

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Antitumor RhCp*-komplexek oldatkémiája és kölcsonhatásuk albuminnal

KÉSZÍTETTE:

Kiss Gabriella Ilona

Vegyész MSc. I. évfolyam

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Enyedy Éva Anna

egyetemi adjunktus

dr. pharm. Dömötör Orsolya

tudományos segédmunkatárs

Szeged

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	2
2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Fémkomplexek (köztük a ródiumvegyületek) szerepe a gyógyászatban és a rákellenes terápiában	3
2.2. $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)\text{Z}_3]$ mint „fémion” bemutatása, hidrolízise kloridionokat tartalmazó közegben	6
2.3. A ligandumok (mal, dhp, pic) és komplexeik rövid bemutatása	7
2.4. A humán szérum albumin rövid bemutatása	11
3. CÉLKITŰZÉS	13
4. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	14
4.1. Felhasznált vegyszerek	14
4.2. Az alkalmazott műszeres módszerek alapjai	14
4.2.1. pH-potenciometria: elvi alapok, kísérleti körülmények.....	14
4.2.2. UV-látható spektrofotometria	18
4.2.3. ^1H Mágneses magrezonancia spektroszkópia (^1H NMR)	19
4.2.4. Spektrofluorimetriás mérések	20
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK.....	23
5.1. A RhCp^* hidrolízisének vizsgálata kloridmentes közegben	23
5.2. A ligandumok sav-bázis tulajdonságai és spektrális változásai	26
5.3. A komplexképződési folyamatok vizsgálata	27
5.3.1. $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -mal rendszer vizsgálata.....	28
5.3.2. $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -dhp rendszer vizsgálata.....	30
5.4. A RhCp^* , valamint dhp-val, illetve pic-val alkotott komplexeinek kölcsönhatása humán szérum albuminnal	33
5.4.1. Spektrofluorimetriás kioltásos és kiszorításos vizsgálatok.....	34
5.4.2. Kölcsönhatás aminosav oldallánc modell vegyületekkel	39
6. ÖSSZEFOGLALÁS	44
7. IRODALOMJEGYZÉK	45
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	48

1. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Az elmúlt években a rákos megbetegedések elleni küzdelemben egyre nagyobb hangsúlyt kapnak az átmenetifémek komplexei, köszönhetően a ciszplatina sikeres alkalmazásának. Ez irányban elindulva napjainkban számos kutatás irányul olyan fémkomplexek kifejlesztésére, melyek citotoxikus hatása a rákos sejtekre specifikus. Ígéretes kutatások folynak többek között Rh^{III} -vegyületekkel is.

Munkánk során a $[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ (Cp^* =pentametil-ciklopentadienil anion) fémorganikus vegyület hidroxipiron (mal), illetve hidroxipiridinon (dhp) típusú ligandumokkal való komplexképződését oldategyensúlyi módszerekkel (pH-potenciometria, UV-látható spektrofotometria, ^1H NMR spektroszkópia) vizsgáljuk, vizes, kloridmentes közegben. A fémion és az adott ligandum egyensúlyában 1:1 arányú komplexek képződnek. Ez a folyamat kloridionok hiányában kisebb pH-n kezdődik meg, így véleményünk szerint a kloridion kompetitorként képes viselkedni a rendszerben.

Mivel egy potenciálisan bioaktív vegyület farmakokinetikai jellemzéséhez a vérben található transzportfehérjékkel való kölcsönhatás leírása is hozzátartozik, így a $[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cp}^*\text{Z}_3]$ ($\text{Z} = \text{H}_2\text{O} / \text{Cl}^-$) vegyületnek, valamint dhp-val és a piridinkarbonsav típusú pikolinsavval (pic) képzett komplexeinek humán szérumban albuminnal való kölcsönhatását vizsgáljuk, mely folyamatokat elsősorban spektrofotometriásan követjük.

A fehérjével kapcsolatos vizsgálatokba kötőhely markereket és védett funkciók csoportokat tartalmazó modellvegyületeket vonunk be annak érdekében, hogy a fehérjén való kötődés helyét minél jobban behatárolhassuk, ezeket a rendszereket spektrofotometria és ^1H NMR spektroszkópia segítségével követjük.

