

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi kar
Szervetlen és analitikai kémiai tanszék



TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**A DNS kölcsönhatása potenciális gyógyszermolekulákkal, valamint azok
réz(II)-, és cink(II)-komplexeivel**

KÉSZÍTETTE:

Krekuska Hajnalka

Vegyész Msc. , I. évfolyam

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi adjunktus

Matyuska Ferenc, PhD hallgató

Szeged, 2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezető	1
2. Célkitűzés	3
3. Irodalmi összefoglaló	4
3.1 A réz(II)-FSA-Pydime komplexképződéséről	4
3.2 Az EtBr – DNS kölcsönhatásról	6
3.3 Ligandumkompetíciós vizsgálatok	9
3.4 A Zn(II)-komplexek kölcsönhatása a DNS-sel	12
3.5 Cu(II)-szalicilát komplexek élettani hatása	13
4. Kísérleti módszerek és eszközök	16
4.1 Potenciometria	16
4.2 Spektrofotometria	16
4.3 Fluoreszcencia spektroszkópia (fluorimetria)	17
4.4 Plazmid transzformálása kompetens sejtekbe	18
4.5 Plazmid tisztítása Qiagen maxi kittel	19
4.6 Gélelektroforézis és EMSA	19
4.7 PCR: avagy polimeráz láncreakció	21
5. Kísérleti eredmények és értékelés	23
5.1 Potenciometria	23
5.2 Spektrofotometria	26
5.3 Fluorimetria	28
5.4 Elektromobilitás eltolódási vizsgálatok	37
6. Összefoglalás	41
7. Irodalomjegyzék	42

1. Bevezető

Az elmúlt évtizedekben a gyógyszerkutatás új irányt vett, és fokozott hangsúly került a hatás optimalizációjára, a már használt gyógyszermolekulák tökéletesítésére pl. szubsztituensek beépítésével vagy kicserélésével, a hatóanyag-molekulák komplexálásával [1-8], vagy izomerizációval.

Már az ókori görögök, és tőlük függetlenül az amerikai indiánok is használták a fűzfa leveleiből és barkájából készített főzetet fejfájás gyógyítására, valamint általános láz- és fájdalomcsillapító szerként. Ezt a hatóanyagot először Johann Buchner izolálta a fűzfa barkájából, és a szalicilsav nevet Raffael Piria adta a vegyületnek, az azt tartalmazó növény, a fűzfa latin neve (Salix) után.

Ennek acetilált származékát később a Bayer cég ASPIRIN néven hozta forgalomba. Ezt a szert a mai napig is sikeresen és nagy mennyiségben alkalmazzák a gyógyászatban. Azonban a néhány esetben fellépő aszpirinreizisztencia, és az a tény, hogy a szalicilsav más szubsztituált származékai, pl. halogeno-, nitro- vagy amino-származékok, jobb hatásfokkal bírnak, további kutatásokat von maga után.

Szintén évszázadok óta ismert a réz(II)-ionok reuma elleni hatása is, ami arra ösztönözte a kutatókat, hogy ezen ionok reuma elleni szerekekkel képzett komplexeinek biológiai aktivitását vizsgálják. Ezek, és hasonló vizsgálatok során arra az általános megállapításra jutottak, hogy a gyógyszerek fémkomplexei hatékonyabbak a gyógyászatban, mint maguk a gyógyszermolekulák.

Azt is kimutatták már, hogy az Aspirin réz(II)komplexének gyulladáscsökkentő, rákellenes és egyéb kedvező hatásai vannak, illetve feltételezik, hogy az aktív komplex *in vivo* is kialakul [9-11]. További lehetőséget nyújt a negatív töltés kompenzációjára a pozitív töltésű egyéb molekulákkal történő asszociátum-képződés. Alkalmasak lehetnek erre pl. a piridinszármazékok, melyek maguk is rendelkeznek gyógyhatással.

A hatékonyabb szerek utáni kutatások során a szalicilsav különböző halogénezett, ill. amino- vagy nitrocsoporthoz tartozó származékait is vizsgálták. Mivel a fluor számos igen hatásos gyógyszermolekulában megtalálható, a szalicilsav különböző fluorozott származékai is érdeklődésre tartanak számot. Kutatócsoportunk ezért a Szlovák Műszaki Egyetem Szervetlen Kémiai Tanszékével közösen már korábban is tanulmányozta fluoro-szalicilsav származékok réz(II)ionnal képzett biner [12,13], illetve és réz(II)ionokkal és piridinszármazékokkal kialakított terner rendszereit [14,15]. Az utóbbi vizsgálatok alapján

megállapítást nyert, hogy a fluoro-szalicilsavak és a piridinszármazékok kölcsönösen elősegítik egymás fémion-koordinációját [15].

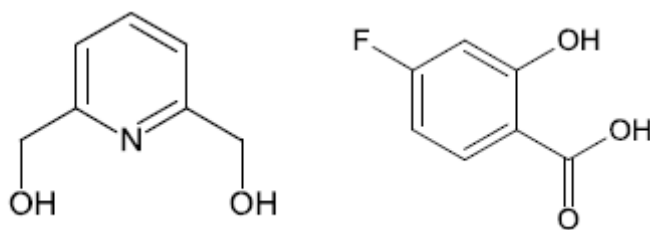
A biológiailag aktív komplexek közül az elmúlt évtizedben fokozott figyelem irányult a réz- és cink komplexekre, ugyanis mind a különböző metalloproteinekben, mint az élő szervezetben ezek a leggyakrabban előforduló nyomelemek[16]. Ezen felül a cink számos komplexéről megállapították, hogy igen változatos módon képesek a DNS-hez kötődni [17],[18].

A réz(II) szalicilsav származékokkal alkotott komplexei sikeresen használhatók gyulladás, fekély és cukorbetegség esetén, de antimutagén és radioprotektív hatásuk is van.

Habár a réz alapú nem szteroid szerkezetű gyulladásellenes szerek pontos hatásmechanizmusa nem ismert minden részletében, sok minden utal arra, hogy ez a prosztaglandin szintézis inhibícióján alapul, és a ciklooxygenáz izoenzimkomplexen keresztül megy végbe, valamint kapcsolatban állhat a szuperoxid-dizmutáció, a nitrogén oxid szintáz és immunbiológiai folyamatok szabályozásával, mely biológiai folyamatokban a cink (II)ionok is kiemelt szereppel bírnak.

2. Célkitűzés

Már a bevezetőben említettem, hogy a réz(II) szalicilsavszármazékokkal alkotott komplexeiről megállapították, hogy az mutációt gátló hatással bír. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy olyan szalicilsavszármazékok, mint a 4-fluoroszalicilsav (továbbiakban 4FSA) és a 2,6-bisz-hidroximetil-piridin (továbbiakban pydime) képesek-e a DNS-sel kölcsönhatásba lépni, és hogy ezen molekulák komplexálása réz(II), illetve cink(II) ionokkal befolyásolja-e ezt a kölcsönhatást.



1. ábra: A 2,6-bisz-hidroximetil-piridin (pydime), és a 4-fluoroszalicilsav (4FSA) szerkezete

Ennek érdekében a következő vizsgálatokat terveztük:

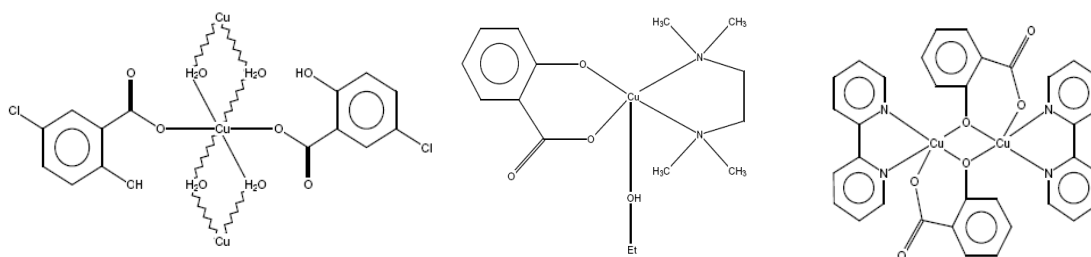
1. A Zn-pydime, Zn-4FSA biner, illetve Zn-pydime-4FSA terner rendszerek oldategysúlyi vizsgálata
2. Spektrofotometriás titrálások
3. A DNS – gyógyszermolekula kölcsönhatás vizsgálata fluorimetriás módszerrel az etídium-bromid kiszorításán keresztül.
4. Géleltolódási vizsgálatok a fenti kölcsönhatás esetleges szerkezeti vonatkozásainak felderítésére.
5. Az eredmények értelmezése

3. Irodalmi összefoglaló

3.1 A réz(II)-FSA-Pydimine komplexképződéséről

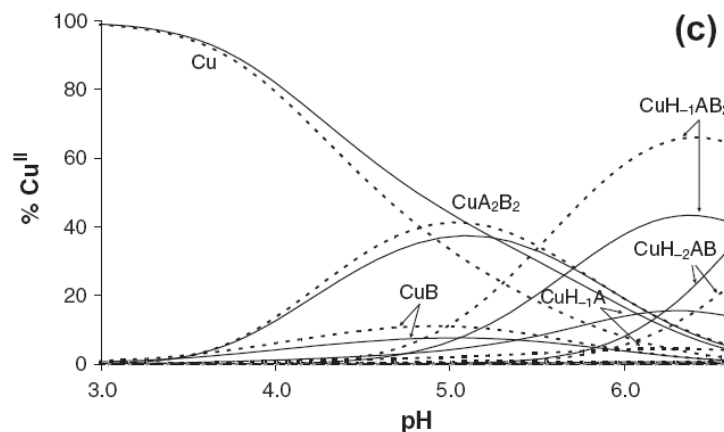
A hatékonyabb gyógyszerek keresése során számos szalicilsav származékot vizsgáltak, köztük annak fluorozott származékait is. Tanszékünkön a Szlovák Műszaki Egyetem Szervetlen kémiai tanszékével közösen tanulmányozták a fluoroszalicilsav-származékok réz(II) ionnal és piridinszármazékokkal alkotott terner rendszereit [14], [19]. Vizsgálataik során arra a megállapításra jutottak, hogy a fluoroszalicilsavak és piridinszármazékok kölcsönösen elősegítik egymás fémion-koordinációját.

A szalicilsav és származékainak réz(II)komplexeiről az irodalomban és a krisztallográfiai adatbázisokban több mint száz kristályszerkezetet található, melyek bemutatják, hogy a szalicilsav koordinációja igen változatos lehet a körülmények, és az esetleges második ligandum minőségétől függően. Az 2. ábra néhány példát mutat egyfogú karboxilát, a karboxilát és a fenolát részvételével kialakuló kelát, illetve fenoláthidas réz(II)komplexekre.



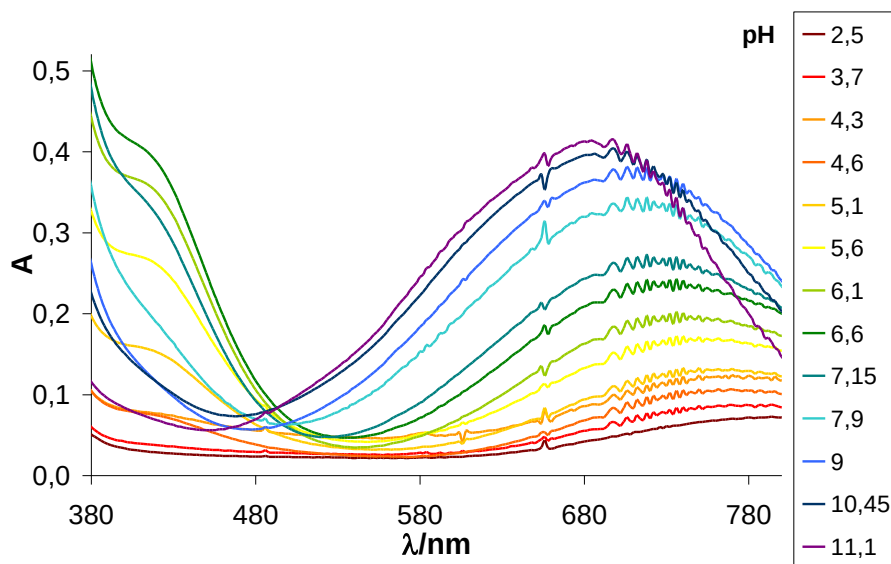
2. ábra: Példák a szalicilsav és származékainak különböző koordinációs módjaira a réz(II)komplexekben: egyfogú karboxilát (balra – [20]), kelát (középen – [21]) és fenoláthidas komplex (jobbra – [22])

A pH potenciometriás mérések során meghatározták a domináns képződő komplexek összetételét és képződési állandóit, melyek segítségével részecskeeloszlási diagramokat készítettek (3. ábra). Ezeken jól látszik, hogy a mérhető pH tartományban a terner részecskék jelenléte szignifikáns.



3. ábra: A réz(II) – 5-fluoro-szalicilsav – 3-hidroximetil-piridin (pyme) rendszer részecskeeloszlási diagramja (Cu:5-FSA:pyme = 1:2:2 (telt vonal), Cu: 5-FSA:pyme = 1:2:4 (szaggatott vonal), $c_{\text{Cu(II)}} = 6,0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$; $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, NaClO_4 ; $T = 298 \text{ K}$. - [22])

Mivel azonban pl. a CuB és CuAB komplexek egymásba alakulása nem mindig jár protonátmenettel, az ilyen komplexek pH-metriásan nehezen elkülöníthetők. A részecskeeloszlás pontosítására így más mérési módszereket is alkalmazni kellett. Ilyen módszer lehet az UV-VIS spektroszkópia és az ESR spektroszkópia, mivel a réz(II)-ionok tartalmaznak párosítatlan elektronokat.



4. ábra: UV-látható abszorpciós spektrumok. $n(\text{Cu(II)}):n(5\text{FSA}):n(\text{pydime}) = 1:2:2$,
 $T_{\text{Cu}} \sim 1\text{mM}$ [1]

A 4. ábrán látható spektrumok alapján megállapítható, hogy $\text{pH} \sim 5$ alatt a pydime koordinálódik erősebben a réz(II)ionhoz, ugyanis ilyen pH-n a fluoro-szalicilsav

karboxilcsoportjával, a pydime pedig piridines nitrogénjével és alkoholos –OH csoportjaival tud koordinatív kötést kialakítani a réz(II) ionokkal, és a N erősebb koordinatív kötést tud kialakítani, mint a karboxilcsoport, és a pydime esetén kelát is képződhet. A pH ~ 5-7 tartományban a fluoroszalicilsav fenolos –OH csoportja deprotonálódva erősebb koordinációs kötést tud kialakítani a réz(II)ionnal, mint a pydime, de az nem egyértelmű, hogy ilyenkor a fluoroszalicilsav kiszorítja-e a pydime-t a réz koordinációs szférájából, vagy terner komplex képződik. Kb. 7-es pH felett ismét a pydime foglalja el a réz(II)ion koordinációs helyeit, ugyanis amint a pydime alkoholos –OH csoportja deprotonálódik, az képes részben vagy egészben kiszorítani a fluoro-szalicilsavat a koordinációs szférából. Tehát pH-t változtatva a koordinációs szférában a ligandumok fluktuációja történik. Ez azért érdekes jelenség, mert a terner rendszerek többségében savas közegben az egyik, lúgosban pedig főként a másik ligandum koordinálódik a fémionhoz.

Ezeket a megfigyeléseket ESR spektrumokkal is alátámasztották. Ezenkívül azt is megfigyelték, hogy pH~6,8 körül olyan vonalak is megjelentek, melyek semmilyen biner rendszerben nem figyelhetők meg, tehát arra következtettek, hogy terner rendszer van jelen az oldatban.

3.2 Az EtBr – DNS kölcsönhatásról

Az etidium-bromidot széles körben alkalmazzák a molekuláris biológiában DNS molekulák jelölésére, mind sáveltolódás, mind fluoreszcencia vizsgálatokhoz, ugyanis az etidium-bromid olyan fluoreszcens festék, amely képes a DNS kettős szála közé beékelődni, és ilyenkor a fluoreszcens intenzitása 20-100-szoros növekedést mutat. Az emittált fény fluorimetriásan mérhető [23]. Az így mért intenzitás (I_{obs}) tulajdonképp a DNS-be beékelődött (I_b) és a szabad (I_f) EtBr fluoreszcens intenzitásainak az összege.

$$I_{obs} = I_b + I_f$$

Mivel mindkét intenzitás arányos a koncentrációval:

$$I_{obs} = k_b c_b + k_f (c_{tot} - c_b),$$

ahol k_b és k_f arányossági tényezők kísérletileg meghatározhatóak. Innen c_b is meghatározható:

$$c_b = \frac{I_{obs} - k_f c_{tot}}{k_b - k_f}$$

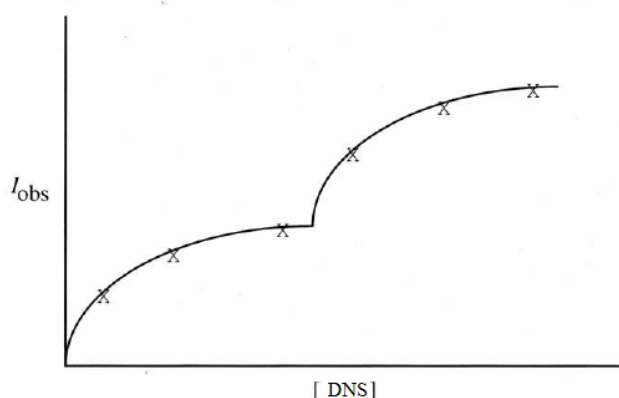
Miután ismert a kötött etídium koncentrációja, a kötődés a Scatchard-egyenlettel [24] írható le:

$$\frac{r}{c_f} = nK - rK$$

Ahol c_f a szabad festék koncentrációja, r a kötött festékmolekulák és a DNS bázispárok koncentráció-hányadosa, n az r maximuma és K a kötődési állandó.

