *Cancer Treat* 1979, 63, 1523–1525.
10. Corden, B. J. *Inorg Chim Acta* 1987, 137, 125–130.
11. Jakubec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *Dalton Trans* 2008, 183–194.
12. Jung, Y.; Lippard, S. J. *Chem Rev* 2007, 107, 1387–1407.
13. Esposito, B. P.; Najjar, R. *Coord Chem Rev* 2002, 232, 137–149.
14. Reedijk, J. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100, 3611–3616.
15. Summa, N.; Soldatović, T.; Dahlenburg, L.; Bugarčić, Ž. D.; van Eldik, R. *J Biol Inorg Chem* 2007, 12, 461–475.
16. Bugarčić, Ž. D.; Soldatović, T.; Jelić, R.; Algueró, B.; Grandas, A. *Dalton Trans* 2004, 3869–3877.
17. Bugarčić, Ž. D.; Hienemann, F. W.; van Eldik, R. *Dalton Trans* 2007, 279–286.

18. Jovanović, S.; Petrović, B.; Bugarčić, Ž. D. *Coord Chem* 2010, 63, 2419–2430.
19. Summa, N.; Schiessl, W.; Puchta, R.; Eikema Hommes, N.; van Eldik, R. *Inorg Chem* 2006, 45, 2948–2959.
20. Frey, U.; Ranford, J. D.; Sadler, P. J. *Inorg Chem* 1993, 32, 1333–1340.
21. Mikkelsen, K.; Nielsen, S. O. *J Phys Chem* 1960, 64, 632–637.
22. Tobe, M. L.; Burgess, J. *Inorganic Reaction Mechanisms*; Addison-Wesley Longman: Essex, UK, 1999.
23. Fekl, U.; van Eldik, R. *Eur J Inorg Chem* 1998, 389–396.
24. Soldatovic, T.; Bugarcic, Z. D.; van Eldik, R. *Dalton Trans* 2009, 4526–4531.
25. Bogojeski, J.; Bugarcic, Z. D.; Puchta, R.; van Eldik, R. *Eur J Inorg Chem* 2010, 5439–5445.

Dalton Transactions

Accepted Manuscript



This is an *Accepted Manuscript*, which has been through the RSC Publishing peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, which is prior to technical editing, formatting and proof reading. This free service from RSC Publishing allows authors to make their results available to the community, in citable form, before publication of the edited article. This *Accepted Manuscript* will be replaced by the edited and formatted *Advance Article* as soon as this is available.

To cite this manuscript please use its permanent Digital Object Identifier (DOI®), which is identical for all formats of publication.

More information about *Accepted Manuscripts* can be found in the [Information for Authors](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics contained in the manuscript submitted by the author(s) which may alter content, and that the standard [Terms & Conditions](#) and the [ethical guidelines](#) that apply to the journal are still applicable. In no event shall the RSC be held responsible for any errors or omissions in these *Accepted Manuscript* manuscripts or any consequences arising from the use of any information contained in them.

To be submitted to Dalton Transactions

Reduction of some Pt(IV) complexes with biologically important sulfur-donor ligands

Snežana Jovanović,^a Biljana Petrović,^a Živadin D. Bugarčić^{a*} and Rudi van Eldik^{b*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Inorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nürnberg, Egerlandstrasse 1, 91058 Erlangen, Germany

* **Corresponding authors:** Prof. Dr. Živadin D. Bugarčić
Department of Chemistry, Faculty of Science,
University of Kragujevac
R. Domanovića 12, P. O. Box 60
34000 Kragujevac, Serbia
Tel: +381(0)34300262
Fax: +381(0)34335040
e-mail: bugarcic@kg.ac.rs

Prof. Dr. Rudi van Eldik
Inorganic Chemistry
Department of Chemistry and Pharmacy
University of Erlangen-Nürnberg, Egerlandstrasse 1,
91058 Erlangen, Germany
Tel: +49-9131-8528383
Fax: +49-9131-8527387
e-mail: vaneldik@chemie.uni-erlangen.de

Abstract

The reduction of the Pt(IV) complexes [PtCl₄(bipy)], [PtCl₄(dach)] and [PtCl₄(en)] by glutathione (GSH), L-cysteine (L-Cys) and L-methionine (L-Met) was investigated by stopped-flow spectrophotometry at pH 2.0 (in 0.01 M perchloric acid) and at pH 7.2 (in 25 mM Hepes buffer). Kinetic measurements were performed under *pseudo*-first order conditions with an excess of the reducing agent. The order of the reactivity of the studied complexes was [PtCl₄(bipy)] > [PtCl₄(dach)] > [PtCl₄(en)], and reactivity of investigated reducing agents followed the order GSH > L-Cys > L-Met. All the reactions between the selected Pt(IV) complexes and the sulfur donor biomolecules proceeded by a reductive elimination process that included nucleophilic attack by the reducing agent on one of the mutually *trans*-coordinated chloride ligands, which led to a two-electron transfer process. The final products of the redox reactions were the corresponding reduced Pt(II) complexes and the oxidized form of the reducing agents.

Keywords: Pt(IV) complexes; reduction; glutathione; L-cysteine; L-methionine

Introduction

It is well known that the clinical efficiency of cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], is limited by many toxic side effects, such as dose-limiting nephrotoxicity, drug resistance of the tumor cells and a narrow range of activity.¹ Further studies in this field revealed a number of different Pt(II) complexes, structurally similar to cisplatin, with reduced toxicity, but still not suitable for longer application.²⁻⁴ To date, about 3000 different platinum complexes have been synthesized and investigated in an attempt to improve the antitumor activity, to lower the toxicity and to design a drug that is able to overcome cell resistance. However, only about 30 platinum complexes have hitherto entered clinical trials.⁵⁻⁷ Significant among them are Pt(II) complexes with a *trans*-geometry, dinuclear Pt(II) complexes and Pt(IV) complexes.^{1,2,4}

Platinum(IV) complexes have shown considerable promise as antitumor agents. Their octahedral geometry introduces two additional ligand sites, and the high kinetic inertness of the complexes lowers their reactivity as well as the prospect of side reactions. Thus, the potential advantages of Pt(IV) complexes are based on the fact that they remain in the higher oxidation state in the bloodstream due to their lower reactivity. This can diminish the loss of the active drug and lower the number of side reactions that lead to toxic side effects.⁸⁻¹⁰

Compared to the Pt(II) complexes, some complexes of Pt(IV) can be orally administered since the amount of the complex that is lost or deactivated on the way to the target cells is relatively small. For example, satraplatin is the first orally applicable Pt drug in a clinical trial.¹¹ On the other hand, the lipophilicity of the Pt(IV) complexes is an important factor for their oral administration.^{8,12}

Pt(IV) complexes are inert in ligand substitution reactions relative to their Pt(II) analogues.¹³⁻¹⁵ Upon entering into the cell, there are two metabolic pathways for Pt(IV) complexes, *viz.* reduction by agents present in the cell, such as glutathione, L-cysteine, L-methionine and ascorbic acid, or direct interaction with DNA molecules in the cell nucleus. The first pathway leads to the well-known reactions of Pt(II) complexes,¹⁶ whereas the second pathway involves the formation of an adduct between Pt(IV) and DNA.^{17,18}

Elding and co-workers¹⁹⁻²³ studied in detail the reduction of various Pt(IV) complexes, such as *trans,trans,trans*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)(cha)], *cis,trans,cis*-[PtCl₂(OH)₂(NH₃)(cha)], *trans*-[PtCl₄(NH₃)(thiazole)], *trans*-[PtCl₄(NH₃)(cha)], *cis*-[PtCl₄(NH₃)(cha)], *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂], and *trans,cis,cis*-[Pt(OCOCH₃)₂Cl₂(NH₃)(cha)], where cha = cyclohexylamine, with different thiols and ascorbic acid as reducing agents. The most of these reactions followed an inner-sphere reductive-elimination mechanism that involved attack of the reducing agent on the halide coordinated *trans* to the good leaving group, leading to a two-electron transfer process. The final products of these reactions were the corresponding reduced Pt(II) complexes and the oxidized form of the reducing agents.

Although most evidence indicates that Pt(IV) compounds are reduced to Pt(II) by potential cellular reducing agents, the underlying reaction mechanism is still poorly understood. The relation between the structures of the Pt(IV) complexes and the rates and mechanisms of their reduction should be strongly connected. Published results for the reduction of different Pt(IV) complexes showed that their reactivity depended on their reduction potential.^{8,17,18,24,25} For diammine complexes of platinum, the structure

variation of the diammine ligand had less effect on the reduction potential, whereas the nature of the axial ligands exerted a stronger influence.^{21,22,26} When the axial ligands were chloride, the reduction was very fast when compared to those of carboxylate or hydroxide complexes.²⁷

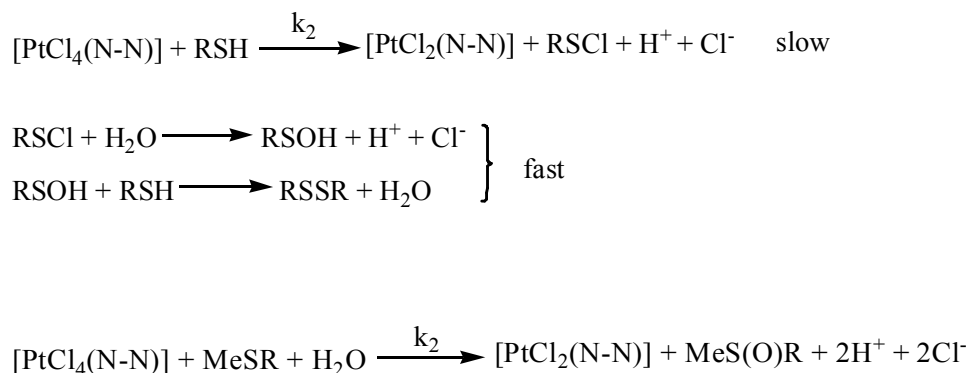
In this study, the reactions of [PtCl₄(bipy)], [PtCl₄(dach)] and [PtCl₄(en)] with glutathione (GSH), L-cysteine (L-Cys) and L-methionine (L-Met) were investigated by stopped-flow spectrophotometry. The influence of acidity on the rate of reduction of the Pt(IV) complexes could reveal more information on the relationship between their structure and chemical behavior due the interaction with the selected biomolecules. The structures of the studied complexes and reducing agents are presented schematically in Fig. 1.

Fig. 1

Results and discussion

The redox reactions of [PtCl₄(bipy)], [PtCl₄(dach)] and [PtCl₄(en)] with GSH, L-Cys and L-Met were studied at pH 2.0 (0.01 M HClO₄) in the presence of 0.2 M NaCl, by following the changes in absorbance at suitable wavelengths as a function of time. Single-exponential traces were obtained under all experimental conditions. The calculated values for the *pseudo*-first order rate constants, k_{obsd} , are given in Tables S1-S3 (ESI). The suggested pathways for the reduction of the selected Pt(IV) complexes by the thiols and thioether at pH 2.0 are presented in Scheme 1. In the first step, the reductive elimination by RSH results in the production of RSCl, which hydrolyzes rapidly in the

subsequent step to form RSOH, which in turn reacts with another RSH molecule to form the final product RSSR.²¹ The first step of this reaction sequence is the rate-determining process.



N-N = bipy, dach, en; RSH = GSH, L-Cys; MeSR = L-Met

Scheme 1

The dependence of the observed rate constants, k_{obsd} , on the concentration of the reducing agents can be expressed by Eqn. (1), where k_2 represents the second-order rate constants for the rate-determining step of all reaction systems:

$$k_{\text{obsd}} = k_2[\text{Reducing agent}] \quad (1)$$

All plots of k_{obsd} vs. reducing agent concentration were linear and passed through the origin. This indicates that possible parallel or back reactions are insignificant or absent

(see Fig. 2, Figs. S1 and S2 (ESI)). The second-order rate constants (k_2) obtained from the slope of the observed plots are summarized in Table 1.

Fig. 2

Table 1

The obtained results clearly show that the reactivity of the studied complexes followed the order: $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})] > [\text{PtCl}_4(\text{dach})] > [\text{PtCl}_4(\text{en})]$. The order of reactivity of the selected reducing agents was: $\text{GSH} > \text{L-Cys} > \text{L-Met}$.

To determine the influence of added chloride on the reduction rate at pH 2.0, the same reactions were investigated in the absence of NaCl. The calculated rate constants are also given in Table 1, whereas the linear plots of k_{obsd} vs. reducing agent concentration are shown in Figs. S3-S5 (ESI). The values of k_{obsd} are given in Tables S4-S6 (ESI). It was found that the rate constant for reduction, k_2 , was independent of the chloride concentrations, which is in agreement with previously published results.²³

Since Pt(IV) compounds are in general inert toward substitution, reduction of Pt(IV) complexes by thiols and thioether occurs by the attack of a sulfur atom on one of the *trans* coordinated ligands (inner-sphere mechanism). The reduction of Pt(IV) halide compounds by reducing agents follows a reductive elimination process. It was proposed that this mechanism involves the attack of the reductant on one of the mutually *trans* coordinated chlorides in the Pt(IV) complex, which leads to a two-electron transfer *via* a chloride-bridged complex. Furthermore, the reduction is followed by loss of two *trans* chloride ligands and the formation of the corresponding Pt(II) complex.^{8,20,21,28,29} The rate

of the reduction of Pt(IV) complexes strongly depends on the type of ligands in the axial and equatorial positions. The axial bridging ligands are usually halide ions, which correlates with their electronegativity. More electronegative ligands promote destabilization of the Pt(IV) complexes, which resulted in a faster reduction process.²⁶ In the case of complexes that do not have axial chloride ligands but some others, such as acetate ligands, the reduction was slower and followed an outer-sphere mechanism.^{22,28} On the other hand, bulky inert equatorial ligands destabilized six-coordinated Pt(IV) complexes and allowed a faster reduction to the four-coordinated Pt(II) complexes.^{26,30} This was confirmed by the results obtained in the present study since ethylenediamine is less bulky than the other two chelates, bipy and dach, and the reduction of the [PtCl₄(en)] complex was the slowest, whereas [PtCl₄(bipy)] showed the fastest reduction rate.

The rate of reduction of Pt(IV) complexes depended on their cathodic reduction potential.^{17,18,24-26} Namely, the cathodic potential depends on the electron-withdrawing power of the axial ligands as well as on the bulkiness of the inert equatorial ligands. The published value for the cathodic potential for [PtCl₄(en)] was -160 mV and was -90 mV for [PtCl₄(dach)].²⁶ This trend is in good agreement with the obtained order of reactivity in the studied case, since the higher value for the cathodic redox potential should correlate with a faster reduction process.^{8,26}

The lowest reactivity observed for the thioether (L-Met) of all studied reducing agents can be accounted for since thioethers are in general less powerful reducing agents than thiols. Furthermore, another possible reason is the steric hindrance of the methyl group, which is directly linked to the sulfur atom.⁸

The reduction of [PtCl₄(bipy)], [PtCl₄(dach)], [PtCl₄(en)] with the selected biomolecules was also investigated at pH 7.2 (25 mM Hepes buffer) in the presence of 0.2 M NaCl by stopped-flow spectrophotometry at 310 K. Single-exponential traces were obtained for all the reactions. The calculated values for the *pseudo*-first order rate constants, k_{obsd} , are reported in Tables S7-S9 (ESI). A linear dependence of k_{obsd} on the reducing agent concentration was observed for all studied reactions (Fig. 3, Figs. S6 and S7, ESI), which can be described by Eqn. (2).

Fig. 3

$$k_{\text{obsd}} = k_1 + k_2[\text{Reducing agent}] \quad (2)$$

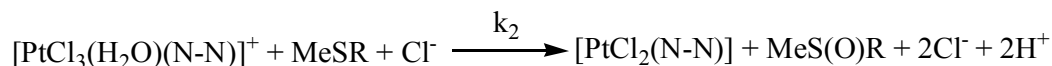
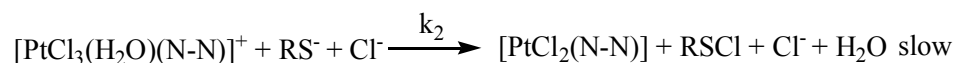
From the slopes of the observed lines, the second-order rate constants, k_2 , for the redox reactions were calculated, see Table 1. The obtained results showed the same order of reactivity for the studied complexes and reducing agents at pH 7.2 as was observed for the reactions at pH 2.0. However, there was a significant difference in that all the observed dependencies at pH 7.2 did not pass through the origin and showed significant intercepts (k_1). In order to investigate this observation further, the reactions between the studied complexes and glutathione were studied at different chloride concentrations. The values for the *pseudo*-first order rate constants obtained under such conditions are reported in Tables S10–S12 (ESI), and the plots of k_{obsd} as a function of glutathione concentration for the [PtCl₄(bipy)] complex in the presence of different concentrations of chloride are reported in Fig. S8 (ESI). The values of the intercept (k_1) and slope (k_2) for

the studied reactions as a function of chloride concentration are summarized in the Table 2. Both these rate constants increased strongly with increasing chloride concentration. The dependences of the rate constants k_1 and k_2 on the chloride concentration are shown in Figs. S9 and S10 (ESI), respectively, from which it follows that both rate constants depended linearly on the chloride concentration. This suggests that the higher chloride concentration mediates the reductive elimination process *via* both reaction paths represented by k_1 and k_2 . Thus, Eqn. (2) can be extended to Eqn. (3) for the reaction between $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ and glutathione, where k_3 and k_4 were determined from the slopes of the plots in Figs. S9 and S10 and had the values $(2.4 \pm 0.1) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $(5.7 \pm 0.5) \times 10^3 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectively.