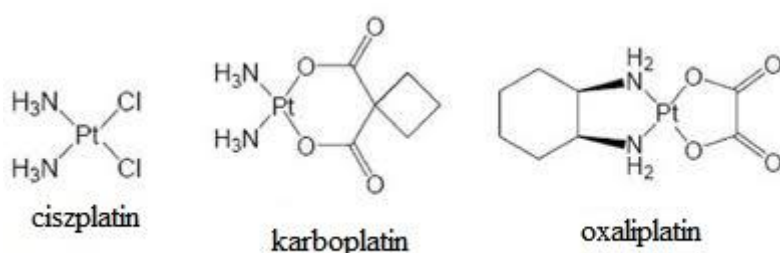
2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Fémkomplexek (köztük a ródiumvegyületek) szerepe a gyógyászatban és a rákellenes terápiában

Napjainkban a gyógyászatban használt szerek túlnyomó része szerves vegyület. A fémtartalmú gyógyszerek igen alulértékelték, pedig számosat közülük terápiás célokra alkalmaznak. Ezek közül talán a legfontosabbak a platinatartalmú rákellenes fémkomplexek, de számos egyéb betegség, például a gyomorfekély és egyéb gyulladásos megbetegedések, valamint bizonyos fertőzések kezelésére is fémtartalmú szereket használnak.

A kezdetben alkalmazott készítmények a fémiont só formájában tartalmazták. Ilyen vegyületek például a Li_2CO_3 , amit a mániás depresszió kezelésére alkalmaznak, illetve az AgNO_3 és sok egyéb fémtartalmú (pl. higany-, arzén-) készítmény, amit fertőtlenítésre, gyógyszerek tartósítására, illetve bakteriális fertőzések (pl. szifilisz) kezelésére is használtak, használnak [1].

A rákellenes terápiában is alkalmazott szerek a fémionokat komplexek formájában tartalmazzák (1. ábra), melyek közül az első, nagy jelentőséggel bíró vegyület a ciszplatin volt („Food and Drug Administration” (FDA) törzskönyvezés: 1978). Ezen kívül a rákellenes, platina tartalmú gyógyszerek családjába tartozik még a karboplatin (1993) és az oxaliplatin (2002) is, melyek hasonlóan széles körben alkalmazott terápiás szerek.



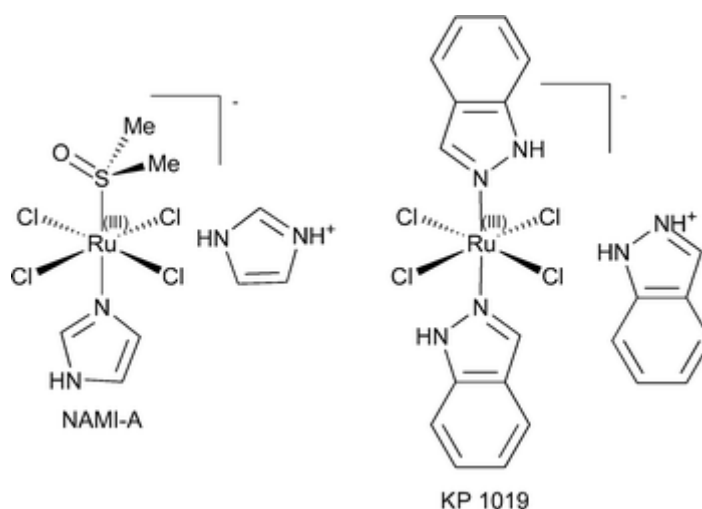
1. ábra: Néhány rákellenes gyógyászatban alkalmazott platinatartalmú vegyület szerkezete

Használatuk során azonban fény derült arra, hogy ezek a platinaalapú készítmények nem rendelkeznek kellő szelektivitással a rákos sejtekre, valamint igen kis százalékuk halmozódik fel a tumorsejtekben (a beadott mennyiség kb. 1%-a van a DNS-hez kötve [2]), így számos súlyos mellékhatás (pl. hányás, hasmenés, hallás-, vese- és idegrendszeri

problémák, az immunrendszer legyengülése stb.) megjelenését okozzák. Emellett a terápia eredményességét gátolhatja a rákos sejtek meglévő vagy szerzett rezisztenciája a platinavegyületekre, így indokoltta vált további fémkomplexek fejlesztése terápiás célzattal.

Napjainkban a kutatások új irányt vettek. A nemkívánatos mellékhatások kiküszöbölése érdekében más, az eddigtől eltérő hatásmechanizmusú fémek, többek között ruténium-, gallium-, titán- és ródiumkomplexek felé is számos vizsgálat irányul, melyek kisebb toxicitást és nagyobb szelektivitást mutat(hat)nak [3].