A k_f -et tiszta etídium-bromid hígítási sorának fluorimetriás mérése során tudjuk meghatározni.

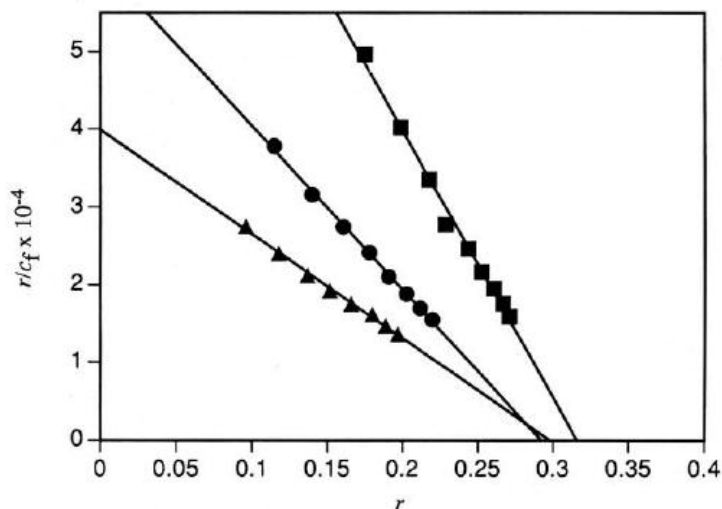
A k_b úgy határozható meg, hogy az előbbi hígítási sorunknak megfelelő legkisebb töménységű etídium-bromid oldathoz DNS-t adagolunk. Az intenzitásukat mérve telítési görbét kapunk. Miután az intenzitás nem nő tovább, újabb adag etídium-bromidot adunk az oldathoz, és ismét addig adagoljuk a DNS-t amíg a görbe nem telítődik újra (5. ábra). Ha ábrázoljuk a telítésnél kapott intenzitást az etídiumion koncentrációjának függvényében, egy egyenest kell kapnunk, aminek a meredeksége k_b .



5. ábra: Az EtBr oldat kétszeri telítése DNS-sel [23]

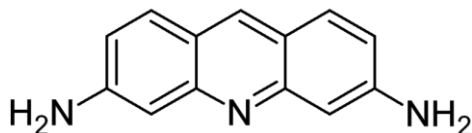
Az így megkapott k_f és k_b értékekből és c_{tot} -ból a c_b kiszámítható, majd ebből a c_f is. Az r a DNS koncentrációból, és a DNS további adataiból számítható ki. Miután kiszámítottuk a c_f -et és c_b -t, és ismerjük a DNS-bázispár koncentrációt, ábrázolni tudjuk az r/c_f -et r függvényében. Az így kapott egyenes meredeksége $-K$, és az y tengelymetszete nK (6.

ábra). Ezen érték a vizsgált DNS-etídiium komplexre az ábra alapján a kötődési állandó $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ -nek, n értéke pedig 0,32nek bizonyult.



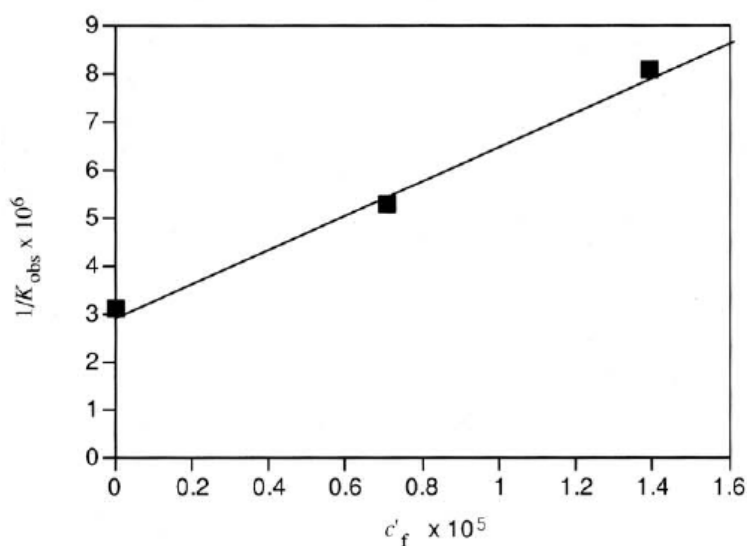
6. ábra: Az etídiium DNS-hez való kötődésének Scatchard-pontjai proflavin jelenléte nélkül (■), $7 \times 10^{-6} \text{ M}$ -os proflavin koncentráció mellett (●), és $1,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ -os proflavin koncentráció mellett (▲). [23]

Inhibítorként különböző koncentrációjú proflavint (7. ábra) alkalmazva és a fluoreszcenciát mérve, megkapjuk az inhibítorra jellemző K_{obs} -értéket. $1/K_{\text{obs}}$ -t ábrázolva a c_f függvényében egy olyan egyenest kapunk, melynek a meredeksége K'/K , és tengelymetszete $1/K$ (8. ábra).



7. ábra: A proflavin szerkezete

$$K_{\text{obs}} = \frac{K}{1 + K'c'_f} \quad \text{és} \quad \frac{1}{K_{\text{obs}}} = \left(\frac{K'}{K} \right) c'_f + \frac{1}{K}$$

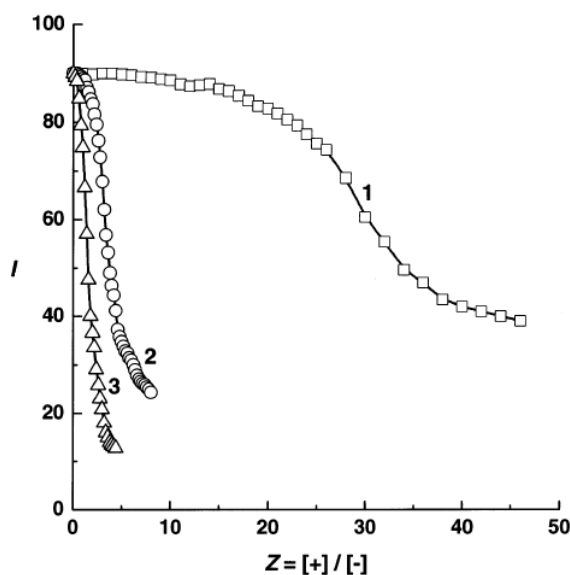


8. ábra: Az etídium mért kötődési állandói különböző proflavin koncentrációk mellett [23]

Így ki tudjuk számolni az inhibitor kötődési állandóját, és ellenőrizni tudjuk az etídium-ion kötési állandóját.

3.3 Ligandumkompetíciós vizsgálatok

Az EtBr kiszorítását a DNS kettős szálból számos tényező befolyásolhatja. Kationos felületaktív anyagokkal végzett mérések mutatják ezt meg [25].



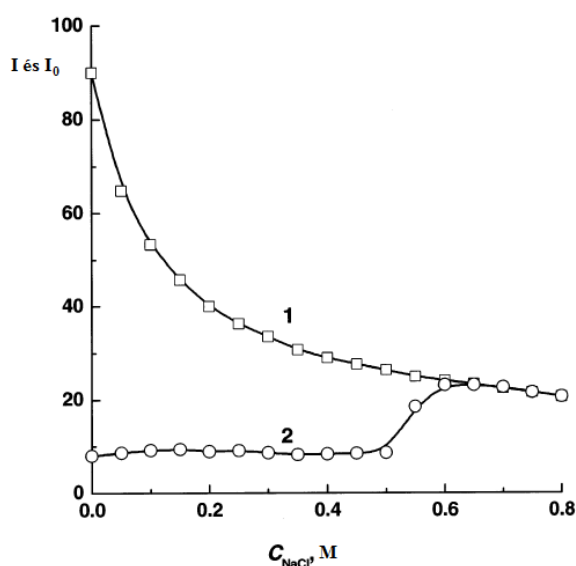
9. ábra: Az I változása különböző alkil-metil ammónium bromidokkal titrált DNS-Et komplexek esetén, állandó Z [+]/[-], [P] = 4×10^{-5} M, [EtBr]/[P] = 0,25; 0,02 M CHES, pH=9,0; T=25 °C. $C_{12}N^+Me_3Br^-$ (1), $C_{14}N^+MeBr^-$ (2) és $C_{16}N^+MeBr^-$ (3) [25]

A 9. ábra görbéiből jól látszik, hogy a szénlánc növekedésével nő a felületaktív anyag és a DNS kölcsönhatásának az erőssége. Ezt a mérést piridínium tartalmú felületaktív anyagokkal is elvégezték, és ugyanezt kapták

Ha ugyanezeket a változó DNS-koncentráció függvényében mérték, a nagyobb DNS-koncentrációk esetén hamarabb észlelték átcsapást.

Ezután vizsgálták a kölcsönhatás ionerősség-függését (10. ábra). Az ionerősség növekedésével a DNS-Et komplex stabilitása nőtt, de csökkent a fluoreszcens jel intenzitása. Ennek az az oka, hogy a DNS-Et komplex nagyobb ionerősségnél stabilisabb, és a gerjesztett állapot félélettartama csökken.

Ha ehhez a rendszerhez kationos felületaktív anyagot adunk, a jelintenzitás egy adott koncentráció eléréséig nem változik, majd egybeolvad az előző görbével, azaz a DNS-CS komplex elbomlik, és csak DNS-Et komplex marad a rendszerben.



10. ábra: A DNS-Et komplex I_0 és a DNS-Et- $C_{16}N^+Me_3Br^-$ I fluoreszcens intenzitása a NaCl koncentráció függvényében.

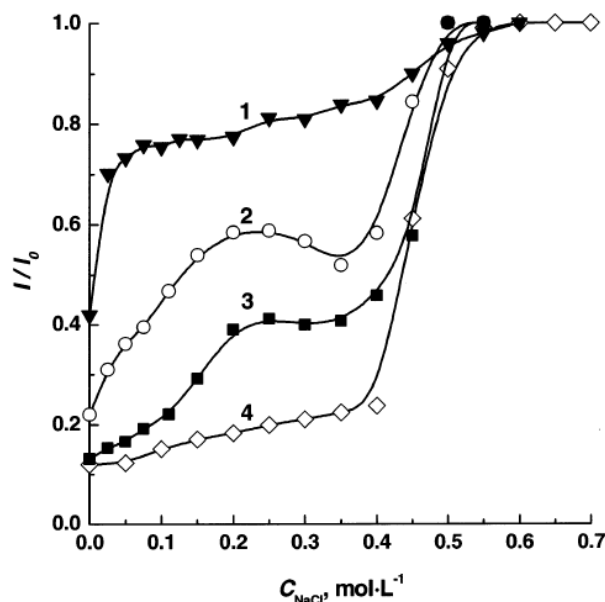
$Z=10$, $P=2 \times 10^{-5}$ M, minden más paraméter a 9. ábrával egyezik meg. [25]

Ebből látszik, hogy a DNS-CS komplex kis ionerősségnél stabil, de az ionerősség növekedésével csökken a stabilitása.

Ha I/I_0 -t ábrázoljuk a NaCl koncentráció függvényében, egy éles átcsapást láthatunk, ami azt mutatja, hogy a DNS-CS bomlása és a DNS-Et képződés kooperatív (10. ábra).

Ezt megvizsgálták különböző hosszúságú szénláncokat tartalmazó alkil-metil-ammonium-bromidokkal, és azt találták, hogy a rövidebb szénlánc esetén nem kooperatív a folyamat, de a szénlánc növekedésével azzá válik.

A bomlás kooperatív voltát az amin koncentráció DNS foszfátkoncentrációhoz való aránya is befolyásolja. Ezt mutatja be a 11. ábra.



11. ábra: A DNS-EtBr+C₁₄N+Me₃Br- keverék relatív fluoreszcens intenzitásváltozása a NaCl koncentráció függvényében, mikor Z=5 (1), 10 (2), 12 (3), 15(4) és [P]=2×10⁻⁵ M. minden más paraméter a 9. ábrával egyezik meg. [25]

Látható, hogy kis aminkoncentrációnál a bomlás nem volt kooperatív, majd az aminkoncentráció növekedésével egyre inkább azzá vált, a 4. sz. görbén már igen éles átsapás látható.

Ennek a magyarázata, hogy a DNS-CS komplex akkor jön létre, ha a CS koncentrációja nagyobb a kritikus aggregációs koncentrációnál (CAC), viszont az ionerősség növekedésével a CAC is nő. A komplex akkor bomlik, amikor a CAC = c(CS). Ha ez nagy ionerősségnél valósul meg, akkor az Et azonnal stabilan odaköt, így kooperatív lesz a bomlás.

Vizsgálták a különböző rendűségű aminok komplexeinek a bomlását is, az ionerősség függvényében. Az átsapás mindenhol éles volt, és először a kvaterner amin majd a tercier, a szekunder és végül a primer amin átsapását észlelték. A kvaterner amin esetén nem, volt kooperatív a folyamat, a többi esetben viszont igen. Az átsapás függ a pH-tól is, növelve a pH-t, az átsapás élesebb lett.

Ugyanezt megmérték polimetakrilát-dodecilamin keverékekben is. Az aminocsoport rendűsége itt is ugyanúgy befolyásolta az átcsapást. A pH növelése ebben az esetben korábbi átcsapást eredményezett.

Összességében elmondható, hogy a DNS-CS komplexek létrejöttét és stabilitását, mind a pH, mind az ionerősség, de az anyagok szerkezeti tulajdonságai is befolyásolják.

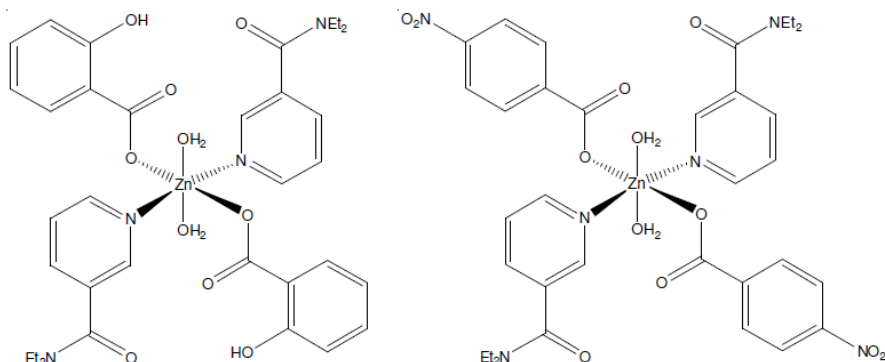
3.4 A Zn(II)-komplexek kölcsönhatása a DNS-sel

A biológiailag aktív komplexek közül az elmúlt évtizedben fokozott figyelem irányult a réz- és cink komplexekre, ugyanis mind a különböző metalloproteinekben, mint az élő szervezetben ezek a leggyakrabban előforduló nyomelemek. Ezen felül a cink számos komplexéről megállapították, hogy igen változatos módon képesek a DNS-hez kötődni [17][18].

Pl. a cink(II)-neotrien komplexek a DNS kettős hélixbe képesek beékelődni, amit spektrofotometriásan, és fluorimetrisan bizonyítottak. Kinetikai mérésekkel igazolták, hogy az interkaláció kétlépédes mechanizmussal zajlik [17].

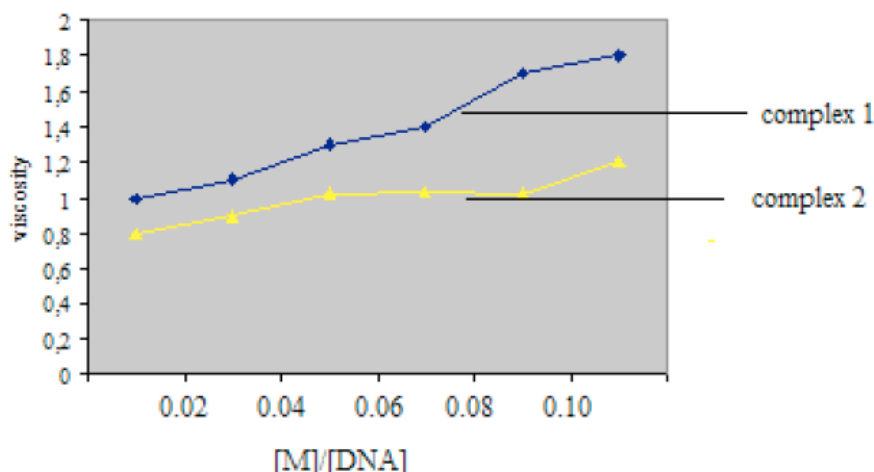
Kationos komplexek, mint pl. a Zn-oktametil-piridil-porfirazin komplex, esetén viszont a DNS-hez külső kötődés is előfordulhat, melyet fotometriás mérésekkel igazoltak [18]. Ebben az esetben a pozitív töltésű komplexek negatív töltésű cukor-foszfát gerinchez elektrosztatikusan kötődnek.

