

L-CISZTEIN $[(\eta^6\text{-}p\text{-CIMOL})\text{Ru(II)}]$ KOMPLEXEINEK OLDATEGYENSÚLYI FOLYAMATAI

Tudományos Diákköri dolgozat

Készítette:

Laskay Krisztina, II. éves Vegyész MSc hallgató

Témavezető:

Dr. Jakusch Tamás, egyetemi adjunktus



Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem

2014.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Metallocén vegyületek	4
2.2. Pt(II) komplexek	4
2.3. A ruténium- és platina-komplexek összehasonlítása	5
2.4. Rákellenes hatású Ru(III) tartalmú komplexek	6
2.5. Hipotézisek a Ru(III) tartalmú komplexekre vonatkozóan.....	7
2.5.1. „Redukció általi aktiválás” szelektív mechanizmusának hipotézise	7
2.5.2. A transferrin mint a ruténium biotranszportere?	7
2.5.3. A platina tartalmú gyógyszerektől eltérő módú DNS- kötődés.....	8
2.6. Rákellenes hatású Ru(II)-komplexek.....	9
2.7. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ (ruténium-4-izopropil-toluol) komplex.....	10
2.7.1. (O,O) donor ligandumok.....	11
2.7.2. (O,N) donor ligandumok.....	14
2.7.3. (O,S) donor ligandumok	15
2.8. L-cisztein jellemzése.....	17
3. Célkitűzés.....	19
4. Kísérleti rész	20
4.1. pH-potenciometria	20
4.2. UV-Vis-spektroszkópia	21
4.3. ^1H -NMR-spektroszkópia	21
4.4. Felhasznált anyagok, vegyszerek.....	22
5. Eredmények bemutatása és értékelése	23
5.1. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és <i>N</i> -acetyl-L-cisztein rendszer	23
5.1.1. pH-potenciometria	23
5.1.2. ^1H -NMR-spektroszkópia és UV-Vis-spektroszkópia	23
5.2. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és L-cisztein, ill. L-cisztein-metil-észter rendszer.....	29
5.2.1. pH-potenciometria (L-cisztein).....	29
5.2.2. ^1H -NMR-spektroszkópia (L-cisztein és L-cisztein-metil-észter)	30
5.2.3. ^1H -TOCSY spektroszkópia.....	42
6. Összefoglalás	44
7. Irodalomjegyzék	46
8. Függelék.....	49
9. Köszönetnyilvánítás.....	50

1. Bevezetés

A Nemzetközi Rákkutatási Alap tanulmánya szerint 2012-ben a világon összesen 14,1 millió új rákos beteget regisztráltak [1]. A statisztikák szerint ez a szám 2035-re a 24 milliót is elérheti. Magyarországon a daganatos betegségek a haláloki statisztikában a második helyet (23%) foglalják el [2]. Átlagosan négy daganatos betegség közül egy lesz halálos kimenetelű [3]. A rákos megbetegedések közös jellemzője a szabályozatlan sejtszaporulat, valamint a biológiai szövetekbe való betörési képesség. Ez utóbbi tulajdonságukat „betöréssel” (invázióval) vagy áttétképzéssel is véghezvihetik [4]. A kontrollálatlan sejtosztódást a sejtciklus szabályozásában résztvevő DNS-hibák, genetikai mutációk okozhatják. A daganatos betegségekhez genetikai és környezeti tényezők együttesen hozzájárulhatnak. A rákos betegségeket leggyakrabban kemoterápiával, sugárkezeléssel vagy sebészeti beavatkozással kezelik.

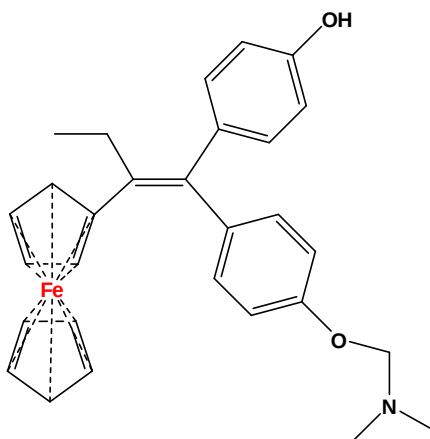
Az átmenetifém-ionok a biológiában és a gyógyszer tudományban egyaránt fontos szerepet játszanak a szerkezeti sokféleségük, változtatható ligandum-csere kinetikájuk, a finoman szabályozható redox aktivitásuk, reaktivitásuk, ugyanakkor toxicitásuk miatt is. Bár már közel 5000 éve használnak szervetlen elemeket és vegyületeket a gyógyászatban, a gyógyszeriparban ma is döntően a szerves vegyületek dominálnak. A gyógyászati szervetlen kémia alig 30 éves múltra visszatekintő tudományág, mely fémtartalmú terápiás és diagnosztikai szerek kutatásával, fejlesztésével foglalkozik [5].

A bioszervetlen kémia – melynek eredményei jelentős felhasználási lehetőségeket kínálnak a gyógyászatnak – egyik fő területe a potenciális rákellenes hatású fémkomplexek kutatása, fejlesztése és klinikai tesztelése [5]. A bioszervetlen kémia egy interdiszciplináris tudományág: magában foglalja többek között a szervetlen kémia, biokémia, fizika, mikrobiológia, toxikológia, farmakológia és fiziológia tudományterületeit. A gyógyszerként alkalmazható szervetlen komplexek kifejlesztésének két általános útja van. Az egyiknél a biológiai hatás empirikus megfigyelését követően a klinikai hatást szerkezet-aktivitás összefüggés vizsgálatokkal optimalizálják. Itt a cél a toxicitás minimalizálása, új vegyületek előállítása és hatásmechanizmusuk felderítése. A gyógyszertervezés másik megközelítésénél az adott biokémiai folyamatból indulnak ki, pl. enzim-inhibitorok tervezésénél.

2. Irodalmi áttekintés

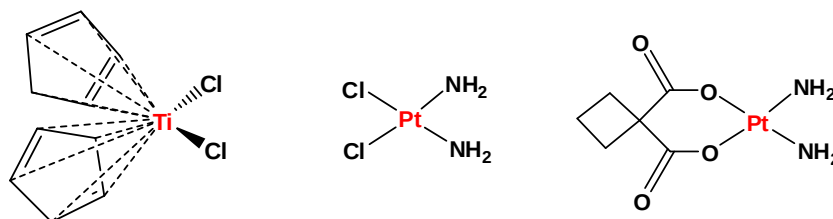
2.1. Metallocén vegyületek

A fémorganikus komplexek közül először a metallocének csoportját vizsgálták részletesebben rákos sejtvonalakon. A metallocének olyan fémorganikus vegyületek gyűjtőnevei, amelyekben két ciklopentadienil-anion a π -komplexnek megfelelően szendvicsszerűen kötődik valamilyen átmenetifémhez (például $M = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Ru}, \text{Os}, \text{Mn}$). A ferrocének kiváló citotoxikus aktivitást mutattak „in vitro”, valamint „in vivo” gátolták a tumorok burjánzását [6].



1. ábra Ferrocén alapú tumorelles gyógyszer szerkezeti képlete

2.2. Pt(II) komplexek



2. ábra Titanocén-diklorid, ciszplatin és karboplatin szerkezeti képlete

A metallocének mintájára állították elő a titanocén-dikloridot, ezen vegyület klinikai tesztjei alapján kiderült, hogy a szervezetbe való bejuttatás módja problémás [7].

A ciszplatin (cisz-diamin-dikloro-platina(II)), valamint második generációs analógjai az egyik legszélesebb körben és legsikeresebben alkalmazott gyógyszerek a rák kemoterápiájában [5]. Hatásmechanizmusuk alapja, hogy a DNS két bázisához kötődve torzítja a kettős spirál szerkezetét, ezáltal gátolja a replikáció folyamatát. A ciszplatin és karboplatin a petefészek, fej, nyak és tüdő tumorokban, az oxaliplatin a vastagbél daganatokban aktív, míg a satraplatin a prosztatarákra van elsősorban hatással.

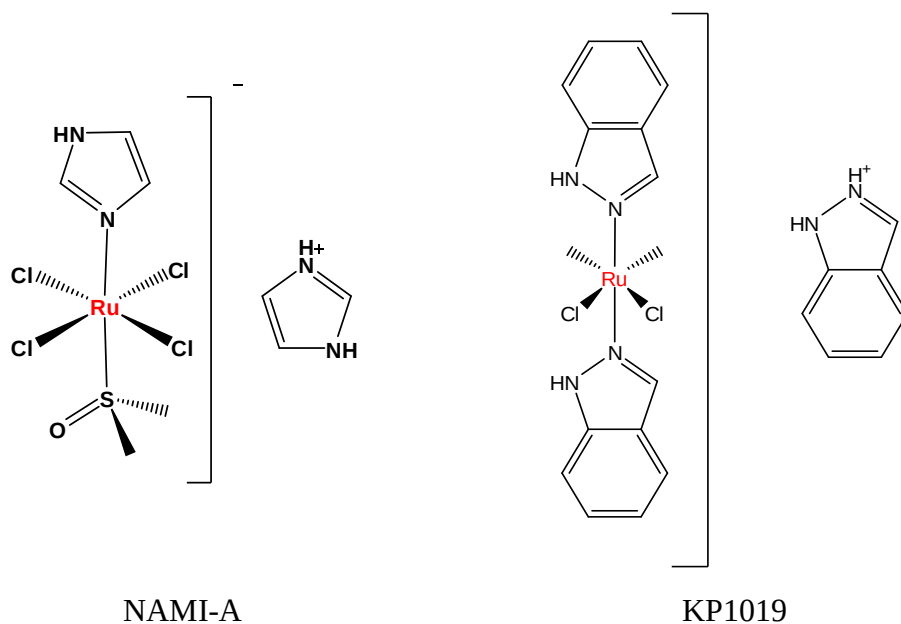
Azonban a Pt(II) komplexek toxikusak, a szervezetben felhalmozódhatnak, számos mellékhatással bírnak (pl. vese és emésztőszervek problémái, hányinger) és limitált az aktivitásuk. A mellékhatásokat a Pt(II)-nek az enzimfehérjék tiolcsoportjaival való kölcsönhatása miatti enzim funkciók gátlása okozza [5]. Ezen negatív tulajdonságok kiküszöbölésére, valamint a szelektivitás és a terápiás index növelése céljából kezdődött meg a többi átmenetifém - Pt(IV), Au(III), Ti(IV), Ga(III), Cu(II), Rh(III), Ru(II/III) - rákellenes hatásának kutatása. A rákellenes fémkomplexek közül a ruténium tartalmú vegyületek bizonyulnak az egyik legígéretesebbnek.

2.3. A ruténium- és platina-komplexek összehasonlítása

A ruténium tartalmú potenciális rákellenes gyógyszerek szintézise és vizsgálata iránt az utóbbi húsz évben egyre nagyobb az érdeklődés; kettő közülük (NAMI-A, KP1019) klinikai próbák részese is volt [8]. A legtöbb tanulmányban kiemelik a ruténium-komplexek a platina vagy más átmenetifém vegyületeitől való eltérését. A ruténium előnye a platínával szemben, hogy kevésbé toxikus az egészséges szövetekre - a ruténium-komplexek többségénél az „in vitro” IC₅₀ érték nagyobb, mint a leginkább elterjedt platina gyógyszereké -, ugyanakkor rákos sejteknél is megfelelő citotoxicitással rendelkezik. A ruténium viszonylag reakcióképes, jó a komplexképző képessége és a fémion-ligandum csere kinetikáját többféleképpen tudjuk módosítani. A platina tartalmú gyógyszerek rákos sejtekben való rezisztenciája a ruténium-komplexekre nem jellemző. További előnye lehetne, ha a vashoz hasonló módon kötődne a biomolekulákhoz. Mivel a tumoros sejteknek fokozott a vasigényük, a vas szállító transferrin gyorsabban tudná eljuttatni a ruténium komplexeket a rákos sejtekhez [9]. A ruténium tulajdonságait a reaktivitás és szerkezet szempontjából is könnyen lehet változtatni, így az egyik legsokoldalúbb fémion, amit különböző biológiai tulajdonságú komplexek tervezésénél is használnak [10].

A ruténium tartalmú rákellenes gyógyszerekhez Bernhard Keppler munkája adott motivációt, aki többek között felfedezte, hogy a bisz-imidazol-tetrakloro-rutenát potenciálisan aktivitást mutathat vastagbélrák kezelésében [11], illetve hogy az imidazol-dimetil-szulfoxid-tetrakloro-rutenát előrehaladott tumornál szelektív aktivitással bír [12].

2.4. Rákellenes hatású Ru(III) tartalmú komplexek



3. ábra Ru(III) tartalmú rákellenes hatású komplexek szerkezeti képletei

A „félszendvics” típusú Ru(III) tartalmú fémorganikus komplexek mint rákellenes gyógyszerek ígéretesnek bizonyulnak. A Ru(III) (d^5 paramágneses) komplexek oktaéderez geometriájúak. A komplexek geometriájából adódóan kicserélhető a koordinált aromás rész, a kloridionok és a kelátképző ligandum.

A NAMI-A (*transz*-[tetrakloro-(1H-imidazol)(dimetil-szulfoxid)rutenát(III)]) neve a „New Anti-tumour Metastasis Inhibitor” kifejezésből származik, az „A” jelölés pedig azt mutatja, hogy a lehetséges sorozat első tagjáról van szó. A NAMI-A a rákos sejtek mobilitására van hatással, ezáltal az áttétek kialakulásának gátlásában vesz részt [13].

A KP1019 (*transz*-[tetrakloro-bisz(1H-indazol)-rutenát(III)]) komplex vastagbélrák kezelésére alkalmas [9].

Létezik néhány olyan fémkomplex, amelynél a fémionnak nincs szerepe a biológiai hatás kifejtésében; egyedüli feladata a szerves molekularész fix és orientált

helyen való tartása. A Ru(III) vegyületeknél nincs erről szó: a NAMI-A esetében a ruténiumot ródiumra vagy ozmiumra cserélve a biológiai hatás jelentős mértékű csökkenését tapasztalták [9]. A fémion minősége befolyásolja a távozó csoport cseresebességét, illetve a komplexek stabilitását.

2.5. Hipotézisek a Ru(III) tartalmú komplexekre vonatkozóan

2.5.1. „Redukció általi aktiválás” szelektív mechanizmusának hipotézise

A hipotézis szerint az inert Ru(III) komplexek lényeges kölcsönhatás nélkül jutnak el a célsejtbe, ott „redukció általi aktiváláson” mennek keresztül elsősorban csak a tumorban. Így a ruténium komplexek ezen tulajdonságával képesek lehetnek a rákos sejteket szelektíven megölni. (Farmakológiai szempontból egy vegyület inertsége utópiának tekinthető.) A tumoros sejtek egy „tömeget” alkotnak, ahol a vérkeringés kevésbé szervezett, és ahol sok rész nem kap elegendő mennyiségű oxigént. Ennek következtében a sejtek az energia-termeléshez a citromsav-ciklus helyett a glikolízist részesítik előnyben. A környező szövet környezetének pH-ja csökken, és a környezet a Ru(III)-at a sokkal labilisabb és reaktívabb Ru(II)-vé redukálja [14]. Kísérleti eredmények alapján egerek esetében a NAMI-A glutationnal való redukciót követően sokkal aktívabbnak bizonyult [15]. Ezt az elméletet azonban eddig csak „in vivo” környezetben tudták bizonyítani, gyakran fízológias körülmények között elképzelhetetlen hatóanyagkoncentráció mellett. Továbbá érdemes megjegyezni, hogy a „redukció általi aktiváció” mechanizmusa nem feltétlenül egy olyan szabály, amelyet bármely ruténium-komplexre ki lehetne terjeszteni.

2.5.2. A transferrin mint a ruténium biotranszportere?

A transferrin elősegíti a sejtek számára a vas oldott formában való felvételét, valamint vas-igényű anyagcsere folyamatoknál is hasznos, pl. sejtnövekedésnél és osztódásnál. A transferrinben két fenolát-, egy karboxilát- és egy karbonát csoport mellett részt vesz egy imidazol csoport is a Fe(III) megkötésében [16]. A rákos sejteknek több vasra van szüksége, mint az egészséges sejteknek, így ahhoz, hogy megkapják ezt a létfontosságú elemet, nagyobb mennyiségű transferrin receptort expresszálnak az egészséges sejtekhez képest [17]. A transferrin az emberi szervezetben többnyire a plazmában fordul elő, így a ruténium vérkeringésbe történő belépésekor könnyen hozzá tudna férni. Ez az elképzelés azonban nem teljesen állja

meg a helyét, hiszen a Ru(III) inertsége miatt kisebb valószínűséggel kötődhet a transferrinhez. Ha viszont megtörténik a kötődés a fehérjéhez, nem feltétlenül tud reverzibilisen disszociálni a sejten belül és kiváltani a kívánt hatást.

2.5.3. A platina tartalmú gyógyszerektől eltérő módú DNS- kötődés

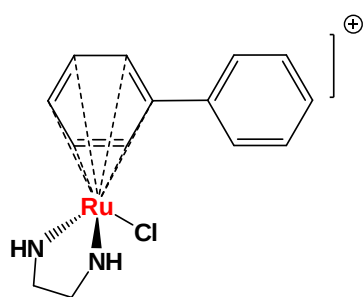
A rákellenes fémion-alapú gyógyszerek tervezésének fő célja, hogy olyan, a DNS-sel kölcsönhatásba lépő vegyületeket kapjunk, amelyeknek a ciszplatintól eltérő a hatásmechanizmusuk, és ezáltal kiküszöböljük a platina tartalmú gyógyszerek tumoros sejtekben tapasztalható rezisztenciáját. Viktor Brabec munkája megmutatta, hogy néhány ruténium vegyület legalább olyan erősen kötődik a DNS-hez, mint a ciszplatin (RM175 és a családba tartozó rokon fajták) [18]. Egyes komplexeknél a kapott adduktumok sokkal jobban ellenállnak a sejt javító mechanizmusainak, mint a platina esetében.