A Pt^{II} -tartalmú rákellenes szerek lehetséges alternatíváiként jelentős figyelmet kaptak a Ru^{II} - és Ru^{III} -komplexek [3-7], mivel ligandumcsere sajátságaik vizes oldatban hasonlóak a platinaszármazékokéhoz [8], viszont kinetikailag sokszor labilisabbak, és a szervezet egészséges sejtjeire kevésbé toxikusak. Két, szerkezetükben rokon rákellenes Ru^{III} -vegyület, a KP1019 (indazólium transz[tetraklorido(bisz(1H-indazol))rutenát^{III}]), illetve a NAMI-A (imidazólium transz[tetraklorido(dimetil-szulfoxid)(1H-imidazol)rutenát^{III}]) már sikeresen túljutott a klinikai fázis I vizsgálatokon [9-12] (2. ábra).



2. ábra: A Pt^{II} -tartalmú szerek alternatíváiként kifejlesztett Ru^{III} -vegyületek szerkezete

Ezen ígéretes eredmények ellenére is jóval kevesebb vizsgálat folyt eddig a szomszédos 9. csoportba tartozó – főként +3-as oxidációs állapotban lévő fémiont tartalmazó – irídium- és ródiumvegyületek biológiai hatását illetően [13, 14]. Bár a $RhCl_3 \cdot 3H_2O$ rákellenes hatását elsőként – Rosenberg felfedezése előtt több mint egy évtizeddel – 1953-ban írták le [15], további kutatások nem folytak a következő 50 évben

ebben az irányban. Ezzel szemben a Rh^{I} - és Rh^{II} -tartalmú komplexek (pl. diródiium^{II}-tetrakarboxilátok, $[\text{Rh}_2\text{L}_2(\text{RCOO})_4]$, $\text{L} = \text{H}_2\text{O}$ vagy más oldószer) rákellenes hatásának vizsgálatával Bear és munkatársai foglalkoztak már 40 évvel ezelőtt is [16].

Ez a kutatási téma az elmúlt néhány évben került újra a figyelem középpontjába. A korábbi mérsékelt érdeklődés oka lehetett az, hogy a Rh^{III} -vegyületek kinetikailag viszonylag inertek, oldhatóságuk rossz [14]. Az oktaéderez $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ akvakation vízcsere sebességére vonatkozó állandó körülbelül négy nagyságrenddel kisebb, mint a síknégyszetes szerkezetű $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ esetén [17]. Emellett a $[\text{ImH}][\text{transz-RhCl}_4(\text{Im})_2]$ ($\text{Im} = \text{imidazol}$) komplexben a ligandumcsere pl. sokkal lassabb, mint a szerkezetileg hasonló Ru^{III} -vegyület, a KP1019 esetében; valamint a Rh^{III} -komplex biológiailag inaktív [18].

A fentiek alapján elérendő céllá vált megnövelt aktivitással bíró Rh^{III} -komplexek fejlesztése. Ennek során alkalmazott módszer lehet a) egy (vagy több) erősebb transz-hatással bíró ligandum beépítése, mely szignifikánsan megnöveli az ellenoldali halogenidionok távozó képességének mértékét, valamint b) már önmagukban citotoxikus ligandumok koordinációja, melyek kölcsönhatásba léphetnek az egyes biológiai támadáspontokkal [19]. Ez utóbbi módszer alkalmazásával a koordinált ligandum farmakokinetikai tulajdonságai (például oldhatóság, sejtbbe való bejutás) is javul(hat)nak.

Az ún. félszendvics típusú, faciálisan koordinált ligandummal rendelkező Rh^{III} -komplexek kutatásának a daganat- és áttétellenes hatású, vízdékony Ru^{II} -arén-komplexek sikeres alkalmazása adta a lendületet [5, 20]. A 9. csoport fémei hasonló, fémorganikus, semleges vagy anionos, aromás kelátképző ligandummal (LL') létrejövő $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{MCl}(\text{LL}')]^{n+}$ ($\text{Cp}^* = \text{C}_5\text{Me}_5^-$, $n = 0, 1$) komplexeinek előnyei közé tartozik többek között a jó vízdékonyság [21-25]. Számos vizsgált vegyület tartalmazott polipiridil típusú ligandumot, melyek önmagukban citotoxikusak, valamint képesek interkalálódni a DNS-be [26]. A Cp^* -anion semleges arénekhez viszonyított jóval jelentősebb transz-hatása miatt a koordinált vízmolekulák cseresebességi állandója több nagyságrenddel nagyobb, mint a szerkezetileg hasonló rákellenes Ru^{II} -vegyületek esetében [8].