Az általunk tanulmányozott komplexekhez igen hasonló cink-diakvabisz(N,N-dietilénnikotinamid)bisz(szaliciláto) és diakvabisz(N,N-dietilnikotinamid)bisz(4-nitrobenzoáto) komplexekről is bebizonyították már, hogy képesek a DNS kettős spirálba ékelődni.



12. ábra: A $[Zn(C_7H_5O_3)_2(C_{10}H_{14}N_2O)_2(H_2O)_2]$ (1-es komplex) és $[Zn(C_7H_5O_3)_2(4-O_2NC_6H_4COO)_2(OH_2)_2]$ (2-es komplex) szerkezete [26]

Ezt viszkozimetriás mérésekkel igazolták, melyek azon alapultak, hogy a komplexek beékelődésének következtében a DNS egy nyújtottabb szerkezetet vesz fel, és emiatt az oldat viszkozitása megnő [26] (13. ábra).

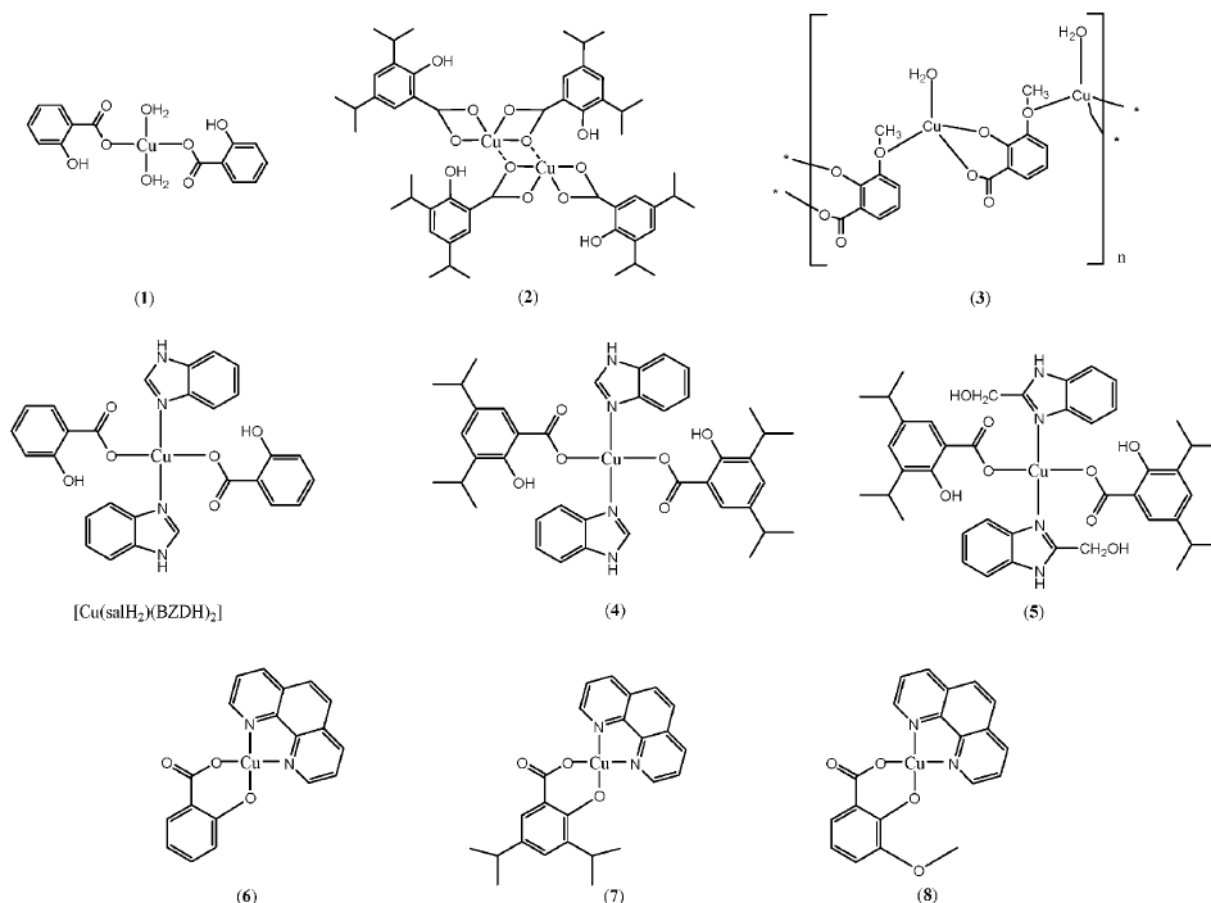


13. ábra: A hozzáadott cink komplexek hatása a DNS viszkozitására, ahol [M] a komplex koncentrációját jelöli [26]

3.5. A Cu(II)-szalicilát komplexek élettani hatásai

Sok rákos sejtvonal, mint pl. a petefészek adenokarcinóma (SK-OV-3) sejtek rezisztensek a tumornekrozis faktorokra és egyes citotoxikus gyógyszerekre, mint pl. a ciszplatinnra. Ezen felül megjegyzendő, hogy a vastagbél adenokarcinóma ciszplatinnal való kezelése nehezen kivitelezhető. Ezért a kutatók figyelme olyan fémion tartalmú komplexekre terelődött, melyek potenciálisan hatásosak lehetnek a ráksejtek elpusztításában.

A téma aktualitását mutatja, hogy egy frissen megjelent publikációban (2012. március) [27], melynek témája a TDK dolgozatomban témájához hasonló, a $[\text{Cu}(\text{salH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (1), $[\text{Cu}(\text{dipsH})_2(\text{H}_2\text{O})]$ (2), $\{\text{Cu}(\text{3-MeOsAl})(\text{H}_2\text{O})_{0,75}\}_n$ (3), $[\text{Cu}(\text{dipsH})_2(\text{BZDH})_2]$ (4), $[\text{Cu}(\text{dipsH})_2(\text{MeOHBZDH})_2] \cdot \text{EtOH}$ (5), $[\text{Cu}(\text{sal})(\text{phen})]$ (6), $[\text{Cu}(\text{dips})(\text{phen})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (7), $[\text{Cu}(\text{3-MeOsAl})(\text{phen})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8) (3-MeOsAlH₂ = 3-metoxi-szalicilsav, 2-MeOHBZDH = 2-metanol-benzimidazol) komplexek citotoxikus tulajdonságait a ciszplatinnal összehasonlítva vizsgálták, humán rákos sejtvonalakon (mellrák (MCF-7), prosztatarák (DU145), petefészekrák (SK-OV-3) és vastagbélrák (HT29)).



14. ábra: Az 1-8 komplexek és a [Cu(salH₂)₂(BZDH)₂] [27]

Azt tapasztalták, hogy 24 óra eltelté után az 1-5 komplexek csak 100 μ M-nál nagyobb koncentrációban voltak hatásosak, és a szabad réz(II) ion sem bizonyult citotoxikusnak 100 μ M koncentráció alatt. 96 óra után a 2,4 és 5-ös komplexek közepes aktivitást mutatnak a mell-, prosztata- és vastagbélrák sejtek ellen. Ezzel ellentétben a 6-8 komplexek már 24 óra után is citotoxicitást mutatnak μ M koncentrációban, amely aktivitás 96 óra elteltével jelentősen nő, minden sejtvonalon. Ezek a komplexek még a ciszplatin-rezisztens petefészekrák sejtekben is hatékonyak voltak, ami arra utal, hogy ezen komplexek más hatásmechanizmussal működnek, mint a ciszplatin. Azt is bebizonyították, hogy a fémmentes fenantrolin *in vitro* apoptózist indukál a p53-at nem expresszáló sejtvonalakban. A fenantrolin a 6-8 komplexekkel ellentétben 24 óra után kismértékű citotoxicitást mutat, ami arra utal, hogy a komplexek hatásmechanizmusa más, mint a fenantroliné. Megfigyelték továbbá, hogy az 1-5 komplexek nem képesek a DNS-sel kölcsönhatásba lépni, szemben a síkalkatú fenantrolin ligandumot tartalmazó 6-8 komplexekkel. Megjegyzendő, hogy a 3,5-diizopropilszalicilát aniont tartalmazó 7-es komplex, kevésbé hat kölcsön a DNS-sel, valószínűleg szterikus okok miatt, és 24 óra után

ez mutat a legkisebb citotoxikus aktivitást a 6-8 komplexek közül, így valószínűsíthető, hogy e DNS-hez való kötődés és a citotoxikus aktivitás között van kapcsolat. Ezen kívül a réz(II) nélküli fenantrolin nem okozott fluoreszcencia intenzitás csökkenést, a DNS-EtBr oldat fluoreszcens vizsgálata során, tehát nem távolítja el az EtBr-ot a DNS-ből.

4. Kísérleti módszerek és eszközök

4.1 Potenciometria

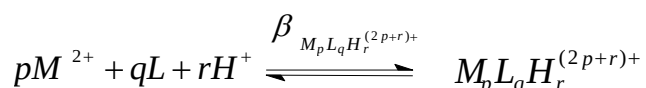
Az oldatbeli egyensúlyi vizsgálatokhoz, a protonálódási és komplexképződési állandók meghatározásához potenciometriás módszert alkalmaztam.

A titrálásokat $298 \pm 0,11$ K-en, argon atmoszféra alatt végeztem Metrohm Dosimat 665 automata burettával. Az ionerősséget $0,1 \text{ mol/dm}^3$ NaClO_4 oldattal tartottuk állandó értéken. A mérések kezdetén az oldatok kémhatását ismert koncentrációjú HClO_4 mérőoldattal állítottam be $\text{pH} \sim 2$ körüli értékre, majd ismert koncentrációjú NaOH mérőoldattal $\text{pH} \sim 11$ -ig folytattam a titrálásokat. A ligandumkoncentráció a Zn-pydimine és Zn-4FSA biner rendszerek esetén rendre 4 mM és 2 mM volt, míg a cink-pydimine-4FSA terner rendszer vizsgálatakor $1-1 \text{ mM}$ volt, a cink koncentráció pedig a fém-ligandum arány függvényében változott.

A potenciálértékeket egy Orion 710A pH-mérő és egy Orion gyártmányú kombinált üvegelektrod segítségével regisztráltuk. Az elektród kalibrálására $0,01 \text{ M}$ -os perklórsav-oldatot használtam. Az így nyert adatsorokat a KALGRAN számítógépes programmal értékeltem ki, a módosított négyparaméteres Nernst-egyenlet [28] segítségével:

$$E = E_0 + K \cdot \log[H^+] + J_H \cdot [H^+] + \frac{J_{OH} \cdot K_w}{[H^+]}$$

ahol az ismert paraméterek mellett a J_H és J_{OH} az üvegelektrod savas illetve lúgos hibájának, valamint a folyadék–folyadék határfelületi potenciálból adódó hibáknak a korrekciójára szolgáló illesztési paraméterek, és $K_w = 10^{-13,75} \text{ mol/dm}^3$ [29]. Az elektród kalibrációja során $0,010 \text{ mol/dm}^3$ perklórsavoldatot titráltam $0,101 \text{ mol/dm}^3$ NaOH törzsoldattal $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ ionerősségnél. A protonálódási és stabilitási állandók számítása a PSEQUAD [30] programmal történt. Az így számított bruttó egyensúlyi állandók a következő általánosított egyensúlyi reakcióra vonatkoznak:



4.2 Spektrofotometria

Az UV-Vis spektroszkópia alapelve, hogy az oldatmintában $200-800 \text{ nm}$ hullámhossz-tartományba eső sugárzás hatására az oldatbeli molekulák vegyértékelektronjai magasabb energiájú pályákra gerjesztődnek.

Amikor egy anyag vizes oldatának fényelnyelését ábrázoljuk a besugárzó fény energiájának (hullámhosszának) függvényében, az ún. abszorpciós spektrumot kapjuk. Az abszorpciós spektrum mind minőségi, mind mennyiségi információkat hordoz, emiatt az analitikai kémia egyik leggyakrabban használt módszere [31]. Ha besugárzunk egy oldatot egy I_0 intenzitású, adott hullámhosszúságú (monokromatikus) fénysugárral, annak intenzitása a fény abszorpciója miatt lecsökken I -re. A fényelnyelést egy mértékegység nélküli mennyiség, az abszorbancia jellemzi, ami definíció szerint:

$$A = \lg(I/I_0)$$

Tekintsünk egy olyan oldatot, amelyben csak egyfajta fényt abszorbeáló anyag van jelen. Az anyag koncentrációja (c) és az adott λ hullámhosszúságú sugárzásra mért abszorbancia (A) közötti összefüggést a Lambert-Beer törvény írja le, amely szerint:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Ahol c az oldat koncentrációja, l a kűvetta hossza és ε a moláris abszorbancia, mely egy anyagi minőségtől függő állandó.

Az UV-Vis spektrumokat egy Unicam HELIOS α típusú, kétutas spektrofotométen vettem fel, 1 cm-es hosszúságú teflondugós kvarekűvettában. A spektrofotometriás titrálásaim pontonkénti mérések sorozatából állnak, melynek során savas pH-któl kezdve, $\sim 0,5$ pH egységenként, kellő mennyiségű oldatrészletet a mérőcellába kimérve vettük fel az oldatok abszorpciós spektrumát a 200-400 nm-es hullámhossztartományban, ugyanis se a fémnek, se a ligandumoknak, se a komplexeknek nincs a látható hullámhossztartományban elnyelésük. A ligandumkoncentráció pydime esetén 0,05 mM, 4FSA esetén 0,025 mM, a cink koncentrációja pedig a megfelelő ligandumkoncentráció fele volt.

4.3 Fluoreszcencia spektroszkópia (fluorimetria)

Fluoreszcenciának azt a jelenséget nevezzük, amikor egy anyag fényt nyel el egy bizonyos hullámhosszon, és majdnem egy időben egy kisebb hullámhosszúságú fényt emittál. Ez a tulajdonság szelektív és érzékeny mérésekre ad lehetőséget, ugyanis mind az abszorpciós, mind az emissziós csúcs az adott anyagra jellemző. A fluoreszcens spektrum a gerjesztés hatására bekövetkező fluoreszcens emisszió intenzitásának a hullámhossztól való függését ábrázolja.

A fluoriméter részei:

- fényforrás (ívlámpák, gázkisülésű csövek (Higany, Xenon), lézerek)
- mintát tartalmazó kűvetta
- emittált fényt felbontó monokromátor

- fotodetektor
- jelfeldolgozó egység

A mérés alapelve, hogy a mintát tartalmazó kvarcküvettát egy megadott hullámhosszágú gerjesztő fénnel besugározzuk, majd a detektoron mérjük az emittált fény intenzitását, és ezek alapján felvesszük a spektrumot. A mért fluoreszcens intenzitás függ a besugárzó fény intenzitásától, az abszorpciótól és a minta koncentrációjától. Ezek alapján felírhatjuk a következő összefüggést:

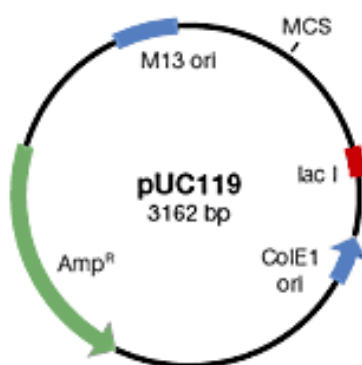
$$I = k \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c,$$

ahol c a minta koncentrációja, ε az elnyelés (besugárzás) hullámhosszán érvényes moláris extinkciós koefficiens, I_0 a besugárzó monokromatikus fény intenzitása, k pedig egy arányossági tényező, ami a küvettára és a műszerre jellemző állandókat és a vizsgálandó vegyület kvantumhasznosítását foglalja magába.

Méréseimet Hitachi-F4500 fluoriméterrel 490 nm-es gerjesztési hullámhosszon 950 V-os PMT feszültségen 510-710 nm-es emissziós hullámhosszon mértem, szobahőmérsékleten, 1cm-es oldalhosszú küvettában.

4.4 Plazmid transzformálása kompetens sejtekbe

A kísérlet célja pUC 119 plazmid bejutatása volt DH10B kompetens sejtekbe, majd telepek növesztése ampicillin-tartalmú táptalajon, ugyanis a pUC119 plazmid ampicillin rezisztencia gént tartalmaz, így a transzformánsok szelektíven tenyészthetők.



15. ábra: A pUC119 plazmid szerkezete

A transzformálást a következő módon hajtottam végre:

- 30 μ l jégen tárolt DH10B kompetens sejthez 1,5 μ l plazmidot adtam, a szuszpenziót pipettaheggyel kevertem, majd a sejteket további 10 percre jégen inkubáltam.
- Ezután 2 percre 42 °C-on előmelegített asztali inkubátorban rázattam.

- A következő lépésben az eppendorf csövet, ami a szuszpenzót tartalmazta, azonnal visszatettem a jégre, és ott 30 percig inkubáltam.

- Az inkubációs idő letelte után 150 µl LB tápoldatot adtam hozzá és 45 percen keresztül, 37 °C-on rázattam. Ezután a mintából 30 µl-t kikentem ampicillin-tartalmú LB táptalajra. Az így elkészült lemezemet egy éjszakán át 38 °C-on inkubáltam, és másnapra kinőttek a telepeim. Ezek egyikét LB tápoldatba oltottam át, hogy ott felszaporítsam, és így kinyerhessem belőle a plazmid DNS-t.