A NAMI-A és KP1019 vegyületek szintetizálásakor is az volt a cél, hogy a DNS-sel kölcsönhatásba lépő vegyületeket kaphassanak, és így a kromatin szétszakadásához és a sejt halálához vezessenek. Kiderült, hogy a NAMI-A aktivitásáért a DNS-től eltérő sejtalkotókkal való kölcsönhatás a felelős: a komplex a rákos sejtek burjánzását és áttéteket módosítja a tüdőrák esetében [19]. Ezzel szemben a KP1019 mitokondriális úton történő programozott sejthalált segít elő [20].

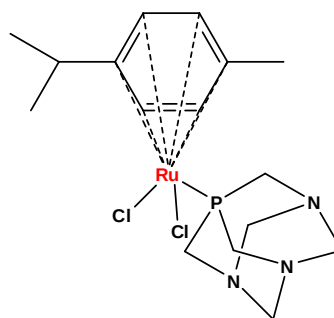
A ruténium tartalmú komplexeknél nehéz szerkezet-aktivitás összefüggést felállítani, ugyanis gyógyszerjelöltek százait megvizsgálva sem mutatnak egyértelmű tendenciát [8].

A ligandum-kicserélődési mechanizmus kinetikája, a „redukció általi aktiváció” és a transferrin általi sejt akkumuláció lehetőséget teremt arra, hogy a ruténium tartalmú vegyületek „in vitro” kötődhessenek a DNS-hez, azonban nem feltétlenül igazolják az „in vivo” aktivitást. A pontos mechanizmusok még nem világosak. Proteomikai módszerek segíthetnek a receptor azonosításában, illetve annak megfigyelésében, hogy a rákos sejtek hogyan reagálnak a szervezetbe adagolt ruténium-komplexre [8].

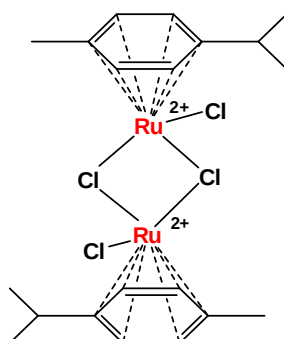
2.6. Rákellenes hatású Ru(II)-komplexek



RM175



RAPTA



$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$

4. ábra Ru(II) tartalmú rákellenes komplexek szerkezeti képletei

Peter Sadler és Paul Dyson kutatócsoportjai a ruténium(II) oxidációs állapot stabilizálását és szervezetbe való juttatását fémorganikus, ún. „félszenvics” Ru(II) komplexek formájában képzeltek el $[(\eta^6(\text{arén})\text{Ru(II)}(\text{kel})\text{X})^+]$ általános összetétellel (ahol az arén: benzol vagy származéka, kel: kelátképző ligandum, X : halogén atom) [21]. A komplexek pszeudo-oktaéderez, „zongora-szék” geometriájúak, ahol a zongorát a fém-szén kötés jeleníti meg, a zongoraszék lábait pedig a halogén atomok [22]. A faciális aromás rész stabilizálja a Ru(II)-t, valamint hidrofób részt biztosít, így megkönnyíti a sejtmembránon keresztüli szállítást és a biomolekuláris felismerés folyamatát. A megfelelő lipofil karakterük lehetővé teszi a komplexek intravénás adminisztrációját [23]. Az aromás rész π -akceptorként viselkedik, a kelátképző ligandumok pedig további stabilitást biztosítanak. A kelátképző ligandumokat tartalmazó komplexek sokkal aktívabbak, mint a monodentát ligandumot tartalmazó párjaik. A kelátképző ligandum természete nagyban befolyásolja a rákellenes aktivitást.

Mivel a komplexek már +2-es oxidációs állapotban vannak és alaptól aktívak, a „redukció általi aktiváció” nem vonatkozik rájuk. Míg a Ru(III) komplexek inerte a ligand szubsztitúcióban, a Ru(II)-Cl kötések labilitása megnő a Ru(III)-hoz képest [24].

A Sadler-csoport által fejlesztett RM175 rákellenes hatást mutat a ciszplatin-rezisztens rákos sejtvonalakon is [25]. Az RM-vegyületek a citotoxicitásuk által fejtik ki hatásukat [26]. Dyson kutatócsoportja által vizsgált RAPTA-vegyületek alacsony „in vitro” citotoxicitásúak, de az áttétek gátlásában „in vivo” aktívnak bizonyultak; az inváziós és áttétes folyamatoknál (amelyeknél nem feltétlenül szükséges citotoxikus folyamat a zavarkeltéshez) hatásosak [26].

Munkánk során a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ (ruténium-4-izopropil-toluol) komplexet választottuk egyensúlyi vizsgálatokhoz.

2.7. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ (ruténium-4-izopropil-toluol) komplex

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ komplexeket általában klór-hidas dinukleáris $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)Cl}_2]_2$ komplexből készítik. Ezen dimer komplex a vizes oldatban monomer részecskékké disszociálódik és hidrolizál. A klorid ligandumok részben vagy teljesen kicserélhetőek vízre vagy hidroxidionra a kloridion koncentráció és a pH értékektől függő mértékben [27].

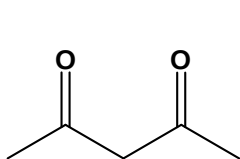
A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ komplex a szervezetbe kerülve jelentős átalakulásokon megy keresztül, és különböző biofolyadékok kis, valamint nagy molekulatömegű komponenseivel reagál. A három elérhető koordinációs hely közül mindegyik lecserélődhet vízre, amelyet gyakran egy kelátképző ligandum foglal el [28]. A három koordinációs helyet elfoglaló ligandumok kiválasztásával szelektíven módosítható a Ru(II) komplexek kinetikája és farmakológiai tulajdonságai [29]. A kelátképző ligandum nemcsak a biológiai tulajdonságokra lesz hatással, hanem a stabilitást is befolyásolja, megelőzve a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ fémorganikus rész hidrolízisét. Továbbá, a ligandum módosíthatja a különböző biomolekulákkal, pl. albuminnal, transzferinnel vagy egyéb, a sejtekben megtalálható fehérjékkel való kölcsönhatását is.

A kelátképző ligandum disszociációjának foka, a Ru(II)-donoratom kölcsönhatás erőssége, valamint a vízben létrejött formák hidrolízisének speciációja kulcsfontosságú témák a fém-alapú rákellenes gyógyszerek „in vivo” aktivitásának tervezésénél [22]. Ezen komplexek „előgyógyszerként” („prodrug”-ként) tekinthetőek, vagyis inaktív formában kerülnek be a szervezetbe, ahol megfelelő folyamatok hatására

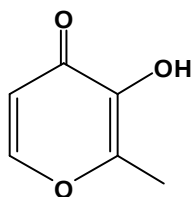
válnak csak aktívvá [30]. A farmakokinetikai tulajdonságok és a hatásmechanizmus megértéséhez a speciáció ismerete biológiai fluidumokhoz hasonló körülmények között nélkülözhetetlen.

Számos $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}(\text{XY})\text{Cl}]$ -típusú komplexet állítottak elő, melyeknél XY egy (N,N), (O,O), (O,N), (O,S), (N,S) típusú bidentát ligandum [30], ezek oldatbeli viselkedését ismertetjük a következőekben.

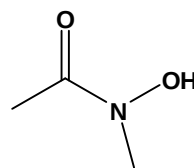
2.7.1. (O,O) donor ligandumok



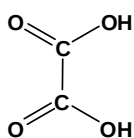
acetyl-aceton



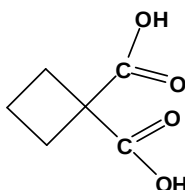
maltol



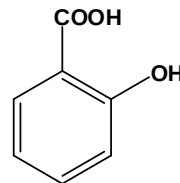
N-metil-aceto-hidroxiámát



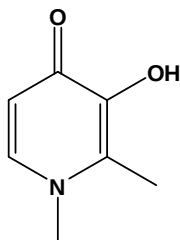
oxálsav



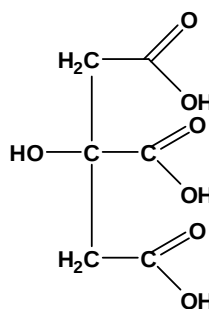
ciklobután-1,1-dikarbonsav



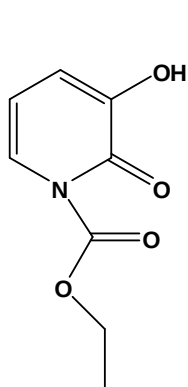
szalicilsav



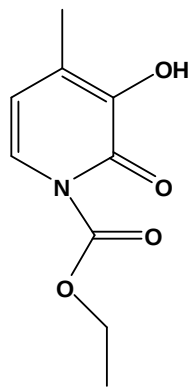
3-hidroxi-1,2-dimetil-piridin-4(1H)-on



citromsav



N-[(etoxikarbonil-metil)]-
3-hidroxi-2(1H)-piridon



N-[(etoxikarbonil-metil)]-3-
hidroxi-4-metil-2(1H)-piridon

5. ábra (O,O) kelátképző ligandumok szerkezeti képletei, melyek
[(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)]-al való kölcsönhatását már vizsgálták

A [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)] és a labilisabb (O,O) kelátképző ligandumok kölcsönhatását a Sadler vezette kutatócsoport, valamint Buglyó Péter és munkatársai intenzíven tanulmányozták. A Sadler-csoport a [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)] és acetyl-aceton (acac) közötti kölcsönhatást vizsgálták [31]. Meghatározták a kloridionok vízmolekulára való cserélését követően kialakult részecskék pK értékét. Kísérleteik alapján $pH = 2,2$ értéken a [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)(acac)(H₂O)]⁺ mellett [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)(H₂O)₃]⁺ is megjelenik, míg $pH > 9$ értéken egy dinukleáris, vegyes hidroxó-komplexet - [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)(acac)]₂(μ^2 -OH)⁺ - is feltételezték.

Ezt követően Sadler és munkatársai a [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)] és maltol (malt) által kialakított komplexek oldategyensúlyi folyamatait írták le [32]. Fiziológias pH értéken ($pH = 7,4$) a fémion : ligandum 1 : 1 arányú [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)(acac)(H₂O)]⁺ komplex részben hidrolizál egy gyors folyamatban és [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)₂(μ^2 -OH)₃]⁺ képződik. A maltol sokkal hatékonyabban képes megakadályozni a hidrolízist, mint az acetyl-aceton, mivel öttagú (O,O) kelátgyűrűt tud képezni, míg az utóbbi csak kevésbé stabil hattagú kelátgyűrűt alkot.

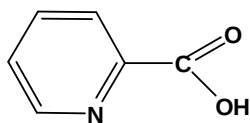
Buglyó Péter és kutatócsoportja megállapította, hogy a monohidroxamátok stabilis komplexeket tudnak képezni a [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)] komplexszel, szilárd fázisban és folyékony oldatban egyaránt [33]. Ezen komplexek hidrolízisét részletesen tanulmányozták, meghatározták a hidroxó-komplexek stabilitási állandóját. A hidrolízist figyelembe véve megkapták a [(η^6 -*p*-cimol)Ru(II)] - meaha rendszer (ahol meaha : N-metil-acetohidroxamát) pH -függő speciációját, valamint meghatározták a monohidroxamáttal képzett komplexek összetételét és stabilitási állandóját.

Ahhoz, hogy a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ meaha-hoz való kötési erősségét összehasonlítsák más (O,O) donor ligandumokéval, szisztematikus tanulmányt végeztek el. Öttagú, ill. hattagú kelátképzőket választottak ligandumokként, ahol a donor atomoknak különböző volt a bázicitása [27]. Eredményeik alapján kijelenthető, azon ligandumok, amelyeknél két enyhén bázikus O donor található (pl. oxálsav), csak savas körülmények között kötik a fémiont, de magasabb pH-n nem képesek megelőzni a fémion hidrolízisét, így fiziológiai pH-n a sokkal inertebb $[\{(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}\}_2(\mu^2\text{-OH})_3]^+$ fog képződni. Azon ligandumoknál, amelyeknél az egyik O kis, a másik O nagy bázicitású (pl. szalicilsav), a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -hoz való gyenge kötődést tapasztaltak. A hasonló típusú donor atomot tartalmazó kelátok közül (pl. karboxilát) az öttagúak sokkal stabilisabbnak bizonyultak, mint a hattagúak (oxálsav vs. ciklobután-1,1-dikarbonsav). Az (O,O) kelát negatív töltésének delokalizációja „pszeudo aromás” karaktert ad, így a fémkomplex extra stabilitású volt (pl. acetil-aceton, 3-hidroxi-1,2-dimetil-piridin-4(1H)-on).

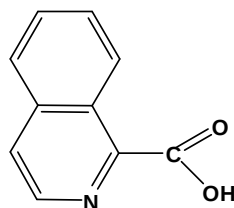
Szintén Buglyó Péter és munkatársai a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és egy fontos kis molekulatömegű, vérérszumban jelenlévő biomolekula, a citromsav (citrH_3) komplexeit tanulmányozta [34]. A citromsav a makromolekulák katabolizmusában játszik fontos szerepet, valamint a citrát-kör egyik fő intermediere. Azt tapasztalták, hogy pH-tól függő mértékben a citrát $[\text{COO}^-, \text{COO}^-, \text{OH}^-]$ vagy $[\text{COO}^-, \text{COO}^-, \text{O}^-]$ típusú koordinációt alakított ki a fémionnal nagy stabilitású 1 : 1 összetételű komplexeket létrehozva. Fiziológias pH értéken a fémion hidrolízise teljesen gátolt, még fémion : ligandum = 1 : 1 arányánál is. Elkészítettek $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}(\text{citrH})]x\text{H}_2\text{O}x\text{CH}_3\text{OH}$ és $2[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}](\text{citrH})x3\text{H}_2\text{O}$ vegyületek egykristályait, a komplexek pontos szerkezetét röntgenkristallográfiával állapították meg.

Egy új ötlet, hogy a fémorganikus részt biológiailag aktív ligandummal hozzák kölcsönhatásba. Enyedy Éva és munkatársai az „in vitro” antitumor aktivitást mutató bidentát (O,O) alkoxi-karbonil-metil-3-hidroxi-2(1H)-piridon $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ komplexeinek összetételét és stabilitását vizsgálták [30]. Tanulmányaik alapján fiziológias pH-tartományban 1 : 1 összetételű komplexek dominálnak, melyekben a ligandum kétfogú módon koordinálódik a fémionhoz az oxigén donor atomjain keresztül. A komplexeknek mérsékelt volt a stabilitása. Bázikus körülmények között a komplexekből egy dinukleáris, trihidroxó-hidas $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}_2(\text{OH})_3]^+$ komplex, szabad ligandum és $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}\text{L}(\text{OH})]$ összetételű komplex képződik.

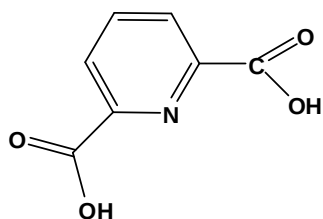
2.7.2. (O,N) donor ligandumok



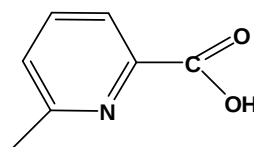
pikolinsav



izokinolin-3-karbonsav



piridin-2,6-dikarbonsav



6-metil-pikolinsav

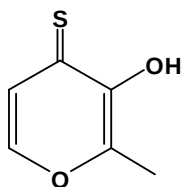
6. ábra (O,N) kelátképző ligandumok szerkezeti képletei, melyek $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -al való kölcsönhatását már vizsgálták

A pikolinsav számos enzim alkotórésze, és gyógyszermolekulák aktív csoportjaként is többször szerepel antiproliferatív hatása miatt. Az izokinolin-3-karbonsav a pikolinsav kondenzált vázat tartalmazó származéka, melynek ezáltal nagyobb a hidrofobicitása. Ivanovic, Jovanovic és kollégái szintetizálták és jellemezték ezen két ligandum (pikolinsav és izokinolin-3-karbonsav), ill. a ligandumok fluor-, klór-, bróm- és metil-származékainak $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -vel alkotott 1 : 1 arányú komplexeit [35]. A röntgenkristallográfiai adatok alapján a részecskék „zongora-szék geometriájúak”, melyekben a pikolinát ligandumok a piridin nitrogénjén és a karboxilcsoport oxigén atomján keresztül koordinálódtak. Az izokinolin-3-karbonsav ligandummal alkotott komplex jóval alacsonyabb citotoxikus aktivitást mutatott az egészséges sejtvonalon, továbbá antiproliferatív hatással is rendelkezett.