A szerkezet és a daganatsejtekre gyakorolt biológiai hatás összefüggéseinek vizsgálata során kiderült, hogy míg a $[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cl}_4\text{L}_2]^-$ (ahol $\text{L} = \text{Im}$, DMSO) komplexek lényegében hatástalanok (vagy csak szerény sejtnövekedés gátlást képesek kifejezni) a tumorsejtekkel szemben [18], addig a meridionális trikloro-ródiium^{III}-aminkomplexek jelentős *in vivo* aktivitást mutattak, egerekben képesek voltak a daganat méretét csökkenteni [18, 27, 28]. Az ammóniát imidazolra cserélve a komplex kevésbé aktív, két imidazol beépítése esetén inaktívvá válik. Más vizsgálatok igazolták, hogy a kloridion

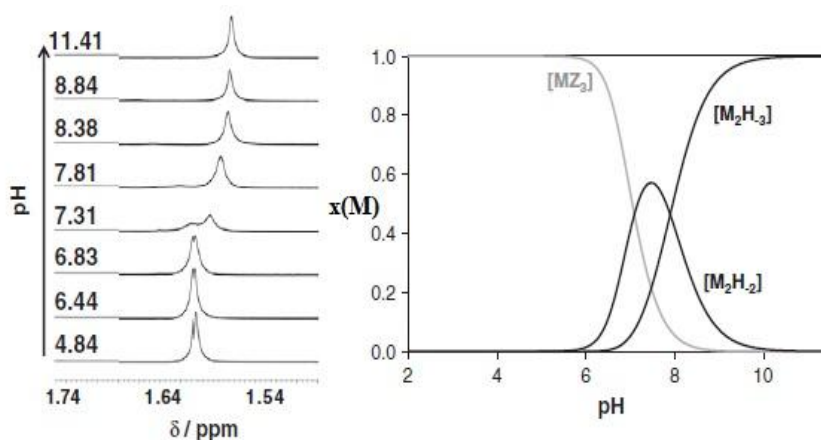
meridionális elrendeződése nem szükséges, bizonyos faciális helyzetű kloridot tartalmazó komplexek is képesek a ciszplatinhoz hasonló rákellenes hatást kifejteni [29].

A $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ akvakation elektronszerkezete hasonló a Ru^{II} - és a Pt^{IV} -ion elektronszerkezetéhez, kis spinszámú komplexeket képez. Továbbá lassú ligandumcsere jellemzi, ez eredményezhette a korábbi csekély érdeklődést rákellenes hatása iránt. Ám három vízmolekulájának Cp^* -ra cserélése a koordinált vízmolekulák labilitását tekintve jelentős növekedést hoz [30]. A három szabad koordinációs helyre kétfogú ligandum koordinálódhat, ez lehet például (O,O) vagy (O,N) donoratomokat tartalmazó vegyület [31-33]. A koordinált ligandumok sajátosságai erőteljesen befolyásolják a képződött komplex stabilitását és biológiai tulajdonságait egyaránt. A harmadik koordinációs helyet gyakran halogenidion (általában klorid) foglalja el, mely vizes oldatban részben vagy teljesen vízre cserélődhet. A jelen dolgozat során a $\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cp}^*$ vegyület és a 3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-on (maltol, mal), valamint a 3-hidroxi-1,2-dimetil-piridinon (Deferiprone[®], dhp) ligandumokkal képzett komplexeinek vizes oldatbeli viselkedéséről pH-potenciometriás titrálások, ^1H NMR vizsgálatok, valamint UV-látható spektrofotometria alkalmazásával nyertünk információkat.

2.2. $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)\text{Z}_3]$ mint „fémion” bemutatása, hidrolízise kloridionokat tartalmazó közegben

A félszendvics típusú $\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cp}^*$ hidrolízise az irodalomból ismert, kutatócsoportunkban tanulmányozták korábban 0,2 M, illetve 0,1 M KCl ionerősség mellett egyaránt [34]. Kloridionok jelenlétében a három koordinálódott vízmolekula részben vagy teljesen kloridionokra cserélődhet, emiatt a savas pH-n jelenlévő részecskét $[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cp}^*\text{Z}_3]$ -ként jelölték, ahol $\text{Z} = \text{H}_2\text{O}$ vagy Cl^- . A teljes vizsgált pH-tartományban (pH 2 – 11,5) az egyensúly gyorsan beállt (általában kevesebb, mint 6 perc alatt). A pH növelésével a Cp^* -gyűrű metil-protonjaihoz rendelt jel intenzitása az ^1H NMR spektrumon csökken, és ezen folyamattal párhuzamosan nagyobb pH-n (pH ~7), kisebb kémiai eltolódásnál egy új csúcs jelenik meg, melynek intenzitása növekszik, és az egyre bázikusabb közegben még kisebb kémiai eltolódások felé mozdul el, egészen pH ~9-ig, majd pozíciója és intenzitása változatlan marad (3. ábra). Ez utóbbi az NMR időskálán gyors cserefolyamat. Az ^1H NMR spektrumok, valamint a pH-potenciometriás titrálások eredményei alapján kétféle hidroxido komplex képződése a valószínű. A közbülső pH-

tartományban megjelenő részecske valószínűleg a $[(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*))_2(\mu\text{-OH})_2\text{Z}_2]$, $([\text{M}_2\text{H}_2])$ bisz(μ -hidroxido)-dimer (3. ábra) [34].