4.5 Plazmid tisztítás Qiagen maxi kittel

Még a munkamenet megkezdése előtt ellenőriztem, hogy a P1 puffer tartalmazza-e már az RNáz A-t és a LyseBlue indikátort, valamint ellenőriztem a P2 puffert, hogy csapadékos-e. A P3 puffert hűtőben tároltuk, így nem kellett előhűteni.

Ezután a már előzőleg felszaporított és lecentrifugált baktériumsejteket felszuszpendáltam 10 ml P1 pufferben, majd hozzáadtam 10 ml P2 puffert, és miután összekevertem 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután 10 ml hűtött P3 puffert adtam hozzá, majd keverés után 20 percig jégen inkubáltam. A következő lépésben 4°C-ra előhűtött centrifugában 13500 rpm-en 30 percig centrifugáltam, majd eltávolítottam a plazmid DNS-t tartalmazó felülúszót, amit ugyanilyen körülmények között 15 percig centrifugáltam, majd ennek a felülúszóját is eltávolítottam. Ezt vittem fel a 10 ml QBT pufferrel egyensúlyba hozott oszlopra, és miután a DNS a gyantán megkötődött 2x30 ml QC pufferrel mostam, majd 15 ml QF pufferrel eluáltam. Az eluált DNS-t 10,5 ml szobahőmérsékletű izopropanollal csaptam ki, majd összekevertem, és 13500 rpm-en és 4°C-on 30 percig centrifugáltam, majd a felülúszót óvatosan leöntöttem. Az így kapott DNS csapadékot 5 ml szobahőmérsékletű 70%-os etanollal mostam, és 13500 rpm-en 10 percig centrifugáltam, majd a felülúszót ismét leöntöttem, vigyázva, hogy az üledéket meg ne zavarjam. Az üledéket levegőn szárítottam, majd TE-oldatban feloldottam.

4.6 Gélelektroforézis és EMSA

A gélelektroforézis igen elterjedt molekuláris biológiai vizsgálmódszer. Alapelve az, hogy a töltéssel rendelkező makromolekulák a gélben az ellentétes töltésű elektród felé vándorolnak. A vándorlás sebessége függ a molekula össztöltésétől, tömegétől, az elektromos térerőtől, valamint a molekula alakjától függő súrlódási együtthatótól. Ez alapján a következő képlet írható fel:

$$v = \frac{E \cdot z}{f}$$

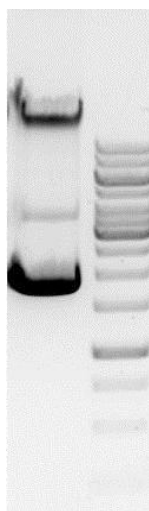
ahol v a vándorlás sebessége, z a molekula töltése, E az elektromos térerősség és f az adott anyagra jellemző állandó, ami függ a molekulatölegetől, a molekula alakjától, és súrlódási együtthatójától.

A makromolekulák futtatásához olyan porózus gélt célszerű használni, amellyel az adott makromolekula nem lép reakcióba, és amely egyben molekulaszűrőként is funkcionál, így a nagyobb molekulák lassabban, a kisebbek gyorsabban haladnak a gélben. [32]

A DNS mintáim vizsgálatára 1%-os agaróz gélt használtam, amit a következő módon állítottam elő: 120 ml desztillált vízbe 1,2 g agarózt mértem be, majd addig melegítettem, amíg az agaróz teljesen fel nem oldódott. Ezután megvártam, amíg 50 °C alá hűlt, majd hozzáadtam 2,4 ml 50-szeres koncentrációjú TAE puffert és 120 µl 500 µg/ml koncentrációjú EtBr-ot. Ezután buborékmentesen kiöntöttem és megvártam amíg megszilárdul.

A módszert a tisztított plazmid DNS-tartalmának ellenőrzésére alkalmaztam, majd a későbbiekben PCR termékek sáveltolódás analíziséhez, valamint a réz(II)- illetve cink(II) komplexek a DNS szerkezetére gyakorolt hatásának vizsgálatára. Ez utóbbi mérések esetén viszont a TAE helyett 50-szeres koncentrációjú Tris puffert alkalmaztam, hogy kiküszöböljem az EDTA kölcsönhatását a fémionokkal.

A 16. ábra a Qiagen tippel tisztított DNS mintám ellenőrző futtatásának eredménye látható.



16. ábra: A 3126 bp méretű pUC119 plazmid DNS ellenőrző futtatása 1%-os agaróz gélen. A jobb oldali zsebben 5 µl marker, a bal oldaliban 5 µl DNS minta található,

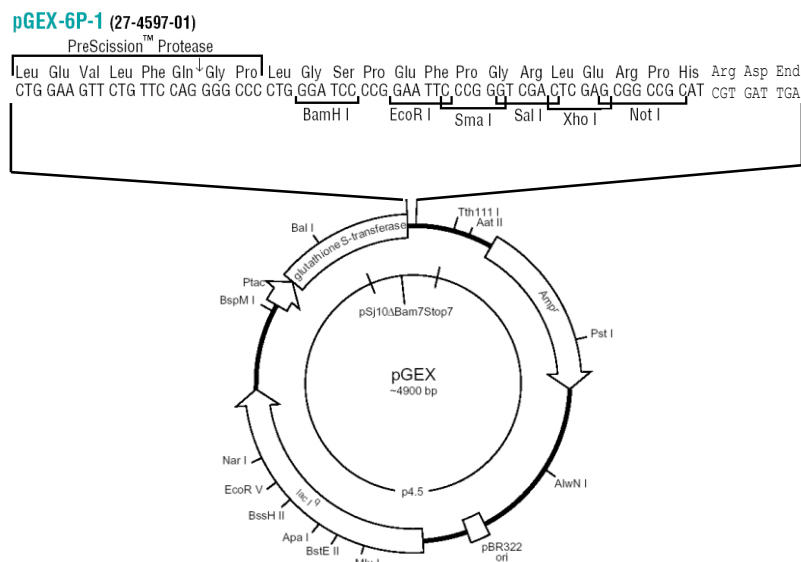
Az EMSA vagy sáveltolódás olyan általánosan elterjedt módszer, ami makromolekulák kölcsönhatásának tanulmányozására alkalmas, és azon alapul, hogy az egymáshoz kötődött makromolekulák a nagyobb tömegük miatt kisebb távolságra fognak futni mint a komponens kontroll.

4.7 PCR: avagy polimeráz láncreakció

A módszer célja tetszőleges DNS darabok felszaporítása PCR csőben hőstabil polimerázzal végzett ciklikusan ismételt polimerizációval. A reakcióhoz szükséges egy minta vagy ún. templát DNS, ami tartalmazza a felszaporítandó DNS fragmenst; két 15-20 nukleotid hosszúságú, a DNS mintához hibridizálódni képes egyszálú DNS darab, ún. primer; hőstabil DNS polimeráz; dNTP-k, amiből a DNS lánc szintetizálódhat, és az enzim működéséhez szükséges Mg^{2+} -ionokat tartalmazó puffer.

A reakció a PCR készülékben játszódik le, amelynek az a lényege, hogy a reakciócsöveket egymás után kb. 92, 60, majd 72 °C-ra melegíti/hűti. 92 °C-on a templát DNS denaturálódik. A következő hőmérséklet a primerektől függően változik. Ez az ún. annealing hőmérséklet, amikor a primerek az előzőleg denaturált templát DNS szálakhoz hibridizálódnak, azaz a primerek a templát megfelelő helyére kötődnek. A 72 °C-os hőmérséklet a Taq polimeráz működési optimuma, így ezen a hőmérsékleten a szintézis zajlik, azaz a primerek meghosszabbításával a templát alapján komplementer DNS szálak képződnek.

A PCR reakciót sáveltolódás kísérlethez szükséges 188 bp méretű DNS minta elkészítésének céljából végeztem az ún. rövid pGEX primerekkel pGEX-6P-1 plazmidról. A PCR csőbe 5 µl Mg^{2+} -tartalmú puffert, 5 µl dNTP-elegyet, 2-2 µl 3' és 5' primert, 1 µl templátot, 34,5 µl steril vizet és 0,5 µl Taq polimerázt mértem be.



17. ábra: A pGEX-6P-1 plazmid szerkezete

Ezután a mintát a PCR készülékbe helyeztem, és a következő programon dolgoztam:

- 1.) 98°C, 01:00 perc
- 2.) 98°C, 00:20 perc
- 3.) 63°C, 01:00 perc
- 4.) 72°C, 01:00 perc
- 5.) 30 ciklus a 2. lépéstől
- 6.) 72°C, 04:00 perc
- 7.) 10°C, leállításig

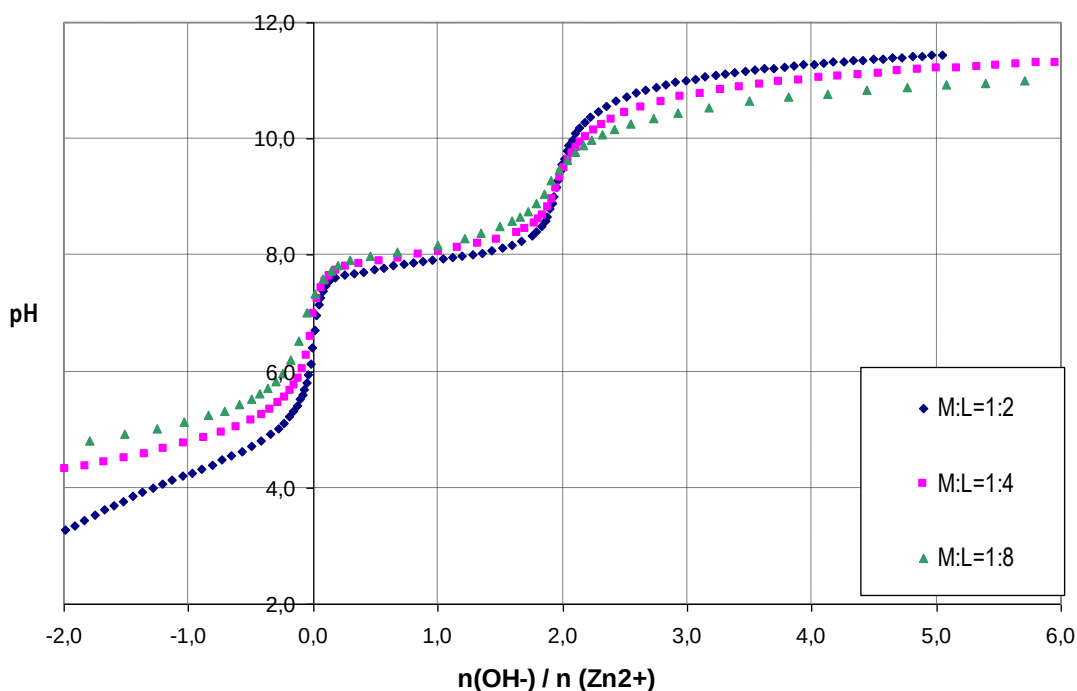
Ezután az elkészült mintát fenol-kloroform eleggyel extraháltam, majd a DNS-t etanollal csaptam ki Na-acetát jelenlétében. Ezek után a további mérésekhez a Tris pufferben oldott mintát használtam.

5. Kísérleti eredmények és értékelés

5.1 Potenciometria

A pydime és a 4-FSA réz(II)-ionokkal képzett biner és terner komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálatát, már korábban elvégezték tanszékünkön, viszont a cink(II)-ionokkal alkotott komplexeikről nem álltak rendelkezésünkre ilyen adatok. Így ez utóbbi rendszerek pH-metriás és UV/látható spektroszkópiás vizsgálatát is elvégeztem, azzal a céllal, hogy tisztázzam, hogy fiziológiás pH tartományban milyen részecskék vannak jelen vizes oldatban.

Méréseimet mindkét biner rendszer esetén 1:2, 1:4 és 1:8 fém-ligandum aránynál végeztem, míg a terner rendszer esetén 1:2:2 és 1:4:4 arányokat használtam.



18. ábra: A Zn-pydimine rendszer normált titrálási görbéi

Titrlásaim során mindkét biner rendszerben 1:2 és 1:4 arányoknál csapadék képződése volt tapasztalható, mely csapadék pydime esetén lúgfeleslegben feloldódott. A csapadékot leszűrve, és azt újra feloldva, majd megtitrálva megállapítottam, hogy ez a csapadék ligandumot nem tartalmazott, tehát Zn(OH)_2 volt. Az FSA titrlása során 1:8 fém-

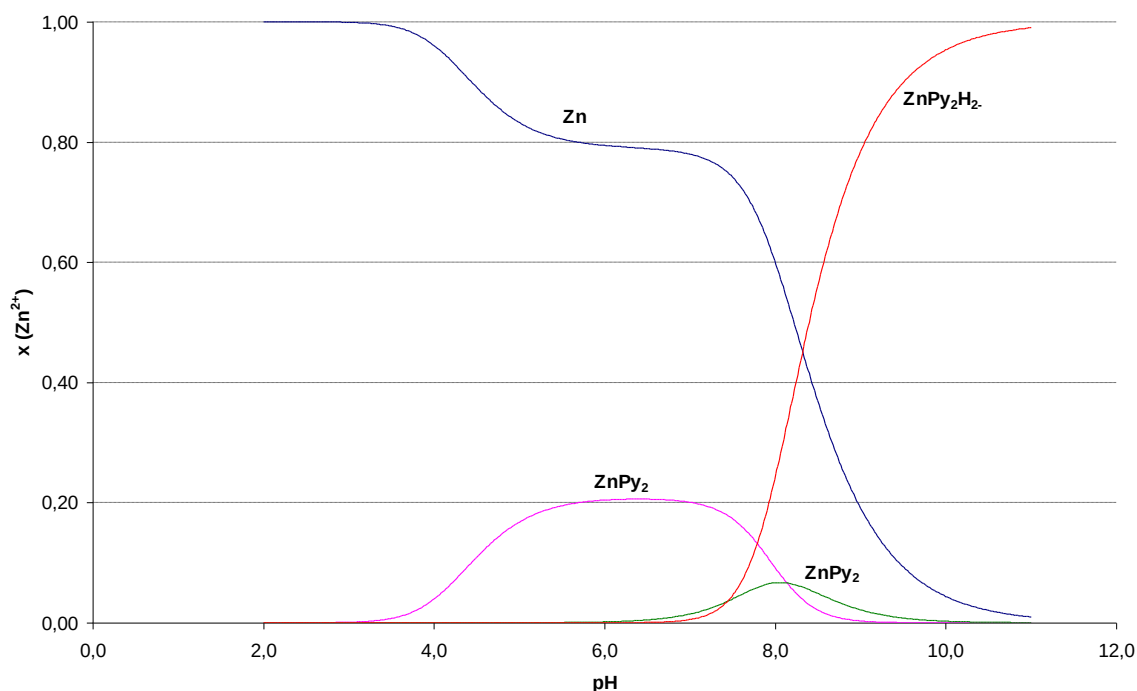
ligandum arányánál is csapadék kiválása volt észlelhető, mely lúgfeleslegben nem oldódott fel.

Méréseim kiértékelése során a mért adatokból pydime esetén normált titrálási görbéket készítettem, melyek a 18. ábrán láthatók. A görbék alapján megállapítható, hogy nagyobb ligandumfelesleg esetén a Zn^{II} hidrolízise magasabb pH-tartományba tolódik, vagyis a ligandum, ha gyengén is, de koordinálódik a cinkionhoz. A csapadék feloldódása viszonylag alacsony pH-n arra utal, hogy deprotonálódva az egyébként gyengén koordinálódó ligandum erősebb kölcsönhatásba lép a fémionnal. A mért adatokból számított stabilitási állandó értékeket az 1. Táblázatban foglaltam össze az ott látható részecskemátrixot használva.

1. Táblázat: A számított bruttó stabilitási állandók (zárójelben az utolsó értékes jegyek bizonytalanságát tüntettem fel)

L=pydime	$\log \beta$
LH	4,32(7)
ML_2	4,23(6)
ML_2H_1	-3,91(6)
ML_2H_2	-11,35(2)

A táblázat alapján a mért rendszerekkel azonos koncentrációkra a HySS [33] nevű program segítségével 1:2 fém ligandum arányú rendszerre a 19. ábrán látható eloszlási diagramot ábrázoltuk.