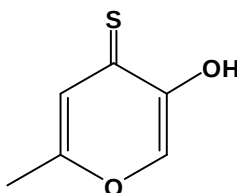
Az SZTE Bioszervetlen kémiai kutatócsoport tagjai pH-potenciometria, ^1H -NMR-spektroszkópia és UV-Vis-spektroszkópia segítségével meghatározták a pikolinsav, valamint 6-metil- és 6-karboxil-pikolinsav származékok és $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ között vizes oldatban, kloridionok jelenlétében létrejövő komplexek

összetételét és stabilitását [36]. A pikolinátok kizárólag 1 : 1 összetételű komplexeket képeztek, amelyekben kétfogú (O,N) módon koordinálódtak a fémionhoz; a fémion körüli harmadik koordinációs helyet pedig a körülményektől függően kloridion vagy vízmolekula foglalta el. A vízmolekulát tartalmazó komplex hidrolízisével vagy a klorid-hidroxid ligandumcserével vegyes hidroxido-komplex: $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)(L)(OH)}]$ alakult ki a bázikus pH-tartományban. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$: pikolinsav = 1 : 1 összetételű komplex pH = 3-11 tartományban 24 óra alatt sem bomlott el. A 6-metil- és 6-karboxil pikolinsav esetében egy kismértékű, alacsony reakciósebességű disszociáció volt megfigyelhető, melynek következményeként dinukleáris trihidroxó-hidas $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}_2(\text{OH})_3]^+$ és szabad ligandum jelent meg pH > 10 tartományban. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ ligandumokhoz való kötési erőssége a következő sorrendben változik: 6-metil-pikolinsav < pikolinsav < piridin-2,6-dikarbonsav. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)(L)Cl}]$ komplex kloridionjának vízmolekulára történő cserélődésével hasonló egyensúlyi állandókat állapítottak meg. A 6-karboxi-pikolinsav komplexe sokkal kevésbé képes megtartani a kloridiont a harmadik koordinációs helyen.

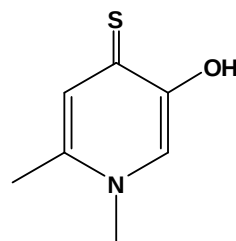
2.7.3. (O,S) donor ligandumok



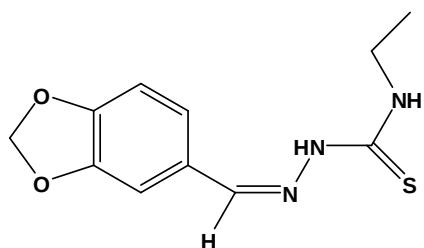
tiomaltol



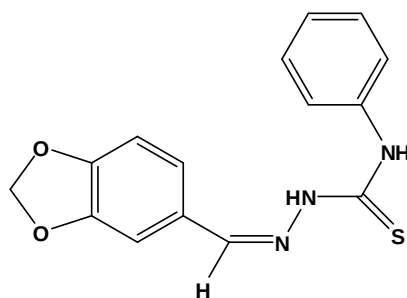
tioallomaltol



tio-3-hidroxi-1,6-dimetil-piridin-4(1H)-on



piperon-N-etil-tioszemikarbazon



piperon-N-fenil-tioszemikarbazon

7. ábra (O,S) kelátképző ligandumok szerkezeti képletei, melyek $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -al való kölcsönhatását már vizsgálták

Keppler és munkatársai az (O,S) donor készletű ligandumokkal kezdtek el foglalkozni [37]. Kutatásaik alapján a maltol (O,S) analógja sokkal stabilabb komplexet képzett $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -vel, mint a maltol, és ellentétben a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{malt})\text{Cl}]$ komplexszel, képes volt „in vivo” megőrizni a komplex rákellenes aktivitását.

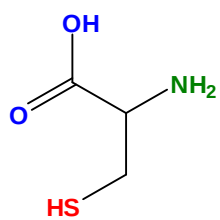
A tioszemikarbazonok kiváló kemoterápiás tulajdonságokkal rendelkeznek. Tioszemikarbazon ligandumot tartalmazó fémorganikus Ru(II) komplexeket szintetizáltak és jellemeztek [38]. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}(\text{pPhTSC})(\text{Cl})]\text{Cl}$ (ahol pPhTSC: piperon-N-fenil-tioszemikarbazon) és $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}(\text{pEtTSC})(\text{Cl})]\text{Cl}$ (ahol pEtTSC: piperon-N-etil-tioszemikarbazon) komplex összetételét IR-, NMR-spektroszkópiával, ill. röntgenkristallográfiával is igazolták. Megvizsgálták a komplexek DNS-sel való kölcsönhatását; a kötési állandók értékei $3,97 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ és $4,07 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ voltak 293 K hőmérsékleten. A DNS-sel való kölcsönhatás viszkozimetriás mérések alapján nem kovalens kötéssel történhet, hanem például a ligandum DNS-száliba történő beékelődésével. A humán szérum albuminhoz a komplexek erősen, $2,94 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, ill. $12,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ kötési állandókkal kötődnek 296 K-en. A kötődés valószínűsíthetően a triptofán aminosavaknál vagy azok környezetében történhet. Mindkét vegyület a humán topoizomeráz II jó katalitikus inhibitorának bizonyult $20 \mu\text{M}$ koncentrációnál.

Az SZTE Bioszervetlen kémiai kutatócsoport munkatársai az (O,O) és (O,S) donor rendszerek speciációja, ill. bioaktivitása közötti eltérést tanulmányozták [39]. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és kétfogú (O,O) hidroxipiron, valamint (O,S) hidroxipir(id)on típusú ligandumok között kialakuló komplexek szerkezetét és stabilitását írták le. A hidroxipiron ligandumok (etil-maltol, allo-maltol) esetében mérsékelt stabilitású monoligandumos komplexek dominálnak a fiziológiás pH-tartományban. A komplexek

bázikus közegben átalakulnak egy dinukleáris tri-hidroxo-hidas $[(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru(II)}_2(\text{OH})_3]^+$ komplexszé és szabad ligandummá, valamint $[(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru(II)}(\text{L})(\text{OH})]$ részecskék képződését is megfigyelték. A hidroxi-tiopir(id)on ligandumok (tiomaltol, tioallomaltol, 3-hidroxi-1,2-dimetil-tiopiridon) a hidroxi-pironokhoz képest jóval nagyobb stabilitású mono-ligandumos komplexeket képeznek, és savas pH-tartományban dominálnak. A hidroxi-pironokhoz képest a komplexeknek nagyobb a citotoxicitása; az eltérő bioaktivitással magyarázható a stabilitásbeli különbség is. A hidroxi-tiopir(id)on komplexek pH > 6 tartományban történő hidrolízise összetettebb folyamat, mivel valószínűleg vízben kevésbé oldódó hidroxo-oligomerek képződnek. Ligandum-felesleg hatására kialakulhatnak bisz komplexek (ML_2 és ML_2H) is, melyeknél egy- és kétfogú koordináció is megfigyelhető volt. Magasabb pH értékeken a tiomaltol monodentát koordinációjú trisz komplexeket is kialakított. *Mindez alapján feltételezhető, hogy endogén bioligandumok, pl. fehérjék cisztein része részt vehet egyfogú koordinációban.* A $[(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru(II)}(\text{L})(\text{Cl})]$ komplex kloridionjának vízmolekulára való lecserélődése fontos aktivációs lépés, mivel megkönnyíti a komplex biológiai célmolekulákhoz történő kötődését. Etil-maltollal kialakított komplexnél a kloridionok ~64 %-a cserélődött ki vízmolekulára 0,1 M kloridion koncentráció esetében a vérszérumban. Az intracelluláris folyadékban – ahol a kloridion koncentráció kisebb – várhatóan az akvakomplexek lesznek túlsúlyban.

2.8. L-cisztein jellemzése

Az L-cisztein a vérszérum kis molekulatömegű komponense, koncentrációja ~ 33 $\mu\text{mol/dm}^3$. Donorcsoportjai – tiol-, karboxil-, aminocsoport - révén potenciális ruténium(II) kelátor, mely koordinációjával hatással lehet a $[(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Ru(II)}]$ szérumbeli speciációjára. Mivel a tiol oldallánc igen reakcióképes, ezért az L- cisztein általában kulcsszerepet játszik a fehérjék szerkezeti és funkciós elemeként [5]. Többek között az antioxidáns glutation, valamint a vas-kén-klaszterek prekursora, továbbá számos metalloenzim fémkötő sajátságaiban is szerepet játszik (pl. citokróm P450, alkohol-dehidrogenáz) [40]. A tiolcsoport acilezése acil-donor vegyületekhez vezet (ilyen például az acetil-koenzim-A). Könnyen oxidálódik, így diszulfid-kötések alakulhatnak ki; az oxidálódott formáját cisztinnek hívják.

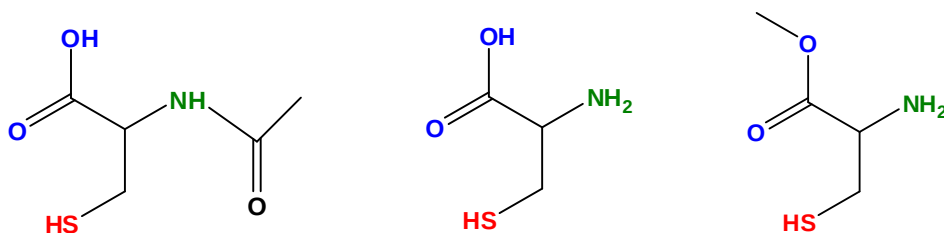


8. ábra L-cisztein szerkezeti képlete és donorcsoportjai

3. Célkitűzés

Fő célunk az L-cisztein és a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ között fiziológiás pH-tartományban kialakuló komplexek összetételének, szerkezetének, illetve stabilitásának meghatározása. Az utóbbi alapján kiszámíthatóvá válna, hogy a vérszérumban mely potenciális kelátorok képesek a koordinációs szférában maradni, megakadályozva, hogy a cisztein kiszorítsa őket onnan.

$^1\text{H-NMR}$ előméréseink alapján a rendszer meglehetősen bonyolult, ezért megbízhatóbb eredmények érdekében először a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és a védett aminos csoportot tartalmazó *N*-acetyl-L-cisztein, valamint a védett karboxil csoporttal rendelkező L-cisztein-metil-észter közötti kölcsönhatást kívántuk felderíteni. A három ligandum komplexeinek összehasonlítása várhatóan elősegíti a kialakuló komplexek kötőmódjának meghatározását is.



9. ábra *N*-acetyl-L-cisztein, L-cisztein és L-cisztein-metil-észter szerkezeti képletei

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -L-cisztein rendszer jellemzésével következtetéseket vonhatunk le a potenciális rákellenes hatású $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ vérszérumbeli viselkedésére a fiziológiás pH értéknél.

4. Kísérleti rész

4.1. pH-potenciometria

Az *N*-acetyl-L-cisztein, ill. L-cisztein pK értékeit, valamint a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -vel oldatfázisban keletkező komplexek összetételének, protonálódási folyamatainak és stabilitási állandóinak meghatározására pH-potenciometriás eljárást alkalmaztunk.

A pH-potenciometria eljárásával a protonok egyensúlyi koncentrációját mérjük megfelelő elektród segítségével. A galvancia két elektródja (referencia és indikátor elektród) közötti potenciálkülönbséget feszültségmérő (pH-mérő) segítségével követhetjük.

A méréseket $25 \pm 0,1$ °C-on végeztük vizes oldatban speciálisan kialakított üvegedényekben. Az oxigén kizárása érdekében argon gázt buborékolattunk a titrálandó oldatokba, melyeket folyamatosan kevertettünk. Az aktivitási egyútható állandó értéken tartásának érdekében az ionerősséget $0,2 \text{ mol/dm}^3$ értékre állítottuk KCl-oldat segítségével. A titrálásokat minimális karbonát-tartalmú KOH-oldatokkal hajtottuk végre. A HCl- és KOH-oldatok pontos koncentrációját szintén pH-potenciometriás titrálással állapítottuk meg. Metrohm kombinált elektróddal felszerelt Orion pH-mérővel és Metrohm Dosimat titrátorral dolgoztunk. Az elektródot minden mérés előtt KH-ftalát-oldattal kalibráltuk ($T = 25,0$ °C, $\text{pH} = 4,005$). A mérőrendszert KH-ftalát és HCl-oldatok KOH-oldattal történő titrálásával hitelesítettük. A pH értékekből az Irving-féle korrekcióval számoltuk ki a hidrogénion koncentrációt [41]. A vízionszorzat ($pK_w = 13,755$) és az Irving-faktor értékét rendszeresen ellenőriztük.

Az *N*-acetyl-cisztein és L-cisztein koncentráció $2,0 \text{ mmol/dm}^3$, a minták kezdeti térfogata $8,0 \text{ cm}^3$ volt, a fémion-ligandum arány rendre 2 : 1,8; 2 : 1; 2 : 0,5; 1 : 1 és 1 : 0,5. A titrálásokat $\text{pH} = 2,0 - 11,7$ tartományban végeztük.

A komplexek sztöchiometriájának és stabilitási állandójának meghatározására a PSEQUAD számítógépes programot alkalmaztuk [42]. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}_2(\text{OH})_i]$ komplexek $\log\beta$ értékeit az irodalomból vettük [27].

4.2. UV-Vis-spektroszkópia

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és *N*-acetil-L-cisztein között kialakuló komplexek protonálódási folyamatainak követésére UV-Vis-spektrofotometriás titrálást használtunk. Az UV-Vis spektrumokat Hewlett Packard 8452A diódasoros spektrofotométerrel vettük fel. 200-800 nm hullámhossz-tartományt és 1,0 cm-es úthosszt állítottunk be. A spektrofotometriás titrálásokat pH = 2-10 tartományban, 0,2 pH-különbséggel végeztük $25,0 \pm 1$ °C-on. A fémion koncentrációja $1,0 \text{ mmol/dm}^3$ volt, az össztérfogat $10,0 \text{ cm}^3$. A titrálásokat fémion-ligandum 1 : 1,15; 1 : 1,5; 1 : 2 arányainál hajtottuk végre.

4.3. ^1H -NMR-spektroszkópia

A ligandumok $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ komplexeinek összetételét, valamint az esetleges protonálódási folyamatait ^1H -NMR mérésekkel is vizsgáltuk. Előméréseink alapján a ligandumcsere sebesség elegendően lassú volt ahhoz, hogy a képződő komplexek jelei külön-külön megjelenjenek a spektrumon, így a pH értékek, valamint a fémion : ligandum arányok megfelelő változtatásával felvett spektrumsorozatok alapján várhatóan dönthetünk a pH-metria alapján felállított modellek közül.

A ^1H -NMR méréseket Bruker Spectrospin Avance 500 MHz-es készülékkel végeztük. Belső NMR-standardként trimetil-szilánt (TMS) használtunk; a mérésekhez vízelnyomás módszert alkalmaztunk. A mintákat 10,0 V/V %-os $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ elegyben készítettük $0,2 \text{ mol/dm}^3$ -es ionerősséget beállítva $25,0 \pm 1$ °C-on. Megmértük a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és mindhárom ligandum pH-függő NMR-spektrumát a pK értékek és az oxidáció mértékének megállapítása céljából. A fémion és a ligandumok koncentrációja $3,0 \text{ mmol/dm}^3$ volt. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -t megtitráltuk mindhárom ligandummal, és felvettük a ^1H -NMR-spektrumokat pH = 2,0; 5,5; 7,5; 10,0 értékeken fémion : ligandum 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1; 1 : 1,2; 1 : 1,4; 1 : 1,6; 1 : 1,8; 1 : 2,0; 1 : 2,5; 1 : 3,0 arányoknál. Az egyedi minták térfogata 800 μl volt. A fémion : ligandum 2 : 1; 1 : 1 és 1 : 2 arányú rendszerek pH-függését is vizsgáltuk pH = 2,0-11,0 tartományban pH = 0,3 különbséggel. A pH-függő méréseknél $20,0 \text{ cm}^3$ mintatérfogatból indultunk ki. A spektrumokat a MestReNova programmal értékeltük ki. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -L-cisztein rendszerénél az ^1H -NMR spektrumok integrál értékei alapján számolt speciáció értelmezéséhez megpróbáltuk felhasználni a PSEQUAD programot is.

A jel-hozzárendelés elősegítésére 2D-NMR (^1H -TOCSY) módszert alkalmaztunk. Ennél a módszernél az RF-impulzust egy „kifejlesztési” szakasz követ, mely tartalmazhat pulzusokat, folyamatos besugárzásokat. A hossza változhat; ez az, amiből a t_1 tengely származik. A „kifejlesztési” szakasz után egy második impulzus következik, majd a mérési periódus, ami a t_2 tengelyt fogja adni. A kétdimenziós spektrumon a keresztcsúcsok az egymással csatolásban lévő protonokról nyújtanak információt. A TOCSY hasonló a COSY-hoz, de előnye, hogy nemcsak direkt csatolások, hanem távolható (több atomra kiterjedő) csatolások is vizsgálhatóak. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]\text{-}N\text{-acetyl-L-cisztein}$ rendszerénél fémion : ligandum 1 : 1 arányánál pH = 2,0; 5,5; 10,0 értékeken, valamint fémion : ligandum 2 : 1 arányánál pH = 7,2 értéken, 4,0 mmol/dm³ koncentrációnál vettük fel a spektrumokat. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és L-cisztein esetében fiziológiás pH értéken fémion : ligandum 1 : 1 és 1 : 2 arányánál mértünk ^1H -TOCSY technikával.