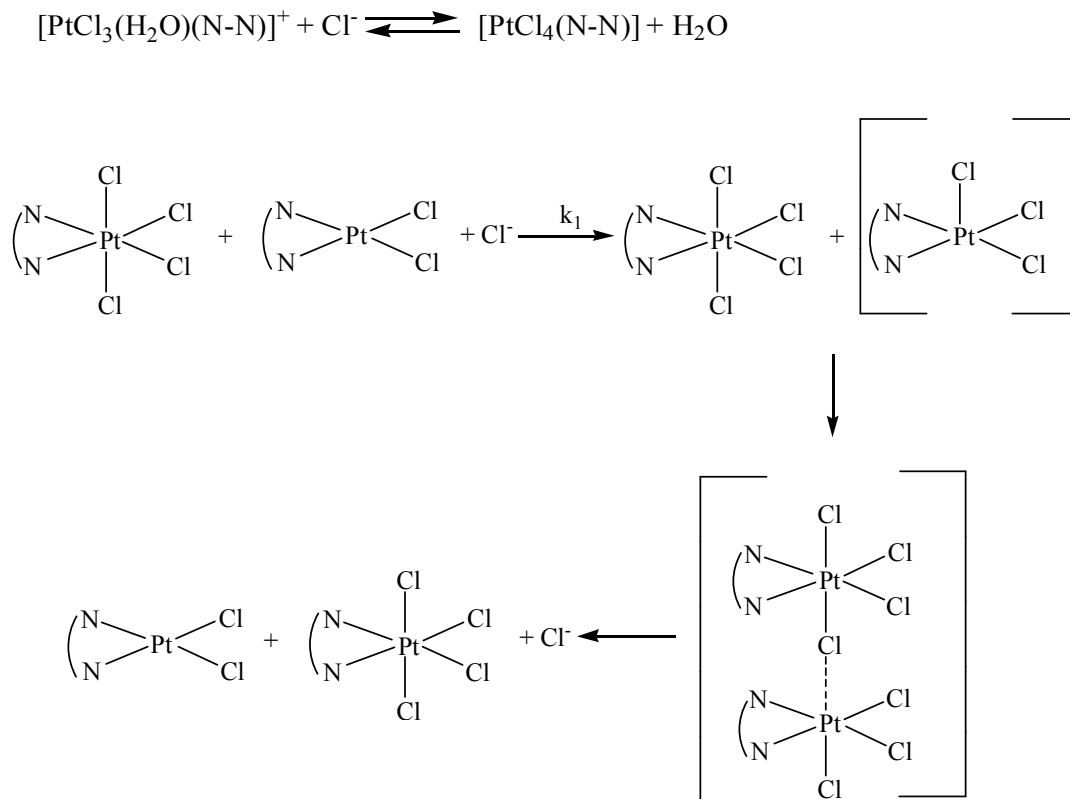
Table 2

$$k_{\text{obsd}} = k_3[\text{Cl}^-] + k_4[\text{Cl}^-][\text{glutathione}] \quad (3)$$

The proposed pathway for the reaction at pH 7.2 is shown in Scheme 2.



where:



N-N = bipy, dach, en; RS^- = deprotonated GSH, L- Cys; MeSR = L-Met

Scheme 2

In the first step, the rate-determining step, the aqua complex, $[\text{PtCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{N-N})]^+$ is present in the system that reacts with chloride ions to give the $[\text{PtCl}_4(\text{N-N})]$ complex. This complex reacts further with the reducing agents leading to the formation of the corresponding Pt(II) complexes. The higher chloride concentration in the solution, the greater is the stability of the $[\text{PtCl}_4(\text{N-N})]$ complex.

In order to confirm the hydrolysis of the complexes under the investigated experimental conditions, the change of absorbance as a function of wavelength was monitored for a series of solutions of the $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ complex (1×10^{-3} M) in the absence of chloride and in the presence of different concentrations of chloride. Three NaCl concentrations were investigated: 0.05, 0.1 and 0.2 M (Fig. S11, ESI). The spectra of each solution of the complex was recorded after 1 h, 3 h, 4 h and 1 day, and then compared. It can be seen that the absorbance significantly decreased when chloride were absent from the solution and hydrolysis of the $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ complex was rapid, while higher concentrations of chloride suppressed the hydrolysis process.

In a separate experiment, an aliquot (3 ml) of the solution of complex $[\text{PtCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{en})]^+$, was transferred into a cuvette and UV-Vis spectrum was recorded. An appropriate amount of solid NaCl was added in the cuvette to the concentration 0.2 M NaCl, and UV-Vis spectrum was recorded, after 1 day (Fig. S12, ESI). Comparing the spectra it can be seen that the absorbance increases with addition of chloride in a solution of complex $[\text{PtCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{en})]^+$, and this complex is converted to the $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$.

The appearance of the intercept could be explained by a dinuclear transition state between Pt(II) and Pt(IV) complexes through chloride as a bridging ligand. The above-mentioned transition state, as a result of a two-electron transfer between the divalent and the tetravalent metal ions, the formerly Pt(IV) species loses the two axial chloride ligands, leading to the reduced Pt(II) species. However, the Pt(II) species will be oxidized to Pt(IV) species that have two chloride ligands in the axial positions^{30,31} (Scheme 2). As the formation of a bridge between complexes of Pt(II) and Pt(IV) occurs through a chloride ligand, higher chloride concentrations in the solution could facilitate the

formation of the bridge. The reduction to the Pt(II) complexes is faster at pH 7.2 than at pH 2.0, which leads to the formation of larger amounts of complex Pt(II). In addition, due to the faster reduction, the chlorides were released faster at pH 7.2 than at pH 2.0, which led to higher chloride concentrations in the solution.

The obtained results also showed that the rate of reduction strongly depended on the acidity of the solution. At pH 7.2, the reductions were about 5-30 times faster than at pH 2.0. This observation is connected with the structures of the ligands and their deprotonation constants. The acid dissociation constants for GSH are $pK_{a1} = 2.05$, $pK_{a2} = 3.40$, $pK_{a3} = 8.79$ and $pK_{a4} = 9.49$, for L-Cys, they are $pK_{a1} = 1.9$, $pK_{a2} = 8.1$ and $pK_{a3} = 10.9$, and for L-Met, they are $pK_{a1} = 2.65$ and $pK_{a2} = 9.08$.³²

The employed amino acids and peptide represent different protolytic forms depending on the pH (Figs. S13-S15, ESI). At pH 2.0, the formation of a bridged activated complex is very difficult, but at pH 7.2, deprotonation of the thiol group increased the reaction rate by a factor of between 5 and 30. Elding *et al.* defined the reduction rates of Pt(IV) complexes that include all protolytic constants of the thiols.²¹ Their results for GSH and L-Cys are in very good agreement with the present data in Table 1, *viz.*, the reactivity of the thiolates (RS^-) was directly related to the proton basicity, whereas the steric factor had little influence on the reaction rate. The oxidation of the thioether, L-Met, is also favored at higher pH. Transformation of thioether to sulfoxide occurs through attack of a hydroxyl group on the sulfur atom and further deprotonation of the obtained product. At pH 2.0, the occurrence of this process is more difficult, which could be the explanation for the higher reactivity of L-Met at neutral pH.

To confirm that the reduction of the Pt(IV) complexes leads to the formation of Pt(II) analogues through the reductive elimination pathway, the reaction between [PtCl₄(en)] and GSH was studied by ¹H NMR in D₂O at 295 K and at pD 6.4 (pD = pH + 0.4). The spectra of (a) free glutathione, (b) oxidized glutathione and (c) the product of the reduction of [PtCl₄(en)] by GSH are summarized in Fig. 4. The formation of GSSG during the reaction could be verified by the disappearance of the multiple peaks at 3 ppm, assigned to the Cys-βCH₂ group of GSH, and the appearance of doublet of doublets at 3.06 ppm and 3.36 ppm, typical for free GSSG. In this region, the signal of the corresponding Pt(II) complex appeared at 3.35 ppm, while the signal at 3.37 ppm was ascribed to the remaining Pt(IV) complex in solution.

Fig. 4

Experimental

Materials

Potassium tetrachloridoplatinate(II) (K₂PtCl₄) was purchased from Strem Chemicals. The ligands ethylenediamine (en) (Merck), (*1R,2R*)-1,2-diaminocyclohexane (dach) (Acros Organics) and 2,2'-bipyridyl (Aldrich), and the nucleophiles glutathione (Acros Organics), L-cysteine and L-methionine (Aldrich) were used without further purification. Hepes buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) was obtained from Aldrich. All other chemicals, such as NaCl (Lachema), AgClO₄ (Aldrich), HClO₄ (Reanal), EDTA (Acros Organics) and D₂O (Aldrich) were of the highest commercially available purity. The complexes [PtCl₄(bipy)], [PtCl₄(dach)] and [PtCl₄(en)] were

prepared according to published procedures.^{33,34} All solutions were prepared in doubly distilled water.

The aqua complex, $[\text{PtCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{en})]^+$, was prepared by the addition of 1 equivalent AgClO_4 into the solution of the complex $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ in perchloric acid (1×10^{-3} M) at pH 3.0, under stirring in the dark at room temperature, for 2 h. The precipitated AgCl was filtered off using Milipore filters. The obtained aqua complex was used as proof for the hydrolysis of the $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ complex.

Instrumentation

The UV-Vis spectra were recorded on Shimadzu UV 250 and Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrophotometers with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. The kinetic measurements were performed on an Applied Photophysics SX.18MV stopped-flow instrument coupled to an on-line data acquisition system. Nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra were acquired on a Varian Gemini-200 spectrometer at 295 K. All chemical shifts are referenced to trimethylsilylpropionic acid (TSP).

Kinetic measurements

The redox reactions were investigated by stopped-flow spectrophotometry at pH 2.0 (0.01 M HClO_4 solution) and at pH 7.2 (25 mM HEPES buffer) in the presence of 0.2 M NaCl . To determine the effect of chloride on the reduction rate, the same reactions were investigated at pH 2.0 in the absence of chloride. All kinetic measurements were performed by following the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time at 310 K. The selected wavelength for each system was determined by recording the

spectra of the reaction mixture over the wavelength range between 220 and 500 nm and is given in Tables S1–S9 (ESI). Reactions were initiated by mixing equal volumes of both solutions of the complex and reducing agent directly in the stopped-flow instrument and were followed for at least five half-lives of the reaction. Kinetic measurements were performed under *pseudo*-first order conditions (10–30 fold excess of the reducing agent). Higher concentrations of the reducing agent could not be used due to differences observed in the recorded spectra that pointed to a more complex reaction sequence (see Fig. S16, ESI). The *pseudo*-first order rate constants, k_{obsd} , were calculated as the average value from five to seven independent kinetic runs. Experimental data are reported in Tables S1–S9 (ESI).

It is known that molecules that contain thiol groups are sensitive to autoxidation catalyzed by metal ions such as Cu(II) and Fe(III).³⁵ The rate of autoxidation increases with increasing pH.²³ In order to check whether autoxidation had an effect on the present kinetic measurements, control experiments were conducted for the reactions of the [PtCl₄(bipy)] complex with glutathione at pH 7.2. In these experiments, both the complex and glutathione solutions contained 0.5 mM EDTA in order to eliminate the possible catalytic effect of any traces of metal ions. Before the reactions were initiated in the stopped-flow instrument, solutions of the [PtCl₄(bipy)] complex and glutathione were flushed with nitrogen for at least 30 min in order to remove dissolved oxygen. No significant discrepancy between the values of k_{obsd} obtained in these experiments and those performed in air-saturated solutions was observed (see data in Table S7, ESI). This finding is in agreement with the results reported by Elding *et al.*²³ For the calculation of the kinetic data, Microsoft Excel and Origin 6.1 programs were used.

Conclusion

The present results show that the reactivity of the studied complexes follows the order $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})] > [\text{PtCl}_4(\text{dach})] > [\text{PtCl}_4(\text{en})]$. The reactivity depends of the structure of the spectator ligands, because bulky inert equatorial ligands destabilize six-coordinated Pt(IV) complexes and enable faster reduction to the corresponding Pt(II) complex. The obtained order of reactivity of the investigated ligands is $\text{GSH} > \text{L-Cys} > \text{L-Met}$. L-Met is a less powerful reductant than the thiols. The steric hindrance of the methyl group could be a further reason for the lower reactivity.

The rate of reduction strongly depends on the acidity of the solution. At higher pH values, the process is much faster due to the easier formation of the bridged intermediate with the deprotonated form of the thiols. In addition, the thioether converts to the sulfoxide faster in neutral than in acidic medium. At pH 7.2, hydrolysis of the starting complex occurs and the formed aqua complex, $[\text{PtCl}_3(\text{H}_2\text{O})(\text{N-N})]^+$, reacts with chloride ions forming $[\text{PtCl}_4(\text{N-N})]$. Furthermore, an increase in chloride concentration leads to increasing of intercepts, due to the facilitated formation of a bridge between Pt(IV) and Pt(II) complexes. All these results confirm the fact that the reduction of complexes Pt(IV) involves a two-electron transfer process and the loss of axial ligands to form the corresponding square-planar Pt(II) complex.

Acknowledgements

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

References

- 1 (a) E. Wong and C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2451; (b) E. R. Jamieson and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2467; (c) J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499.
- 2 M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger and B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2008, 183.
- 3 Y. Jung and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 1387.
- 4 M. A. Jakupec, M. Galanski and B. K. Keppler, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2003, **146**, 1.
- 5 M. Galanski, M. A. Jakupec and B. K. Keppler, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 2075.
- 6 D. Lebwohl and R. Canetta, *Eur. J. Cancer*, 1998, **34**, 1522.
- 7 T. G. Appleton, *Coord. Chem. Rev.*, 1997, **166**, 313.
- 8 M. D. Hall and T. W. Hambley, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 49.
- 9 M. D. Hall, H. R. Mellor, R. Callaghan and T. W. Hambley, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 3403.
- 10 J. Kasarkova, O. Novakova, O. Vrana, F. Intini, G. Natile and V. Brabec, *Mol. Pharmacol.*, 2006, **70**, 1708.

- 11 H. Kostrhunova, J. Kasparkova, D. Gibson and V. Brabec, *Mol. Pharmaceutics*, 2010, **7**, 2093.
- 12 R. Song, K. M. Kim and Y. S. Sohm, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2000, **21**, 1000.
- 13 C. E. Housecroft and A. G. Sharpe, in *Inorganic Chemistry*, Prentice Hall, New York, 2001, ch. 22.
- 14 M. D. Hall, H. L. Daly, J. Z. Zhang, M. Zhang, R. A. Alderden, D. Pursche, G. J. Foran and T. W. Hambley, *Metallomics*, 2012, **6**, 568.
- 15 J. J. Wilson and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 3103.
- 16 M. S. Davies, S. J. Berners-Price and T. W. Hambley, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 5603.
- 17 S. Choi, S. Mahalingaiah, S. Delaney, N. R. Neale and S. Masood, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 1800.
- 18 S. Choi, L. Vastag, C. H. Leung, A. M. Beard, D. E. Knowles and J. A. Larrabee, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 10108.
- 19 K. Lemma, D. A. House, N. Retta and L. I. Elding, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **331**, 98.
- 20 K. Lemma, J. Berglund, N. Farrell and L. I. Elding, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 300.
- 21 K. Lemma, T. Shi and L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 1728.
- 22 K. Lemma, A. M. Sargeson and L. I. Elding, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 1167.
- 23 T. Shi, J. Berglund and L. I. Elding, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3498.
- 24 S. Choi, L. Vastag, Y. C. Larrabee, M. L. Personick, K. B. Schaberg, B. J. Fowler, R. K. Sandwick and G. Rawji, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 1352.