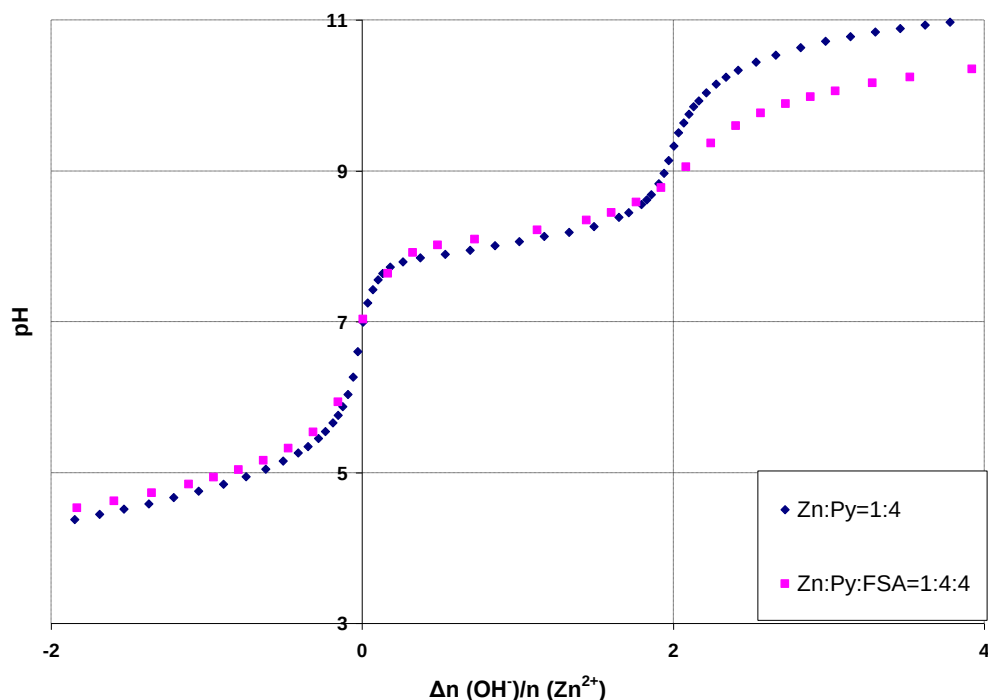


19. ábra: A Zn:pydime = 1:2 rendszerben található részecskék eloszlási diagramja

A 19. ábrán jól látszik, hogy a fémion hozzáadása a ligandum saját deprotonálódását nem tolja el, és a komplexképződés csak a deprotonálódás után kezdődik. Látható továbbá, hogy semleges formában a ligandum igen gyenge komplexképző, ami erősödik deprotonálódás hatására, egészen addig, míg lúgos pH tartományban az ML_2H_2 összetételű részecske dominánsa nem válik. Fiziológiai pH tartományban a szabad cink dominál, a komplexben lévő fém nagy része pedig ML_2 formában van jelen az oldatban.

Az FSA-t összehasonlítva a pydimevel, látható, hogy ez a ligandum jóval gyengébb komplexképző. Méréseim során kiderült, hogy potenciometriásan az esetlegesen képződő komplexek stabilitása nem határozható meg, és igen valószínűtlen a fenolos hidroxil korai deprotonálódása és koordinációja.

A turner rendszer titrálása során már az 1:2:2 arány esetén sem tapasztaltam csapadékkiválást, holott biner rendszereknél 1:4 aránynál mindkét esetben csapadékkiválás volt tapasztalható. Ez arra enged következtetni, hogy a két ligandum elősegíti egymás koordinációját a fémhez.

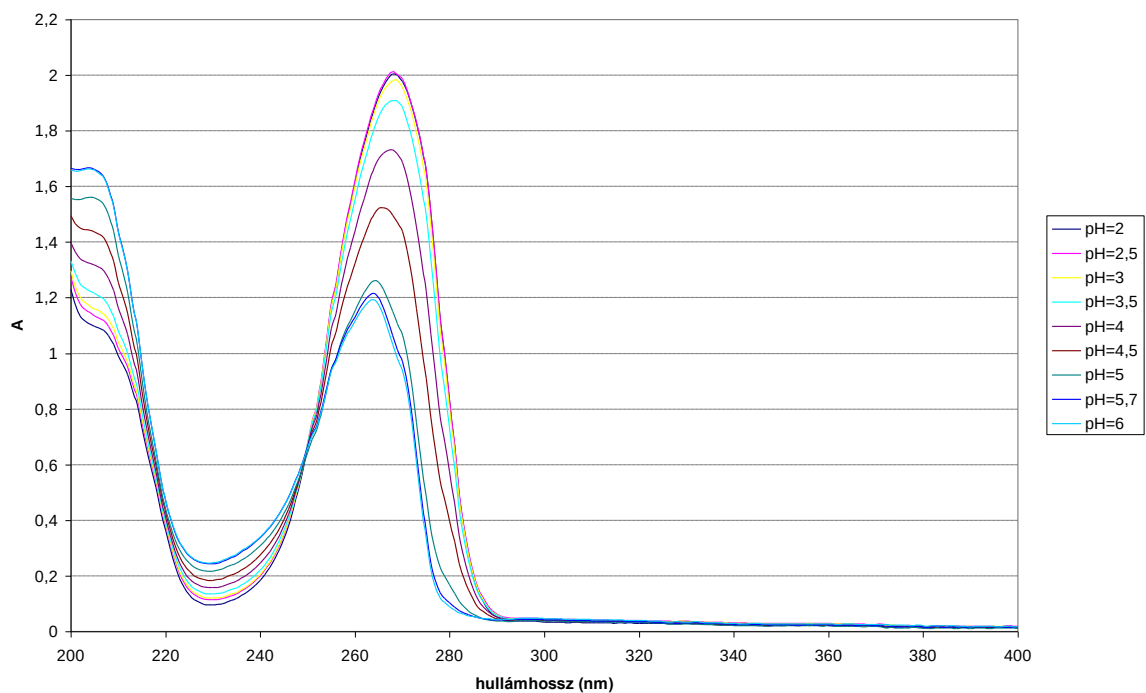


20. ábra: Az 1:4:4= Zn:Py:FSA és 1:4 Zn:Py fém-ligandum arányú rendszerek normált titrálási görbéi

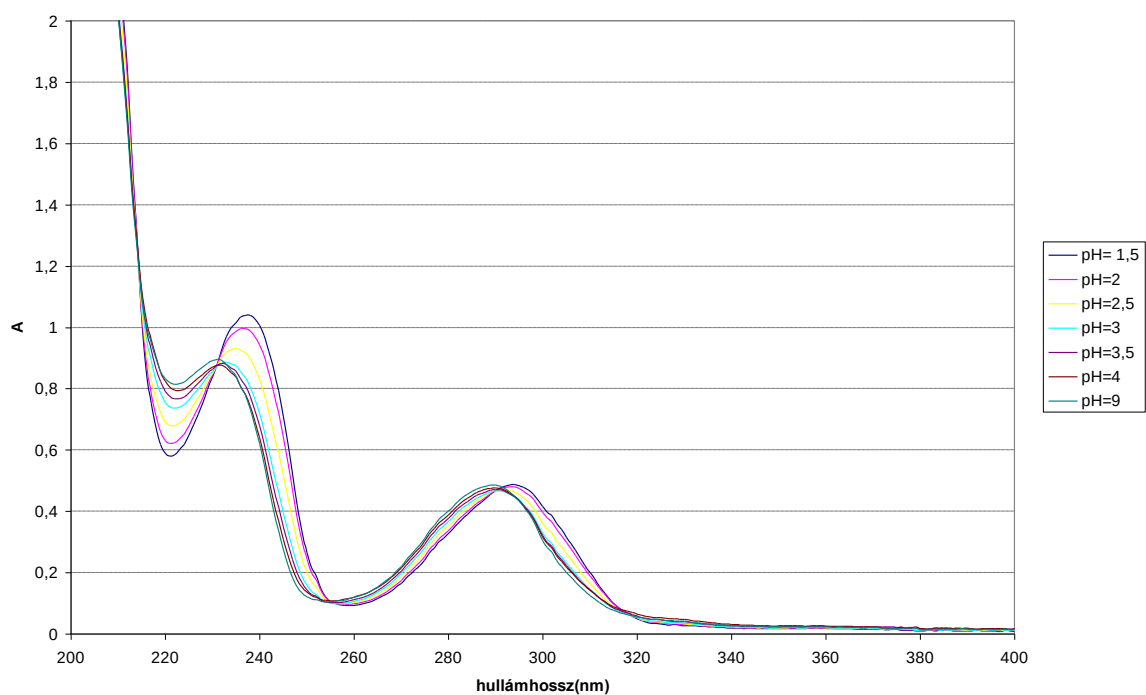
Mivel a 4-FSA igen gyenge komplexképző, ezért a megfelelő molarányú pydime-cink(II) biner- és a pydime-cink(II)-FSA terner rendszerek titrálási görbéi közvetlenül összehasonlíthatók. Ezt példázza a 20. ábra, melyen jól látható, hogy a cinkionok hidrolízise még magasabb pH-tartományba tolódik el, azaz az FSA is koordinálódik a cinkhez. Ezt az is alátámasztja, hogy csapadék a terner rendszerben nem vált ki. Hasonló rendszerekre vonatkozóan rendelkezésünkre állnak az irodalomban kristályszerkezeti adatok is [34][35][36], melyek alapján feltételezhető, hogy itt is MA_2B_2 összetételű komplexek alakulnak ki.

5.2 Spektrofotometria

A potenciometriás mérések eredményeinek megerősítésére spektrofotometriás titrálásokat végeztem. A 21. és 22. ábrákon a ligandumok titrálásai láthatók, melyek megerősítik a potenciometriásan megállapított deprotonálódási állandókat.

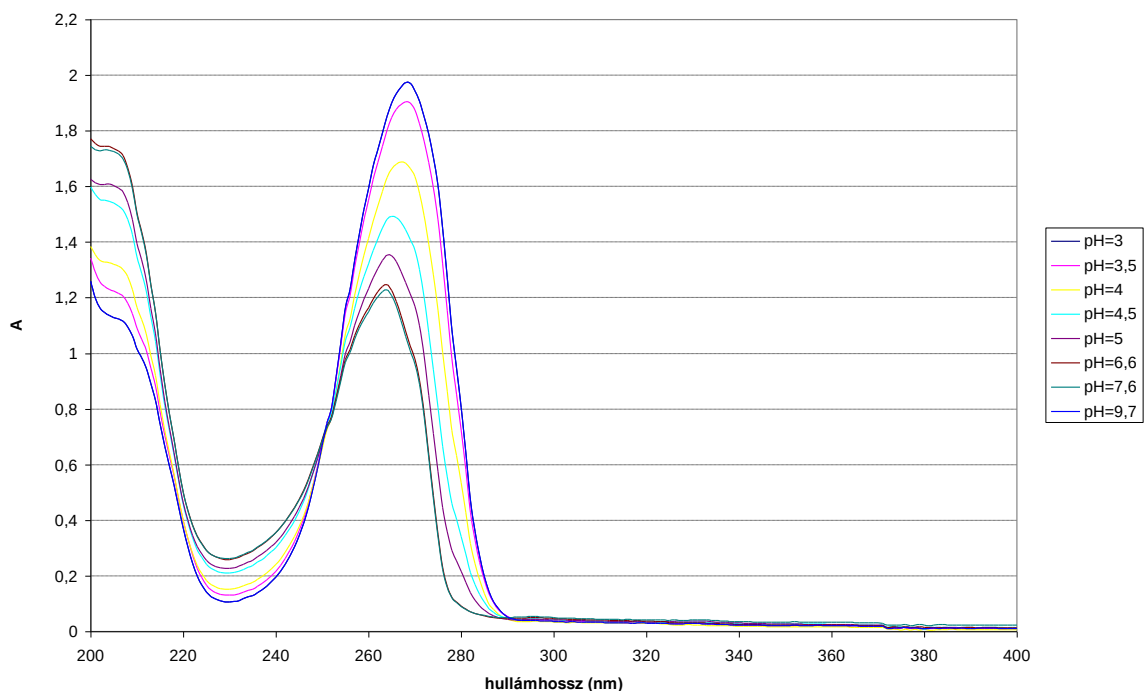


21. ábra: A pydime spektrofotometriás titrálásának spektrumsorozata



22. ábra: Az FSA spektrofotometriás titrálásának spektrumsorozata

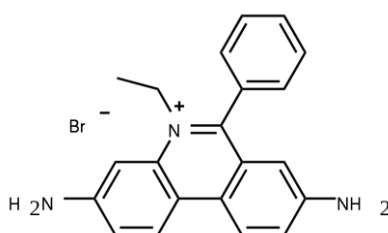
A cink-pydime rendszer spektrofotometriás titrálása során a ligandum titrálásánál tapasztaltakhoz képest - amint az a 23. ábrán is látható -, nem figylehattünk meg spektrális változást, valamint ebben a koncentrációtartományban csapadékkiválás sem történt.



23. ábra: A pydime-cink rendszer spektrofotometriás titrálásának spektrumsorozata

5.3 Fluorimetria

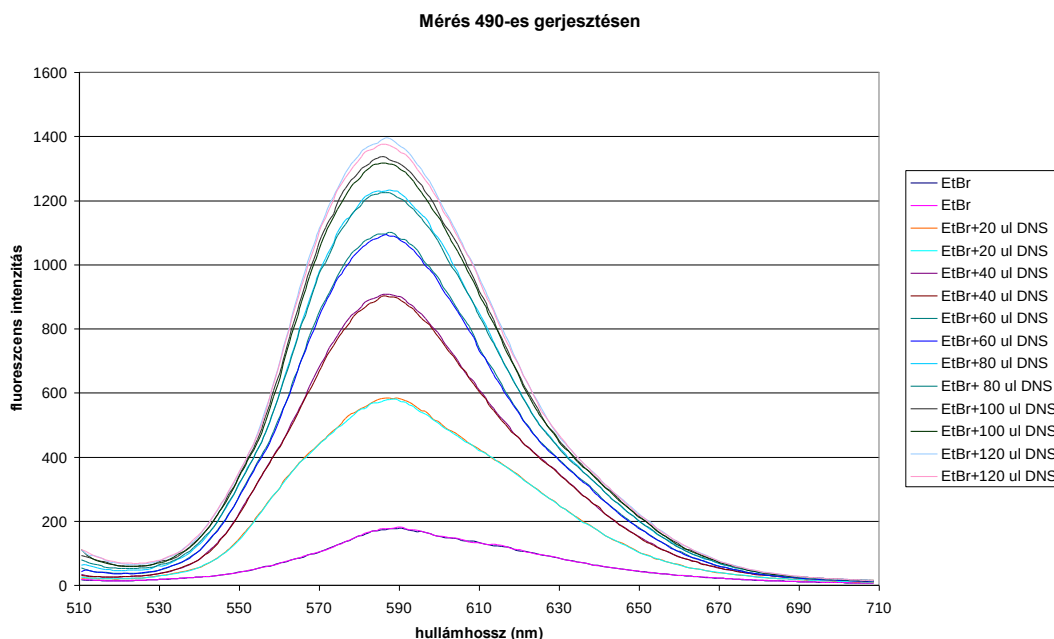
Tervezett méréseink azon alapultak, hogy az etídium-bromidot (24. ábra) 490 nm-es fénysugárral gerjesztve ~ 590 nm-nél fluoreszcens intenzitása maximummal rendelkezik. Ha az etídiumion DNS-hez kötődik, akkor ez az intenzitás jelentősen megnövekedik.



24. ábra: Az EtBr szerkezete

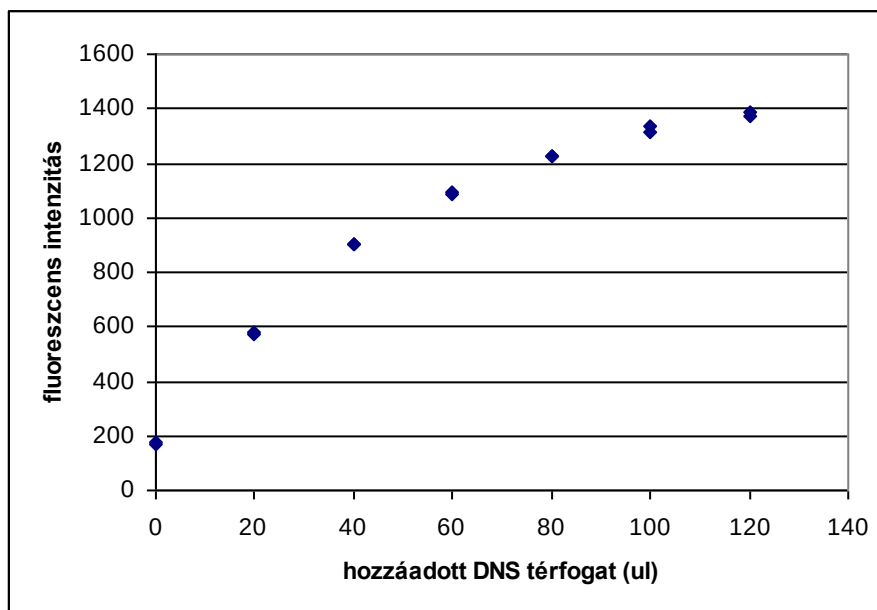
A méréseket ezért 490 nm-es gerjesztési hullámhosszon, 950V-os fotoelektron-sokszorozó feszültség mellett, 510-710 nm-es hullámhossz-tartományban végeztem, oly módon hogy a küvetába bemértem 800 μ l 6×10^{-7} M-os EtBr-ot, 640 μ l desztillált vizet és 160 μ l 0,1M-os Tris puffert, melynek pH-ját sósavoldattal 7,5-re állítottam. Majd ehhez az oldathoz 20 μ l-enként $2,99 \times 10^{-4}$ M-os DNS-oldatot adagoltam, melynek a koncentrációját már előtte

spektrofotometriás módszerrel meghatároztam. A 25. ábrán látható, a fluoreszcencia intenzitásának növekedése a hozzáadott DNS növekvő mennyiségének hatására.