4.4. Felhasznált anyagok, vegyszerek

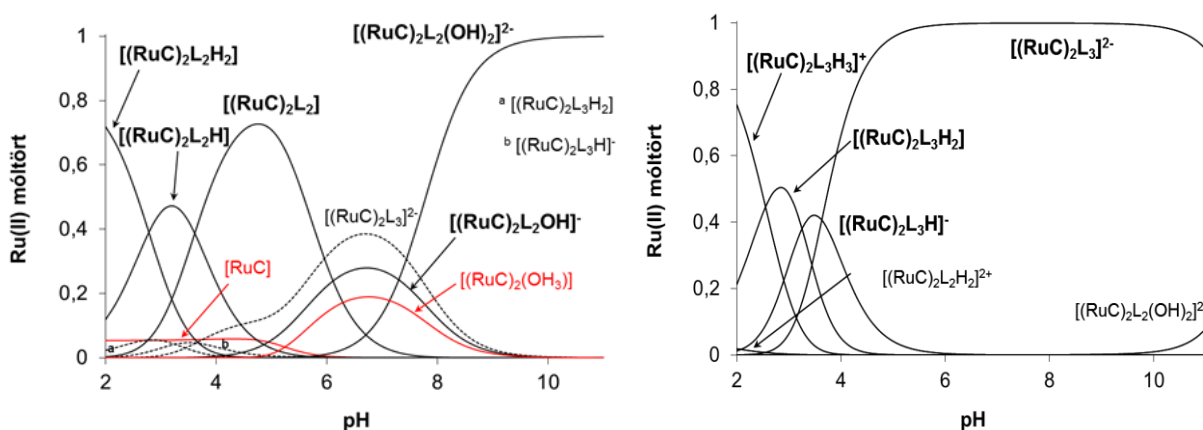
A mérésekhez használt $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]\text{-t}$, N-acetyl-L-cisztein, L-cisztein és L-cisztein-metil-észter ligandumokat a Sigma Aldrich cégtől rendeltük, a KOH, HCl és KCl Molar termékek voltak.

5. Eredmények bemutatása és értékelése

5.1. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és *N*-acetyl-L-cisztein rendszer

5.1.1. pH-potenciometria

A stabilitási állandók abszolút értékének meghatározása objektív okok miatt nem lehetséges, de az egyes komplexfeleségek között kémiai egyensúlyokra jellemző állandók mérhetőek voltak, eloszlásgörbe számítására lehetőség volt. A kapott koncentráció eloszlásgörbék alapján fémion : ligandum 1 : 1 arányánál ($c_{\text{RuC}} : c_{\text{acys}} = 3,0 \text{ mmol/dm}^3 : 3,0 \text{ mmol/dm}^3$) $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplexek dominálnak, gyakorlatilag nincs szabad ligandum. Ezzel szemben fémion : ligandum 1 : 1,5 arányánál ($c_{\text{RuC}} : c_{\text{L}} = 3,0 \text{ mmol/dm}^3 : 4,5 \text{ mmol/dm}^3$) $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_{3-0}$ komplexek bizonyultak dominánsnak, szabad fémion pedig nem jelent meg (lsd. 10. ábra).



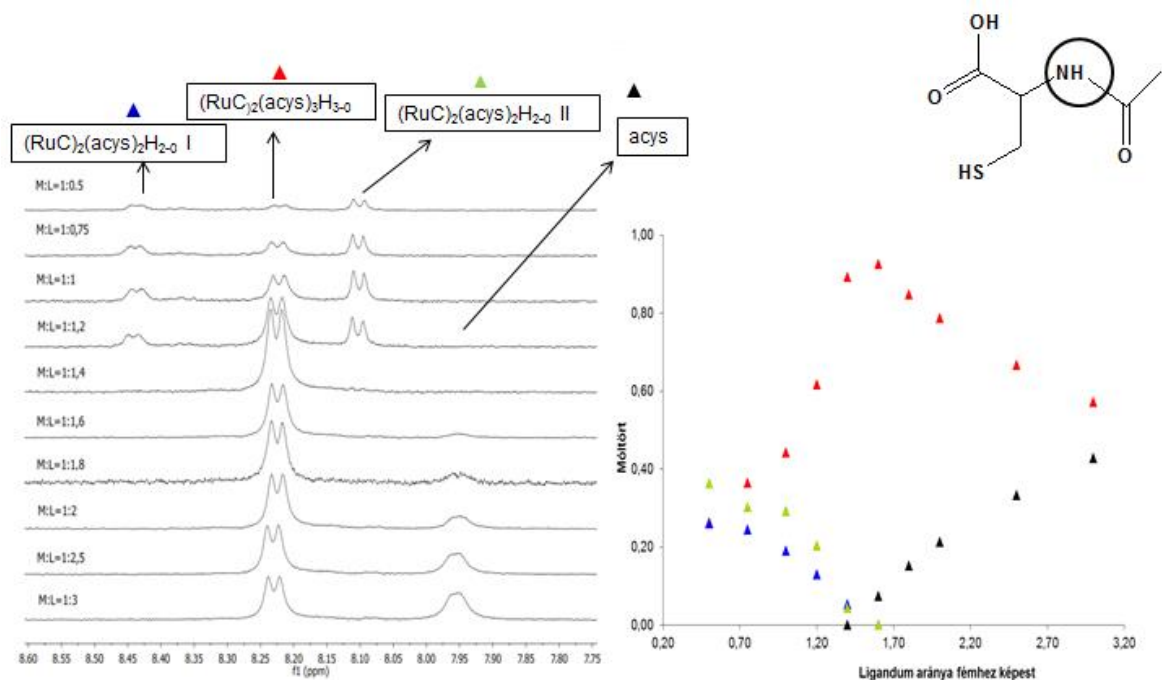
10. ábra Koncentráció eloszlásgörbe fémion : ligandum 1 : 1, illetve 1 : 1,5 arányainál ($\text{RuC} : [(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$, L: *N*-acetyl-L-cisztein)

Pontos stabilitási állandó számítására nem volt lehetőség, mivel másfélszeres ligandum feleslegig a rendszerben nincs szabad ligandum (fémion : ligandum 1 : 1 arány mellett a „szabad” fémionon kívül 2 : 3 összetételű részecskék is képződnek), ennél nagyobb felesleg esetén az összes ruténium komplexálva található.

5.1.2. ^1H -NMR-spektroszkópia és UV-Vis-spektroszkópia

A ^1H -NMR-spektrumokon $\delta = 7\text{-}9$ ppm tartományt választottuk az értékelés során. Ezen a tartományon a ligandum amidcsoport protonjának viselkedését tudjuk

követni, valamint ez az a tartomány, ahol a legkevesebb átfedő folyamat játszódik le. A csúcsok és az egyes komplexféleségek hozzárendelése érdekében kiszámoltuk a csúcsok integráljainak arányát (móltörtet) és ábrázoltuk a ligandum arány függvényében. A spektrumsorozatok esetében y tengelyt nem tüntettünk fel, mivel az nem ad kvantitatív információt. pH = 5,5 értéken azonosítottuk a fémion : ligandum 1 : 1,5 arányánál maximumot mutató $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_{3-0}$ komplexet (lsd. 11. ábra).

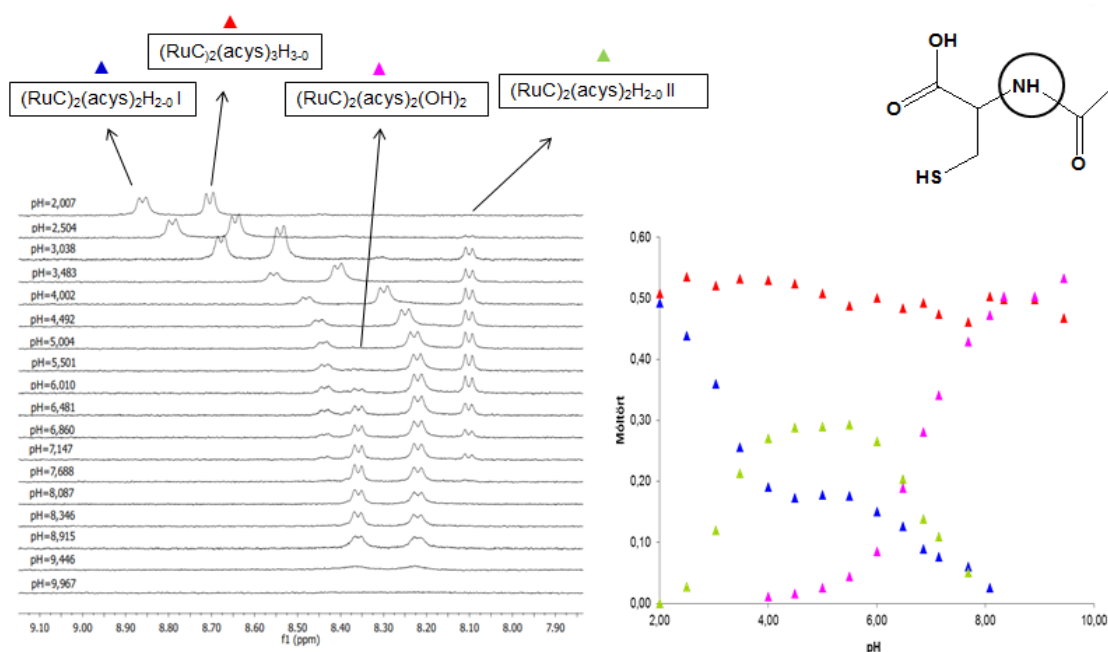


11. ábra Ligandum-függő ^1H -NMR spektrumok és integrálarányok a ligandumfelesleg függvényében pH = 5,5 értéken, $\delta = 7\text{--}9$ ppm tartományon (M: RuC, L: acys)

A párhuzamos lefutású két részecskét a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplex két izomer formájaként képzeljük el. A fémion : ligandum 1 : 1,5 arányától kezdve megjelent a szabad ligandum is.

A pH-függő ^1H -NMR spektrumoknál a részecskék protonálódási folyamatainak követése a csúcsok integrálarányainak (móltört) kiszámításával és pH függvényében történő ábrázolásával vált lehetővé. A fémion : ligandum 1 : 1 arányánál felvett pH-függő ^1H -NMR-spektrumok azt mutatják, hogy a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_{3-0}$ komplex mellett a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ izomerek egyike vesz részt egyszerű protonvesztéssel járó sav-bázis folyamatban, melyek mindegyike a szabad, nem koordinálódó karboxilcsoporthoz

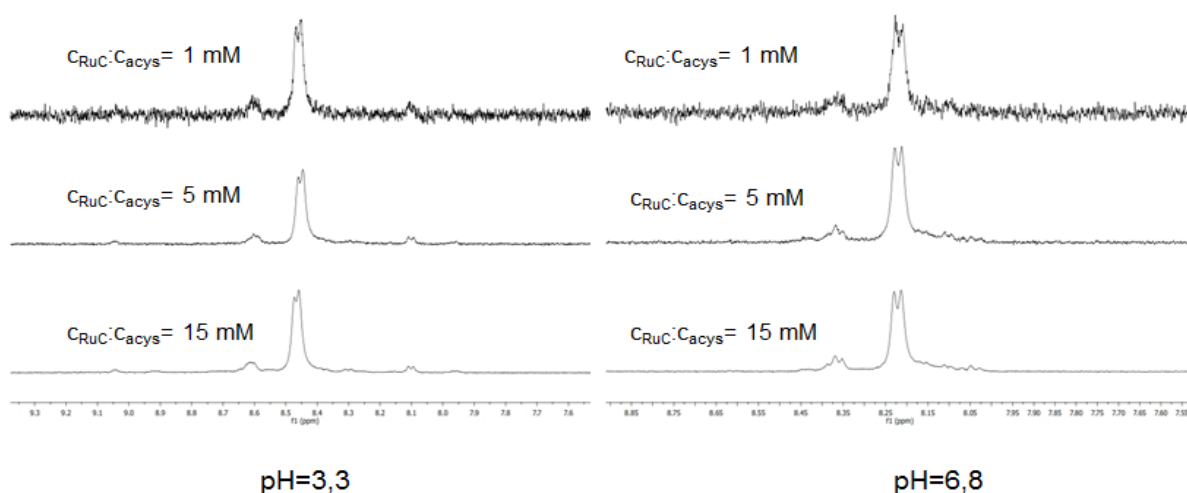
rendelhető (lsd. 12. ábra). A spektrumokon a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2(\text{OH})_2$ komplex jelenléte is kimutatható volt.



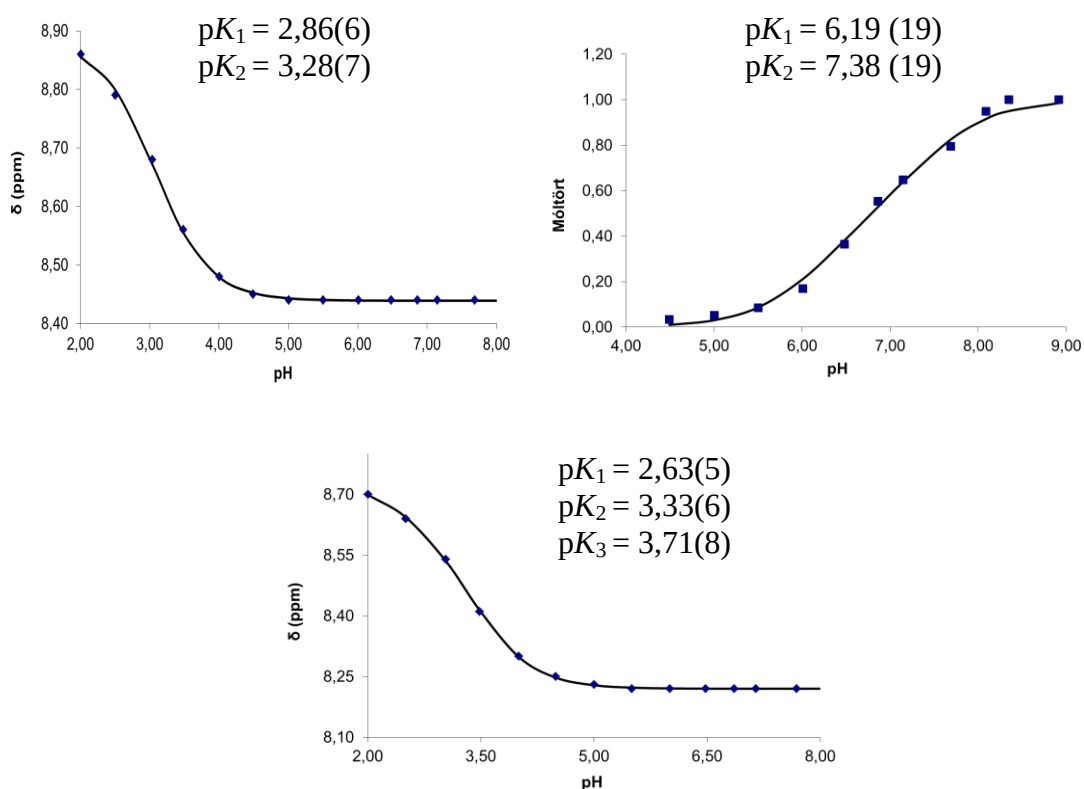
12. ábra pH-függő ^1H -NMR-spektrumok és integrál arányok a pH függvényében
fémion : ligandum 1 : 1 arányánál, $\delta = 7\text{--}9$ ppm tartományon
(M: RuC, L: acys)

Annak ellenőrzésére, hogy a 2 : 2 összetételű komplex összetételét helyesen adtuk-e meg, ^1H -NMR-méréseket végeztünk fémion : ligandum 1 : 1 arányánál 1,0 mmol/dm³, 5,0 mmol/dm³ és 15,0 mmol/dm³ koncentrációknál pH = 3,3 és pH = 6,8 értékeken (lsd. 13. ábra). A spektrumokban nem tapasztaltunk különbséget, így a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplexek valóban azonos nuklearitásúak.

A ^1H -NMR-spektrumok alapján kapott kémiai eltolódás értékekből, illetve egyik esetben móltörtre történő illesztéssel meghatároztuk a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_2$, $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2$ és $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_3$ pK értékeit (lsd. 14. ábra).