- 25 S. Choi, R. B. Cooley, A. Voutchkova, C. H. Leung, L. Vastag and D. E. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1733.
- 26 S. Choi, C. Filotto, M. Bisanzo, S. Delaney, D. Lagasee, J. L. Whitworth, A. Jusko, C. Li, N. A. Wood, J. Willingham, A. Schwenker and K. Spaulding, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 2500.
- 27 M. D. Hall, S. Amjadi, M. Zhang, P. J. Beale and T. W. Hambley, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, **98**, 1614.
- 28 M. Sinisi, F. P. Intini and G. Natile, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 9694.
- 29 E. Reisner, V. B. Arion, B. K. Keppler and A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta*, 2008, **361**, 1569.
- 30 T. Shi and L. I. Elding, *Inorg. Chim. Acta*, 1998, **282**, 55.
- 31 F. Basolo, M. L. Morris and R. G. Pearson, *Discuss. Faraday Soc.*, 1960, **29**, 80.
- 32 R. M. Smith and A. E. Martel, in *Critical Stability Constants*, Plenum Press, NewYork, NY, 1989, p. 20.
- 33 L. T. Ellis, H. M. Er and T. W. Hambley, *Aust. J. Chem.*, 1995, **48**, 793.
- 34 S. Jovanović, B. Petrović and Ž. D. Bugarčić, *J. Coord. Chem.*, 2010, **63**, 2419.
- 35 L. Ehrenberg, M. Harms-Ringdahl, I. Fedorcsak and F. Granath, *Acta Chem. Scand.*, 1989, **43**, 177.

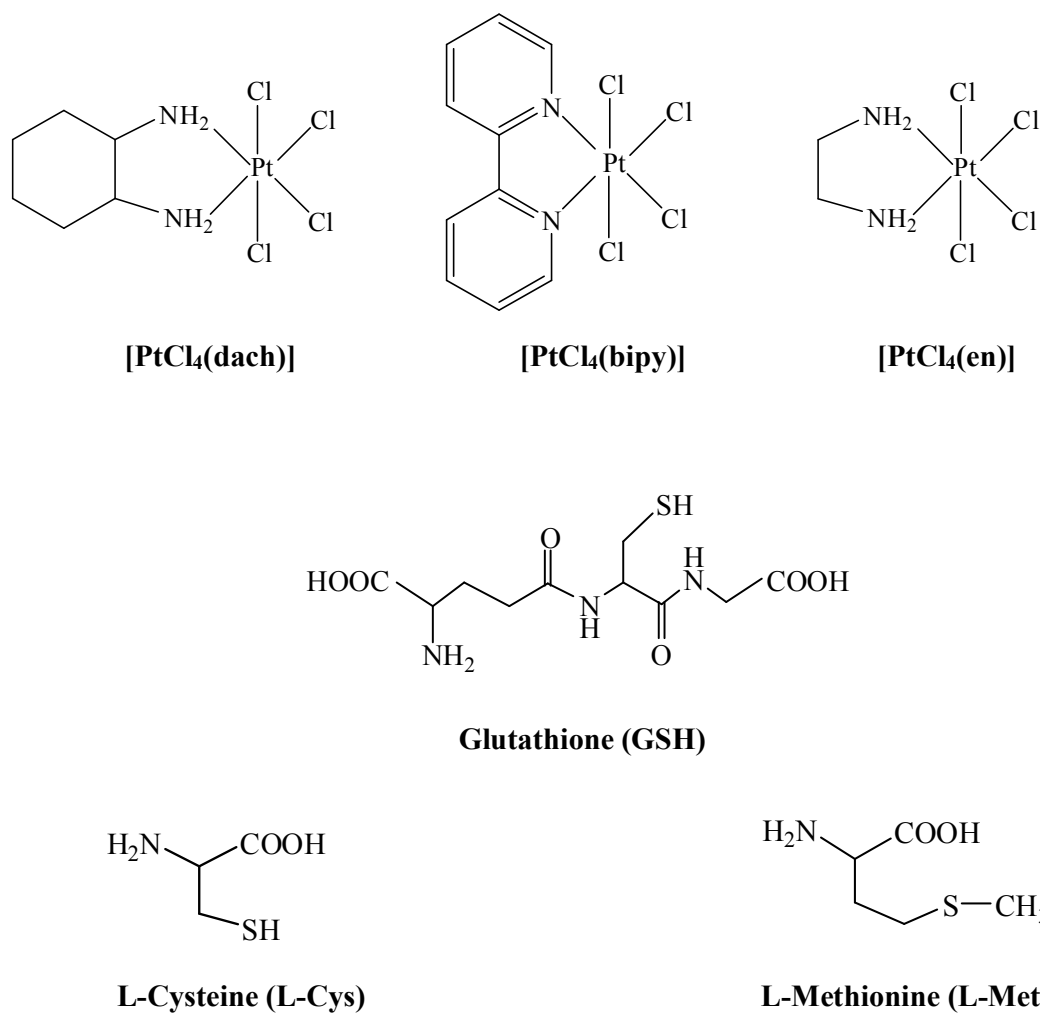


Fig. 1 Schematic structures of the investigated Pt(IV) complexes and reducing agents.

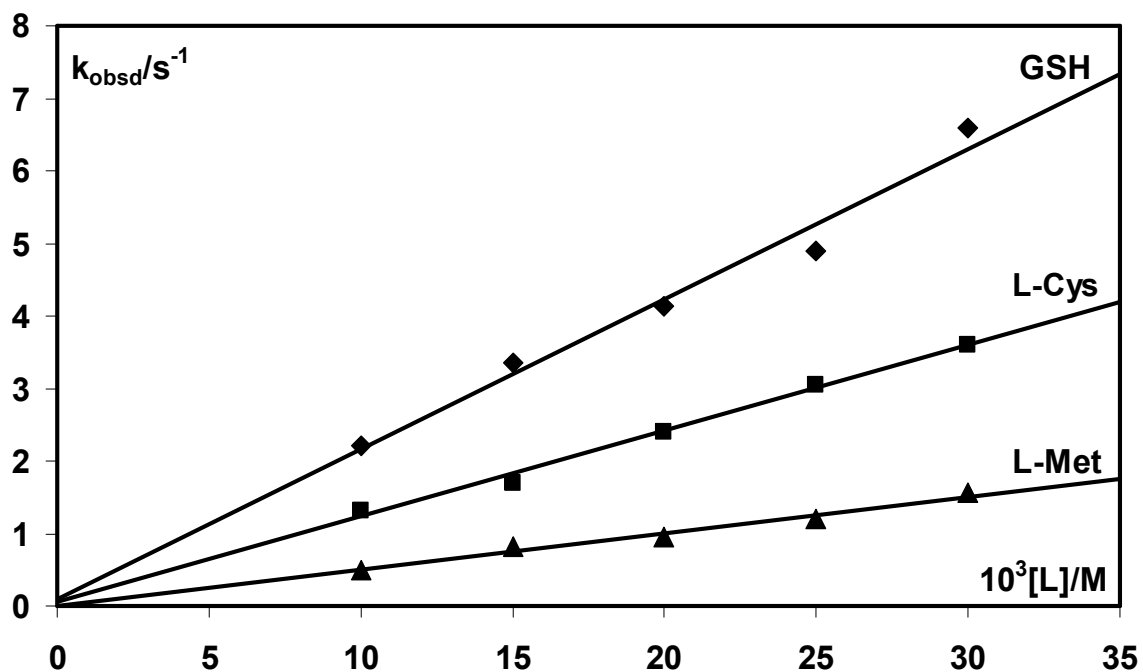


Fig. 2 *Pseudo*-first order rate constants plotted as a function of reducing agent (L) concentration for the reactions of the $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ complex at pH 2.0 (0.01 M HClO_4) in the presence of 0.2 M NaCl at 310 K.

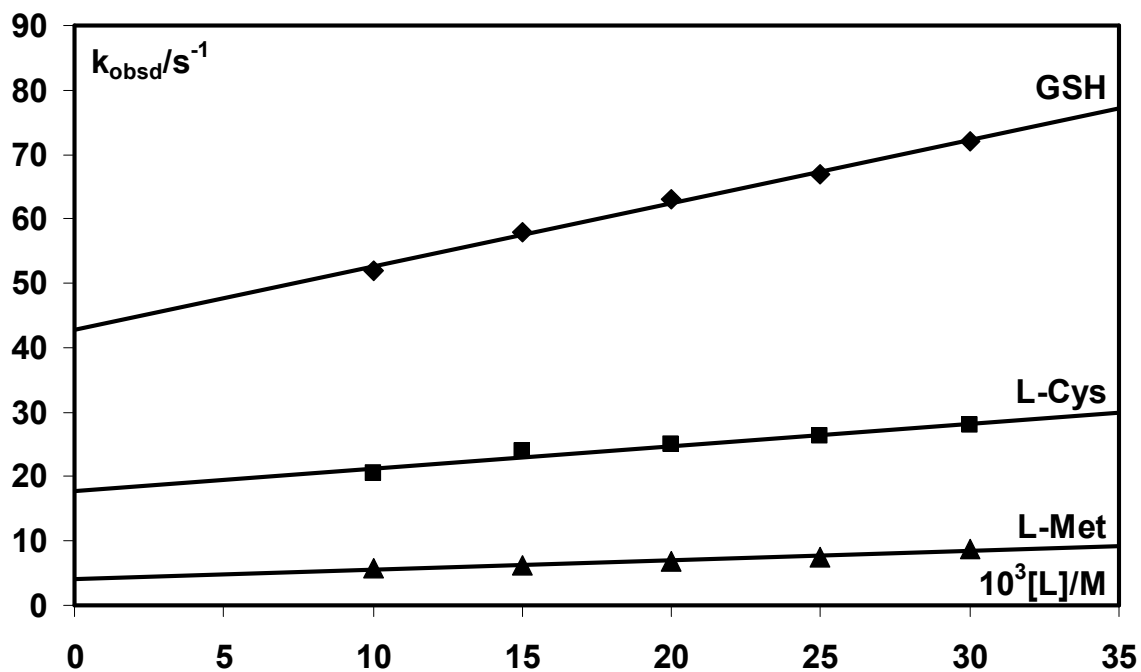


Fig. 3 *Pseudo*-first order rate constants plotted as a function of reducing agent (L) concentration for the reactions of the $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ complex at pH 7.2 (25 mM HEPES buffer) in the presence of 0.2 M NaCl at 310 K.

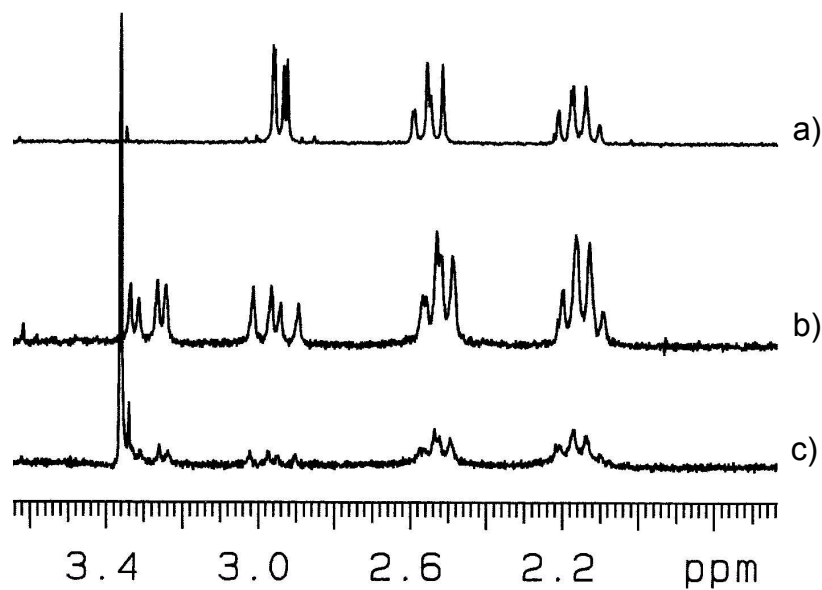


Fig. 4 ¹H NMR spectra recorded in D₂O at 295 K and pD 6.4 (pD = pH + 0.4) of a) 4 mM GSH, b) 2 mM oxidized glutathione (GSSG), c) the final spectrum of the reaction between 2 mM [PtCl₄(en)] and 4 mM GSH.

Table 1 Second-order rate constants for the reactions of the selected Pt(IV) complexes with GSH, L-Cys and L-Met at different pH at 310 K.

Complex	pH	GSH	L-Cys	L-Met
$k_2/M^{-1}s^{-1}$				
[PtCl ₄ (bipy)]	2.0 ^a	210 ± 20	118 ± 6	50 ± 4
	2.0 ^b	190 ± 20	107 ± 5	48 ± 5
	7.2 ^c	980 ± 40	350 ± 50	150 ± 20
	7.2 ^d	10 ± 1	-	-
[PtCl ₄ (dach)]	2.0 ^a	62 ± 3	57 ± 3	39 ± 3
	2.0 ^b	60 ± 3	54 ± 1	35 ± 2
	7.2 ^c	920 ± 70	340 ± 40	134 ± 5
	7.2 ^d	1.5 ± 0.5	-	-
[PtCl ₄ (en)]	2.0 ^a	31 ± 2	20 ± 1	14 ± 1
	2.0 ^b	30 ± 2	19 ± 2	13 ± 1
	7.2 ^c	870 ± 90	330 ± 40	130 ± 20
	7.2 ^d	1.1 ± 0.1	-	-

^a 0.01 M HClO₄ in the presence 0.2 M NaCl; ^b 0.01 M HClO₄ in the absence of NaCl; ^c 25 mM Hepes buffer in the presence 0.2 M NaCl; ^d 25 mM Hepes buffer in the absence of NaCl

Table 2 The values of the rate constants k_1 and k_2 for the reactions between the Pt(IV) complexes and glutathione (Scheme 2) in the presence of different concentrations of chloride at pH 7.2 and 310 K.

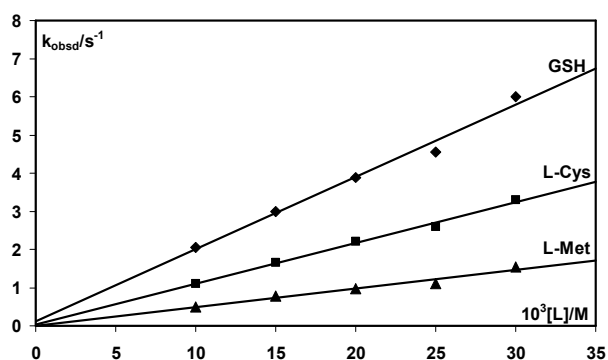
	[Cl ⁻]/M	k_1/s^{-1}	$k_2/M^{-1} s^{-1}$
[PtCl ₄ (bipy)]	In the absence of NaCl	0.51 ± 0.02	10 ± 1
	With 0.02	4.9 ± 0.2	114 ± 9
	With 0.05	10.8 ± 0.5	230 ± 40
	With 0.10	17.7 ± 0.5	450 ± 20
	With 0.15	25 ± 2	760 ± 80
	With 0.20	42.8 ± 0.5	980 ± 40
[PtCl ₄ (dach)]	In the absence of NaCl	0.038 ± 0.005	1.5 ± 0.5
	With 0.02	3.7 ± 0.2	91 ± 7
	With 0.20	35.2 ± 0.5	920 ± 70
[PtCl ₄ (en)]	In the absence of NaCl	0.0034 ± 0.0005	1.1 ± 0.1
	With 0.02	2.8 ± 0.1	87 ± 8
	With 0.20	27 ± 2	870 ± 90

Graphical Contents Entry

Reduction of some Pt(IV) complexes with biologically important sulfur-donor ligands

Snežana Jovanović,^a Biljana Petrović,^a Živadin D. Bugarčić^{a*} and Rudi van Eldik^{b*}

The reduction of the Pt(IV) complexes [PtCl₄(bipy)], [PtCl₄(dach)] and [PtCl₄(en)] by glutathione (GSH), L-cysteine (L-Cys) and L-methionine (L-Met) was investigated by stopped-flow spectrophotometry at pH 2.0 (in 0.01 M perchloric acid) and at pH 7.2 (in 25 mM Hepes buffer).



Substitution behaviour of novel dinuclear Pt(II) complexes with bio-relevant nucleophiles†

Tanja Soldatović,^a Snežana Jovanović,^b Živadin D. Bugarcic^{*b} and Rudi van Eldik^{*c}

Received 11th July 2011, Accepted 11th October 2011

DOI: 10.1039/c1dt11313e

The novel dinuclear Pt(II) complexes [$\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pyrazine})\}(\text{ClO}_4)_2$ (**Pt1**), [$\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-4,4'-(bipyridyl)})\}(\text{ClO}_4)_2\cdot\text{DMF}$ (**Pt2**), and [$\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-1,2-bis(4-pyridyl)ethane})\}(\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**), were synthesized. Acid–base titrations, and temperature and concentration dependent kinetic measurements of the reactions with biologically relevant ligands such as thiourea (Tu), glutathione (GSH) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) were studied at pH 2.5 and 7.2. The reactions were followed under *pseudo*-first-order conditions by stopped-flow and UV-vis spectrophotometry. ¹H NMR spectroscopy was used to follow the substitution of chloride in the complex [$\{trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-4,4'-(bipyridyl)})\}(\text{ClO}_4)_2\cdot\text{DMF}$ by guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) under second-order conditions. The results indicate that the bridging ligand has an influence on the reactivity of the complexes towards nucleophiles. The order of reactivity of the investigated complexes is **Pt1** > **Pt2** > **Pt3**.