3. ábra: RhCp^* pH-függő NMR spektrumai kloridos rendszerben és a stabilitási szorzatok alapján számolt koncentrációeloszlási görbék ($c_{\text{M}} = 1 \text{ mM}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,20 \text{ M (KCl)}$) [34].

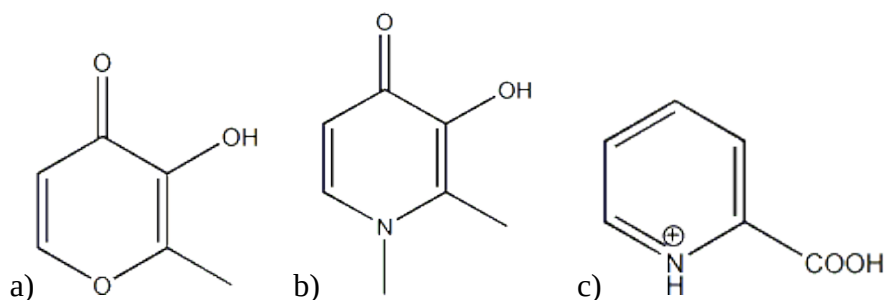
Nagyobb pH-n kloridionok jelenlétében valószínűleg a kétmagvú, trisz(μ -hidroxido) $([(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*))_2(\mu\text{-OH})_3]^+; ([\text{M}_2\text{H}_3]^+))$ részecske képződik, az ehhez tartozó jelet látjuk az NMR spektrumon pH 9 felett (3. ábra).

A 0,2, valamint 0,1 M KCl ionerősség mellett kapott pH-potenciometriás titrálási görbéken inflexiós pontok pH 7,3 és 7,0 értékeknél figyelhetők meg. A $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)\text{Z}_3]$ titrálásakor 1,5 lúgekvivalensnyi KOH fogy, ez szintén azt igazolja, hogy az $[\text{M}_2\text{H}_3]^+$ összetételű részecske az uralkodó pH 9 (0,2 M KCl) felett. Továbbá a mért adatokból kapott titrálási görbékhez jobban illeszthetők azok a számolt görbék, melyeknél a $[\text{M}_2\text{H}_2]$ részecske megjelenését is figyelembe vették. Ennek a részecskének a képződését már korábban feltételezték [35], de stabilitásra vonatkozó adat megadására, ill. állandó számolására nem került sor.

2.3. A ligandumok (mal, dhp, pic) és komplexeik rövid bemutatása

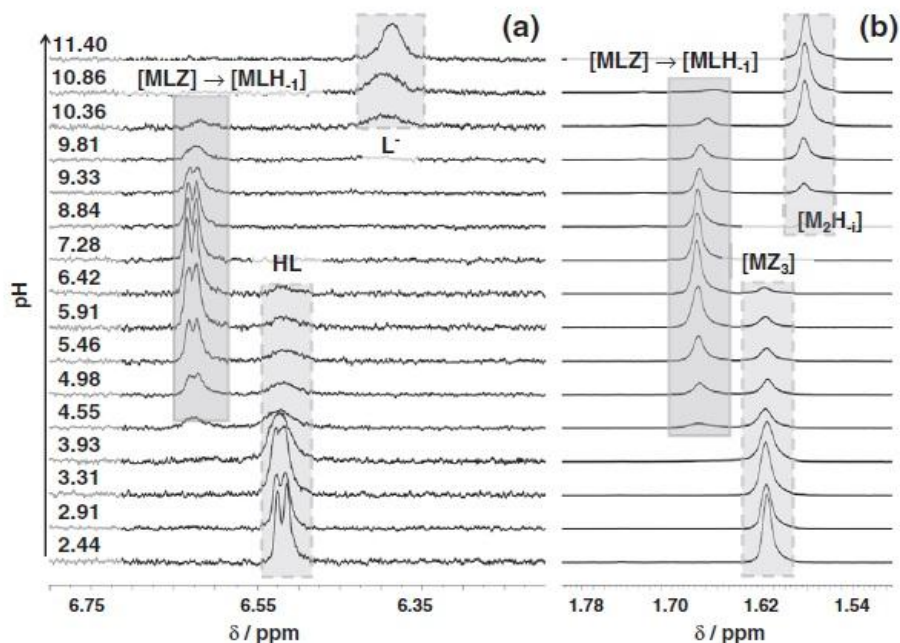
Az általunk felhasznált ligandumok (4. ábra) proton disszociációs folyamatait az irodalomban már részletesen tanulmányozták [34, 36]. A mal ($\text{pK}_a = 8,44$; 0,2 M KCl) és a dhp ($\text{pK}_2 = 9,77$; 0,2 M KCl) proton disszociációs állandói az OH-csoport