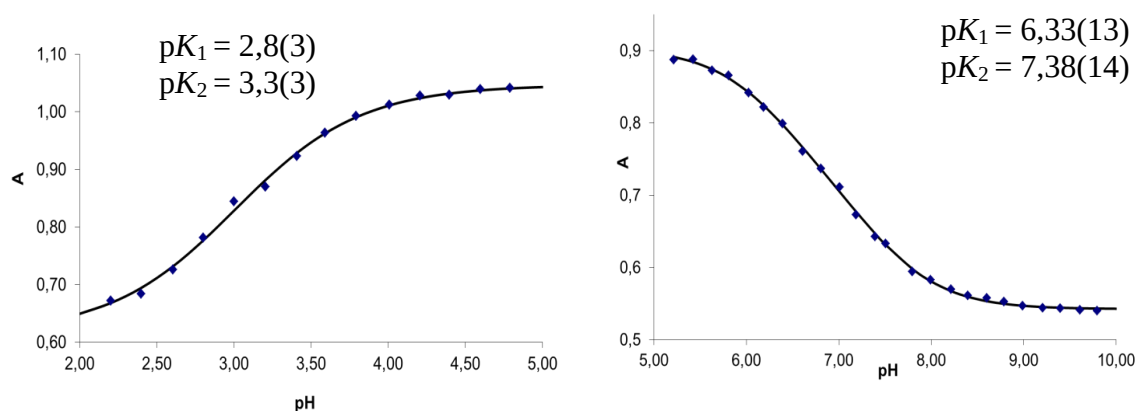


13. ábra Koncentráció-függő ^1H -NMR-spektrumok fémion : ligandum 1 : 1 arányánál
pH = 3,3 és pH = 6,8 értékeken ($\delta = 7\text{-}9$ ppm)

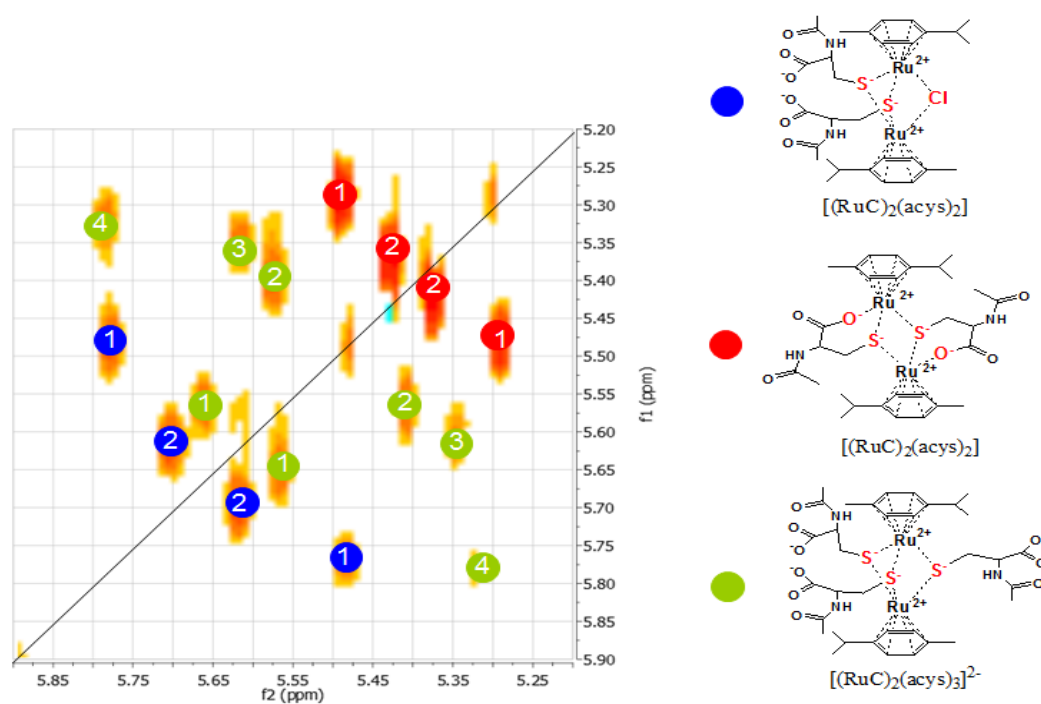


14. ábra $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_2$, $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2$ és $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_3$ pK értékeinek kiszámítása
kémiai eltolódás értékekre, illetve móltörré történő illesztéssel fémion : ligandum 1 : 1
arányánál

A spektrofotometriai mérések abszorbancia (A) értékeiből is meghatároztuk illesztéssel a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_2$ és $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2$ komplexek két pK értékét (ld. 15. ábra).



15. ábra $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_2$ és $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2$ pK értékeinek kiszámítása abszorbancia értékekre történő illesztéssel fémion : ligandum 1 : 1 arányánál



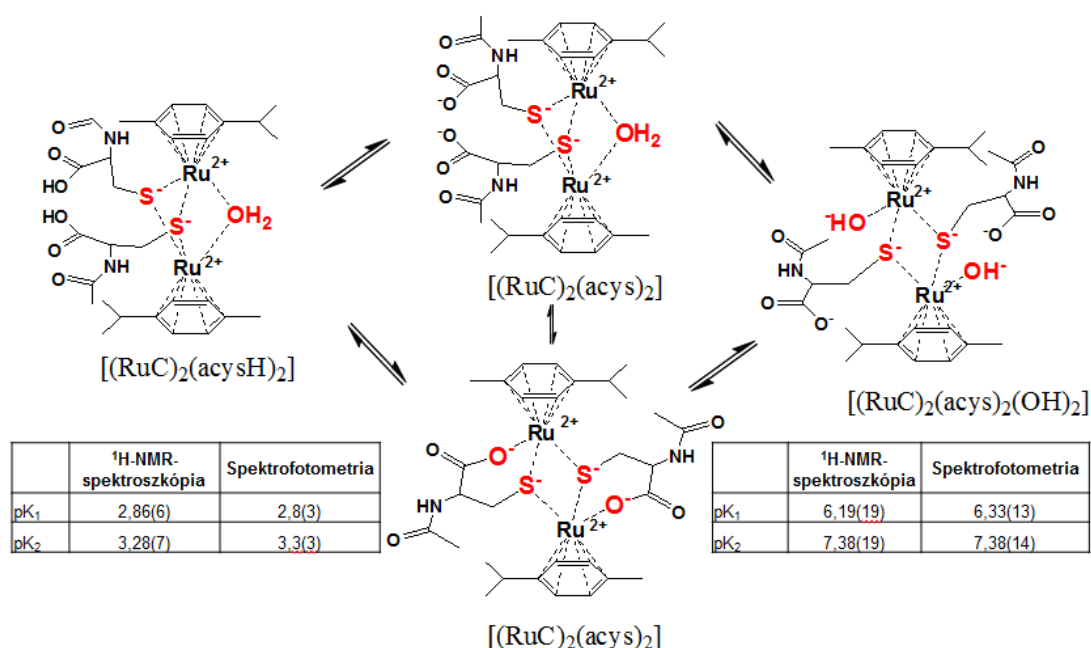
16. ábra Fémion : ligandum 1 : 1 arányánál, pH = 5,5 értéken felvett ^1H -TOCSY kétdimenziós spektrum és a keresztcsúcsokhoz rendelt komplexféleségek szerkezetei ($\delta = 5\text{-}6$ ppm)

A ^1H -TOCSY kétdimenziós spektrumoknál $\delta = 5\text{-}6$ ppm tartományt választottuk ki, ebben a részben a *p*-cimol-csoport aromás protonjait tudjuk tanulmányozni. Fémion : ligandum 1 : 1 arányánál, pH = 5,5 értéken felvett spektrumok alapján háromféle keresztcsúcs készletet tudunk elkülöníteni (ld. 16. ábra). Annak megállapítására, hogy

mely keresztcsúcsok tartoznak egy szetthez/készlethez, megnéztük, hogy az egy dimenziós tengelyeken lévő csúcsok közül melyek mozogtak együtt.

Az első készlethez (kék színnel jelölve) egy olyan 2 : 2 összetételű komplexet rendeltünk hozzá, melyben a két karboxilátcsoporthoz deprotonált, a fémionok harmadik koordinációs helyén pedig kloridion áll. A piros színnel jelölt második keresztcsúcs „készlet” feltételezéseink szerint szintén egy 2 : 2 összetételű komplexnek feleltethető meg, ahol a karboxilátionok és a tiolcsoporthoz kapcsolódnak a fémionhoz, a kloridion kiszorul a koordinációs szférából. Az utolsó keresztcsúcs csoporthoz $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_{3-0}$ összetételű komplexet javasoltunk, amelyben a két fémiont a három ligandum tiolcsoporthoz kapcsolja össze. Ennél a részecskénél az aromás protonok nyolcféle kémiai környezetben fordulnak elő. Ez az eredmény elég nehezen értelmezhető, hiszen a 2 : 3 összetételű hidrolízisrészecskéje esetén a két aromás proton jeléhez elméletileg csak egy keresztcsúcs kellene, hogy tartozzon. Nincs kielégítő válaszuk a jelenségre. A több környezet egyik magyarázata lehetne, hogy izomerek jönnek létre, de ez nehezen elképzelhető. Logikusabb magyarázat a négy különböző jelre az, hogy mivel a komplex a ligandum oldaláról nézve C_{3v} szimmetriájú, de a *p*-című résznek csak egy tükrötengelye van, így ennek megfelelően az aromás gyűrű elvileg két-két ekvivalens protonja másképp érzékeli a kén donorcsoporthoz, ami az ekvivalenciájuk megszűnését jelenthetné.

Az előbbieken részletezett eredmények alapján megkíséreltük leírni a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplexek lehetséges protonálódási folyamatait (ld. 17. ábra). Az első szerkezet a teljesen protonált komplex. A $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_2$ két proton elvesztésével átalakul $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2$ komplexszé, amely a koordinációs módtól függően két, egymással izomer formában fordulhat elő. A $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2$ két protont leadva $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2(\text{OH})_2$ komplexet fog képezni.



17. ábra $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplexek protonálódási folyamatai és pK értékei

5.2. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru}(\text{II})]$ és L-cisztein, ill. L-cisztein-metil-észter rendszer

5.2.1. pH-potenciometria (L-cisztein)

A pH-potenciometriás méréseket bár elvégeztük, kiértékelésük önmagukban nem volt sikeres. Feltételeztük, hogy az $^1\text{H-NMR}$ spektrumok teljes (kvantitatív) értelmezése nélkül a kiértékelés valószínűsíthetően nem is sikerülhetne. A problémát bonyolítja, hogy az NMR mérések alapján ligandumot a fémionhoz képest feleslegben tartalmazó minták esetében az L-cisztein oxidációja cisztinné már a savas pH tartományban megkezdődik. Ha ez a pH-metriás mérések esetében is így történt, értelmezésük gyakorlatilag lehetetlen, hiszen sem a pontos ligandum koncentrációt, sem a pontos proton koncentrációt nem ismerjük, ráadásul egy idegen, pH-metriásan aktív anyag (cisztin) is keletkezett, ismeretlen mennyiségben.

5.2.2. ^1H -NMR-spektroszkópia (L-cisztein és L-cisztein-metil-észter)

A ligandum koncentráció- és pH-függő ^1H -NMR-spektrumsorozat kiértékelésénél először a $\delta = 1,8\text{-}2,2$ ppm tartományt választottuk; ezen a tartományon a *p*-cimolnak a gyűrűhöz kapcsolódó metilcsoport jeleit tudtuk követni. (Az *N*-acetyl-L-cisztein esetében ezen a tartományon a ligandum acetyl csoportjának metil jelei is megjelentek, bonyolítva az értelmezést. Az L-cisztein ligandumnak viszont nincs amidcsoportja, így a $\delta = 7 - 9$ ppm tartomány jelmentes.) Összességében több mint 50 db különböző ppm értéknél megfigyelhető jelet találtunk $\delta = 1,8 - 2,2$ ppm kémiai eltolódás tartományon, melyek pontos hozzárendelése meghaladja ezen dolgozat kereteit. A kisebb csúcsok integrál értékeit ráadásul könnyű túlbecsülni. Igyekeztünk azokat a jeleket hozzárendelni az összetételhez, illetve szerkezethez, amelyeknek integrál értékei a legnagyobbak voltak, illetve az összes jel területéhez képest legalább 10%-ot értek el.

Azt tapasztaltuk, hogy nagy valószínűséggel a cimol gyűrűhöz közvetlenül kapcsolódó metilcsoportra jellemző kémiai eltolódás értékek nem kifejezetten érzékenyek az L-ciszteinen bekövetkező protonálódási folyamatokra. A kvantitatív kiértékelés további nehézségekbe ütközött a sok azonosíthatatlan részecske (az integrálértékek alapján kb. 20-40%), az L-ciszteinek ligandumfelesleg esetén, $\text{pH} > 6$ lejátszódó, a fémion : ligandum arányt már számottevően befolyásoló oxidációja, illetve esetlegesen feltételezhető egyéb lassú kinetikai folyamatok miatt, amelyekre a pH-beállítás nehézsége bizonyos körülmények között utalt. Sajnálatos módon a metil-észter származék mellett, hogy oxidációra hajlamos, lúgos közegben kismértékben disszociál is, így a cisztein-tartalmú komplexek kémiai eltolódásai is megjelenhettek kismértékben a spektrumokon, ami tovább bonyolította az esetünket.

Annyi mindenképpen megállapítható, hogy az L-cisztein és L-cisztein-metil-észter komplexei akárcsak az előző ligandum esetében kvantitatíve képződnek: vagy a szabad ligandum, vagy a szabad fémion koncentrációja nem mérhető, ezért a stabilitási adatok meghatározására csak a kétkomponensű rendszer tanulmányozásával nincs lehetőség.

Az egyes csúcsok integrál értékeiből számolt móltörtek különböző pH értékeken különböző fémion : ligandum aránynál vettek fel maximum értéket. Mindebből arra lehet következtetni, hogy a csúcsokhoz nem minden esetben lehet egyértelműen összetételt rendelni. Feltételezéseink szerint csak koordinációs módokat érdemes megállapítani, melyek több különböző összetételű komplexre is jellemzőek lehetnek.

Az 1. táblázatban a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és az L-cisztein komplexeinek kémiai eltolódás értékét láthatjuk a másik két ligandummal összehasonlítva. Azon részecskék, amelyek az L-ciszteinnél és metil-észtere esetében is megjelennek, nem tartalmazhatnak (COO⁻) koordinációt. Amennyiben az L-cisztein és a védett aminocsoportot tartalmazó N-acetil-L-cisztein között találunk hasonlóságokat, a (N) koordinációt zárhatjuk ki. A különbségek vizsgálatánál figyelembe kell venni a három rendszert jellemző eltérő sav-bázis állandók különbségét is (N-acetil-L-cisztein: $pK_{\text{H}_2\text{L}} = 3,10$, $pK_{\text{HL}} = 9,57$; L-cisztein: $pK_{\text{H}_3\text{L}} = 3,68$; $pK_{\text{H}_2\text{L}} = 8,15$ és $pK_{\text{HL}} = 10,09$; L-cisztein-metil-észter: $pK_{\text{H}_2\text{L}} = 6,65$; $pK_{\text{HL}} = 9,02$).

1. táblázat A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és L-cisztein, L-cisztein-metil-észter, ill. N-acetil-L-cisztein komplexeinek kémiai eltolódás értéke $\delta = 1,8\text{-}2,2$ ppm tartományon (*p*-cimol gyűrűhöz kapcsolódó metilcsoport protonjainak tartománya)

Feltételezett koordinációs mód	L-cisztein δ (ppm)	L-cisztein-metil-észter δ (ppm)	N-acetil-L-cisztein δ (ppm)
(N,S,S)	2,131-2,139	2,135-2,145	-
(N,N,S)	2,009-2,029	2,026-2,034	-
(O,N,S)	2,071-2,084	-	-
(N/S, OH ⁻ , OH ⁻)	2,179-2,183	2,178-2,182	-
	2,069-2,078	2,071-2,078	-
(S,S,OH ⁻)	2,105-2,154	2,103-2,112	-
(S,S,S)	2,087-2,098*	-	2,089-2,096**

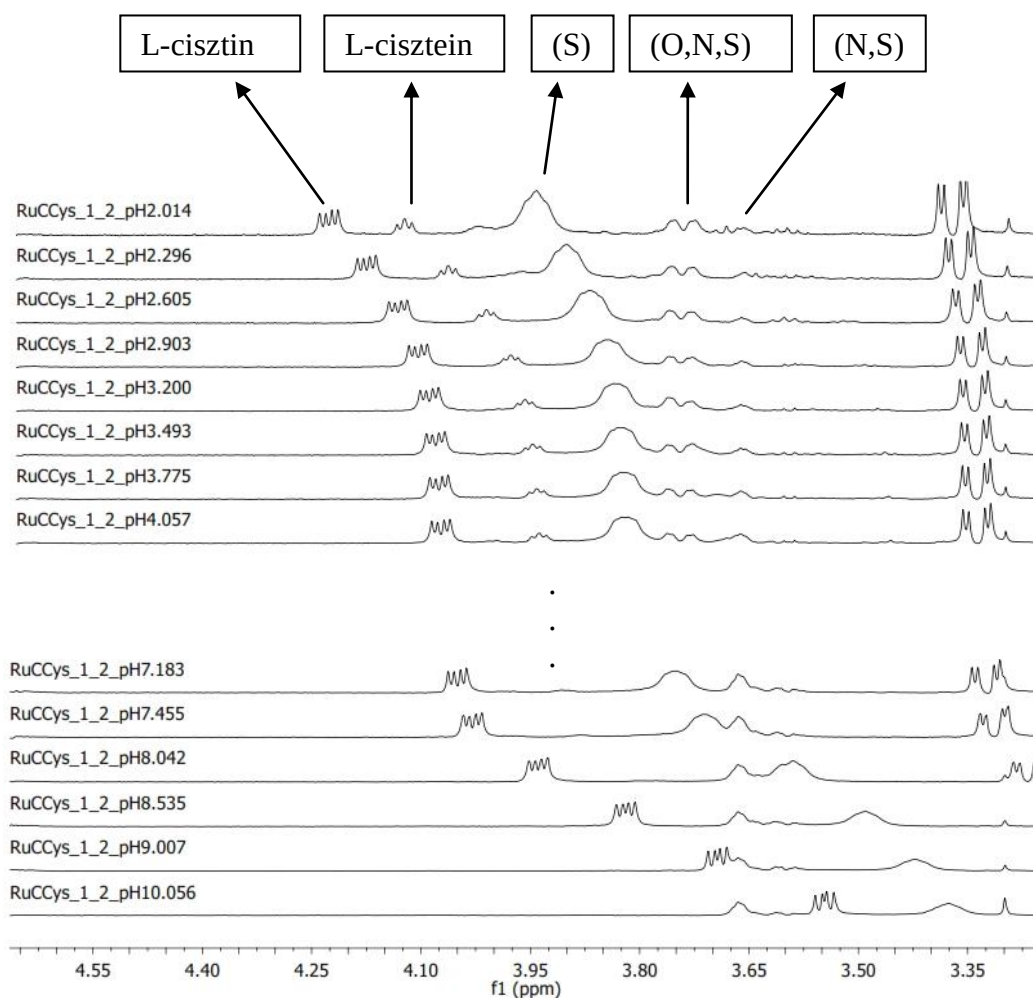
*domináns részecske

** mérhető, de nem jellemző

5.2.2.1. *L-cisztein lehetséges koordinációs módjai*

Ahhoz, hogy a különféle koordinációs módokat felderítsük, az L-cisztein esetében a $\delta = 3,5\text{-}4,3$ ppm tartományra fókuszáltunk, ahol a ligandum metincsoportjának protonjaihoz rendelhető jel detektálható. A pontos fémion : ligandum arány megállapítása érdekében kiszámoltuk az oxidált cisztein (cisztin) mennyiségét és kivontuk a ciszteinéből. A számítás során kiderült, hogy például az elvileg fémion : ligandum 1 : 2 arányú oldatnál csak $\sim 1 : 1,5$ arányt sikerült biztosítani. Azonban az L-cisztin egy része esetleg koordinálódott, így az arány pontos megállapítása nem lehetséges.