Introduction

It is well known that platinum complexes such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin are extensively used for the treatment of different types of cancer.¹ Negative side effects during treatment (such as vomiting, resistance, nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity, *etc.*) encouraged researchers to design new classes of platinum complexes with improved anti-tumour properties. The third generation anti-tumor complexes such as orally active Pt(IV) complexes, sterically hindered Pt(II) complexes, polynuclear Pt(II) complexes and sulphur-containing platinum complexes, are now being tested in pre-clinical trials.^{2,3} These polynuclear Pt(II) complexes consist of either two or three platinum centres that are linked through a flexible bridge such as an aliphatic chain,⁴ or a rigid bridge that consists for instance of azole molecules.⁵ The reason for the increasing interest in multinuclear complexes is their ability to form DNA adducts that differ significantly from those formed by cisplatin and related complexes,⁶ which results in a completely different anti-tumour behaviour. Some of the azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes are highly effective *in vitro* in cisplatin-resistant cell lines, as well as in several tumour cell

lines.^{7,8} As a main structural feature, the azole-bridged complexes possess a leaving hydroxo group, an appropriate Pt...Pt distance, and some flexibility to provide the 1,2-intrastrand cross-links with a minimal distortion of the DNA.

It is well known that once anti-tumour complexes are in the bloodstream they remain intact due to the relatively high concentration of chloride ions (~100 mM). After entering into the cell *via* either passive diffusion or active uptake, the complexes undergo aquation by which a chloride ligand is displaced by a molecule of water due to a much lower chloride ion concentration (3–20 mM) inside the cell. These hydrolyzed species bind to DNA in competition with sulfur-containing molecules that also have a high affinity for platinum.⁹ In addition, the interaction of Pt complexes with sulfur-containing biological molecules has been associated with negative phenomena. Reactions with thiol groups (SH) of protein side chains (*e.g.* in metallothionein and glutathione) are thought to trap and deactivate the drug before it reaches its cellular DNA target to form intrastrand cross-links with guanine bases, the most likely cytotoxic adduct.¹⁰ Glutathione, a tripeptide with a sequence γ -glutamylcysteinylglycine (γ -Glu-CysH-Gly, GSH), is frequently the most prevalent intracellular thiol with concentrations up to 10 mM and is the most abundant low molecular weight peptide. The understanding of the chemical transformations of dinuclear Pt(II) complexes with biologically relevant nucleophiles under physiological conditions is of special concern for pharmaceutical and biomedical research.

In this study we synthesized different dinuclear Pt(II) complexes starting from transplatin using various types of bridging ligands (the structures of the complexes are given in Fig. 1). We determined pK_a values of the coordinated water ligands and investigated substitution reactions of these complexes with biologically relevant

^aDepartment of Chemical-Technological Sciences, State University of Novi Pazar, 36300, Novi Pazar, Serbia

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000, Kragujevac, Serbia. E-mail: bugarcic@kg.ac.rs; Fax: +381(0)34335040; Tel: +381(0)34300262

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

† Electronic supplementary information (ESI) available: See DOI: 10.1039/c1dt11313e

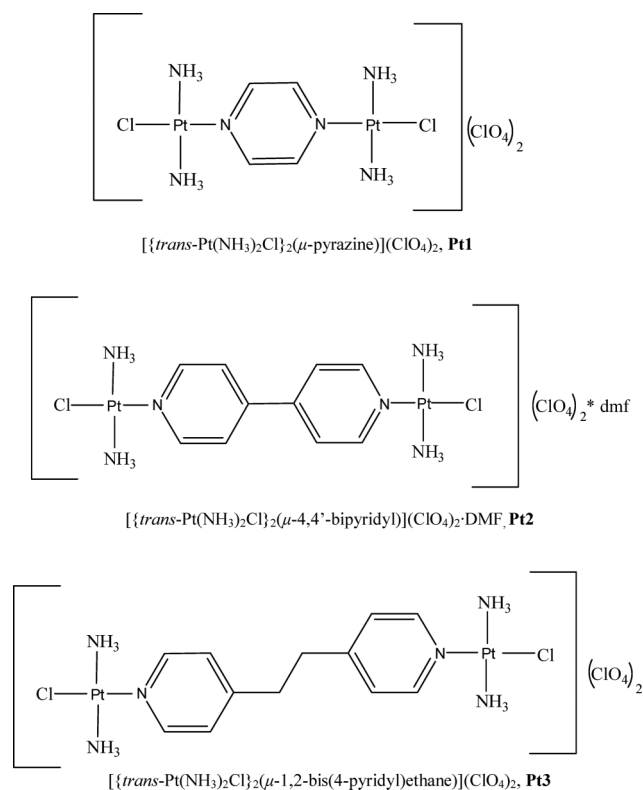


Fig. 1 Structures of the investigated dinuclear platinum(II) complexes.

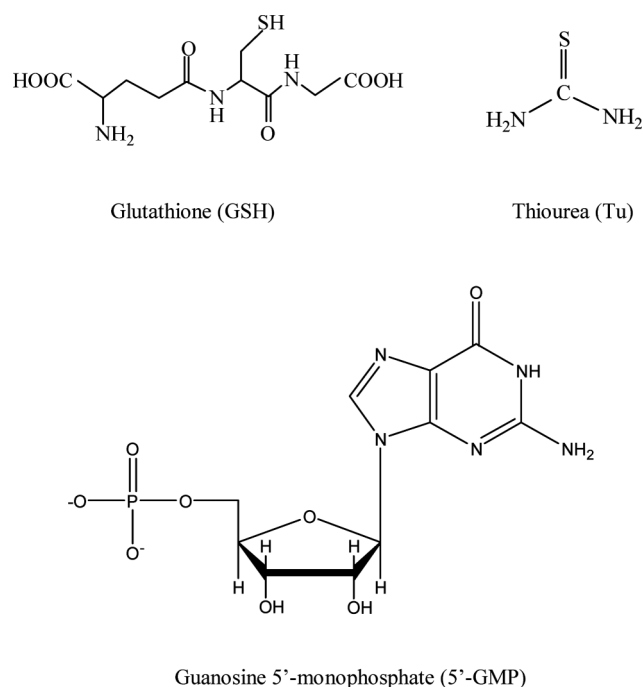


Fig. 2 Structures of the investigated nucleophiles.

nucleophiles (Fig. 2). Thiourea (Tu) is a strong sulphur containing nucleophile with a high solubility and can act as a good model nucleophile since it combines the ligand properties of thiolates (π -donor) and thioethers (σ -donor, π -acceptor). Thiourea has also for a long time been used as protecting agent to minimize nephrotoxicity following cisplatin treatment.¹¹ Glutathione (GSH)

is present in the cell, while guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) is used as a model for binding to nucleobases.¹²

The reactions were studied in aqueous solution at pH 2.5 and 7.2 using UV-vis spectrophotometric, stopped-flow and ¹H NMR spectroscopic techniques.

It was envisaged that this study could throw more light on the mechanism of the interactions of dinuclear platinum(II) anti-tumour complexes with N- and S-donor ligands, and also provide a better understanding of the mechanism of chemo-protection and platinum metabolism.

Experimental

Chemicals

The nucleophiles thiourea, glutathione and guanosine-5'-monophosphate sodium salt used in the kinetic measurements were obtained from Acros Organics. Transplatin, *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], pyrazine, 4,4'-bipyridyl, and 1,2-bis(4-pyridyl)ethane, used for the synthesis of the new complexes, were also obtained from Acros Organics.

Synthesis of Complexes

The studied complexes [*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ -pyrazine)(ClO₄)₂ (**Pt1**), [*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ -4,4'-bipyridyl)(ClO₄)₂·DMF (**Pt2**), and [*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ -1,2-bis(4-pyridyl)ethane)(ClO₄)₂ (**Pt3**), were synthesized following the literature procedure reported by Reedijk *et al.*¹³

Preparation of *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl(dmf)](ClO₄). To a stirred dimethylformamide (DMF) solution of *trans*-dichlorodiamine platinum(II) 0.1 g (0.33 mmol), a DMF solution of AgClO₄ was added drop wise in a molar ratio of 1 : 1. The mixture was stirred overnight in the dark and the AgCl precipitate was then filtered off. The resulting pale yellow DMF solution of *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl(dmf)](ClO₄) was used as the starting material for the preparation of the dinuclear platinum(II) complexes.

Preparation of the dinuclear Pt(II) chloro complexes. To a stirred DMF solution of *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl(dmf)](ClO₄) (0.33 mmol) obtained as described above, a solution of the ligands (pyrazine, 4,4'-bipyridyl and 1,2-bis(4-pyridyl)ethane) was added drop wise in the molar ratio 2 : 1 (complex : bridging ligand), and the solution was stirred at room temperature for 3 h in the dark. For the synthesis of **Pt1** pyrazine, for **Pt2** 4,4'-bipyridyl and for **Pt3** 1,2-bis(4-pyridyl)ethane were added as bridging ligands. The solution was then rotary evaporated and the residue was washed with diethyl ether. A light yellow powder was obtained and left to dry in the air for all synthesized dinuclear Pt(II) complexes. The results obtained from the analysis of the complexes are given below.

Pt1 complex. Yield 0.141 g (52.80%) Anal. Calc. for C₄H₁₆N₆Pt₂Cl₄O₈: N, 10.40; C, 5.94; H, 2.00. Found: N, 9.95; C, 6.38; H, 2.10. ¹H NMR (D₂O, 25 °C) δ 2.0 (m, 2H, NH₂), δ 8.63 (m, 1H, CH, pyrazine).

Pt2 complex. Yield 0.220 g (69.64%) Anal. Calc. for C₁₃H₂₇Cl₄N₇O₉Pt₂: N, 10.24; C, 16.31; H, 2.84. Found N, 10.08; C, 16.79; H, 2.80. ¹H NMR (D₂O, 25 °C) δ 2.0 (m, 2H, NH₂) δ 2.93

(s, 1H, CH₃, DMF), δ 7.28 (m, 1H, CH, 4-pyridine), δ 8.02 (s, 1H, CHO, DMF), δ 8.59 (m, 1H, CH, 4-pyridine).

Pt3 complex. Yield 0.195 g (64.78%) Anal. Calc. for C₁₂H₂₄Cl₄N₆O₈Pt₂: N, 9.21; C, 15.80; H, 2.65. Found: N, 9.06; C, 15.16; H, 2.71. ¹H NMR (D₂O, 25 °C) δ 2.0 (m, 2H, NH₂), δ 2.88 (m, 2H, CH₂, ethane), δ 7.28 (m, 1H, CH, 4-pyridine), δ 8.59 (m, 1H, CH, 4-pyridine).

Preparation of the dinuclear Pt(II) diaqua complexes

The solutions of the diaqua **Pt1**, **Pt2** and **Pt3** complexes were prepared from the corresponding dichloro complexes by addition of the corresponding amount of AgClO₄ to a solution of the chloro complex and stirring at 50 °C for 8 h. The white precipitate that formed (AgCl) was filtered off using a Millipore filtration unit, and the solutions were diluted. Great care was taken to ensure that the resulting solutions were free of Ag⁺ ions and that the chloro complexes had been converted completely into the aqua species. The solution was acidified with HClO₄ to pH 2.0 (for determination of the pK_a values) and pH 2.5 (for kinetic measurements). The resulting solution was diluted with water to give the desired complex concentration of 0.20 mM. The ionic strength was adjusted to 0.01 M with NaClO₄.

Chemicals and solutions

Nucleophile stock solutions were prepared shortly before use by dissolving the chemicals in purified water. All other chemicals were of analytical reagent grade. Ultra pure water was used in all experiments. Since it is known that perchlorate ions do not coordinate to Pt(II) and Pd(II) in aqueous solution,¹⁴ the kinetics of the ligand substitution reactions were studied in 0.01 M NaClO₄ (Merck, p.a.). The pH of 2.5 of the solution was adjusted with HClO₄ and NaOH, whereas for pH 7.2 a freshly prepared 25 mM Hepes buffer (Acros Organics) was used. NaCl was used to adjust the chloride concentration.

Instrumentation

Chemical analyses were performed on a Carlo Erba Elemental Analyser 1106. UV-vis spectra were recorded on Hewlett-Packard 8452A diode-array and a Perkin Elmer Lambda 35 double-beam spectrophotometer equipped with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. The pH measurements were recorded on a Jenway 4330 pH meter with a combined Jenway glass microelectrode that had been calibrated with standard buffer solutions of pH 4.0, 7.0 and 10.0 (Merck). The KCl solution in the reference electrode was replaced with a 3 M NaCl electrolyte to prevent precipitation of KClO₄ during use.^{15,16} Kinetic measurements on fast reactions were monitored using an Applied Photophysics SX.18 MV (v4.33) stopped-flow reaction analyzer coupled to an online data acquisition system. The temperature of the instrument was controlled to within ± 0.1 °C.

Determination of the pK_a values of the diaqua complexes

All pH measurements were made separately outside the stock solution. Small vials were used for sampling aliquots (3 ml) of the diaqua complex. After pH measurements, the complex was discarded to avoid its *in situ* precipitation as a chloride derivative.

The solution was titrated with NaOH within the pH range of 2–9. An example of the spectral changes recorded during the titration is shown for the diaqua **Pt3** complex in Fig. 3. To avoid dilution effects due to addition of the titrant, a large volume (250 ml) of metal complex was used for titration and small granules of crushed pellets were used within the pH range of 2–3. NaOH solutions of decreasing concentrations were used in a manner that ensured that as many evenly distributed points were collected on the rising or falling sections of the titration curve. After each addition of titrant, the solution was stirred before its pH and respective spectrum were recorded. The sample aliquots from each absorbance measurement were returned back to the stock solution after use.

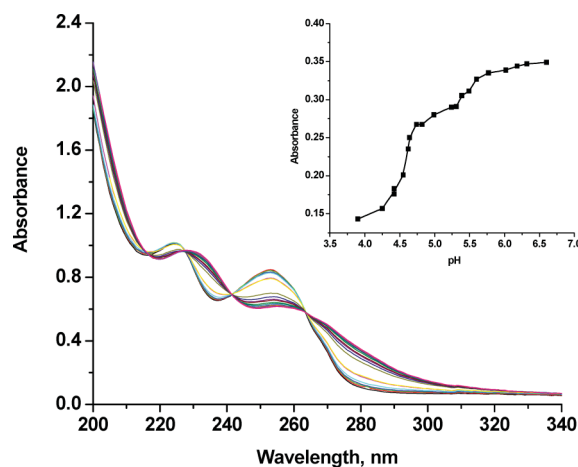


Fig. 3 UV-vis spectra of the diaqua **Pt3** complex recorded as a function of pH in the range 2 to 10 at $I = 0.01$ M (NaClO₄) and 25 °C. Inset: titration curve at 280 nm.

Kinetic measurements

Spectral changes resulting from mixing dinuclear Pt(II) complex and nucleophile solutions were recorded over the wavelength range 220 to 600 nm to establish a suitable wavelength at which kinetic measurements could be performed (see Tables S2–S7, ESI†). All kinetic measurements were performed under *pseudo*-first-order conditions, *i.e.*, at least a 10-fold excess of the nucleophile was used. The temperature was controlled throughout all kinetic experiments to ± 0.1 °C. Reported rate constants represent an average value of at least three to five independent kinetic runs for each set of experimental conditions (see Tables S2–S7†). All the reactions of the diaqua complexes were studied at pH 2.5 (0.01 M NaClO₄). Kinetic measurements for all the dichloro complexes were investigated at pH 7.2 in 25 mM Hepes buffer with the addition of 20 mM NaCl (see Fig. S1 and Table S1, ESI†). The concentration of 20 mM NaCl was enough to suppress spontaneous hydrolysis of the dichloro complexes as shown by the data in Fig. S1†.

¹H NMR measurements

¹H NMR kinetic experiments of the dichloro complex **Pt2** with 5'-GMP were studied on a freshly prepared sample of the reactants. A 10 mM solution of the complex and 20 mM solution of the ligand were prepared in 300 μ l of D₂O, 30 min prior to the start of the kinetic experiment. The solution of the ligand was added to the

Table 1 Summary of pK_a values for the deprotonation steps of the investigated diaqua complexes

	Pt1	Pt2	Pt3
pK_{a1}	3.94 ± 0.07	4.6 ± 0.2	4.58 ± 0.06
pK_{a2}	5.0 ± 0.5	5.69 ± 0.05	5.5 ± 0.3

solution of the complex to initiate the reaction. NMR spectra were recorded at 22 °C over a period of several days until completion of the reaction was reached. No buffer was used to prevent increased activation of the complexes due to coordination of phosphate, or interfering signals in the observed peak area. The pH^* ($pD = pH + 0.4$) changed from 7.2 to 6.7 during the reaction. The NMR spectra were acquired on a Varian Gemini-200 spectrometer. All chemical shifts are referenced to TSP (trimethylsilylpropionic acid).