deprotonálódásához köthetők, illetve a dhp esetén $pK_1 = 3,67$, (0,2 M KCl) a piridinon-N hidrogénjének disszociációjához rendelhető. (A pic komplexképzését nem vizsgáltuk a RhCp*-vel, így a pic oldategyensúlyi viszonyainak tárgyalása jelen dolgozatnak nem része.)



4. ábra: Az általunk vizsgált ligandumok: a) mal, b) dhp, és c) pic

A mal egy – a természetben is előforduló – szerves vegyület, melynek felhasználása legfőképp az élelmiszeriparban, ízfokozóként jelentős, bár korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy többek között Al^{3+} - és VO^{2+} -ionokkal komplexképzésre hajlamos. A mal-lal képzett komplex – melyet bécsi partnereink (Wolfgang Kandioller, Bécsi Egyetem, Szervetlen Kémiai Intézet) szilárdan is előállítottak – kloridos közegben lejátszódó egyensúlyi folyamatait már korábban tanulmányozták kutatócsoportunkban [34]. A vizsgálati módszerek pH-potenciometria, 1H NMR (5. ábra) és UV-látható spektrofotometria voltak. A komplexképződés gyors folyamat, a RhCp*-mal esetében csak monokomplexek képződnek, a komplexképződés pH 4 felett kezdődik el. A folyamat az 1H NMR spektrumon a ligandum (a), valamint a fémion (b) kémiai eltolódásának változásait figyelve egyaránt követhető.



5. ábra: A $[Rh^{III}(Cp^*)Z_3]$ -mal rendszer 1H NMR spektrumainak nagy (a) és kis (b) kémiai eltolódású régiói különböző pH-értékeknél [34]. Kiemelt csúcsok: (a) CH(5) (mal), (b) CH_3 (Cp^*) protonok. ($c_M = c_L = 1$ mM; $t = 25$ °C; $I = 0,20$ M (KCl); 10% D_2O ; $i = 2, 3$; $Z = H_2O, Cl^-$)

Savas pH-n a protonált szabad ligandumot, valamint a komplexben nem kötött $RhCp^*$ metilcsoportjainak jelét látjuk. Ezen jelek intenzitásának csökkenésével más kémiai eltolódásnál új csúcsok jeleinek növekedése látható, ezek a jelek a fémion, valamint a ligandum oldaláról egyaránt a képződő komplex megjelenésére utalnak.

Egyre bázikusabb pH értékeken azonban megfigyelhető, hogy a komplexben kötött fémion/ligandum csúcsa elmozdul, intenzitása csökkenni kezd. Ezzel párhuzamosan ismét egy új csúcs növekedése látszik a spektrumon, melynek kémiai eltolódása különbözik az eddigiekétől. A folyamatot a ligandum oldaláról szemlélve megállapíthatjuk, hogy ez a szabad, deprotonált ligandum jele. A $RhCp^*$ oldaláról vizsgálva a folyamatot szintén a komplexben már nem kötött fémion megjelenésének tudhatjuk be a lúgos pH tartományban növekvő csúcsot, mely ebben a pH-tartományban már a trihidroxido dimer részecske.

A komplexben a fémion harmadik koordinációs helyére – attól függően, hogy az oldat tartalmaz-e kloridionokat – kerülhet Cl^- ion is. Ez a H_2O/Cl^- csere az UV-látható spektrumban változást okoz, így ezen spektrumok alapján a $[Rh^{III}(Cp^*)L(H_2O)]^+ + Cl^- \rightleftharpoons [Rh^{III}(Cp^*)(L)Cl] + H_2O$ folyamat $\lg K' = 1,17$ értékű látszólagos állandóval jellemezhető

fiziológiás pH-n, ahol a $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)\text{LZ}]$ forma a domináns. Eszerint a RhCp^* -mal komplex 76, illetve 61 százalékához koordinálódik kloridion fiziológiás pH-n, 0,2 valamint 0,1 M kloridkoncentráció mellett [34].