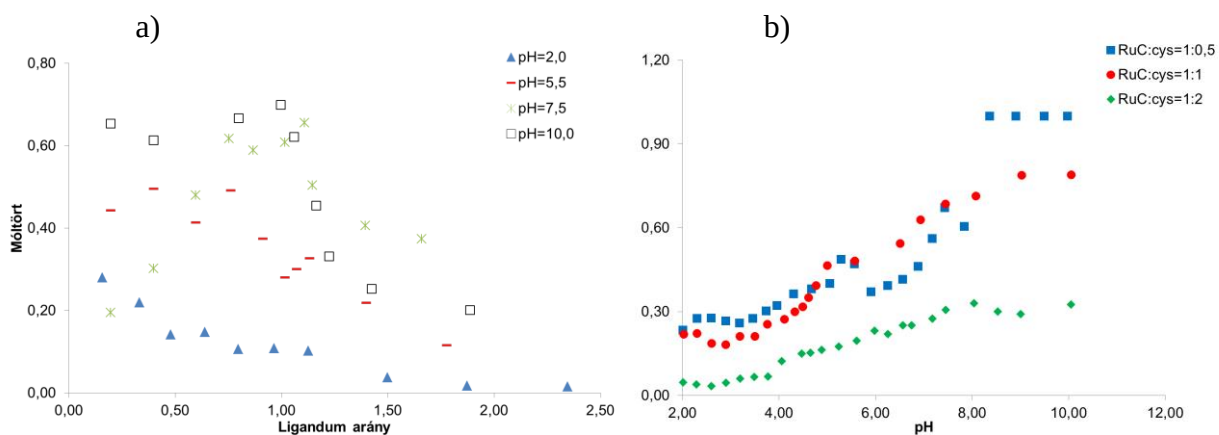
A ligandum oldaláról nézve a koordinációs módokat az alapján döntöttük el, hogy hány protonálódási folyamatot tudunk azonosítani adott kémiai eltolódásnál megfigyelhető csúcs esetében. A kémiai eltolódás folyamatos változása gyors cserére, általában protonálódási folyamatra utal. Ha a kémiai eltolódás nem változott a pH függvényében, biztosan nincs sav-bázis folyamat, ekkor feltételezhetően mindhárom donatorom koordinálódik (O,N,S). Ha csak egy protonálódási folyamat figyelhető meg, valószínűsíthetően két donatorom vesz részt a koordinációban. Ha az egyetlen sav-bázis folyamat a savas tartományon következik be, ez szabad karboxilcsoport jelenlétére, (N,S) koordinációra utal. Amennyiben két sav-bázis folyamat figyelhető meg, csak egyféle donatorom koordinálódását feltételezzük. Ez a donatorom lehet (S), (N), (O), attól függően, hogy milyen pH értékeken mutat sav-bázis viselkedést. A 18. ábrán a koordinációs módok azonosítását szemléltetjük fémion : ligandum 1 : 2 arányú, pH-függő ^1H -NMR-spektrumsorozatok alapján.



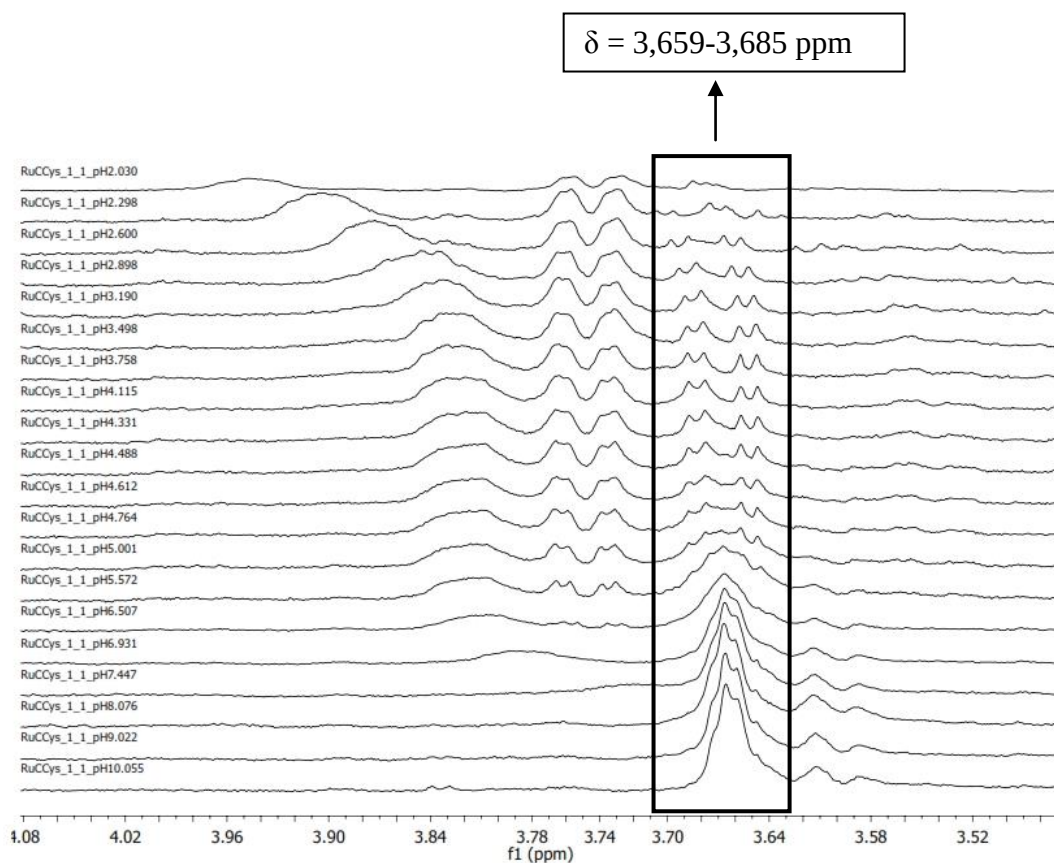
18. ábra pH-függő ^1H -NMR spektrumsorozat fémion : ligandum (L-cisztein) 1 : 2 arányánál ($\delta = 3,3\text{-}4,6$ ppm)

5.2.2.1.a) (N,S) típusú koordináció

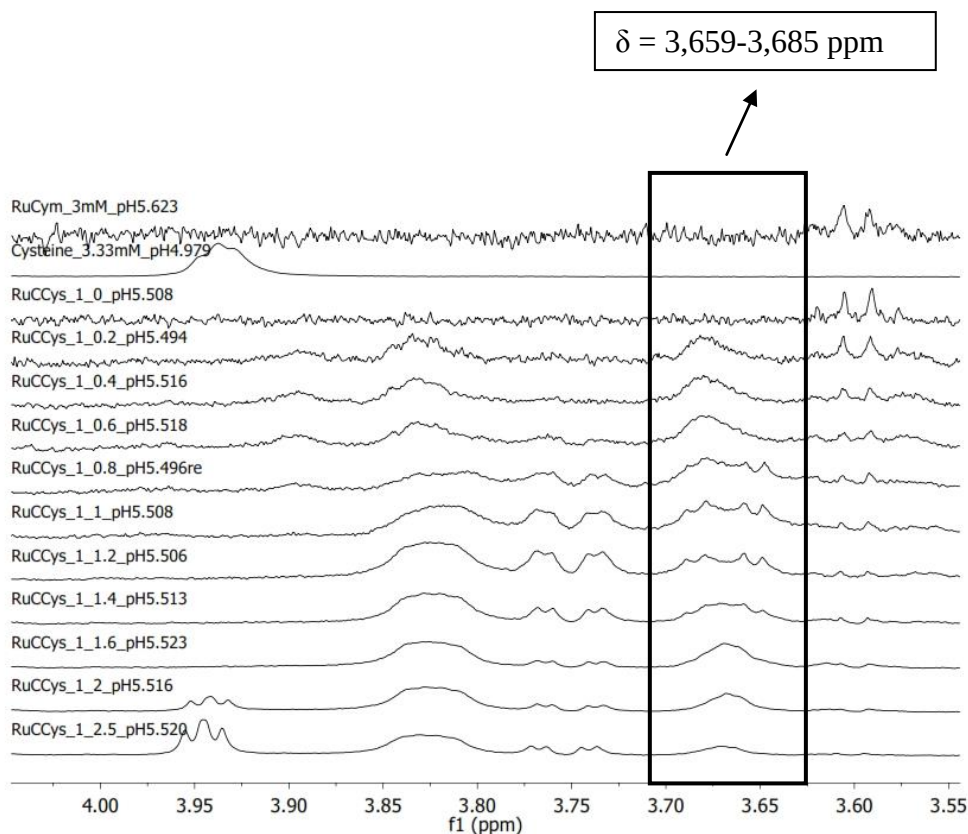
Ha (N,S) donoratomokkal történik a ligandum koordinációja, a karboxilcsoport deprotonálódása miatt a savas pH tartományban várunk kémiai eltolódás változást, és a komplexek a lúgos tartományban lesznek dominánsak (lisd. 19. ábra). A $\delta = 3,659\text{-}3,685$ ppm tartományon megfigyelhető jel alakjában változás következik be mind a fémion : ligandum arány, mind a pH függvényében (lisd. 20., 21. ábra). A különböző alakú csúcsokat okozhatja eltérő Ru(II) környezet és a cseresebesség megváltozása is.



19. ábra (N,S) koordinációjú komplexek móltörtjei a ligandum arány (a), ill. pH függvényében (b) ($\delta = 3,659\text{-}3,685$ ppm)



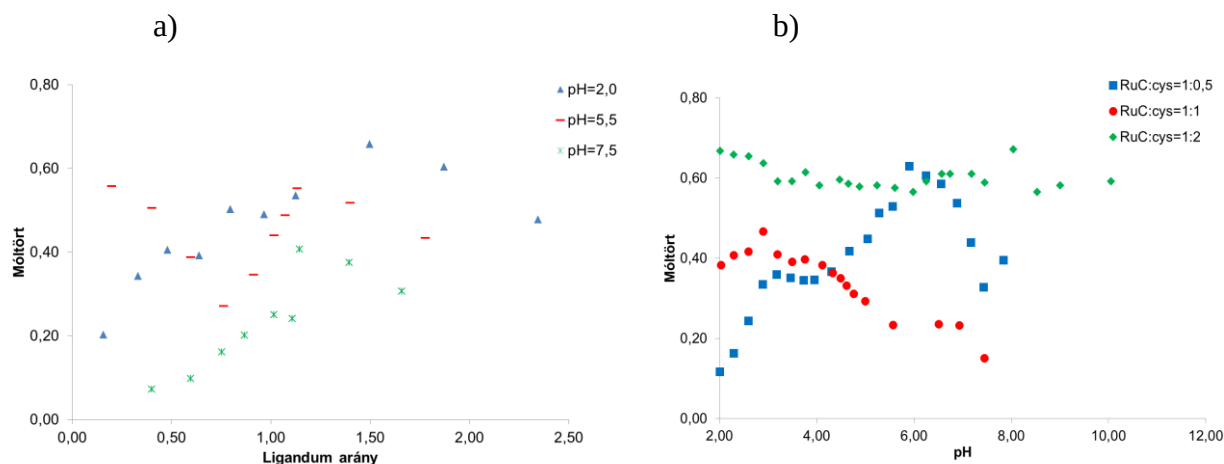
20. ábra pH-függő ^1H -NMR-spektrumsorozat fémion : ligandum (L-cisztein) 1 : 1 arányánál ($\delta = 3,5 - 4,1$ ppm)



21. ábra L-cisztein koncentráció-függő ^1H -NMR-spektrumsorozat pH = 5,5 értéken ($\delta = 3,5\text{--}4,0$ ppm)

5.2.2.1.b) (S) típusú koordináció

A (S) típusú koordináció esetében a karboxilcsoport és az aminocsoport vagy tiolcsoport deprotonálódását tudjuk megfigyelni, így a savas és lúgos pH tartományban is kémiai eltolódás változásnak kell megjelennie (lsd. 22. ábra). A kémiai eltolódás értékekre történő illesztésekkel kapott pK értékek a következők: $pK_1 = 2,0(3)$; $pK_2 = 8,01(6)$.



22. ábra (S) koordinációjú komplexek móltörtjei a ligandum arány (a), ill. pH függvényében (b) ($\delta = 3,376\text{--}3,956$ ppm)

5.2.2.1.c) *Egyéb* – (N,S,S), (N,N,S), (N/S, OH⁻, OH⁻), (O,N,S), (S,S,OH⁻) típusú koordináció

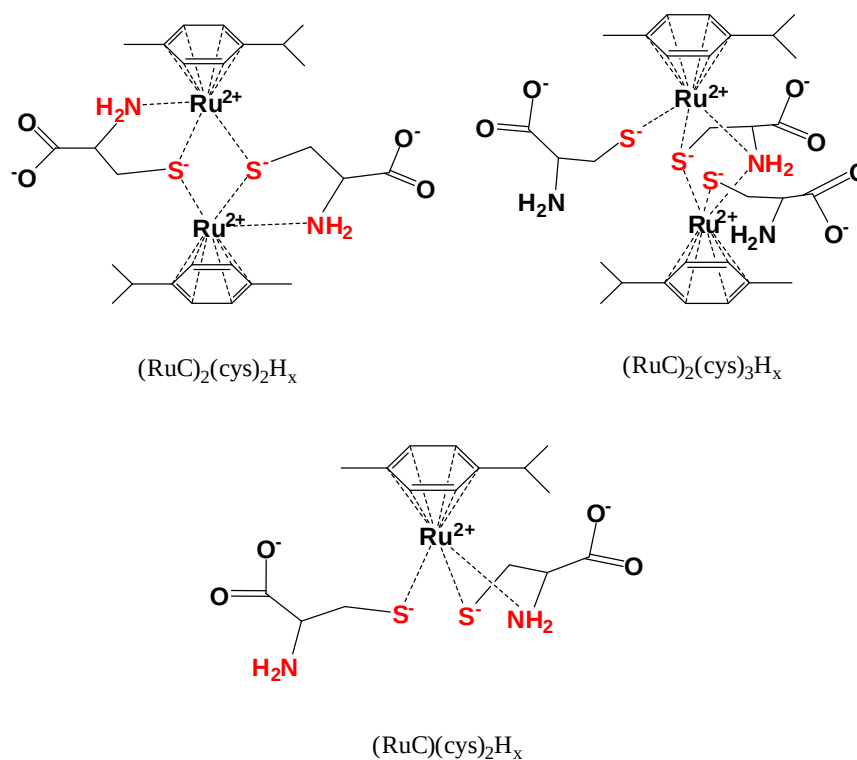
Az (N,S,S), (N,N,S), (O,N,S), (N/S, OH⁻, OH⁻), (S,S,OH⁻) típusú koordinációkat a fémion koordinációs módjainál részletezném.

5.2.2.2. Ru(II) lehetséges koordinációs módjai

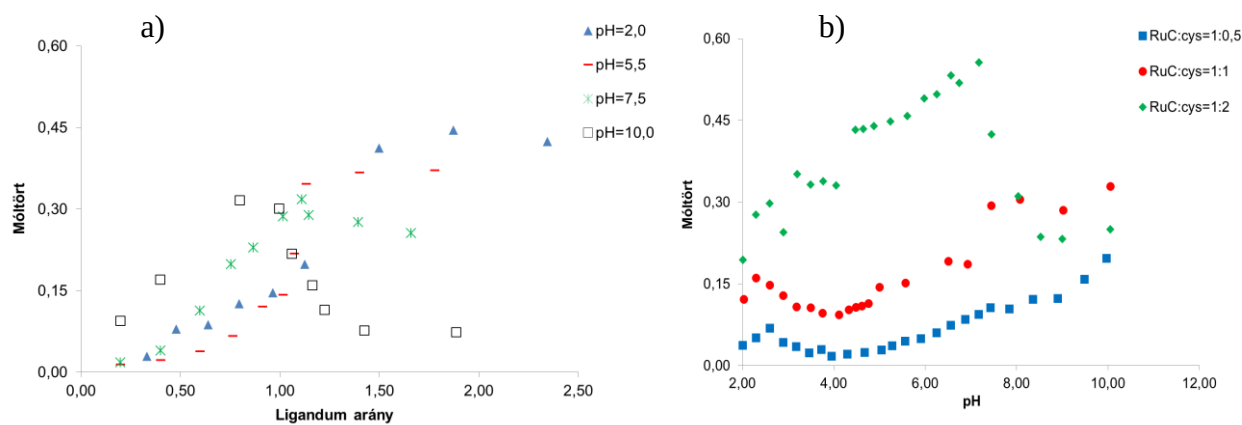
A $\delta = 1,8\text{--}2,2$ ppm tartományon a *p*-cimolnak a gyűrűhöz kapcsolódó metilcsoport jeleit tudjuk követni. A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ három formáját tudtuk azonosítani: Ru(II); (RuC)₂(OH)₂Cl és (RuC)₂(OH)₃ összetételekkel [27]. Az azonosítás a fémion pH-függő spektrumával való összehasonlítással vált lehetővé. Ötféle fő részecskének tudtuk megállapítani a koordinációs módját, egyesekhez szerkezeteket is rendeltünk. A kvantitatív kiértékelés hiányában azonban a szerkezetek és a protonáltsági állapotok csak feltételezések, amelyekre (egyenlőre) nincs közvetlen bizonyítékunk.