Results and Discussion

Determination of pK_a values for the diaqua complexes

The spectral changes observed during a pH titration of the diaqua **Pt3** complex are shown in Fig. 3 (see Fig. S2 and S3 for the corresponding data for the **Pt1** and **Pt2** complexes, respectively, ESI†). The pK_a values were determined from titration traces taken from the absorbance at a specific wavelength as a function of the pH (see inset in Fig. 3). The titration data for the complexes were fitted to the following equation for the determination of both pK_a values,^{17,18} and the obtained data are summarized in Table 1.

$$y = a + (b - a)/(1 + 2.718^{*(x - pK_{a1}/m)}) + (c - b)/(1 + 2.718^{*((x - pK_{a2})/n)})$$

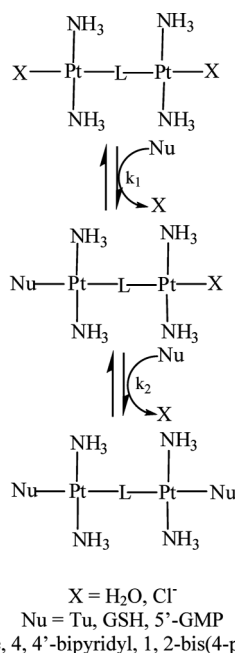
In this equation x refers to pH, and y represents the absorbance value. The parameter a represents the value of the absorbance at the beginning of the titration, b represents the absorbance during the titration and c represents the absorbance at the end of the titration. The parameters m and n are used to optimize the titration curve.

The investigated complexes are characterized by two Pt(II) centres that are linked by different bridging ligands (Fig. 1). The aqua ligands coordinated to each platinum centre can exhibit different pK_a values depending on the distance between the two Pt(II) centres. The conjugated π -electron system in some of the bridging ligands supports electronic communication between the two platinum centres and contributes to the pK_a values.¹⁸ The platinum centres in the studied complexes are thermodynamically and kinetically independent of each other, and for all the complexes two pK_a values (Table 1) were observed. A shorter distance between the two Pt(II) centres results in the addition of the charges on the platinum centres by which each platinum centre becomes more electrophilic and thus more acidic, which leads to lower pK_a values than that found for 2+ charged platinum centres of mononuclear complexes. The pK_{a1} value of the diaqua **Pt1** complex is in agreement with recently published pK_{a1} values,¹⁹ and lower than for the **Pt2** and **Pt3** complexes, and could be associated with the π -acceptor ability of the pyrazine ligand in **Pt1**. Following deprotonation of the first coordinated water in all the dinuclear Pt(II) complexes, the overall charge of the complex decreases from 4+ to 3+ and the electrophilicity and acidity of the second platinum centre also decreases. These effects account

for the smaller difference between the pK_{a1} and pK_{a2} values (see Table 1).

Kinetic measurements

The kinetics of the substitution of coordinated water and chloride in the dinuclear platinum(II) complexes was investigated spectrophotometrically by following the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time at 37 °C. The proposed reaction pathways for the reaction of the dinuclear Pt(II) complexes with biologically relevant nucleophiles are presented in Scheme 1. The reactions with the diaqua complexes were performed at pH 2.5 to assure that complexes **Pt1**, **Pt2** and **Pt3** are present in the diaqua form based on the pK_a values reported in Table 1. Then reactions with the corresponding dichloro complexes were studied at pH 7.2 in the presence of NaCl in order to mimic biological reaction conditions.



Scheme 1 Proposed pathways for the reaction of the dinuclear Pt(II) complexes with a series of nucleophiles. (In the reaction with thiourea the fast step refers to the substitution of both labile aqua or chloro ligands and is represented by the second order rate constant k_1).

The substitution reactions of all the studied dinuclear Pt(II) complexes proceeded in two subsequent reactions steps that both depended on the nucleophile concentration. All kinetic traces gave an excellent fit to a double exponential function, typical for a two-step reaction. The so-obtained *pseudo*-first-order rate constants, k_{obsd1} and k_{obsd2} , calculated from the kinetic traces were plotted against the concentration of the entering nucleophiles. A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all the studied reactions (see Fig. 4 and 5), and only in the case of the dichloro complexes (Fig. 5) was a small intercept occasionally observed. The linear fits passing through the origin indicate that possible parallel or backward reactions are insignificant or absent, whereas the observed intercepts for the dichloro complexes are ascribed to the back reaction with the excess chloride present in solution to prevent the spontaneous hydrolysis of the dichloro

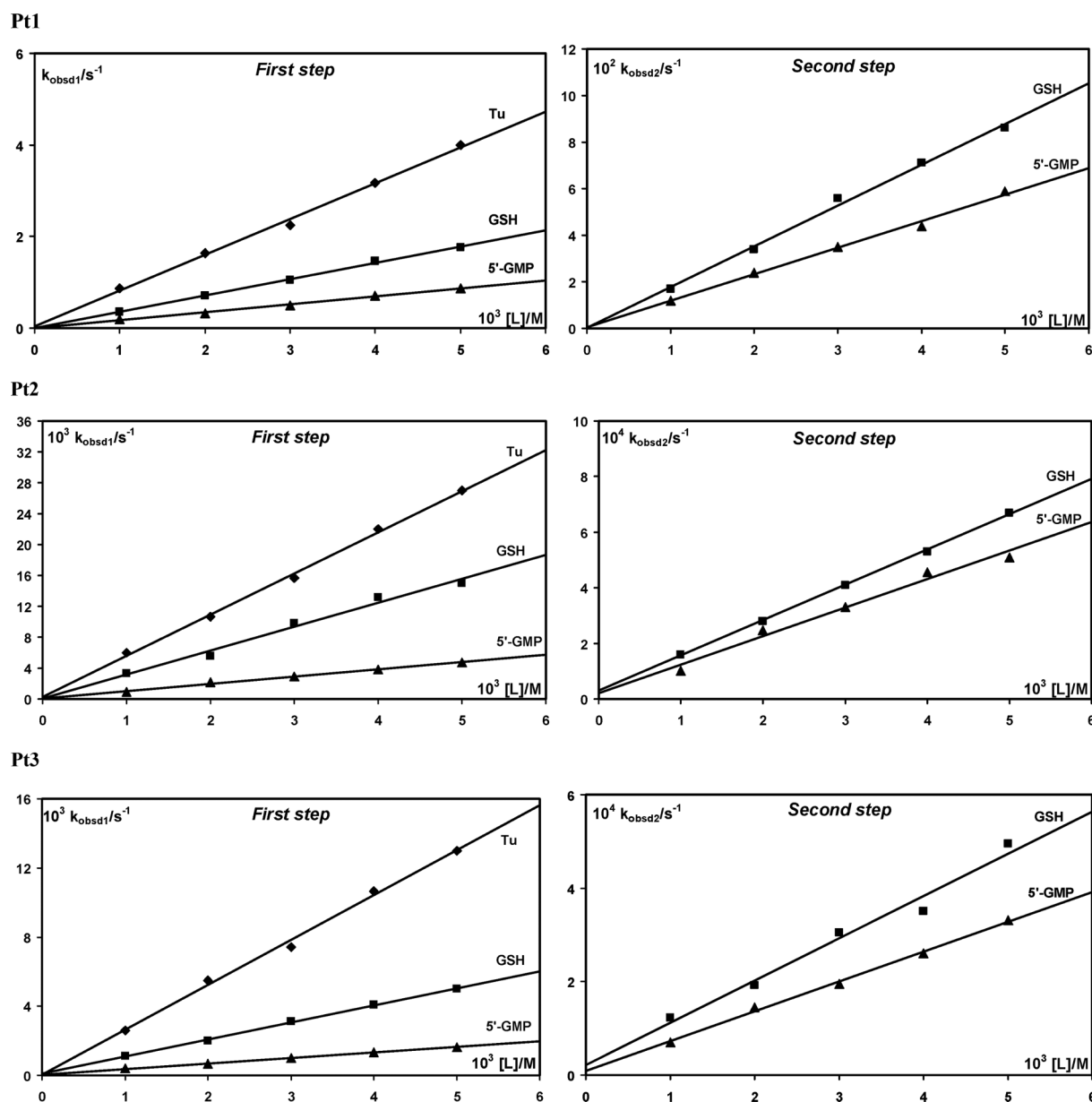


Fig. 4 Pseudo-first-order rate constants plotted as a function of nucleophile concentration for the first and second substitution reactions of the diaqua Pt1, Pt2 and Pt3 complexes by Tu, GSH and 5'-GMP at pH = 2.5, 0.01 M NaClO₄ and 37 °C.

complexes. The dependence of the observed *pseudo*-first-order rate constants, k_{obsd1} and k_{obsd2} , on the concentration of the entering nucleophile can be presented by eqn (1) and (2), where k_1 and k_2 represent the second order rate constants for the first and second substitution reactions of the dinuclear Pt(II) complexes.

$$k_{\text{obsd1}} = k_1[\text{Nu}] \quad (1)$$

$$k_{\text{obsd2}} = k_2[\text{Nu}] \quad (2)$$

Reactions of the diaqua Pt1, Pt2 and Pt3 complexes with Tu, GSH and 5'-GMP

Under the selected experimental conditions (pH 2.5), the substitution of the aqua ligands in the complexes involved two reaction

steps determined by the second-order rate constants k_1 and k_2 (Scheme 1). The obtained results for both reaction steps are summarized in Table 2.

In the case of thiourea as the nucleophile the first reaction turned out to be very fast, whereas the second reaction was extremely slow, and both steps showed a dependence on the thiourea concentration. The fast step was assigned to the substitution of both labile aqua ligands, whereas the second step was ascribed to the displacement of the bridging ligand as a result of the strong *trans* effect of coordinated thiourea. This effect is the strongest for thiourea as an S-donor nucleophile, followed by glutathione and guanosine-5'-monophosphate. Due to the observed decomposition of the dinuclear bridged complex during the subsequent slow reaction with thiourea, this process was not studied in any further detail. The data in Table 2 and Fig. 4 clearly

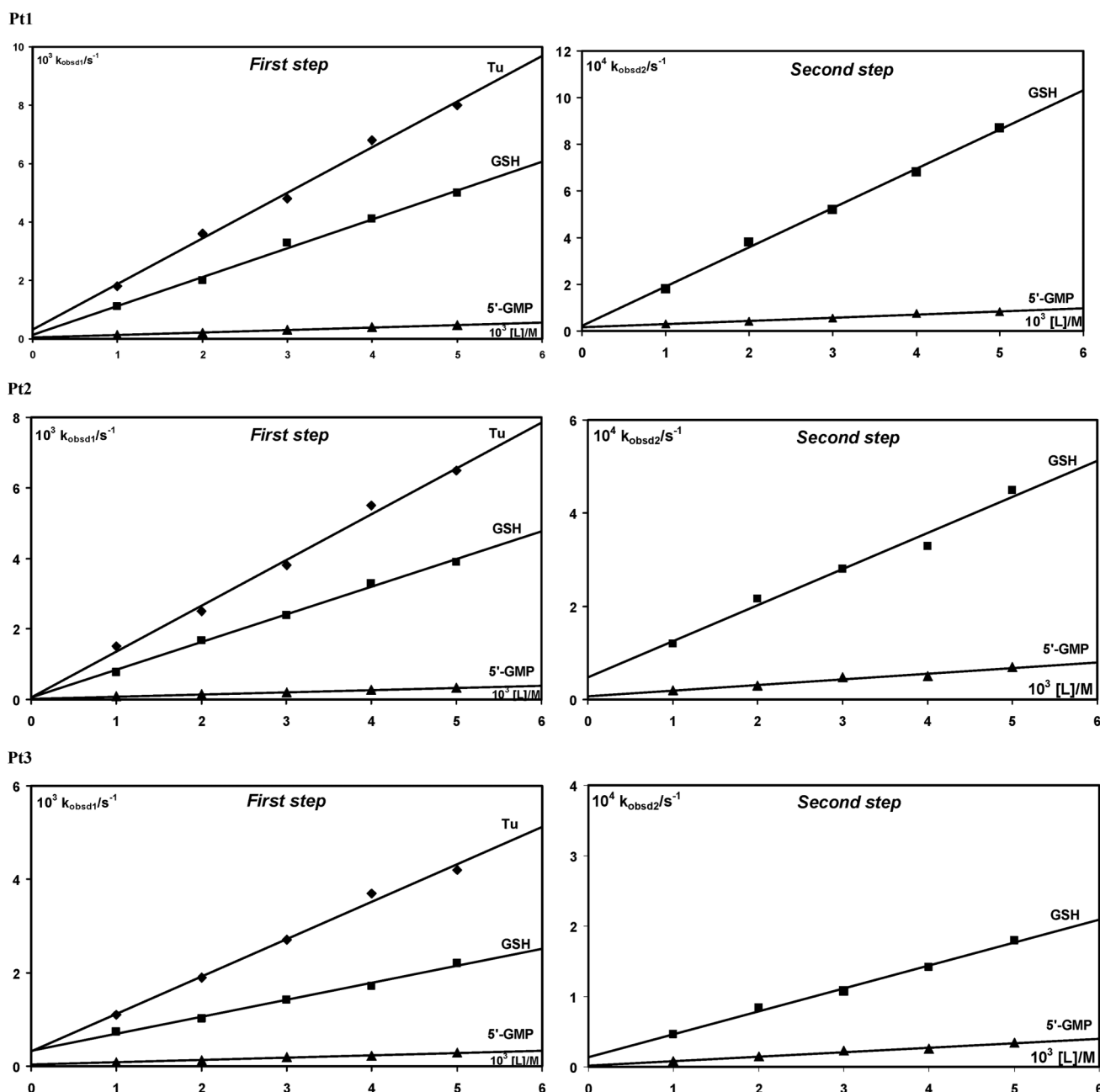


Fig. 5 Pseudo-first order rate constants plotted as a function of nucleophile concentration for the first and second substitution reactions of the dichloro **Pt1**, **Pt2** and **Pt3** complexes by Tu, GSH and 5'-GMP at pH = 7.2 (25 mM Heppees buffer), 20 mM NaCl and 37 °C.

show that the **Pt1** complex reacts two orders of magnitude faster with thiourea than the corresponding diaqua complexes of **Pt2** and **Pt3**. This is in agreement with other published results for the reactions of related dinuclear Pt(II) complexes with thiourea.^{17,18} The higher lability of the **Pt1** complex can be ascribed to the decrease in electron density on the platinum centre caused by the π -acceptor ability of the pyrazine ligand, by which the metal centres in **Pt1** become more electrophilic and favour the rapid binding of the entering nucleophile. The **Pt2** and **Pt3** react significantly slower because the nature of the bridging ligand is such that less π -back bonding can occur to increase the electrophilicity of the metal centres.

In the case of the substitution reactions with glutathione, we observed a lower reactivity than with thiourea. The kinetic traces showed two reaction steps. Over time the first reaction step with GSH for all the dinuclear platinum(II) complexes was complete, and it was possible to study the second substitution step (see Fig. 4). If we take into account the pK_a values of glutathione, *viz.* $pK_{a1} = 2.05$, $pK_{a2} = 3.40$, $pK_{a3} = 8.79$ and $pK_{a4} = 9.49$,²⁰ the SH group will be partially protonated under our experimental conditions (pH 2.5). Coordination primarily takes place through the sulphur donor and the reactions go to completion. In the reactions with glutathione the first step could be described as a substitution of the first aqua molecule by glutathione, while the second substitution

Table 2 Second-order rate constants for the reactions of the diaqua **Pt1**, **Pt2** and **Pt3** complexes with Tu, GSH and 5'-GMP at pH = 2.5 (0.01 M NaClO₄) and 37 °C

Pt1			
<i>First step</i>	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	78000 ± 2800	—	—
GSH	35600 ± 800	—	—
5'-GMP	17300 ± 800	46 ± 2	-56 ± 5
<i>Second step</i>	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	—	—	—
GSH	1800 ± 100	—	—
5'-GMP	1140 ± 50	41 ± 1	-94 ± 3
Pt2			
<i>First step</i>	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	533 ± 15	—	—
GSH	310 ± 22	—	—
5'-GMP	94 ± 5	77 ± 2	-23 ± 5
<i>Second step</i>	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	—	—	—
GSH	12.7 ± 0.2	—	—
5'-GMP	10.3 ± 0.9	113 ± 2	-89 ± 5
Pt3			
<i>First step</i>	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	260 ± 10	—	—
GSH	99 ± 3	—	—
5'-GMP	32.0 ± 0.5	64 ± 3	-48 ± 8
<i>Second step</i>	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	—	—	—
GSH	9.1 ± 0.8	—	—
5'-GMP	6.4 ± 0.2	53 ± 1	-95 ± 3

step is substitution of the second aqua molecule. The slower reaction for the second step as compared to the first could be explained by the steric effect after the coordination of the first GSH, and by the charge on the complex. After coordination of the first glutathione the overall charge of the complexes is reduced from 4+ to 3+. This leads to a decrease in electrophilicity on the Pt(II) centre, which causes a slower second substitution step.