A RhCp^* -mal komplex a biológiai mérések alapján mérsékelt citotoxicitású (l. 1. táblázat), mely a fiziológiás körülmények között jelenlévő biológiailag aktív komponensek hatásának tudható be [34]. A RhCp^* -mal komplex tesztelése a következő három sejtvonalon történt: CH1 (petefészekrák), SW480 (vastagbélrák) és A549 (tüdőrák). Általánosságban elmondható, hogy a CH1 sejtek voltak a leginkább érzékenyek a fémkomplex toxikus hatására a vizsgált sejtvonalak közül, itt a meghatározott IC_{50} érték (azaz az a koncentráció, melynél 50 százalékos sejthalál következik be) $120\ \mu\text{M}$. Az SW480, illetve az A549 sejtvonalak kevésbé voltak érzékenyek, köszönhetően az általánosan is kisebb érzékenységüknek a kemoterápiás szerek iránt [33]. Továbbá a vizsgált komplex citotoxicitása az analóg Ru^{II} -vegyületnél ($[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cimol})]$) meghatározott értékektől nem mutat nagy eltérést [37].

A dhp-t a *Thalassemia major* (mediterrán vérszegénység) kezelésekor szükséges vérátömlesztések folytán a szervezetben kialakuló vastóbblet eltávolítására használják a terápiában. Hajlamos (O,O)-típusú kelátképzésre elsősorban +3-as oxidációs állapotú fémekkel. A biológiai mérések alapján a RhCp^* dhp-val képzett komplexének aktivitása közepesnek mondható (1. táblázat).

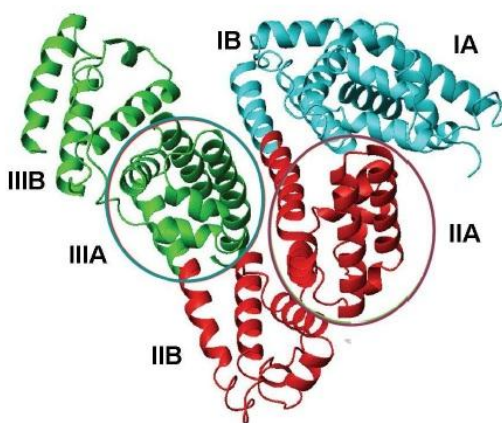
A pic biológiai hatásáról és komplexképző tulajdonságáról több tanulmány is íródott, több fémkomplexét is kipróbálták gyógyászati céllal. Vanádium- és cinkkomplexét mint potenciális antidiabetikus hatású szereket tesztelték [38], míg Ru^{II} -komplexe rákellenes aktivitást mutat, több rákos sejtvonalon is vizsgálták a komplex biológiai aktivitását (Hela, human cervix carcinoma = méhnyakrák; FemX, melanoma), a meghatározott IC_{50} értékek alapján ($36 - 82\ \mu\text{M}$) a komplex aktivitása közepesnek mondható [39]. Az általunk vizsgált RhCp^* -komplexek citotoxicitási adatait az 1. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatban látható IC_{50} -értékek alapján a RhCp^* -mal és az RhCp^* -dhp aktivitása közepesnek mondható, a dhp-val képzett komplex tekinthető a rákos sejtekkel szemben leginkább toxikusnak.

1. táblázat: A RhCp* mal-lal, dhp-val és pic-val alkotott komplexeinek citotoxicitási adatai [μM] [34, 40]

Sejtvonal	RhCp*-dhp	RhCp*-pic	RhCp*-mal
CH1	50 ± 2	258 ± 6	120 ± 16
SW480	112 ± 15	283 ± 65	178 ± 26
A549	165 ± 14	343 ± 24	306 ± 34

2.4. A humán szérum albumin rövid bemutatása

A humán szérum albumin (HSA) az emlősök vérében a legnagyobb koncentrációban ($c \sim 630 \mu\text{M}$) fellelhető szérumfehérje. Számos funkcióval rendelkezik a szervezetben, feladata például a vér pH-jának pufferelése, az érpályában a megfelelő ozmózisnyomás biztosítása, emellett különböző szervetlen ionok és szerves vegyületek szállításáért is felelős. A HSA egyetlen láncból álló fehérje, mely szerkezetileg három egységre (doménre) osztható (I-es, II-es és III-as egység, ezek további alegységekre bontása a következőképpen jelölendő: IA, IIB stb.) (6. ábra). A molekulában egyetlen triptofán van (Trp214) az ún. I. kötőhelyen [41].