5.2.2.2.a) $\delta = 2,131\text{--}2,139$ ppm; (N,S,S) típusú koordináció

Az (N,S) és (S) kombinációjával létrejövő (N,S,S) típusú komplexekben a fémion : ligandum arány lehet 2 : 2, 2 : 3 vagy 1 : 2 (lsd. 23. ábra). A $\delta = 2,131\text{--}2,139$ ppm tartományon látható jel feltételezéseink szerint (N,S,S) típusú. A 24. ábra alapján a komplex jellemzően fémion : ligandum = 1 : 2 aránya mellett képződik inkább, azonban semleges és lúgos közegben már 1 : 1 aránynál is megjelenik.



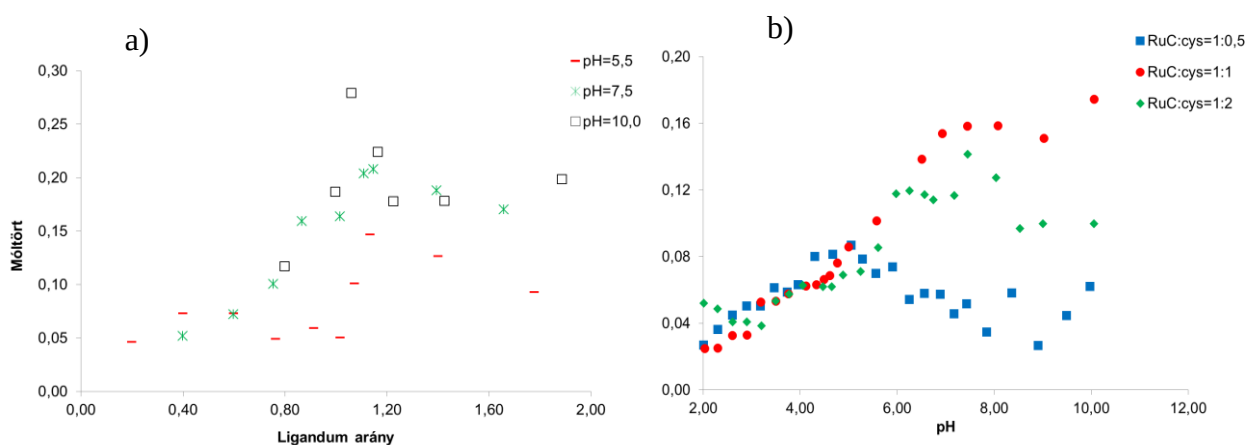
23. ábra (N,S,S) típusú koordinációjú fémion : ligandum 2 : 2, 2 : 3 és 1 : 2 összetételű komplexek



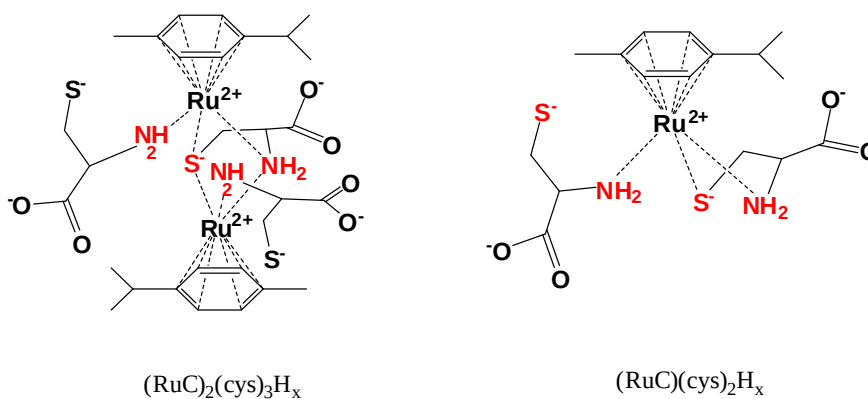
24. ábra $\delta = 2,131\text{-}2,139$ ppm tartományban megjelenő komplexek móltörtjei a ligandum arány (a), ill. pH függvényében (b)

5.2.2.2.b) $\delta = 2,009\text{--}2,029$ ppm; (N,N,S) típusú koordináció

(N,N,S) típusú koordinációt feltételezünk a $\delta = 2,009\text{--}2,029$ ppm tartományban megfigyelhető jel esetében, mely savas pH-tartományban mutatott jelentősebb kémiai eltolódás változást ($pK = 2,00(18)$) (lsd. 25. ábra). Az összetétel lehet fémion : ligandum 2 : 3 és 1 : 2 arányú (lsd. 26. ábra).



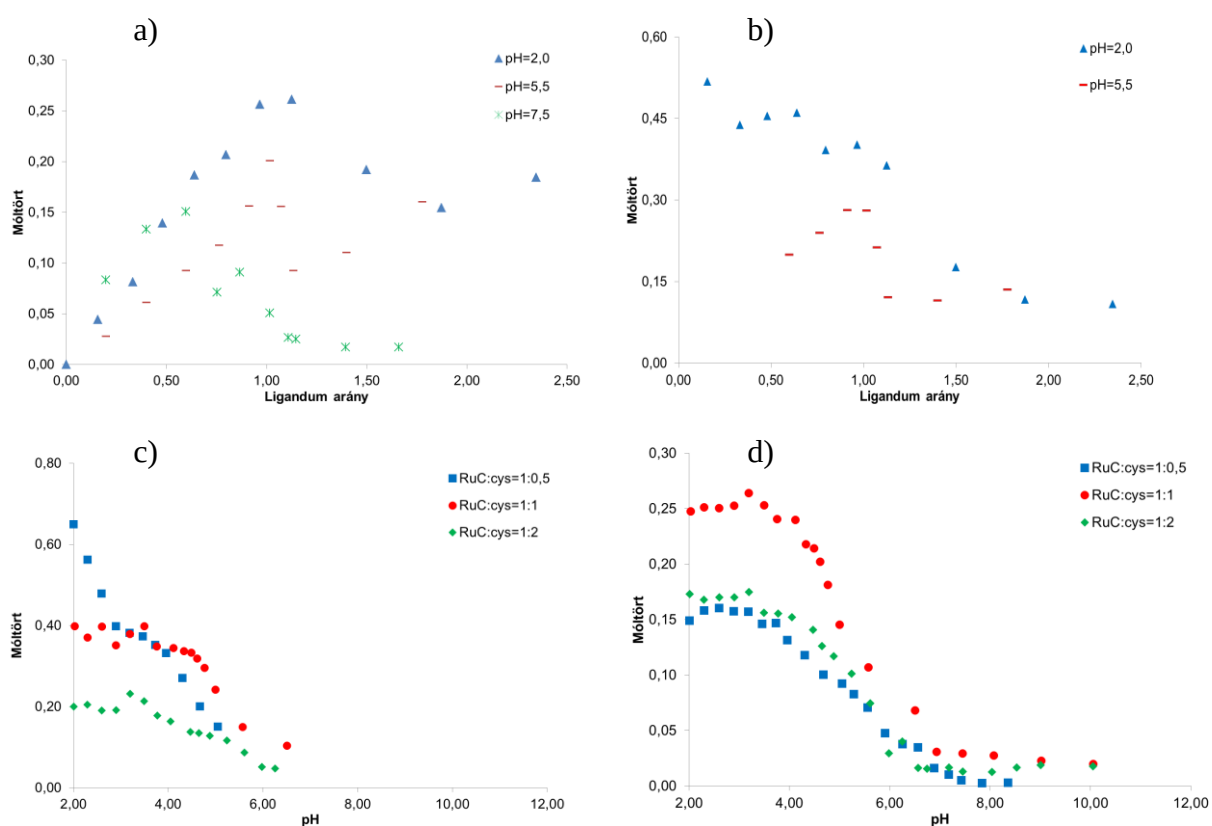
25. ábra $\delta = 2,009 - 2,029$ ppm tartományban megjelenő komplexek móltörtjei a ligandum arány (a), ill. pH függvényében (b)



26. ábra (N,N,S) típusú koordinációjú, fémion : ligandum 2 : 3 és 1 : 2 összetételű komplexek

5.2.2.2.c) $\delta = 2,071\text{-}2,084$ ppm; (O,N,S) típusú koordináció

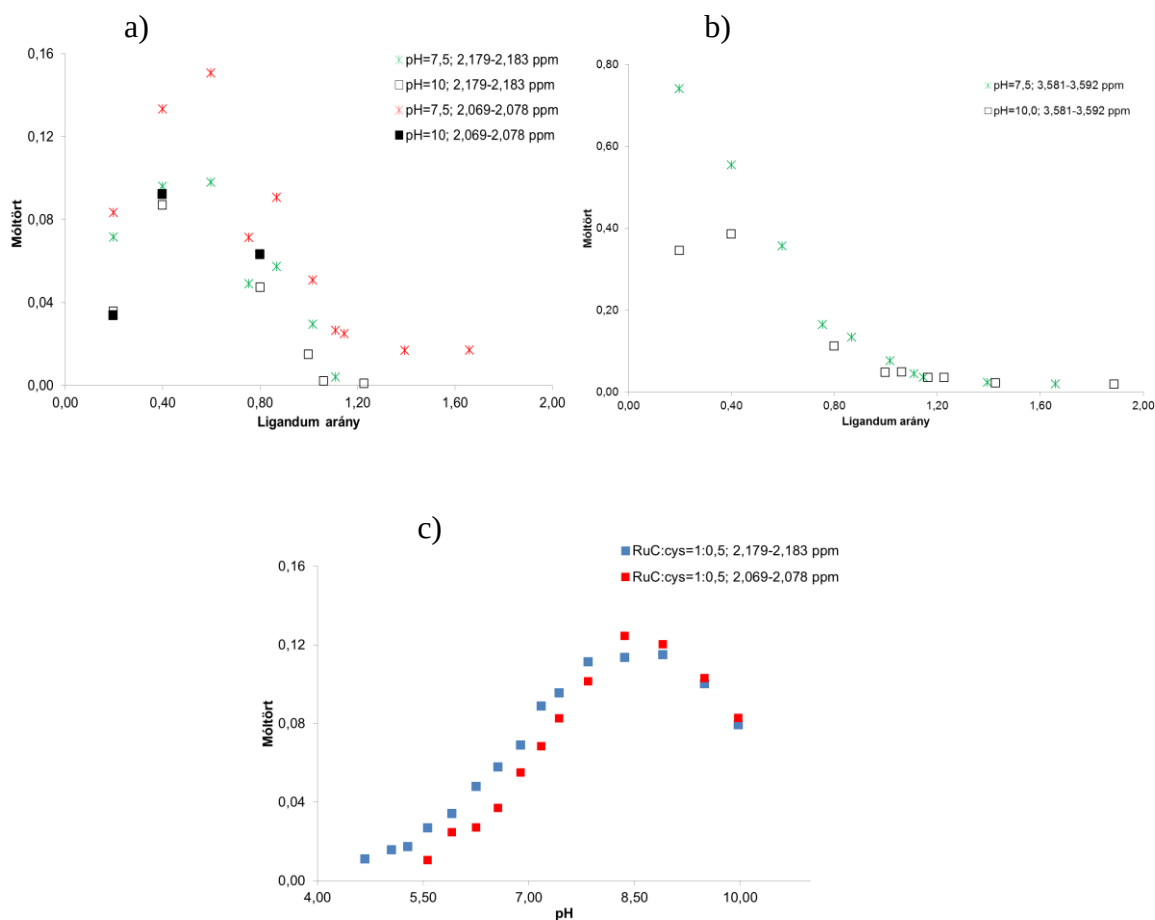
Az (O,N,S) típusú koordinációt az alapján feltételeztük, hogy nem találtunk hasonló kémiai eltolódásnál megjelenő jelet az L-cisztein és metil-észtere között, így (COO⁻) koordináció biztos szerepel benne. Továbbá, a részecskék kémiai eltolódása nem változott a pH függvényében ($\delta = 3,743 - 3,753$ ppm). (O,N,S) donoratomokkal történő koordinációt javasolunk a $\delta = 2,071 - 2,084$ ppm tartományban megjelenő csúcs esetében (ld. 27. ábra). Az ábrákon látható, hogy ezen koordinációs típus pH < 6 tartományban lesz jellemző, pH > 6 értékeken mennyisége elhanyagolhatóvá válik. Az arányfüggés alapján a komplex fémion : ligandum = 1 : 1 aránynál fordul elő leginkább.



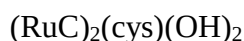
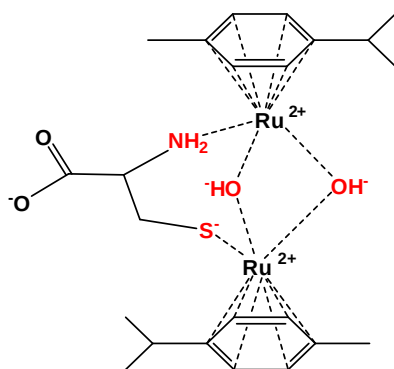
27. ábra (O,N,S) koordinációjú komplexek móltörtjei a ligandum arány (a,b), ill. pH függvényében (c,d) ($\delta = 2,071\text{-}2,084$ ppm (a,c), ill. $\delta = 3,743\text{-}3,753$ ppm (b,d))

5.2.2.2.d) $\delta = 2,179-2,183$, ill. $2,069-2,078$ ppm; (N/S, OH, OH) típusú koordináció

A $\delta = 2,179-2,183$ ppm és $\delta = 2,069-2,078$ ppm értékekhez tartozó, közel azonos intenzitású csúcsokat $(\text{RuC})_2(\text{cys})(\text{OH})_2$ összetételű komplexekként azonosítottuk. Az azonosítás az alapján történt, hogy a móltörtök értéke fémion : ligandum 1 : 0,5 arányánál mutatott maximumot, valamint a komplexek mindegyike pH = 6,5 - 10 tartományban volt csak megfigyelhető (lsd. 28. ábra). Továbbá, teljesen azonos részecske (összetétel, kémiai eltolódás) jelent meg az L-cisztein metil-észtere esetében is, így karboxilcsoport nem koordinálódhat. A komplex általunk feltételezett szerkezete a 29. ábrán látható. Ezen komplexek kialakulásának valószínűsége azonban terápiás körülmények között a feltételezhetően nagy ligandumfelesleg mellett igen csekély.



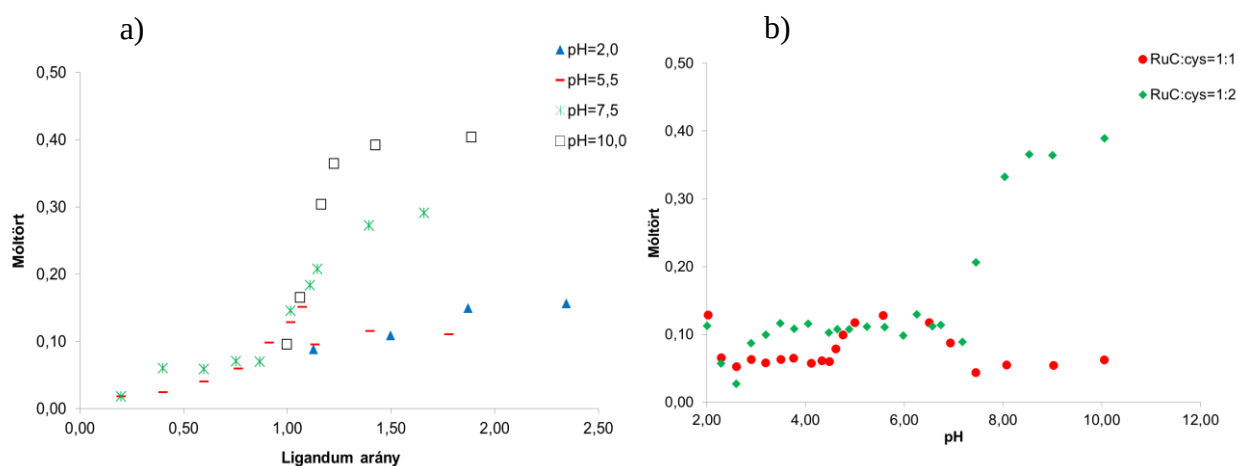
28. ábra $(\text{RuC})_2(\text{cys})(\text{OH})_2$ komplexek móltörtjei a ligandum arány (a,b), ill. pH függvényében (c) ($\delta = 2,179-2,183$ ppm (a,c); $\delta = 2,069-2,078$ ppm (a,c) és $\delta = 3,581-3,592$ ppm (b))



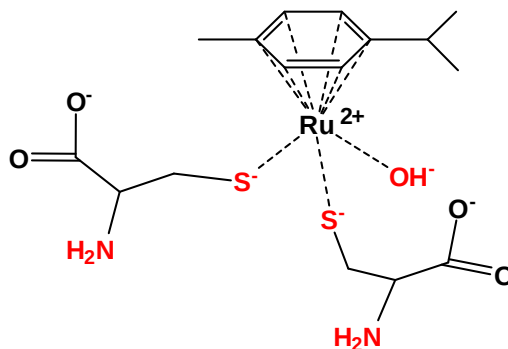
29. ábra A fémfelesleget tartalmazó $(\text{RuC})_2(\text{cys})(\text{OH})_2$ komplex feltételezett szerkezete

5.2.2.2.e) $\delta = 2,105\text{-}2,154$ ppm; (S,S,OH) típusú koordináció

Egy igen nehezen meghatározható összetételű (átfedő csúcsok, széles jelek miatt az integrálértékek nem feltétlenül megbízhatóak) részecskét jellemző kémiai eltolódás értéke jelentős változást mutatott a pH függvényében (illesztéssel $\text{pK} = 7,88(16)$ értéket állapítottunk meg erre a folyamatra) (ld. 30. ábra). Ezen lassú folyamatot okozó részecskét a metil-észter esetében nem tudtuk kimutatni. Ha két kénatomot feltételezünk donor csoportként, a harmadik koordinációs helyen pedig víz vagy hidroxidion szerepel, 1 : 2 összetételű komplex jöhet létre (ld. 31. ábra).