The interaction of glutathione with the dinuclear platinum(II) complexes has biological importance because glutathione is the most prevalent intracellular thiol. It is important to note that glutathione has been used as a protecting agent and administered before or after cisplatin.¹³ Cisplatin readily reacts with glutathione and as much as 67% of the administered platinum has been found to coordinate to glutathione. However, the role of glutathione appears to be dual: glutathione both activates and deactivates cisplatin.²¹ Higher effectiveness of cisplatin has also been demonstrated by co-administering cisplatin and glutathione in patients. For now it is not clear whether the increase in effectiveness is due to the reduced toxicity or due to the modification of the platinum drug by binding to the metal.

The substitution reactions with guanosine-5'-monophosphate were over during the observed reaction time and kinetic traces also showed two substitution steps. Under our experimental conditions (pH 2.5) only the N7 position of 5'-GMP will bind to the dinuclear Pt(II) complexes, since at this pH the N1 position is protonated ($pK_a = 8.88$). The first step of the substitution reaction could be interpreted as substitution of the first water molecule by the nucleophile, whereas the second step is substitution of the other water molecule by 5'-GMP. The steric hindrance may not

significantly differ for the first step as free rotation around the Pt–N azine bonds is present within both of them. However, for the second step effects of steric hindrance should be considered, as caused by the binding of the first nucleophile.¹³ Moreover, the charge of the complex may also play an important role because after the coordination of the first 5'-GMP²⁻ the charge of the complex is 2+ and the second substitution reaction is much slower. Furthermore, the substitution process is slow in comparison with S-donor ligands. It is well known that Pt–N complexes are thermodynamically more stable products. The most reactive complex is **Pt1** due to the π -acceptor ability of the pyrazine ligand that causes a decrease in the electron density on the platinum centre. The **Pt1** complex is around 100 times more reactive than the **Pt2** and **Pt3** complexes. The second reaction step is around 10 times slower than the first step for all substitution reactions. The order of reactivity of the complexes are **Pt1** > **Pt2** > **Pt3** (Table 2). In comparison with thiourea and glutathione 5'-GMP is less reactive. The reactivity of GSH for the first step is around 30 times higher, but for the second step we observed almost the same reactivity as for 5'-GMP.

Reactions of the dichloro **Pt1**, **Pt2** and **Pt3** complexes with Tu, GSH and 5'-GMP at pH 7.2

The reactions of the dichloro dinuclear platinum(II) complexes were studied at pH 7.2 in 25 mM Hepes buffer in the presence of 20 mM NaCl at 37 °C. All the substitution processes showed two reaction steps determined by two second-rate constants k_1 and k_2 (Scheme 1). In Table 3 all the data for substitution by thiourea, glutathione and guanosine-5'-monophosphate are summarized. Only in the case of thiourea was it not possible to study the second reaction step because labilization of the bridging ligand as a result of the strong *trans*-effect of Tu. The order of reactivity of the nucleophiles for all complexes is Tu > GSH > 5'-GMP. Dichloro complexes are less reactive than their diaqua analogues, partly because of the stronger Pt–Cl bond and the lower electrophilicity of the platinum centre of the chloro complexes arising from the lower overall charge of 1+. Plots of the *pseudo*-first-order rate constants as a function of the nucleophile concentration for all substitution processes are given in Fig. 5.

Glutathione is around 10 times more reactive than 5'-GMP for both reaction steps. In the light of the fact that the reactions were studied at pH 7.2, it should be considered that GSH is deprotonated to an extent of 95% such that GS⁻ represents the reactive species.²² The order of reactivity of the complexes is **Pt1** > **Pt2** > **Pt3**. The reason could be the short distance between the two Pt(II) centres and the resonance effect of pyrazine that induces electronic communication between the two Pt(II) centres. Furthermore, the π -acceptor ability of pyrazine causes a decrease in electronic density on the platinum centre and makes it more electrophilic.

The activation parameters ΔH^\ddagger and ΔS^\ddagger (Tables 2 and 3) were calculated by using the Eyring equation for the reactions with guanosine-5'-monophosphate at pH 2.5 and 7.2. All available activation parameters support an associative mechanism. The significantly negative activation entropies suggest that the activation process in the studied systems seems to be strongly dominated by bond making.²³

Table 3 Second-order rate constants for the reactions of the dichloro **Pt1**, **Pt2** and **Pt3** complexes with Tu, GSH and 5'-GMP at pH = 7.2 (25 mM Hepes buffer) in the presence of 20 mM NaCl at 37 °C

Pt1			
First step	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	156 ± 7	—	—
GSH	99 ± 4	—	—
5'-GMP	8.7 ± 0.6	72 ± 2	-32 ± 5
Second step	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	—	—	—
GSH	16.8 ± 0.5	—	—
5'-GMP	1.4 ± 0.1	68 ± 6	-57 ± 19
Pt2			
First step	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	130 ± 7	—	—
GSH	79 ± 3	—	—
5'-GMP	6.1 ± 0.4	73 ± 2	-33 ± 5
	0.71 ± 0.03^a	—	—
Second step	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	—	—	—
GSH	7.7 ± 0.6	—	—
5'-GMP	1.2 ± 0.1	63 ± 5	-75 ± 15
Pt3			
First step	$10^2 k_1 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	80 ± 4	—	—
GSH	36 ± 2	—	—
5'-GMP	4.9 ± 0.3	75 ± 2	-35 ± 6
	—	—	—
Second step	$10^2 k_2 / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
Tu	—	—	—
GSH	3.3 ± 0.2	—	—
5'-GMP	0.63 ± 0.04	77 ± 2	-32 ± 5

^a Rate constant evaluated by NMR experiments, pD = 6.7 and 22 °C.

¹H NMR kinetics

¹H NMR spectroscopy was used to investigate the substitution reactions with 5'-GMP in aqueous solution at pD 6.7 and 22 °C. The substitution kinetics were studied under second order conditions with an initial molar ratio of 1:2 for the dichloro **Pt2** complex: 5'-GMP. Considering that the initial concentrations of 5'-GMP and the complex, c_{a0} and c_{b0} respectively, can be expressed by $c_{a0} \neq c_{b0}$ for the first reaction step, we applied eqn (3) for the determination of k_1 . The concentration of the 1:1 product, *i.e.* singly substituted complex, is represented by x .²⁴ The concentration x is calculated considering the area of the signals for free 5'-GMP and coordinated 5'-GMP (ESI, Table S8†).

$$k_1 t = \frac{1}{c_{a0} - c_{b0}} \ln \frac{c_{b0}(c_{a0} - x)}{c_{a0}(c_{b0} - x)} \quad (3)$$

The integral of the singlet of the H8 proton in 5'-GMP was unavailable to measure because there was a multiplicity of product signals, and we therefore used the intensity of the doublet of the H1' proton of 5'-GMP. The intensity of the signal for free 5'-GMP at 5.95 ppm decreases during the reaction, whereas at the same time a signal for coordinated 5'-GMP appears around 6.12 ppm and increases with time. A plot of the right hand side of eqn (3) versus reaction time resulted in a straight line passing through the origin (see Fig. 6). The value of k_1 was obtained from the slope (see Table 3) when one 5'-GMP molecule was coordinated. The second reaction step does not go to completion during the selected reaction time and was not considered.

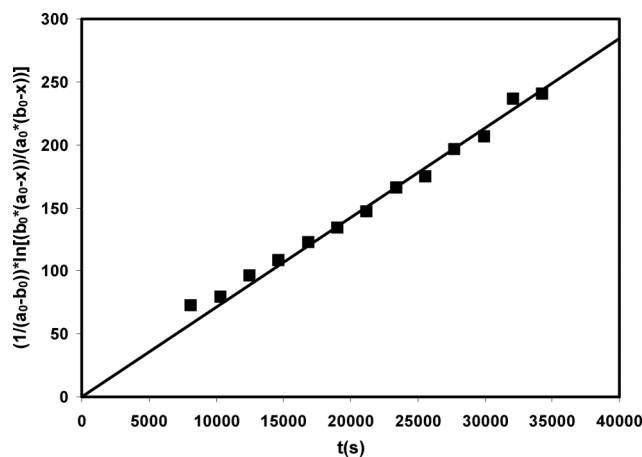


Fig. 6 Second order plot for the reaction of the dichloro **Pt2** complex (10 mM) with 5'-GMP (20 mM) (in the molar ratio complex : ligand = 1 : 2). The y-axis represents the right-hand side term of eqn (3) at pD = 6.7 and 22 °C.

The value of k_1 obtained for the substitution of chloride by 5'-GMP investigated by ¹H NMR spectroscopy is smaller than the value obtained from UV-vis spectrophotometry. The main reason is the effect of temperature since the reaction was studied at 22 °C as compared to 37 °C in the UV-vis measurements. The obtained k_1 value is in agreement with literature data for the related dinuclear platinum(II) complexes.^{18c}

Conclusion

The new dinuclear platinum(II) complexes [*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-pyrazine)(ClO₄)₂ (**Pt1**), [*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-4,4'-bipyridyl)(ClO₄)₂·DMF (**Pt2**) and [*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-1,2-bis(4-pyridyl)ethane)(ClO₄)₂ (**Pt3**), were synthesized and the kinetics of the complex formation with Tu, 5'-GMP and GSH were studied. It was shown that the diaqua and dichloro **Pt1** complexes are the most reactive. The short distance between the two Pt(II) centres involved electrostatic interactions between the metals that increased the electrophilicity of both Pt(II) centres. The increase in electrophilicity of the platinum centres leads to the lower pK_a values in the case of the diaqua **Pt1** complex (pK_a = 3.94 ± 0.07) and also an increase in reactivity. In all complexes the two platinum centres are independent, so it was possible to determine two pK_a values and also separate rate constants for the two reaction steps in the reactions with glutathione and guanosine-5'-monophosphate. The results have shown that the bridging ligand has an important influence on the reactivity of the complexes towards the selected nucleophiles. The order of reactivity of the complexes for all substitution processes is **Pt1** > **Pt2** > **Pt3**, whereas the order of reactivity of the investigated nucleophiles is Tu > GSH > 5'-GMP.

Acknowledgements

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

References

- 1 (a) *Cisplatin Chemistry and Biochemistry of Leading Anticancer Drugs*, ed. B. Lippert, Wiley-VCH, Zürich, 1999; (b) D. Wang and S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2005, **4**, 307; (c) S. van Zutphen and J. Reedijk, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **24**, 2845; (d) H. Zorbas and B. K. Keppler, *Chem. Bio. Chem.*, 2005, **6**, 1157.
- 2 B. P. Esposito and R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 137.
- 3 E. Wong and C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2451.
- 4 N. Farrell, *Comments Inorg. Chem.*, 1995, **16**, 373.
- 5 J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**, 3611.
- 6 V. Brabec, J. Kasparikova, O. Vrana, O. Novakova, J. W. Cox, Y. Qu and N. Farrell, *Biochemistry*, 1999, **38**, 6781.
- 7 S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, M. Chikuma and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 4230.
- 8 S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4738.
- 9 P. Pil, S. J. Lippard, In *Encyclopedia of Cancer*, ed. J. R. Bertino, Academic Press: San Diego, CA, 1997, Vol. 1, pp. 392-410.
- 10 P. M. Takahara, C. A. Frederic and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 8.
- 11 J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499.
- 12 S. Komeda, H. Yamane, M. Chikuma and J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2004, **24**, 4828.
- 13 S. Komeda, G. V. Kalayda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma and J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1210.
- 14 T. G. Appleton, J. R. Hall, S. F. Ralph and C. S. M. Thompson, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 3521.
- 15 D. Jaganyi, A. Hofmann and R. van Eldik, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 1680.
- 16 A. Hofmann, D. Jaganyi, O. Q. Munro, G. Liehr and R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 1688.
- 17 A. Mambanda, D. Jaganyi, S. Hochreutther and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 3595.
- 18 (a) A. Hofmann and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2003, 2979; (b) H. Ertürk, A. Hofmann, R. Puchta and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2007, 2295; (c) H. Ertürk, J. Maigut, R. Puchta and R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2008, 2759; (d) H. Ertürk, R. Puchta and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, 1334.
- 19 D. Reddy and D. Jaganyi, *Int. J. Chem. Kinet.*, 2011, **43**, 161.
- 20 J. Arpalahi and B. Lippert, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 104.
- 21 E. Valckova, L. P. Dudones and R. N. Bose, *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 124.
- 22 N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž. D. Bugarčić and R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 461.
- 23 *Inorganic Reaction Mechanisms*, M. L. Tobe, J. Burgess, Addison Wesley Longman Inc, Essex, 1999, pp. 30-115.
- 24 *Chemical Kinetics The study of Reaction Rates in solution*, K. A. Connors, VCH, Weinheim, 1990.

Cytotoxic properties of platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes and their ligand substitution reactions with guanosine-5'-monophosphate

Miloš Arsenijević · Marija Milovanović · Vladislav Volarević ·
Dragan Čanović · Nebojša Arsenijević · Tanja Soldatović ·
Snežana Jovanović · Živadin D. Bugarčić

Received: 7 March 2012 / Accepted: 17 April 2012 / Published online: 10 May 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract The substitution reaction of the Pt(IV) complex [PtCl₄(bipy)] with guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) was studied by UV–Vis spectrophotometry. This reaction was investigated under *pseudo*-first-order conditions at 37 °C in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in the presence of 10 mM NaCl to prevent the hydrolysis of the complex. The substitution of chlorides in [{{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl}₂(μ-1,2-bis(4-pyridyl)ethane)}(ClO₄)₂ (**Pt3**) complex by 5'-GMP was followed by ¹H NMR spectroscopy under second-order conditions. Very similar values for the rate constants of both substitution steps were obtained. The Pt(IV) complexes, [PtCl₄(bipy)] and [PtCl₄(dach)], as well as dinuclear Pt(II) [{{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl}₂(μ-pyrazine)}(ClO₄)₂ (**Pt1**), [{{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl}₂(μ-4,4'-bipyridyl)}(ClO₄)₂ · DMF (**Pt2**) and [{{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl}₂(μ-1,2-bis(4-pyridyl)ethane)}(ClO₄)₂ (**Pt3**) complexes, displayed potent cytotoxic activity against human ovarium carcinoma cell line TOV21G and lower

activity toward human colon carcinoma HCT116 cell line at the same concentrations. Our data indicate that these platinum complexes could be explored further, as potential therapeutic agents for ovarian cancer.

Introduction

The use of platinum coordination compounds in cancer chemotherapy has been extensively studied following the discovery of the therapeutic properties of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], cisplatin) by Rosenberg et al. [1, 2]. Cisplatin is one of the most widely utilized antitumor drugs, exhibiting high efficacy against solid tumors, particularly testicular and ovarian cancer [3–5]. The anticancer activity of cisplatin is based on its ability to form intrastrand covalent adducts with DNA by binding of Pt to the N7 atoms of two adjacent guanine bases [6, 7]. However, the clinical efficiency of cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], is limited by toxic side effects, in particular a dose-limiting nephrotoxicity, by drug resistance in tumor cells, and by a narrow range of activity [8, 9].

Platinum(IV) complexes have greater inertness than the corresponding Pt(II) complexes. Hence, these complexes may have some advantages, such as: allowing oral administration, reduced toxicity, and decrease in the amount of the complex that is lost or deactivated on the path to the target cell [10]. Platinum(IV) complexes have enormous potential as anti-cancer agents in terms of both high activity and low toxicity. About 3000 Pt(IV) complexes have been synthesized and investigated in an attempt to improve the antitumor activity, lower toxicity and to design a drug that would be able to overcome resistance. Only about 30 platinum complexes have entered into clinical trials [11, 12]. However, it is generally believed that since Pt(IV) complexes are less reactive in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11243-012-9613-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Arsenijević · M. Milovanović · V. Volarević · D. Čanović ·
N. Arsenijević
Faculty of Medicine, Centre for Molecular Medicine and Stem
Cell Research, University of Kragujevac, Svetozara Markovića
69, 34000 Kragujevac, Serbia

T. Soldatović
Department of Chemical-Technological Sciences,
State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb,
36300 Novi Pazar, Serbia

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

ligand substitution reactions relative to their Pt(II) analogues, they must be reduced to Pt(II) species before binding to DNA. Upon entering into the cell, there are two metabolic pathways for Pt(IV) complexes: reduction by agents present in the cell (glutathione, ascorbic acid) or direct interaction with DNA in the nucleus. The first pathway leads to well-known interactions of Pt(II) complexes, while the second proposes the formation of adducts between Pt(IV) and DNA [13, 14].