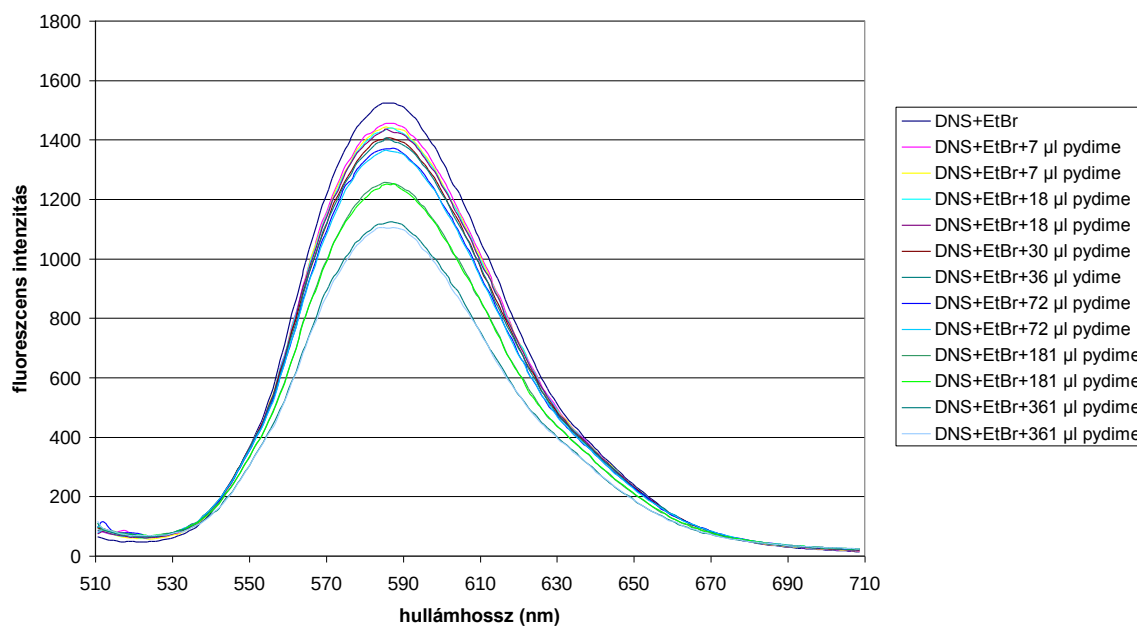
25. ábra: EtBr-oldat titrálása DNS-sel: a fluoreszcencia spektrumok 490 nm-es gerjesztésnél

Láthatjuk, hogy az intenzitásnövekedés a DNS felesleg jelenlétében telítésbe hajlik (26. ábra), ugyanis ekkor már minden EtBr DNS-hez kötött állapotban található. Ilyenkor már további DNS hozzáadása után nem tapasztalható változás. A DNS-hez kötött EtBr fluoreszcencia intenzitása ebben az esetben mintegy hétszeres növekedést produkált a szabad festék intenzitásához viszonyítva.



26. ábra: A fluoreszcencia intenzitás csúcsának növekedése az EtBr-oldat titrálása során DNS-oldattal

A következő lépés annak vizsgálata volt, hogy olyan potenciális gyógyszermolekulák, mint a 4-FSA, vagy a pydime, valamint ezek réz(II) komplexei képesek-e kiszorítani az EtBr-ot a DNS kettős spirálból. Most is az előzőekkel megegyező fluoriméter beállításokkal dolgoztam. Összemértem egy olyan oldatot, mely 800 μl 6×10^{-7} M-os EtBr-ot, 640 μl desztillált vizet és 160 μl 0,1 M-os 7,5-ös pH-jú Tris-HCl puffert, és 120 μl $2,99 \times 10^{-4}$ M-os DNS-t tartalmazott. Ehhez először 0,00496 M-os pydime-oldatot adtam, úgy, hogy az oldathoz adott össztérfogat rendre 7, 18, 36, 72, 181, majd végül 361 μl volt. A pydime hozzáadásával a fluoreszcencia intenzitása csökkent, 1524-ről 1103-egységre (37. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a pydime feleslege képes a DNS kettős hélixből kiszorítani az oda kötődött EtBr egy részét.

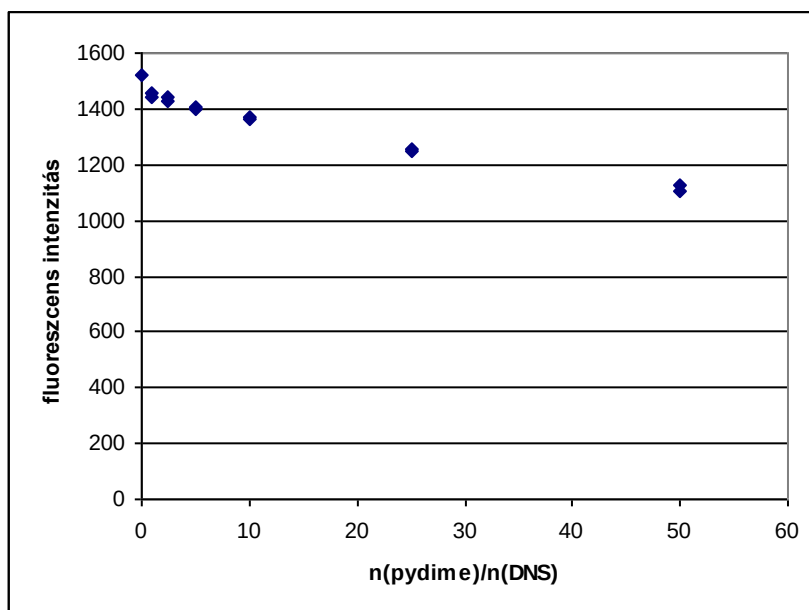


27. ábra: A DNS-t tartalmazó EtBr oldat titrálása pydime oldattal

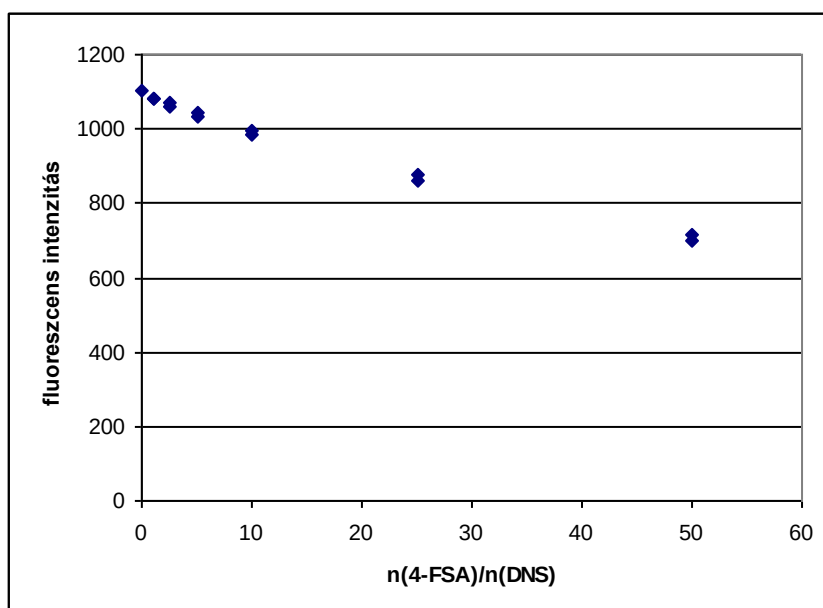
Ezután ugyanezt az oldatot 0,00247 M 4FSA-oldattal titráltam, úgy, hogy a hozzáadott össztérfogatok rendre 15, 36, 73, 145, 363, és végül 725 μl legyenek. Az intenzitás a 4FSA hozzáadásával tovább csökkent, 1103-ról 701-re. Tehát a 4FSA felesleg vélhetően további beékelődött etidium-bromidot tudott kiszorítani a DNS kettős hélixből, azonban nem annak teljes mennyiségét.

Végül réz(II)ionokat (0,025 M törzsoldatból kiindulva) adtam a fenti rendszerhez, hogy a hozzáadott össztérfogat 2, 4, 7, 18, 36 μl legyen. Itt az előzőeknél intenzívebb, és egyenletesebb csökkenést észleltem. A maximális fluoreszcens intenzitás 701-ről 232-re

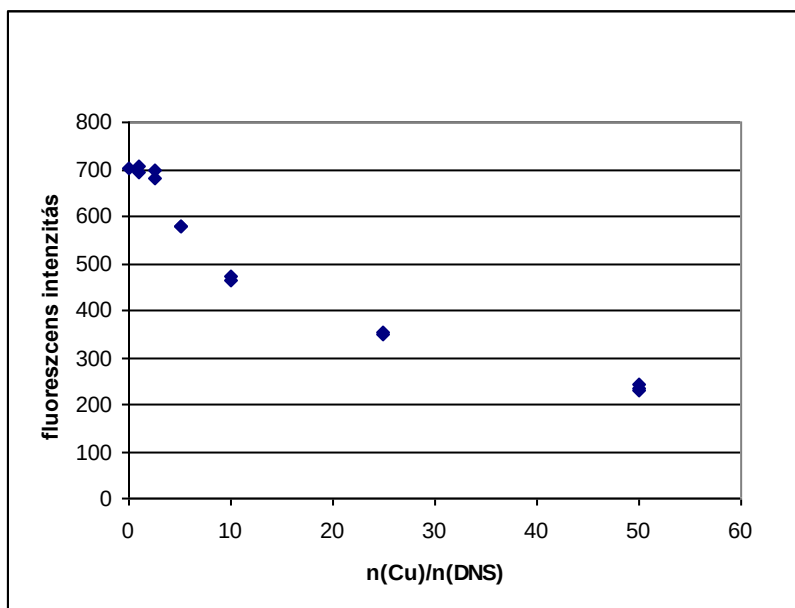
csökkent. Ennek a jelenségnek többféle magyarázata is lehetséges. A réz(II)-ionok nagy valószínűséggel nem lépnek kompetíciós reakcióba az etídium bromiddal, így más folyamatokkal kell számolnunk. Lehetséges, hogy a réz(II)ionok a potenciális gyógyszermolekulákkal kölcsönhatásba lépve azokat aktívabbá teszi a kompetíciós reakcióban. Az is elképzelhető, azonban, hogy a réz(II)ionok, azaz komplexeik a DNS szerkezetét befolyásolva akadályozzák az EtBr interkalációját. Végül az sem kizárható, hogy a réz(II)ionok, illetve komplexeik fényelnyelése okozza a detektálható fluoreszcencia csökkenést. A 28-30. ábrák mutatják, hogy hogyan változott a fluoreszcencia intenzitás a különböző komponensek hozzáadása után.



28. ábra: A fluoreszcencia maximális intenzitásának alakulása a DNS/EtBr oldat pydime-oldattal történő titrálása során



29. ábra: A fluoreszcencia maximális intenzitásának változása, az előző oldathoz történő 4-FSA-oldat adagolása során



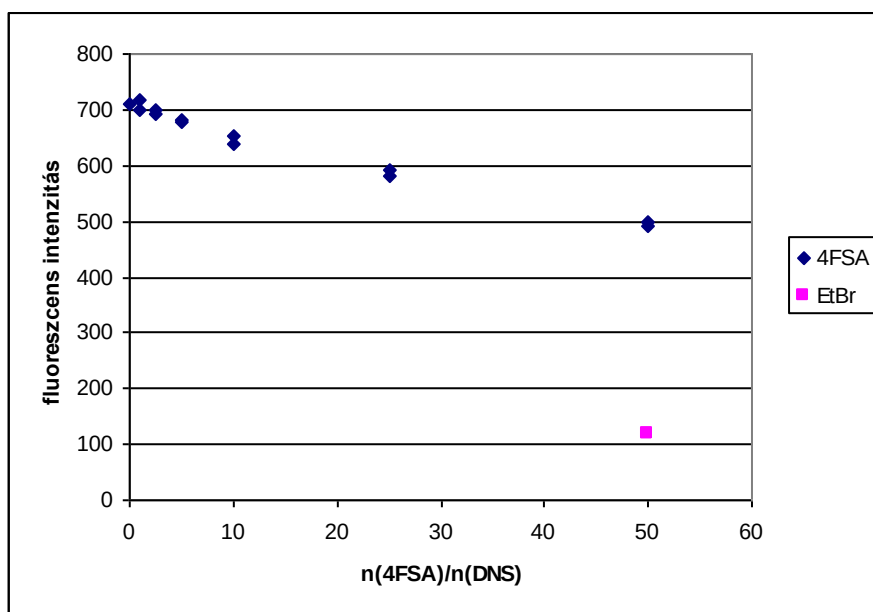
30. ábra: A réz(II)/pydime/4-FSA rendszerben mért fluoreszcencia maximális intenzitásának változása, a réz(II)ionok adagolása során

A következő mérésorozatban a kiindulási oldatban a koncentrációkat a felére csökkentettük anyagtakarékosság céljából: 400 μl EtBr-ot, 1020 μl desztillált vizet, 80 μl 7,5-ös pH-jú Tris puffert mértünk be. Ellenőrzésképpen ehhez 10 μl -enként adagoltam a DNS-oldatot, hogy lássam, hogy kisebb koncentrációnál is működik-e a telítés. 60 μl DNS hozzáadása után a csúcsmagasság megközelítőleg 700 volt.

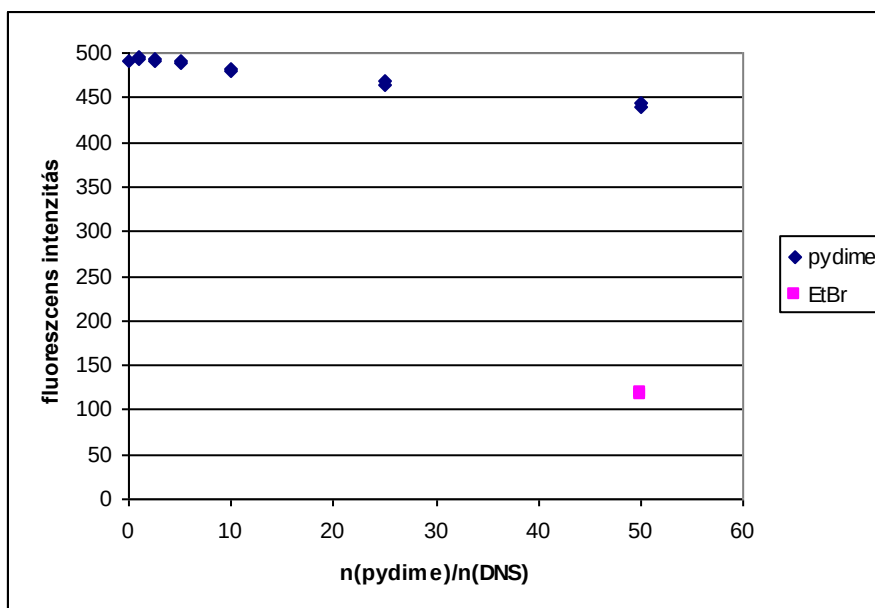
A kiszorításos vizsgálatot a potenciális gyógyhatású molekulákkal kipróbáltuk más sorrendben is, mint az előző kísérletsorozatban, hogy láthassuk, hatnak-e egymásra, és milyen módon a közöttük esetleg kialakuló komplexek, adduktumok. Ebben az esetben a kiszorítást a 4FSA-oldattal kezdtem, amit úgy adagoltam, hogy a hozzáadott össztérfogat 7, 18, 37, 72, 181, 362 μl legyen. Arányaiban az előző esettel azonos mértékű fluoreszcens intenzitáscsökkenést tapasztalható. Ezután ugyanehhez az oldathoz pydime-oldatot adagoltam, úgy, hogy a hozzáadott össztérfogat rendre 3, 9, 18, 36, 90 és 180 μl legyen. Itt viszont azt tapasztaltam, hogy a hozzáadott pydime hatására az intenzitás-csökkenés mintegy negyede annak, amit a 4FSA esetében tapasztaltunk. Az előzőek alapján azt valószínűsítjük, hogy a 4FSA nagyobb mértékben tudja befolyásolni a mért fluoreszcencia intenzitását, mint a pydime, és ha már jelen van az oldatban, az csökkenti a pydime hatékonyságát.

A következő lépésben réz(II)ionokat adagoltam a rendszerhez, úgy, hogy a hozzáadott össztérfogat rendre 1, 2, 3,5, 7, 18 és végül 36 μ l legyen. Ebben az esetben nagyon intenzív, és egyenletes, mintegy 300 egységnyi fluoreszcencia intenzitáscsökkenést tapasztaltam. A végső intenzitás megközelítette a szabad EtBr intenzitását, csakúgy, mint az első kísérletben.