30. ábra $\delta = 2,105\text{-}2,154$ ppm tartományban megjelenő komplexek móltörtjei a ligandum arány (a), ill. pH (b) függvényében



31. ábra (RuC)(cys)₂(OH) általunk feltételezett szerkezete

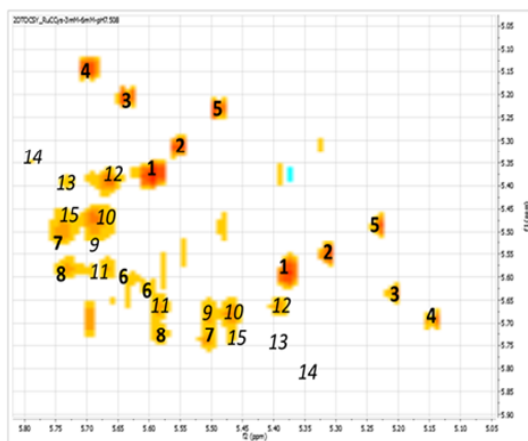
5.2.2.2.f) $\delta = 2,087\text{-}2,098\text{ ppm}$; (S,S,S) típusú koordináció

Az N-acetil-ciszteinnél is megjelenő (S,S,S) hídligandum koordinációjú komplex az L-cisztein esetében sokkal kisebb mennyiségben található meg.

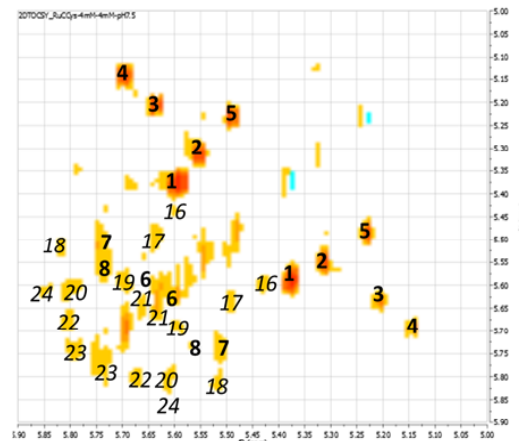
5.2.3. ¹H-TOCSY spektroszkópia

Fiziológiás pH értéken fémion : ligandum 1 : 2 és 1 : 1 aránynál megmért ¹H-TOCSY-spektrumok között a cimol aromás protonjeleinek tartományában 8 keresztcsúcs egyezett meg (lsd. 32. ábra).

¹H-TOCSY NMR-spektrum
c_{RuC}:c_{cys}=3mM:6mM
pH=7,5



¹H-TOCSY NMR-spektrum
c_{RuC}:c_{cys}=4mM:4mM
pH=7,5



32. ábra Fiziológiás pH értéken fémion : ligandum 1 : 2 és 1 : 1 aránynál felvett ¹H-TOCSY-spektrumok ($\delta = 5\text{-}6\text{ ppm}$)

Az előző rendszer ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és *N*-acetyl-L-cisztein) ^1H -TOCSY NMR-spektrumaival összehasonlítva nem találtunk azonos kémiai eltolódásnál megjelenő keresztcsúcsokat.

6. Összefoglalás

A potenciálisan rákellenes hatású $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ – L-cisztein rendszer bonyolultsága miatt, valamint megbízhatóbb eredmények érdekében a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ és a védett aminocsoportot tartalmazó *N*-acetyl-L-cisztein, valamint a védett karboxilcsoporttal rendelkező L-cisztein-metil-észter közötti kölcsönhatást is tanulmányoztuk.

Leírtuk a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ (*RuC*) és a védett aminocsoportot tartalmazó *N*-acetyl-L-cisztein (*acys*) között kialakuló komplexek összetételét és szerkezetét, illetve az egyes komplexféleségek protonálódási folyamatait. Fémion : ligandum 1 : 1 arányánál ($c_{\text{RuC}} : c_{\text{acys}} = 3\text{mM} : 3\text{mM}$) $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplexek, ezzel szemben fémion : ligandum 1 : 1,5 arányánál ($c_{\text{RuC}} : c_{\text{L}} = 3\text{mM} : 4,5\text{mM}$) $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_{3-0}$ komplexek bizonyultak dominánsnak. Ligandum-felesleg függő ^1H -NMR spektrumok alapján azonosítani tudtuk a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_{3-0}$ komplexet, valamint a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplex két izomer formáját. A ^1H -NMR spektrumok pH-függése azt mutatja, hogy a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_3\text{H}_{3-0}$ komplex mellett a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ izomerek egyike vesz részt egyszerű protonvesztéssel járó sav-bázis folyamatban, melyek mindegyike a szabad, nem koordinálódó karboxilcsoporthoz rendelhető. A ^1H -NMR-spektrumok alapján kapott kémiai eltolódás, ill. a spektrofotometriai mérések abszorbancia értékeiből illesztéssel meghatároztuk az egyes komplexek *pK* értékeit. Megkíséreltük leírni a $(\text{RuC})_2(\text{acys})_2\text{H}_{2-0}$ komplexek lehetséges protonálódási folyamatait. A jel-hozzárendelés elősegítésére 2D-NMR (^1H -TOCSY) módszert alkalmaztunk. A komplexek képződése kvantitatív, egyensúlyi állandókat meg tudtunk határozni az egyes komplexféleségek között, de stabilitási állandót nem.

A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ (*RuC*) - L-cisztein (*cys*), valamint $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ (*RuC*) - L-cisztein-metil-észter (*cysme*) rendszerben a ^1H -NMR-spektrumok nehezebben voltak értelmezhetőek, mint a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ -*N*-acetyl-L-cisztein rendszer esetében. A kvantitatív kiértékelés nehézségekbe ütközött a sok azonosítatlan részecske (az integrálértékek alapján kb. 20-40%), a ciszteinnek ligandumfelesleg esetén, $\text{pH} > 6$ lejátszódó, a fémion : ligandum arányt már számottevően befolyásoló oxidációja, illetve esetlegesen feltételezhető egyéb lassú kinetikai folyamatok miatt. A metil-észter származék amellet, hogy oxidációra hajlamos, lúgos közegben kismértékben disszociál is, így a cisztein-tartalmú komplexek kémiai eltolódásai is megjelenhettek kismértékben

a spektrumokon. Az egyes ^1H -NMR csúcsokhoz általában nem lehetett egyértelműen összetételt rendelni. Feltételezéseink szerint csak koordinációs módokat érdemes megállapítani, melyek több különböző összetételű komplexre is jellemzőek lehetnek. A *N*-acetyl-L-ciszteinre jellemző kémiai eltolódásnál megjelenő komplexek nem találhatók meg az L-cisztein és metil-észtere esetében, így (O,S) koordináció nem jellemző. Utóbbi két vegyület komplexei esetében azonban elég jelentős az átfedés. A ligandum koncentráció és pH-függő ^1H -NMR-spektrumsorozatok, valamint ^1H -TOCSY NMR-spektrumok kiértékelésével az alábbi jellemző koordinációs módokat feltételezzük: (N,S,S), (N,N,S), (O,N,S), (N/S, OH⁻, OH⁻), (S,S,OH⁻).

Az L-cisztein és L-cisztein-metil-észter komplexei akárcsak az előző ligandum esetében kvantitatíve képződnek, vagy a szabad ligandum, vagy a szabad fémion koncentrációja nem mérhető, ezért a stabilitási adatok meghatározására csak a kétkomponensű rendszer tanulmányozásával nincs lehetőség. Felmerült a ligandumkiszorítási módszer, de nehéz találni olyan ligandumot, amely egyféle komplexet képez a $[\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ vegyülettel. Továbbá, ha a kétkomponensű rendszerben sokféle összetételű komplexek alakulhatnak ki, a turner rendszer felfejtése valószínűleg még bonyolultabb lenne. Tömegspektroszkópiai módszerek szintén nem lehetnének alkalmasak, mert a mérési körülmények megváltoztathatják az oldategyensúlyt, a vérplazmában való viselkedéstől eltérőt tapasztalnánk. A legígéretesebb módszer esetleg nagy ciszteinfolesleg alkalmazása lehetne, így feltételezhetően a komplexfészeségek száma lecsökkenne és bizonyos részecskéket talán egyértelműen be lehetne azonosítani. Továbbá ^{13}C -NMR mérések is segítségünkre lehetnek.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy egyéb, a vérérszérumban található kéntartalmú vegyületek is szerepet játszhatnak a $[\eta^6\text{-}p\text{-cimol})\text{Ru(II)}]$ biotranszformációs folyamataiban, így a metionin, glutation egyedi vizsgálata elengedhetetlennek tűnik.

7. Irodalomjegyzék

- [1] http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php
- [2] T. Anna, *Magyar Tudomány*, **11**, 1333-1345 (2011).
- [3] C. J. Johnson, H. K. Weir, A. K. Fink, R. R. German, J. L. Finch, R. K. Rycroft, D. Yin, *Cancer Epidemiol*, **37**, 20-28 (2013).
- [4] [http://hu.wikipedia.org/wiki/R%C3%A1k_\(betegs%C3%A9g\)](http://hu.wikipedia.org/wiki/R%C3%A1k_(betegs%C3%A9g))
- [5] Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2007.
- [6] L. V. Popova, V. N. Babin, Y. A. Belousov, Y. S. Nekrasov, A. E. Snegireva, N. O. Borodina, G. M. Shaposhnikova, O. B. Bychenko, P. M. Raevskii, N. B. Morozova, A. I. Iiyina, K. G. Shitkov, *Appl Organomet Chem*, **7**, 85–94 (1993).
- [7] S. Top, E. B. Kaloun, A. Vessières, I. Laios, G. Leclercq, G. Jaouen, *J Organomet Chem*, **15**, 350–356 (2002).
- [8] A. Bergamo, G. Sava, *Dalton T*, **40**, 7817-7823 (2011).
- [9] C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J Inorg Biochem*, **100**, 891-904 (2006).
- [10] A. L. Noffke, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, P. J. Sadler, *Chem Commun*, **48**, 5219-5246 (2012).
- [11] B. K. Keppler, W. Rupp, U. M. Juhl, H. Endres, R. Niebl, W. Balzer, *Inorg Chem*, **26**, 4366-4370 (1987).
- [12] G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. R. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. Di Giovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa, *Clin Cancer Res*, **9**, 1898-1905 (2003).
- [13] G. Sava, I. Capozzi, K. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, *Clin Exp Metastasis*, **16**, 371-379 (1998).
- [14] R. A. Gatenby, R. J. Gillies, *Nat Rev Cancer*, **4**, 891-899 (2004).
- [15] E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, *Metal Ions in Biological Systems; Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents*, Marcel Dekker Inc, New York, **42**, 323-351 (2004).
- [16] http://dspace.jorum.ac.uk/xmlui/bitstream/handle/10949/951/Items/S343_1_section8.html

- [17] E. Musgrove, C. Rugg, I. Taylor, D. Hedley, *et al.*, *J Cell Physiol.*, **118**, 6-12 (1984).
- [18] V. Brabec, O. Novakova, *Drug Resist Update*, **9**, 111-122 (2006).
- [19] G. Sava, F. Frausin, M. Cocchietto, F. Vita, E. Podda, P. Spessotto, A. Furlani, V. Scarcia, G. Zabucchi, *Eur J Cancer*, **40**, 1383-1396 (2004).
- [20] S. Kapitzka, M. A. Jakupiec, M. Uhl, B. K. Keppler, B. Marian, *Cancer Lett*, **226**, 115-121 (2005).
- [21] M. A. Furrer, F. Schmitt, M. Wiederkehr, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, *Dalton T*, **41**, 7201-7211 (2012).
- [22] Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem Commun*, **38**, 4764-4776 (2005).
- [23] B. Therrien, *Coord Chem Rev*, **253**, 493-519 (2009).
- [24] R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Brit J Cancer*, **86**, 1652-1657, (2002).
- [25] R. E. Morris, R. E. Aird, P. del S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J Med Chem*, **44**, 3616-3621 (2001).
- [26] C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, *J Med Chem*, **48**, 4161-4171 (2005).
- [27] L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó, *Dalton T*, **39**, 1-7 (2010).
- [28] P. C. A. Bruijninx, P. J. Sadler, *Adv Inorg Chem*, **61**, 1-62 (2009).
- [29] C. A. Vock, A. K. Renfrew, R. Scopelliti, L. Juillerat-Jeanneret, P. J. Dyson, *Eur J Inorg Chem*, **10**, 1661-1667 (2008).
- [30] É. A. Enyedy, G. M. Bognár, T. Kiss, M. Hanif, C. G. Hartinger, *J Organomet Chem*, **734**, 38-44 (2013).
- [31] M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P. J. Sadler, *Inorg Chim Acta*, **359**, 3020-3028 (2006).
- [32] A. F. A. Peacock, M. Melchart, R. J. Deeth, A. Habtemariam, S. Parsons, P. J. Sadler, *Chem.-Eur. J.*, **13**, 2601-2613 (2007).
- [33] P. Buglyó, E. Farkas, *Dalton T*, **38**, 8063-8070 (2009).
- [34] L. Bíró, D. Hüse, A. Cs. Bényei, P. Buglyó, *J Inorg Biochem*, **116**, 116-125 (2012).
- [35] I. Ivanovic, K. K. Jovanovic, N. Gligorijevic, S. Radulovic, V. B. Arion, K. S. A. M. Sheweshein, Z. Lj. Tesic, S. Grguric-Sipka, *J Organomet Chem*, **749**, 343-349 (2014).

- [36] É. Sija, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, T. Kiss, É. A. Enyedy, *Polyhedron*, **67**, 51-58 (2014).
- [37] W. Kandioller, C. G. Hartinger, A. A. Nazarov, C. Bartel, M. Skocic, M. A. Jakupec, V. B. Arion, B. K. Keppler, *Organometallics*, **28**, 4249-4251, (2009).
- [38] F. Beckford, D. Dourth, M. Shaloski Jr., J. Didion, J. Thessing, J. Woods, V. Crowell, N. Gerasimchuk, A. Gonzalez-Sarrias, N. P. Seeram, *J Inorg Biochem*, **105**, 1019-1029 (2011).
- [39] É. A. Enyedy, É. Sija, T. Jakusch, C. G. Hartinger, W. Kandioller, B. K. Keppler, T. Kiss, *J Inorg Biochem*, **127**, 161-168 (2013).
- [40] <http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine>
- [41] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal Chim Acta*, **38**, 475-488 (1967).
- [42] L. Zékány, I. Nagypál, *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*, Plenum Press, New York, 291-353 (1985).

8. Függelék

A kémiai eltolódások alapján, három pK-val történő illesztéshez használt képlet:

$$\delta_{illesztett} = \frac{\delta_{min}}{1 + 10^{pK_3 - pH} + 10^{pK_3 + pK_2 - 2pH} + 10^{pK_3 + pK_2 + pK_1 - 3pH}} + \frac{\delta_{\hat{a}tl,1} 10^{pK_3 - pH}}{1 + 10^{pK_3 - pH} + 10^{pK_3 + pK_2 - 2pH} + 10^{pK_3 + pK_2 + pK_1 - 3pH}} + \frac{\delta_{\hat{a}tl,2} 10^{pK_3 + pK_2 - 2pH}}{1 + 10^{pK_3 - pH} + 10^{pK_3 + pK_2 - 2pH} + 10^{pK_3 + pK_2 + pK_1 - 3pH}} + \frac{\delta_{max} 10^{pK_3 + pK_2 + pK_1 - 3pH}}{1 + 10^{pK_3 - pH} + 10^{pK_3 + pK_2 - 2pH} + 10^{pK_3 + pK_2 + pK_1 - 3pH}}$$

Az abszorbancia értékek alapján, két pK-val történő illesztéshez használt képlet:

$$A_{illesztett} = \frac{A_{max}}{1 + 10^{pK_2 - pH} + 10^{pK_2 + pK_1 - 2pH}} + \frac{A_{\hat{a}tl} 10^{pK_2 - pH}}{1 + 10^{pK_2 - pH} + 10^{pK_2 + pK_1 - 2pH}} + \frac{A_{min} 10^{pK_2 + pK_1 - 2pH}}{1 + 10^{pK_2 - pH} + 10^{pK_2 + pK_1 - 2pH}}$$

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Jakusch Tamásnak a sokoldalú szakmai segítségét, türelmét és támogatását.

Köszönet illeti Dr. Kiss Tamás tanszékvezetőt, hogy lehetővé tette a TDK-dolgozatom elkészítését. Köszönöm a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék dolgozóinak, hogy készségesen segítettek munkámban.