Multinuclear complexes of platinum(II) represent a third generation of antitumor drugs the same as platinum(IV) complexes [15]. These complexes consist of either two or three platinum centers that are linked through a flexible bridge such as an aliphatic chain [16] or a rigid bridge that consists for instance ofazole molecules [17]. The reason for the increasing interest in multinuclear complexes is their ability to form DNA adducts that differ significantly from those formed by cisplatin and related complexes [18], which results in a completely different antitumor behavior. These complexes usually exist in cationic forms in solution and hence have high solubility in water; some of them are active in both cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cell lines [19, 20]. The biological activity of polynuclear platinum complexes may be modulated by geometry and number of leaving groups in the platinum coordination sphere as well as by the nature of the linkers connecting the platinum centers. In contrast to the mononuclear complexes, such as

antitumor cisplatin and clinically ineffective transplatin, in the dinuclear case both geometries are antitumor active [21]. As the structure of the DNA adducts determines repair, protein recognition, and other downstream cellular events, an understanding of their formation and biological consequences is essential to further drug development.

We report here the cytotoxic activity of some newly synthesized platinum(IV) and dinuclear platinum(II) (see Figs. 1 and 2) complexes on two human carcinoma cell lines: TOV21G (ovarian cancer cell line) and HCT-116 (colon cancer cell line), indicating their potential therapeutic use for treatment of ovarian and colon cancer. In addition, we studied the substitution reactions of the platinum(IV) complex [PtCl₄(bipy)] (Fig. 1) and dinuclear Pt(II) complex [*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-1,2-bis(4-pyridyl)ethane)](ClO₄)₂ (Pt3) (Fig. 2) with guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) using UV-Vis spectrophotometric and ¹H NMR techniques to clarify the mechanism of these interactions.

Experimental

Chemicals

Potassium tetrachloroplatinate (K₂PtCl₄), a starting complex for the other synthesis, was purchased from Strem

Fig. 1 Structures of the investigated complexes and 5'-GMP

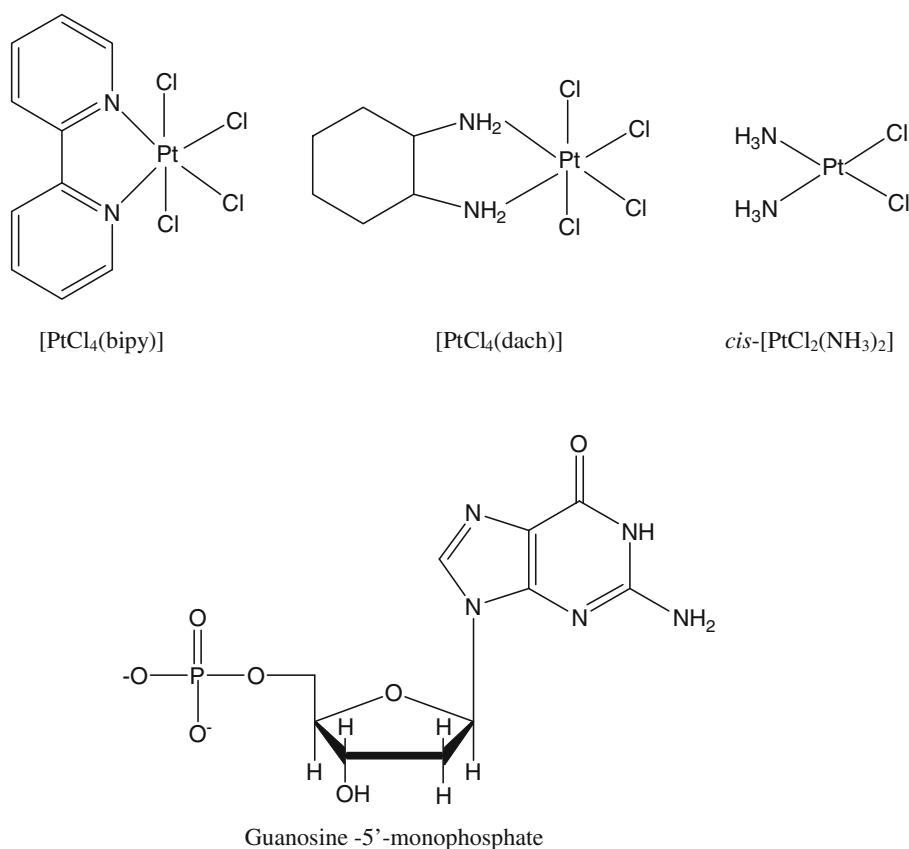
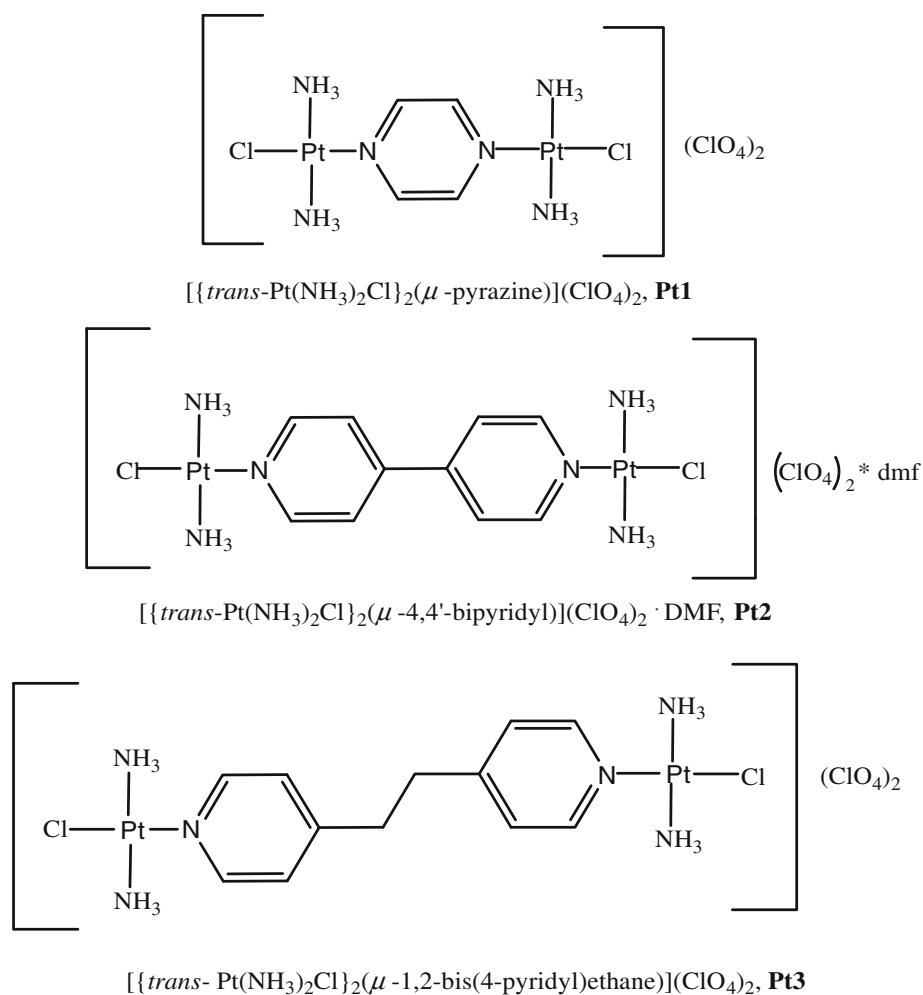


Fig. 2 Structures of investigated dinuclear platinum(II) complexes



Chemicals, while cisplatin, *cis*-diamminedichloroplatinum(II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], were purchased from Aldrich. The ligands (1R,2R)-1,2-diaminocyclohexane (dach) (Acros Organics), 2,2'-bipyridyl (bipy) (Aldrich) as well as nucleophile guanosine-5'-monophosphate sodium salt (5'-GMP) (Acros Organic) were used without further purification. Hepes buffer (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) was obtained from Aldrich. Transplatin, *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂], pyrazine, and 4,4'-bipyridyl, 1,2-bis(4-pyridyl)ethane, which were used for synthesis of dinuclear complexes, were also obtained from Acros Organics. The complexes [PtCl₄(bipy)], [PtCl₄(dach)] were prepared according to the published procedures [22], while the dinuclear platinum(II) complexes, such as [{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-pyrazine)](ClO₄)₂ (**Pt1**), [{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-4,4'-bipyridyl)](ClO₄)₂•DMF (**Pt2**), and [{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-1,2-bis(4-pyridyl)ethane)](ClO₄)₂ (**Pt3**), were synthesized according to the literature procedures [23, 24].

Chemical analyses were performed on a Carlo Erba Elemental Analyser 1106. UV–Vis spectra were recorded on Shimadzu UV 250, Hewlett-Packard 8452A diode-array

spectrophotometers and a Perkin-Elmer Lambda 35 double-beam spectrophotometer, equipped with thermostated 1.00 cm quartz Suprasil cells. The temperature was controlled throughout all kinetic experiments to ±0.1 °C. The ¹H NMR measurements were recorded on a Varian Gemini-200 spectrometer.

Cell culture

Two human carcinoma cell lines, TOV21G (ovarium) and HCT-116 (colon), were purchased from the American Type Culture Collection and cultured in 1:1 mixture of MCDB 105 and Medium 199 (TOV-21G) and DMEM (HCT116), supplemented with 10–15 % fetal bovine serum, 100 units/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin. Human mesenchymal stem cells (MSC) from peripheral blood were kindly provided by Dr Diana Bugarski (Institute for Medical Research, University of Belgrade, Serbia) and maintained in DMEM with 10 % FBS. All cells were cultured and treated at 37 °C in a humidified incubator

containing 5 % CO₂. All reagents were purchased from Sigma Chemicals.

UV–Vis measurements

Nucleophile stock solution was prepared shortly before use by dissolving the chemicals in purified water. All other chemicals were of analytically reagent grade. Highly purified, deionized water was used in the preparation of all solutions. All kinetic measurements were performed under *pseudo*-first-order conditions, that is, at least a 10-fold excess of the entering nucleophile was used. The working wavelength for reaction system was determined by recording the spectra of reaction mixtures over the wavelength range between 220 and 450 nm. The reaction was initiated by mixing equal volumes of the complex and nucleophile solutions (1.5 mL) in the quartz cuvette.

The substitution reactions of platinum(IV) complex [PtCl₄(bipy)] with 5'-GMP were studied spectrophotometrically by following the change in absorbance at suitable wavelengths as a function of time at 37 °C. These reactions were followed in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) in addition of 10 mM NaCl to prevent the hydrolysis of complex. All reported *pseudo*-first-order rate constants, k_{obsd} , represent an average value of two to four independent kinetic runs for each experimental condition (data are given in the Tables 1S in Electronic supplementary material). Rate constants were calculated using the computer programs Microsoft Excel and Origin 6.1.

¹H NMR measurements

¹H NMR kinetic experiment of [{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-1,2-bis(4-pyridyl)ethane)](ClO₄)₂ (**Pt3**) complex with 5'-GMP was studied on a freshly prepared sample of reactants. A 10-mM solution of the complex and 20-mM solution of the ligand were prepared in 300 μL of D₂O, 10 min prior to the start of the kinetic experiment. The solution of the ligand was added to the solution of the complex to initiate the reaction. NMR spectra were recorded at 22 °C, over a period of several days, until completion of the reaction was reached. No buffer was used to prevent increased activation of the complexes due to coordination of phosphate, or interfering signals in the observed peak area. The pH*(pD = pH + 0.4) changed from 7.2 to 6.7 during the reaction. All chemical shifts are

referenced to TSP (trimethylsilylpropionic acid). The ¹H NMR measurements were recorded on a Varian Gemini-200 spectrometer. Acquisition parameters for the ¹H experiments were pulse sequences S2 pul length 21.0 degree, relaxation delay 1.0 s, acquisition time 4.0 s, 56 repetitions, and sweep width 3000.3 Hz.

Cytotoxicity assay (MTT test)

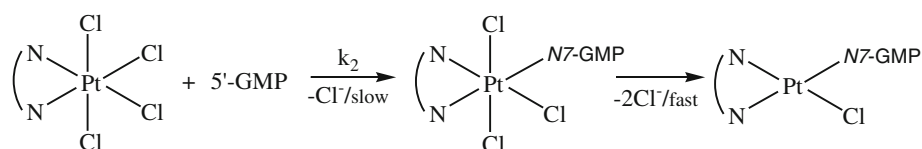
Cell viability was assessed by the MTT assay. Cells were harvested from the culture during the exponential growth phase and seeded into 96-well culture plates at 5 × 10⁵ cells/mL (TOV-21G and HCT-116) and 1 × 10⁶ cells/mL (MSC) in fresh medium, 100 μL/well. After a 24 h time period, cells were treated with selected concentrations of complexes for 3 days. Control wells were prepared by addition of culture medium. Wells containing culture medium without cells were used as blanks. After incubation, drug-containing medium was discarded and replaced with serum-free medium containing 15 % of MTT (5 mg/mL) dye. After additional 4 h of incubation at 37 °C in a 5 % CO₂ incubator, medium with MTT was removed and DMSO (150 μL) with glycine buffer (20 μL) was added to dissolve blue formazan crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate multimode detector Zenyth 3100. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % of viable cells = ((TS – BG0) – E/(TS – BG0) × 100), where BG0 is for background of medium alone, TS is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is for the experimental well.

Results and discussion

Reactions of [PtCl₄(bipy)] complex with 5'-GMP

The substitution reactions of Pt(IV) complexes with the biologically relevant molecule 5'-GMP have been frequently studied [22, 25–29]. It is well known that 5'-GMP can coordinate to metal ions through N1 and N7 atoms, depending on pH of the solution. At pH = 7.2, N1 is protonated (pK_a = 9.3 [30–34]), and coordination of 5'-GMP to Pt(IV) and Pt(II) complexes is via N7 of the purine base. Previously, for the reactions of a few Pt(IV) complexes with 5'-GMP two reaction steps were found,

Scheme 1 Proposed reaction pathways for the reaction between [PtCl₄(bipy)] complex and 5'-GMP



one slow which was substitution and the fast one which was reduction. The final reaction product was a substituted complex of Pt(II) [22]. The suggested mechanism for the reaction of the $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ complex with 5'-GMP could be the same (Scheme 1). The substitution reaction of one chloride ligand in Pt(IV) complex with nucleophile is characterized by a second-order rate constant (k_2).

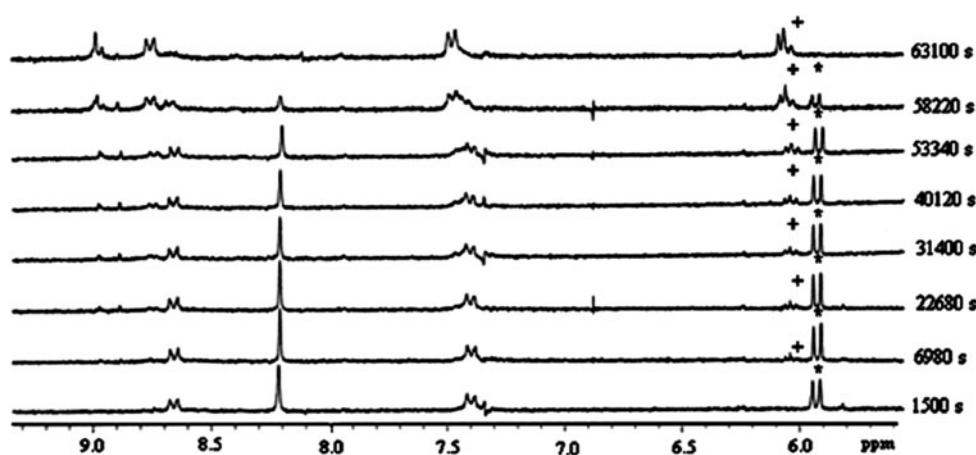
The observed *pseudo*-first-order rate constants, k_{obsd} as a function of the total concentration of nucleophile could be described by Eq. 1. The rate constant for the reduction reaction was not determined.

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

The obtained value of rate constant k_2 for substitution of one chloride in $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ complex with 5'-GMP, at 37 °C in 25 mM Hepes buffer (pH = 7.2) with addition of 10 mM NaCl, is $(5.9 \pm 0.3) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ while the value of k_1 is $(8.4 \pm 2.0) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. The observed small intercept (k_1) is ascribed to the back reaction with the excess chloride present in solution to prevent the spontaneous hydrolysis of the complex.