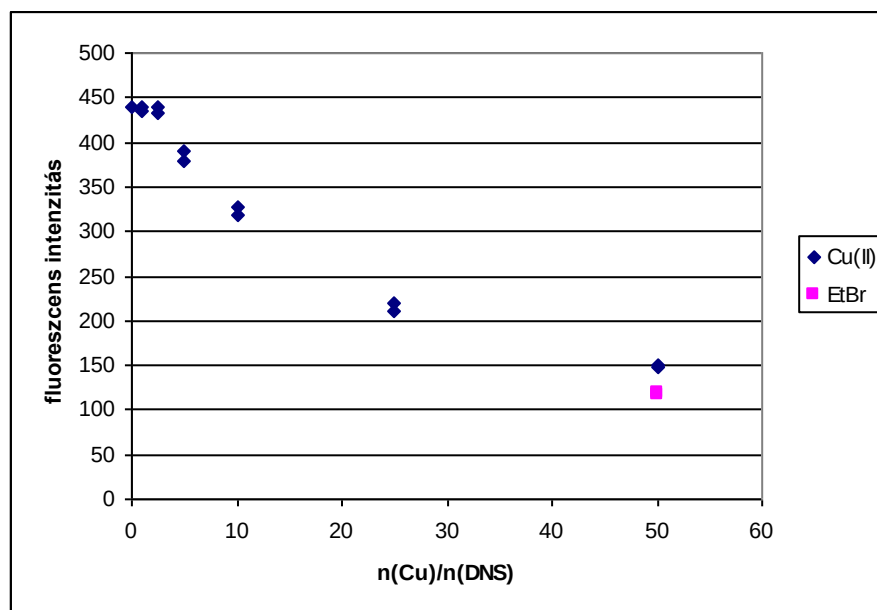
A 31-33. ábrák azt mutatják be, hogyan csökkent a rendszerek fluoreszcens intenzitása az egyes molekulák / ionok hozzáadása után. Az utolsó két pont mindhárom esetben a szabad EtBr fluoreszcens intenzitása, hozzáadott DNS nélkül.



31. ábra: A fluoreszcens csúcs intenzitásának alakulása a DNS/EtBr oldat 4FSA-val történő titrálása során



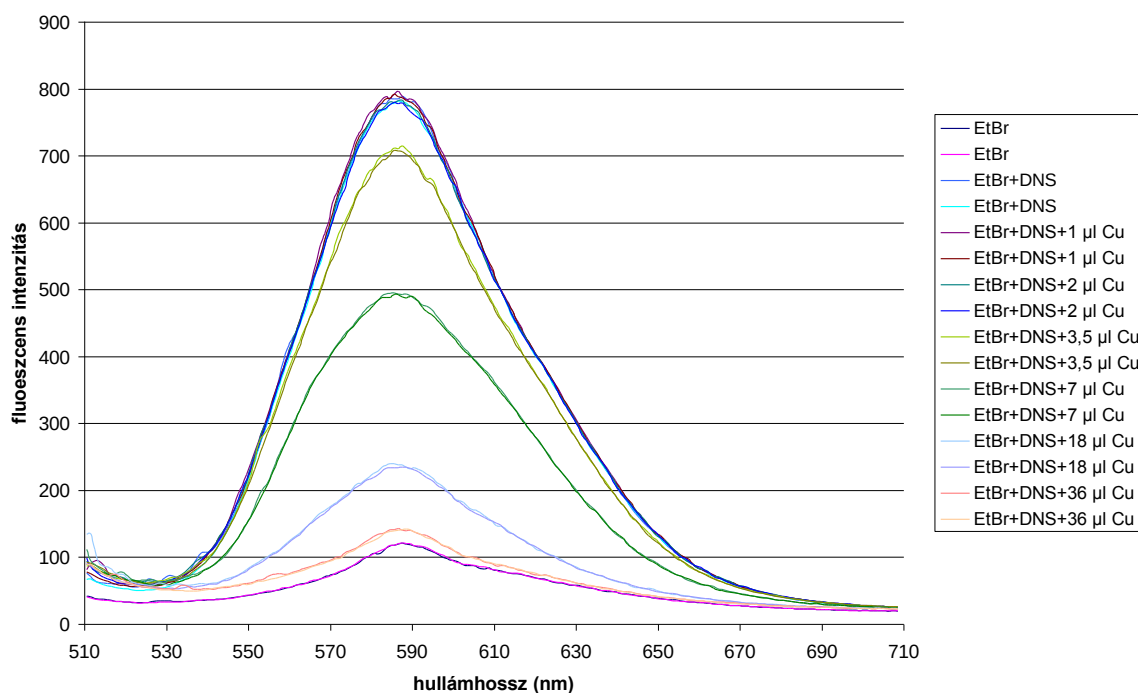
32. ábra: A fluoreszcens csúcs intenzitásának változása, az előző oldathoz történő pydime-oldat adagolása során



33. ábra: A réz(II)/4FSA/pydime rendszerben mért fluoreszcens csúcs intenzitásának változása, a réz(II)ionok adagolása során

A továbbiakban olyan méréseket végeztem, amikor az első gyógyhatású molekula adagolása után a réz(II)ionokat másodikként adagoltam a rendszerbe. Itt is az előzőekkel megegyező fluoriméter beállításokkal, és ugyanolyan koncentrációjú oldatokkal dolgoztam, valamint szintén az előzőekkel megegyező pydime, 4FSA és réz(II) mennyiségeket adagoltam a titrálások során. Ezekben az esetekben azt tapasztaltam, hogy az elsőnek hozzáadott gyógyszer-molekula ugyanolyan fluoreszcens intenzitás-csökkenést váltott ki mint az előzőekben, majd a hozzáadott réz(II)-oldat hatására jelentős intenzitás-csökkenés keletkezett be: a szabad EtBr saját fluoreszcens intenzitás-csúcsának megfelelő intenzitás értékéig. Ezen az ezután hozzáadott második gyógyszer-molekula érdemben már nem változtatott.

Végül olyan méréseket is végeztem, amikor a réz(II)ionokat adagoltam elsőként a DNS/EtBr oldathoz, majd utána adtam hozzá a gyógyszer-molekulákat. Itt is az előzőekkel megegyező beállításokkal, és ugyanolyan koncentrációjú oldatokkal dolgoztam. Azt tapasztaltam, hogy a réz(II)ionok oldata önmagában is igen erőteljes csökkenést váltott ki a fluoreszcencia intenzitásában, majd nem az EtBr saját fluoreszcens intenzitás csúcsáig csökkentette le a csúcsmagasságot (34. ábra). Ezen tapasztalatok azt valószínűsítik, hogy ez a jelenség vagy a réz(II)ionok saját abszorpciós tulajdonságának köszönhető, vagy a réz(II)ionok kölcsönhatása DNS-sel az oka az intenzitás csökkenésének.

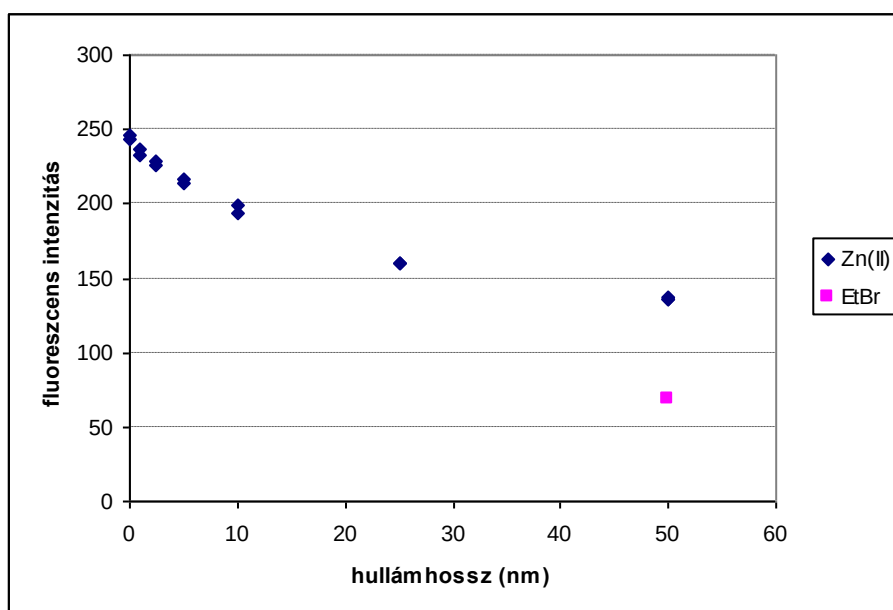


34. ábra: DNS-t és EtBr-ot tartalmazó oldat titrálása Cu(II)-ionokkal

Ezután az oldathoz 180 µl pydime-t majd 360 µl FSA-t adtam, de ezek hatására az intenzitás érdemben nem csökkent tovább.

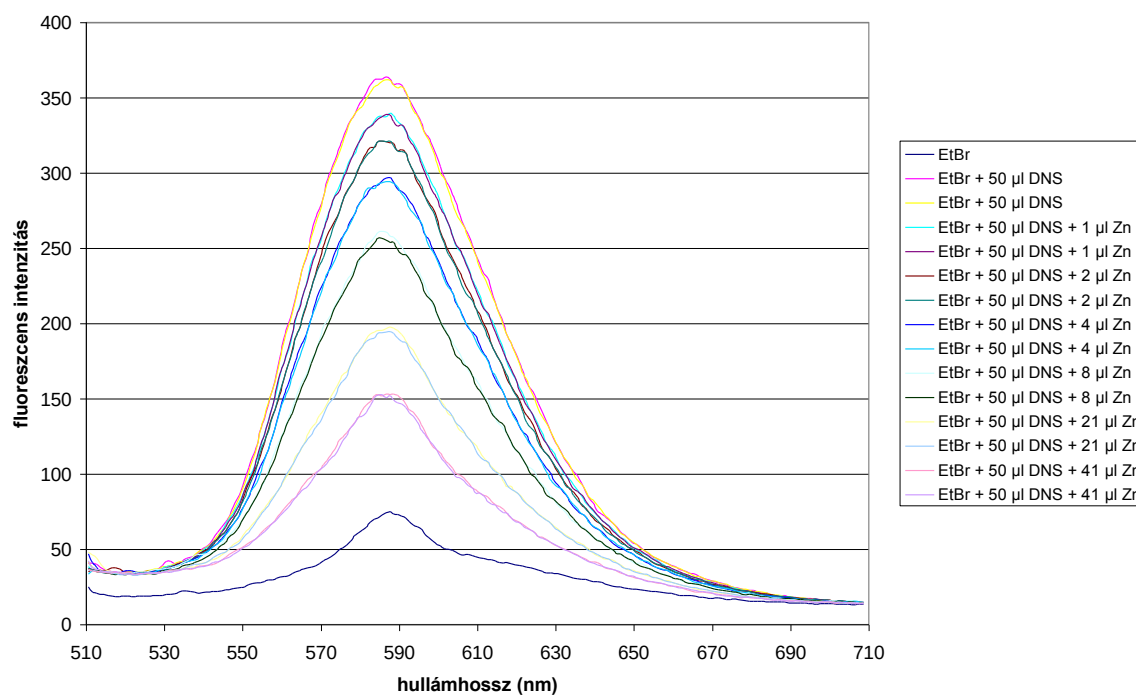
A fenti méréseket cink(II)-ionokkal is megismétltem, hiszen míg a réz(II)-ionok esetén a tapasztalatokat betudhatjuk a fémion saját abszorbanciájának, a cink(II)-ionnak ebben a hullámhossztartományban sem abszorbanciája, sem fluoreszcenciája nincs. A kiindulási oldat 50 µl DNS-t, 100 µl EtBr-ot, 1380 µl desztillált vizet és 20 µl Tris puffert tartalmazott. Majd ehhez adtam hozzá a ligandumokat és a fémionokat úgy, hogy a bemért térfogat 0,005M-os pydime-oldatból rendre 4 µl, 10 µl, 20 µl, 41 µl, 102 µl, 203 µl; 0,0025 M-os FSA-oldatból rendre 8 µl, 21 µl, 41 µl, 83 µl, 207 µl, 413 µl; 0,025M-os cink-perklorát oldatból pedig rendre 1 µl, 2 µl, 4 µl, 8 µl, 21 µl, 41 µl volt. Ezek a térfogatok bázispáronként 1; 2,5; 5; 10; 25; valamint 50-szeres felesleget jelentenek.

A mérések során a cink(II)-ionok a réz(II)-ionokhoz hasonló viselkedést mutattak, vagyis a fémion hozzáadása után minden rendszer fluoreszcencia intenzitásában markáns csökkenés volt megfigyelhető. Ezt példázza a 35. ábra.



35. ábra: A cink(II)/4FSA/pydime rendszerben mért fluoreszcens intenzitás csúcsainak változása, a cink(II)ionok adagolása során

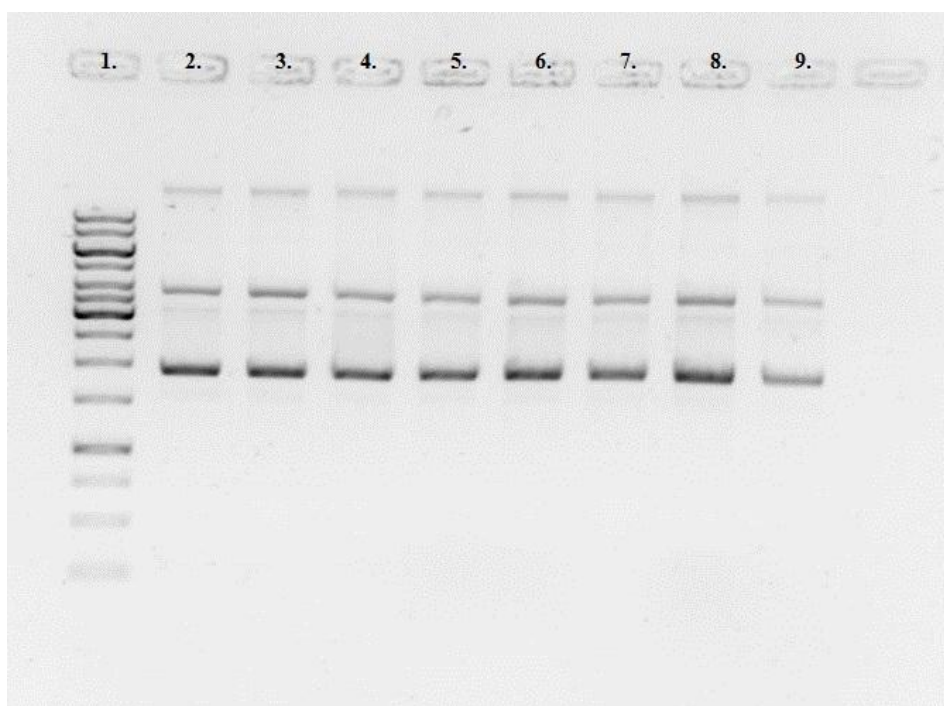
Ezenfelül a cink(II)-ionok, éppúgy mint a réz(II)ionok is, a csak DNS-t és etídium-bromidot tartalmazó oldat fluoreszcenciáját is lecsökkentik (36. ábra).



36. ábra : DNS-t és EtBr-ot tartalmazó oldat titrálása Zn(II)-ionokkal

5.4 Elektromobilitás eltolódási vizsgálatok

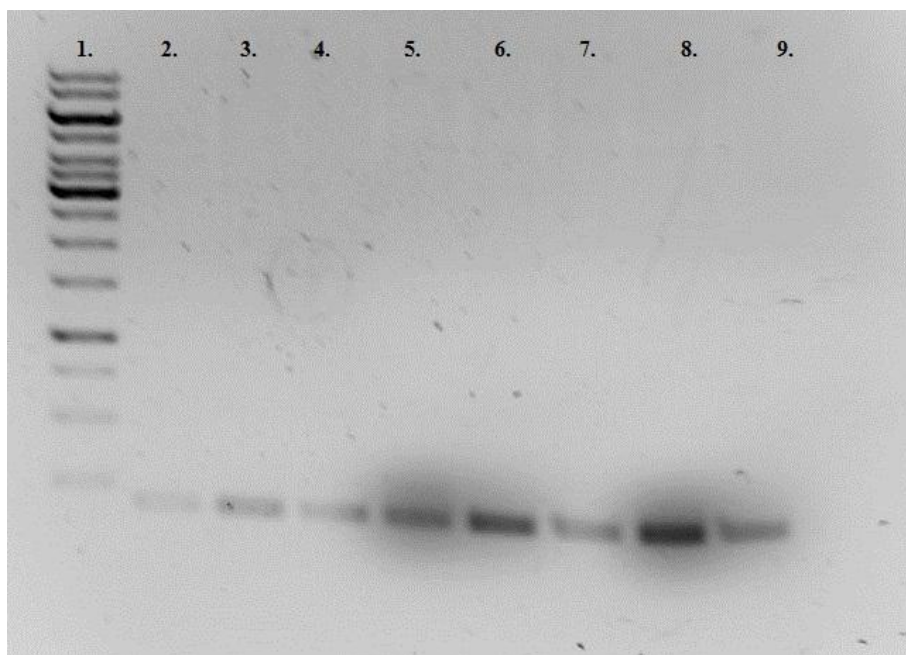
A kísérletek célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a DNS-hez kötődő pydime és 4FSA molekulák, illetve réz(II)-ionok és a fentiek adduktumai okoznak-e olyan nagymértékű szerkezeti változásokat a DNS-ben, amelyek befolyásolnák az EtBr megkötését, illetve a DNS futását az agaróz gélen az elektroforézis során. Az első esetben a fluorimetriás mérésekhez is használt pUC119 plazmid DNS-t használtam a futtatáshoz, és ugyanazokat az oldatokat, amelyeket a fluorimetriánál. A gélen az első zsebbe 15 μ l marker DNS, a másodikba 4 μ l DNS és 11 μ l Tris puffer; a következőbe 4 μ l DNS, 1 μ l réz(II)-oldat, és 10 μ l Tris puffer; majd 4 μ l DNS, 1 μ l réz(II)-oldat és 10 μ l pydime; majd 4 μ l DNS, 1 μ l réz(II)-oldat és 10 μ l 4FSA; majd 4 μ l DNS, 1 μ l réz(II)-oldat, 5 μ l pydime és 5 μ l 4FSA; majd 4 μ l DNS és 10 μ l pydime; majd 4 μ l DNS és 10 μ l 4FSA, és végül 4 μ l DNS 5 μ l pydime és 5 μ l 4FSA került. Ily módon FSA-val 16 szoros, a pydimevel 32-szeres, míg a terner rendszerben 24-szeres ligandumfelesleget értem el DNS bázispáronként. A futtatás végeredménye a 37. ábrán látható.