If we compare the reactivity of the investigated complex with already published results, it could be seen that the order of reactivity of Pt(IV) complexes toward the biologically relevant nucleophile 5'-GMP is $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})] > [\text{PtCl}_4(\text{en})] > [\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ [22]. The substitution behavior for $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ depends on the π -acceptor properties of the inert ligand 2,2'-bipyridyl. As a result of these properties, there is an increase in electrophilicity of the platinum center and reactivity toward entering nucleophile (5'-GMP). The slightly greater reactivity of $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ complex than $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ could be explained by comparing the structures of inert ligands ethylenediamine and *trans*-1,2-diaminocyclohexane [22]. A major influence on the reactivity of $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ is steric hindrance, while in the case of $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ the most important influence arises from electronic effects.

Fig. 3 ^1H NMR spectra of the reaction between 10 mM dichloro **Pt3** complex and 20 mM 5'-GMP at pD = 6.7 and 22 °C (where * is the H1' signal of free 5'-GMP, while + is the H1' signal of coordinated 5'-GMP)



Reactions of $[\{\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,2\text{-bis}(4\text{-pyridyl})\text{ethane})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**) complex with 5'-GMP

^1H NMR spectroscopy was used to investigate the substitution reactions of dinuclear Pt(II) complex $[\{\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,2\text{-bis}(4\text{-pyridyl})\text{ethane})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**) with 5'-GMP in

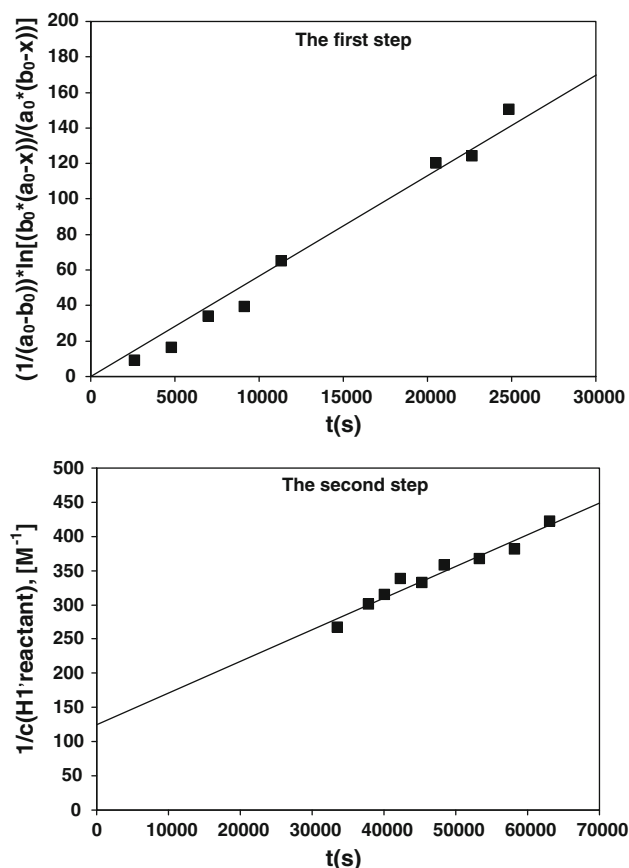


Fig. 4 Second-order plot for the reaction of the dichloro **Pt3** complex (10 mM) with 5'-GMP (20 mM). The y-axis represents the right-hand side term of Eq. 2 and 3 at pD = 6.7 and 22 °C

aqueous solution at pD 6.7 and 22 °C. The substitution kinetics was studied under second-order conditions, with an initial molar ratio of 1:2 (complex:5'-GMP). Considering that the initial concentrations of 5'-GMP and the complex, c_{a0} and c_{b0} , respectively, can be expressed by $c_{a0} \neq c_{b0}$, we applied Eq. 2 for the first reaction step in order to determine k . The concentration of the 1:1 product, that is, singly substituted complex, is represented by x . The concentration x is calculated considering the area of the signals for free 5'-GMP and coordinated 5'-GMP (estimated error is 5 %, Electronic supplementary material, Table 2S).

$$kt = \frac{1}{c_{a0} - c_{b0}} \ln \frac{c_{b0}(c_{a0} - x)}{c_{a0}(c_{b0} - x)} \quad (2)$$

The integral of the singlet of the H8 proton in 5'-GMP was unavailable to measure because there was a multiplicity of product signals, and we therefore used the intensity of the doublet of the H1' proton of 5'-GMP (see Fig. 3). The intensity of the signal for the free 5'-GMP at 5.90 ppm decreases during the reaction, whereas at the same time a signal for coordinated 5'-GMP appears around 6.05 ppm and increases with time (Fig. 3). A plot of the right side of Eq. 2 versus reaction time resulted in a straight line passing through the origin (see Fig. 4). The value of the second-order rate constant k , when one 5'-GMP molecule is coordinated, was obtained from the slope and is $(5.7 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The value for the rate constant for the second substitution process (k_2) could be determined from Eq. 3. A plot of $1/c_a$ versus time gives a straight line, from which the value for the rate constant k_2 results from the slope and the intercept is $1/c_{a0}$ (see Fig. 4). We obtained very similar values for the rate constants of both substitution steps. For the second substitution step, the obtained value of k_2 is $(4.60 \pm 0.02) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

$$\frac{1}{c_a} = \frac{1}{c_{a0}} + k_2 t \quad (3)$$

The value of k , obtained for the substitution of the first chloride by 5'-GMP investigated by ^1H NMR spectroscopy, is smaller than the value obtained from UV–Vis spectrophotometry [24]. The difference between the rate constants is a consequence of temperature effects (37 °C during UV–Vis measurements) and also of slightly different pH compared to pH^* ($\text{pD} = \text{pH} + 0.4$). The pH^* changed from 7.2 to 6.7 during the reaction [24]. The rate constant k_2 is the same order of magnitude as the value obtained for the second substitution step, investigated by UV–Vis spectrophotometry [24]. The two Pt(II) centers in $[\{\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-1,2-bis(4-pyridyl)ethane})](\text{ClO}_4)_2$ (Pt3) complex act completely independent of each other and show the same thermodynamic and kinetic properties. The obtained values are in agreement with literature data for the related dinuclear platinum(II) complexes [35].

Cytotoxic activity of platinum complexes

We compared the cytotoxic capacity of these platinum complexes toward TOV21G, HCT116 tumor human cell lines, and human MSC, normally dividing cells rapidly (Fig. 5).

All the complexes displayed a dose-dependent and time-dependent cytotoxicity toward the tested cell lines, but the highest cytotoxic effect was shown toward TOV21G cells (Fig. 5). The complex $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ at lower concentrations induced significantly higher cytotoxic effect toward TOV21G cells than the other four complexes.

HCT116 cells were more resistant to cytotoxic effects of the selected complexes (Fig. 5). Again, $[\text{PtCl}_4(\text{dach})]$ was the most efficient and exerted very similar activity toward HCT116 cells as cisplatin.

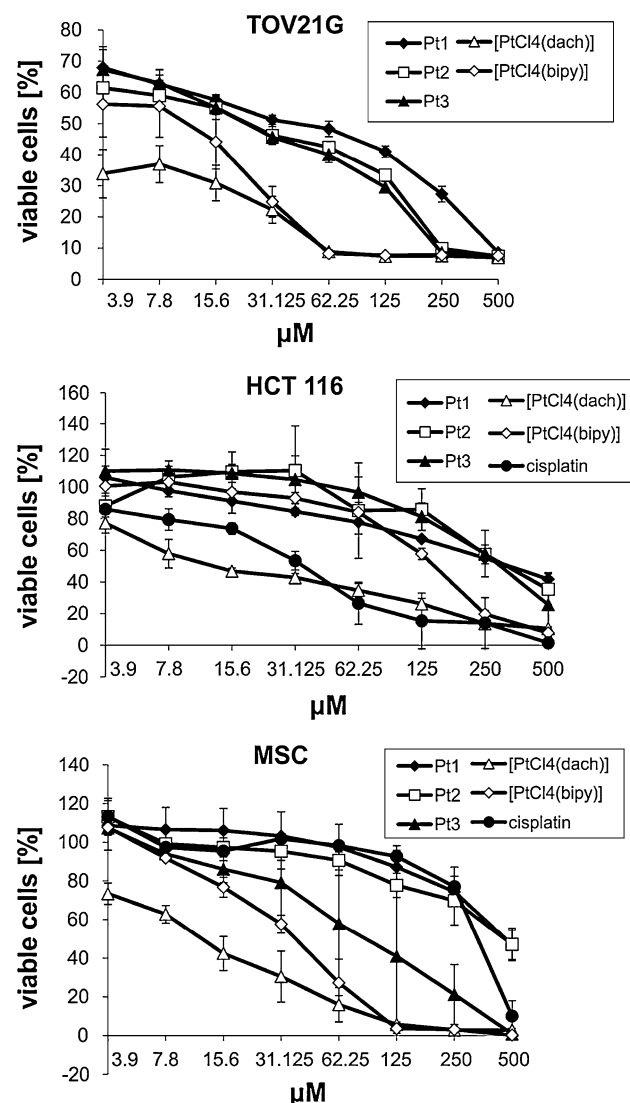


Fig. 5 Cytotoxic activity of tested complexes measured by MTT test (Mean \pm SE)

The complexes **Pt2** and **Pt3** displayed cytotoxicity toward MSC similar to cisplatin, but the other three complexes **Pt1**, [PtCl₄(dach)], and [PtCl₄(bipy)] were more toxic.

The cytotoxicities of a series of Pt(IV) complexes such as [PtCl₂(OH)₂(en)], [PtCl₂(OH)₂(ipa)], [PtCl₂(OCOCH₃)₂(en)], [PtCl₄(en)], and [PtCl₄(dach)] were studied toward L1210/0 cell line. The highest cytotoxicity toward this cell line is shown by [PtCl₄(dach)], and it decreases in the order: [PtCl₄(dach)] > [PtCl₄(en)] > [PtCl₂(OCOCH₃)₂(en)] > [PtCl₂(OH)₂(ipa)] > [PtCl₂(OH)₂(en)] [27]. Satraplatin (JM-216), which is structurally similar to our investigated Pt(IV) complexes, shows a high cytotoxicity toward ovarium carcinoma cell line [36]. The cytotoxicity of our [PtCl₄(dach)] complex is very similar to the cytotoxicities of previously investigated Pt(IV) complexes [27].

The dinuclear azine-bridged Pt(II) complexes, for example, [{*cis*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-pyrazine)](NO₃)₂, [{*cis*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-pyridazine)](NO₃)₂ show significant cytotoxicity for the ovarium carcinoma cell line and a lower cytotoxicity toward colon cancer cell line, compared to cisplatin [23].

A new chiral ligand, 2-(((1R,2R)-2-aminocyclohexyl)amino)acetic acid (HL), was designed and synthesized to prepare a series of novel dinuclear Pt(II) complexes with dicarboxylates or sulfate as bridges. All compounds showed antitumor activity to HCT116 very close to the activity of oxaliplatin and better than our the dinuclear Pt(II) complexes [36]. Also, dinuclear Pt(II) complex, [{*cis*-Pt{NH₃}₂Cl]₂(μ-4,4'-methylendianiline)](NO₃)₂, is highly cytotoxic against the murine leukemia (P-388) and the human non-small-cell lung cancer (A-549) cell lines, and it is more cytotoxic than cisplatin at most concentrations tested [37].

Conclusion

The substitution reaction of the [PtCl₄(dach)] complex with 5'-GMP is a slow process and followed by fast reduction of Pt(IV) to Pt(II) complexes. The obtained rate constant, k_2 , is comparable with those obtained earlier with similar Pt(IV) complexes [22].

However, the substitution reactions of the investigated dinuclear [{*trans*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(μ-1,2-bis(4-pyridyl)ethane)](ClO₄)₂ (**Pt3**) complex with 5'-GMP proceeds via two reaction steps. The first step is substitution of one chloride by 5'-GMP ($5.7 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), while the second step is substitution of another one ($4.60 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Both rate constants are very similar.

All tested complexes displayed cytotoxic activity against TOV21G cell line, with lower activity toward HCT116 at the same concentrations. The complex [PtCl₄(dach)] at lower

concentrations induced significantly higher cytotoxic effect toward TOV21G cells than the other four complexes.

These results could contribute to better understanding of the interactions of Pt(IV) complexes with some biologically important nucleophiles and their antitumor activity.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Science and Technological Development, Republic of Serbia (Project No.172011 and No.175069).

References

- Rosenberg B, van Camp L, Krigas T (1965) Nature 205:698–699
- Rosenberg B, van Camp L, Trosko JE, Mansour VH (1969) Nature 222:385–386
- Ash DC (1980) J Clin Hematol Oncol 10:55–62
- Chu GJ (1994) Biol Chem 269:787–790
- Lippert B (1999) Cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. Wiley-VCH, New York
- Jamieson ER, Lippard SJ (1999) Chem Rev 99:2467–2498
- Reedijk J (1999) Chem Rev 99:2499–2510
- Wong E, Giandomenico CM (1999) Chem Rev 99:2451–2466
- Von Hof DD, Schilsky R, Reichert CM, Reddick RL, Rozencweig M, Young RC, Muggia FM (1979) Cancer Treat Rep 63:1527–1531
- Arendse MJ, Anderson GK, Majola RN, Rath NP (2002) Inorg Chim Acta 340:65–69
- Jakubec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK (2008) Dalton Trans 183–194
- Jung Y, Lippard SJ (2007) Chem Rev 107:1387–1407
- Talman EG, Kidani Y, Mohrmann L, Reedijk J (1998) Inorg Chim Acta 283:251–255
- Lemma K, House DA, Retta N, Elding LI (2002) Inorg Chim Acta 331:98–108
- Esposito BP, Najjar R (2002) Coord Chem Rev 232:137–149
- Farrell N (1995) Comments Inorg Chem 16:373–389
- Reedijk J (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:3611–3616
- McGregor TD, Balcarova Z, Qu Y, Tran M.-C, Zaludova R, Brabec V, Farrell N (1999) J Inorg Biochem 77:43–46
- Kraker AJ, Hoeschele JD, Elliott WL, Showalter HDH, Sercel AD, Farrell NP (1992) J Med Chem 35:4526–4532
- Perego P, Caserini C, Gatti L, Carenini N, Romanelli S, Supino R, Colangelo D, Viano I, Leone R, Spinelli S, Pezzoni G, Manzotti C, Farrell N, Zunino F (1999) Mol Pharmacol 55:528–534
- Farrell N (2004) In: Sigel A, Sigel H (eds) Metal ions in biological systems, New York. Basel Marcel Dekker Inc, New York, pp 251–296
- Jovanović S, Petrović B, Bugarčić ŽD (2010) J Coord Chem 63:2419–2430
- Komeda S, Kalayda GV, Lutz M, Spek AL, Yamanaka Y, Sato T, Chikuma M, Reedijk J (2003) J Med Chem 46:1210–1219
- Soldatović T, Jovanović S, Bugarčić ŽD, van Eldik R (2012) Dalton Trans 41:876–884
- Choi S, Mahalingaiah S, Delaney S, Neale NR, Masood S (1999) Inorg Chem 38:800–1805
- Choi S, Vastag L, Larrabee JC, Personick ML, Schaberg KB, Fowler BJ, Sandwick RK, Rawji G (2008) Inorg Chem 47:1352–1360
- Choi S, Filotto C, Bisanzo M, Delaney S, Lagasee D, Whitworth JL, Jusko A, Li C, Wood NA, Willingham J, Schwenker A, Spaulding K (1998) Inorg Chem 37:2500–2504

28. Choi S, Cooley RB, Voutchkova A, Leung CH, Vastag L, Knowles DE (2005) *J Am Chem Soc* 127:1773–1781
29. Choi S, Vastag L, Leung CH, Beard AM, Knowles DE, Larrabee JA (2006) *Inorg Chem* 45:10108–10114
30. Summa N, Schiessl W, Puchta R, Eikema Hommes N, van Eldik R (2006) *Inorg Chem* 45:2948–2959
31. Arpalahti J, Lehtikoinen P (1990) *Inorg Chem* 29:2564–2567
32. Arpalahti J, Lippert B (1990) *Inorg Chem* 29:104–110
33. Martin RB (1999) In: Lippert B (ed) *Cisplatin, chemistry and biochemistry of leading antitumor drugs*. Wiley-VCH, Zurich, pp 193–200
34. Shourky M, van Eldik R (1996) *J Chem Soc Dalton Trans* 2673–2678
35. Ertürk H, Maigut J, Puchta R, van Eldik R (2008) *Dalton Trans* 2759–2766
36. Boulikas T, Pantos A (2007) *Cancer Ther* 5:537–583
37. Damin F, Xiaoliang Y, Xiaoyong W, Shouchun Z, Jiafei M, Jian D, Liping L, Zijian G (2007) *J Biol Inorg Chem* 12:655–665