37. ábra: A pUC119 plazmidból nyert DNS-sel végzett sáveltolódás kísérlet. A zsebek tartalma:
1: marker, 2: DNS, 3: DNS+Cu²⁺, 4: DNS+Cu²⁺+Py, 5: DNS+Cu²⁺+4-FSA, 6: DNS+Cu²⁺+Py+4-FSA,
7: DNS+Py, 8: DNS+4-FSA, 9: DNS+Py+4-FSA

A futtatás alapján nem láthatunk szerkezeti változást, minden minta ugyanolyan messzire futott, bár ebből még messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le, ugyanis egy

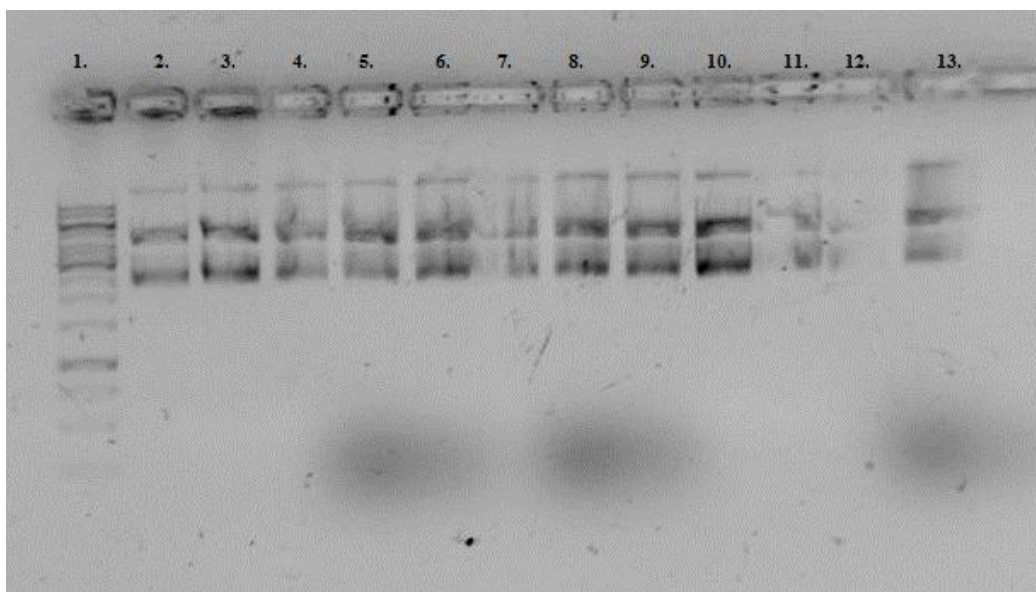
nagyméretű plazmid DNS esetén előfordulhat, hogy a molekuláink nem tudnak olyan nagy mértékű deformációt kiváltani, hogy az a futási sebességet befolyásolja. Éppen ezért egy PCR reakcióban készült kisebb méretű DNS-t tartalmazó $4,73 \cdot 10^{-4}$ M koncentrációjú DNS mintával is megismételtem a gélelektroforézis vizsgálatot. Ezen kísérletekben DNS bázispáronként 10-szeres feleslegben adtam 4FSA-t, 20-szoros feleslegben a pydimet, míg a turner rendszernél 15-szörös ligandumfelesleget alkalmaztam.(38. ábra).



38. ábra: A pGEX-6P-1 plazmidból PCR-rel készített DNS-sel végzett sáveltolódás kísérlet. A zsebek tartalma:

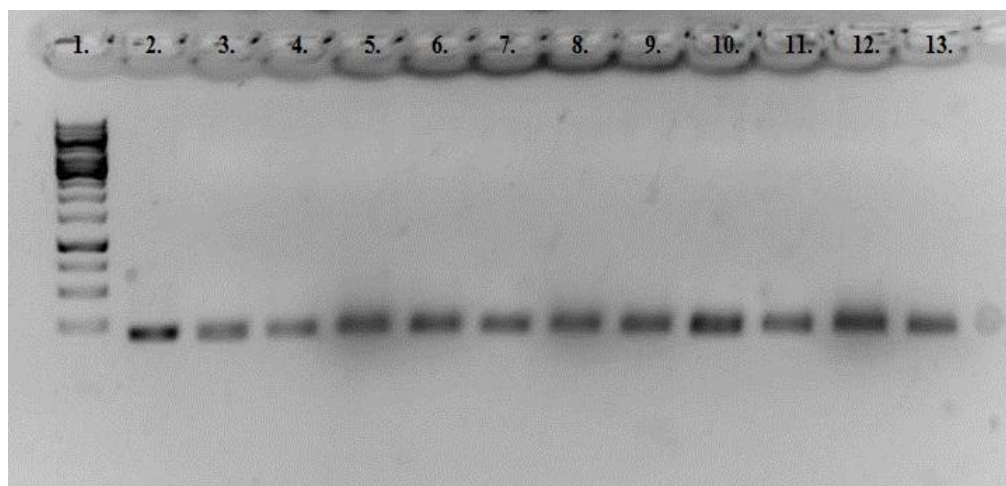
1: marker, 2: DNS, 3: DNS+Cu²⁺, 4: DNS+Cu²⁺+Py, 5: DNS+Cu²⁺+4-FSA, 6: DNS+Cu²⁺+Py+4-FSA, 7: DNS+Py, 8: DNS+4-FSA, 9: DNS+Py+4-FSA

Habár a kép kissé elmosódott azt láthatjuk, hogy nem történt a DNS molekulában szerkezeti változás. Érdekesség csupán, hogy a 4FSA-t tartalmazó zsebek diffúzan és jobban világítanak az UV lámpa alatt, ami a 4FSA saját fluoreszcenciájának köszönhető. A kísérleteket a cink(II)komplexek hozzáadásával is elvégeztem, az előzőekkel megegyező ligandumfeleslegek alkalmazásával, a pUC119 plazmidból nyert DNS-sel. Amint az a 39. ábrából is látható, szerkezeti változást itt sem észleltünk.



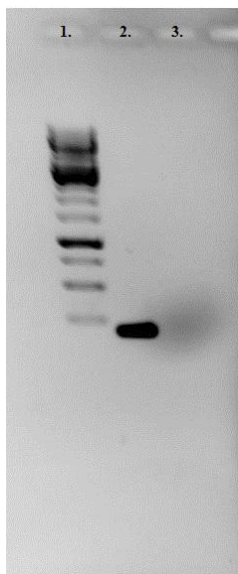
39. ábra: A pUC119 plazmidból nyert DNS-sel végzett sáveltolódás kísérlet. A zsebek tartalma:
 1: marker, 2: DNS, 3: DNS+Cu²⁺, 4: DNS+Cu²⁺+Py, 5: DNS+Cu²⁺+4-FSA, 6: DNS+Cu²⁺+Py+4-FSA, 7:
 DNS+Py, 8: DNS+4-FSA, 9: DNS+Py+4-FSA, 10: DNS+Zn²⁺, 11: DNS+Zn²⁺+Py, 12: DNS+Zn²⁺+4-FSA,
 13: DNS+Zn²⁺+Py+4-FSA

Ezután ismét megfuttattam a PCR terméket nagyobb ligandumfelesleggel is, melynek eredménye a 40. ábrán látható. E kísérlet folyamán a ligandumfelesleg 40-szeres volt pydime esetén, 20-szoros FSA esetén, míg 30-szoros a turner rendszer esetén DNS bázispáronként. Szerkezeti változást ebben az esetben sem észleltem.



40. ábra: A pGEX-6P-1 plazmidból PCR-rel készített DNS-sel végzett sáveltolódás kísérlet. A zsebek tartalma:
 1: marker, 2: DNS, 3: DNS+Cu²⁺, 4: DNS+Cu²⁺+Py, 5: DNS+Cu²⁺+4-FSA, 6: DNS+Cu²⁺+Py+4-FSA, 7:
 DNS+Py, 8: DNS+4-FSA, 9: DNS+Py+4-FSA, 10: DNS+Zn²⁺, 11: DNS+Zn²⁺+Py, 12: DNS+Zn²⁺+4-FSA,
 13: DNS+Zn²⁺+Py+4-FSA

A 38. és 40. ábrán az figyelhető meg, hogy a 4-FSA és a DNS fluoreszcens foltjai ugyanazon a helyen láthatóak, ám a 39. ábra alapján jól látszik, hogy a fluoroszalicilsav ugyanoda fut a gélen, mint a PCR termék futna, de a minta DNS helyén nem látszik fluoreszcens folt. Ennek alátámasztásául elvégeztem a 4-FSA és a PCR termék összehasonlító futtatását is, mely a 41. ábrán látható.



41. ábra: A 4-FSA és a PCR termék összehasonlító futtatása.
1: marker, 2: DNS, 3: 4-FSA

Ezek alapján elmondható, hogy habár a ligandumok, és komplexeik képesek részlegesen kiszorítani az EtBr-ot a DNS kettős spirálból, ez utóbbi szerkezetét és felületi töltéssűrűségét nem befolyásolják jelentős mértékben.

6. Összefoglalás

A laboratóriumi munkám során elvégeztem a 4FSA/ cink(II), pydime/cink(II) biner, valamint a 4FSA/pydime/cink(II) terner rendszerek oldategyensúlyi vizsgálatait, melyek során az oldatban, fiziológias pH-tartományban terner részecskék jelenlétét állapítottam meg. Ezen részecskék további vizsgálatát tervezzük ^1H -NMR spektroszkópiával, és röntgenkristallográfiával.

Tanulmányoztam továbbá a DNS/4FSA/pydime/réz(II) és a DNS/ 4FSA/pydime/cink(II) kölcsönhatást a DNS/EtBr rendszer fluoreszcenciájának mérése alapján, ahogyan azt az irodalomban számtalan tanulmányban olvashatjuk. Kísérleteinket géleltolódás vizsgálatokkal is kiegészítettük, hogy láthassuk, olyan szerkezeti változások létrejönnek-e a DNS molekulában, melyek annak futását a gélben megváltoztathatják. Az elvégzett fluoreszcencia spektroszkópiás és sáveltolódás kísérletek során azt a következtetést vontam le, hogy a réz(II)-4FSA, a réz(II)-pydime és a réz(II)-4FSA-pydime terner komplexek rákellenes jótékony hatásukat nem oly módon váltják ki, hogy azok a DNS-hez kapcsolódva annak szerkezetét megváltoztatják.

Annak eldöntésére, hogy milyen változást okoznak a gyógyhatású molekuláink a DNS szerkezetében a továbbiakban cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás méréseket tervezünk.

7. Irodalomjegyzék

- [1] F.J. Ramos-Lima, A.G. Quiroga, J.M. Perez, C. Navarro-Ranninger, *Polyhedron*, 22 (2003) 3379
- [2] F.J. Ramos-Lima, O. Vrana, A.G. Quiroga, C.N. Navarro-Ranninger, A. Halamikova, H. Rybnickova, L. Hejmalova, V. Brabec, *J. Med. Chem.*, 49 (2006) 2640
- [3] V. Brumas, B. Brumas, G. Berthon *J. Inorg. Biochem.*, 57 (1995) 191
- [4] S. Gaubert, M. Bouchaut, V. Brumas, G. Berthon *Free Radic. Res.*, 32 (2000) 451
- [5] V. Brumas, H. Miche, M. Fiallo *J. Inorg. Biochem.*, 101 (2007) 565
- [6] G.D. Geromichalos, D.T. Trafalis, G.A. Katsoulos, A. Papageorgiou, P. Dalezis, E.B. Triandafillidis, C.C. Hadjikostas, A. Athanassiou *J. Boun.*, 11 (2006) 469
- [7] A. Martinez, J. Lorenzo, M.J. Prieto, M. Font-Bardia, X. Solans, F.X. Aviles, V. Moreno *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (2007) 969
- [8] Svik, M. Stančíková, J. Rovenský, M. Melník *Rheumatologia*, 9 (1995) 89
- [9] Z. Korolkiewicz, E. Hac, E. Gagalo, P. Gorczyca, A. Lodzinska, *Agents Actions*, 26 (1989) 355–389.
- [10] N. Palanisami, G. Prabusankar, R. Murugavel, *Inorg. Chem. Commun.*, 9 (2006) 1002–1006.
- [11] J.R. J. Sorenson, *J. Med. Chem.*, 27 (1984) 1747–1758.
- [12] T. Szabó-Plánka, B. Gyurcsik, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, R. Šípoš, J. Šima, M. Melník, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 101–109.
- [13] T. Szabó-Plánka, B. Gyurcsik, I. Pálincó, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, R. Šípoš, J. Šima, M. Melník, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 75–83.
- [14] N.I. Jakab, Z. Vasková, J. Moncol, B. Gyurcsik, J. Šima, M. Koman, D. Valigura, *Polyhedron* 29 (2010) 2262–2268
- [15] T. Szabó-Plánka, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, E. Tóth, B. Gyurcsik, Z. Vasková, J. Moncol, D. Valigura, *Polyhedron*, 30 (2011) 2421–2429.
- [16] M. J. Kendrick, M. T. May, M. J. Plishka, K. D. Robnson, in ed.: J. Burgess, *Metal sin Biological Systems*, Ellis Horwood, London, pp. 83-86, 142-149 (1992)
- [17] T. Biver, F. Secco, M. R. Tine, M. Venturini, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorni, *J. Inorg. Biochem.*, 98, 1531 (2004)
- [18] M. E. Anderson, A. G. M Barret, B. M. Hoffman, *J. Inorg. Biochem.*, 80, 257 (2000)

- [19] Tóth Eszter, Borsos Katalin: pH-függő koordinációs szféra fluktuáció a réz(II) – 5-fluoro-szalicilsav – 2,6-bisz-hidroximetil-piridin terner rendszerben (TDK dolgozat)
- [20] M. Melnik, M. Koman, J. Moncol, T. Glowiak, *J. Coord. Chem.*, 53 (2001) 173.
- [21] A . Pajunen, S. Pajunen, *Cryst. Struct. Commun.*, 11 (1982) 427
- [22] P. Lemoine, D. Nguyen-Huy, B. Viossat, J.-M. Leger, A. Tomas, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, 55 (1999) 2068.
- [23] K.G. Strothkamp, R.E. Strothkamp, *Journal of Chemical Education* 71 (1994) 77
- [24] Scatchard, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660-672
- [25] V. A. Izumrudov, M. V. Zhiryakova, A. A. Goulko, *Langmuir* (2002), 18, 10348-10356
- [26] A. Arslantas, H. Necefoglu, M. Sozmen, *Asian Journal of Cemistry* 22 (2010) 7648-7654
- [27] M. O'Connor, A. Kellett, M. McCann, G. Rosair, M. McNamara, O. Howe, B. S. Creawen, S. McClean, A. F-A Kia, D. O' Shea, M. Devereux, *J. Medical Chemistry* 55 (2012) 1957
- [28] F.J.C. Rosotti, H. Rosotti, *The determination of stability constants*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1962, p. 149.
- [29] E. Högfeltdt, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes, Part A. Inorganic Ligands*, Pergamon, New York, 1982, p. 32
- [30] L. Zékány, I. Nagypál, G. Peintler, *PSEQUAD for Chemical Equilibria* (1991); L. Zékány, I. Nagypál, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, szerk. D.J. Leggett, Plenum Press, New York, (1991).
- [31] Galbács Gábor ,Galbács Zoltán ,Sipos Pál: *Műszeres Analitikai Kémiai Gyakorlatok*, 2008
- [32] Ádám Veronika: *Orvosi biokémia*
- [33] L. Alderighi és mtsai, *Coordination Chemistry Reviews*, 184 (1999) 311-318
- [34] T. Hokelek, H. Dal, B. Tercan, F. E. Ozbek, H. Necefoglu, *Acta Crist. Section E*, 65 (2009) M481-U230
- [35] T. Hokelek, N. Cayalak, H. Necefoglu, *Acta Crist. Section E*, 63 (2007) M2561-U1121
- [36] M. Sari, G. Goekce, S. Goekce, E. Sahin, H. Necefoglu, *Acta Crist. Section E*, 63 (2007) M2191-U1521

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Gyurcsik Bélának, hogy tudományos diákköri munkámat az általa adott témából írhattam, valamint a munka közben nyújtott értékes észrevételeit.

Szeretném megköszönni Dr. Kiss Tamásnak, hogy a méréseket a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken végezhettem.

Valamint megköszönni Matyuska Ferenc PhD-hallgatónak a mérések kivitelezése és kiértékelése közben nyújtott segítségét, és Németh Eszter PhD-hallgatónak a biológiai munkák során adott iránymutatást.