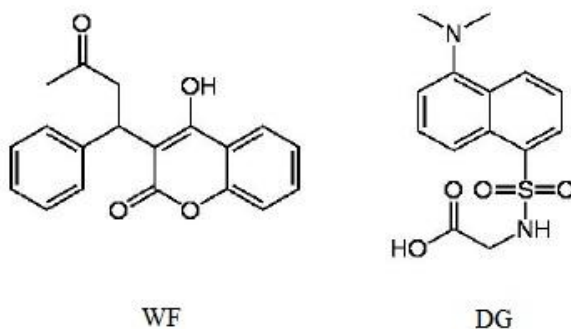


6. ábra: A humán szérum albumin térszerkezete

A HSA-n való kötődés helyének feltárása végett a vizsgálatokba általában ún. kötőhely marker anyagokat vonnak be. Ezek lehetnek olyan vegyületek, melyek fluoreszcens emissziós intenzitása önállóan kicsi, azonban fehérjéhez kötve jelentősen megnövekszik. Ha azonban egy másik vegyület a marker kötőhelyére kötődik be – leszorítva ezzel a marker anyagot arról a helyről –, akkor a képződő vegyület fluoreszcenciás intenzitása csökken. Ilyen molekulák például a warfarin (WF), valamint a danzilglicin (DG) (7. ábra).

A WF véralvadásgátlóként alkalmazott szer, többek között trombózisok kialakulásának megelőzésére használják. Kölcsönhatása HSA-nal az irodalomban jól leírt, a fehérje IIA alegységében, az I-es kötőhelyen köt, erre a folyamatra számos állandót is találunk az irodalomban [42].

A DG a WF-hoz képest jóval kevésbé tanulmányozott vegyület, a II-es kötőhely (IIIA alegység) markere. A DG N-védett aminosav származék, amfipatikus tulajdonságú molekula. A danzilcsoport biztosítja a molekula fluoreszcens tulajdonságát.



7. ábra: A warfarin és a danzilglicin szerkezeti képlete

3. CÉLKITŰZÉS

A vizsgált RhCp* fémorganikus vegyület oldategyensúlyi sajátosságainak feltárására eddig csak kloridionokat tartalmazó közegben került sor. Ezáltal felmerülhet a kérdés, hogy a kloridionok hiánya a rendszerben hogyan változtatja meg a fémion hidrolízisének folyamatát, pl. képes-e annak hidrolízisét valamilyen mértékben visszaszorítani (részlet vesz-e kompetícióban a kloridion a fémion kötőhelyeiért). Emiatt vizsgáljuk a RhCp* hidrolízisét kloridionoktól mentes közegben.

Mivel az általunk vizsgált RhCp* vegyület adott ligandummal alkotott komplexe a gyógyászatban kerülhet felhasználásra, különösen fontos a komplex vizes oldatbeli stabilitásának és a szervezetben való szállításának, kötődésének ismerete fiziológiai pH-n, hogy ez által az aktivitás, illetve hatásmechanizmus megértéséhez információkat szerezzünk. Ezért vizsgáljuk egyrészt a RhCp* (O,O) donoratomokat tartalmazó dhp és mal ligandumokkal való komplexképzését, valamint a dhp-val és az (O,N) típusú pic-val alkotott komplexeinek humán szérumban való kölcsönhatását.

A fehérje – komplex kölcsönhatást elsősorban fluorimetriás közvetlen, illetve kompetíciós mérésekkel is tanulmányozzuk kötőhely marker anyagok (warfarin, danzilglicin) bevonásával. A fehérje aminosav oldalláncjaihoz történő koordinációt modellvegyületek felhasználásával vizsgáljuk.

4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. Felhasznált vegyszerek

A mal, dhp, pic, WF, DG, HSA (A1653, zsírsavat tartalmazó), N-metil-imidazol (N-MeIm) N-acetil-cisztein-metilészter (Cys*), etil(3-metil-tio)propionát (MS), N-acetil-L-metionin (AM), KCl, KNO₃, AgNO₃, HNO₃, KOH, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, és NaCl a Sigma-Aldrich termékei, az anyagokat további tisztítás nélkül használtuk fel. A ligandumoldatok pontos koncentrációjának meghatározása pH-potenciometriás mérésekkel történt, a mérési eredményeket HYPERQUAD nevű programmal [43] értékeltük ki. A [Rh^{III}(Cp*)-(μ-Cl)Cl]₂ komplexet Prof. Bernhard K. Keppler (Bécsi Egyetem, Szervetlen Kémiai Intézet) kutatócsoportjától kaptuk.

A törzsoldatokat ismert mennyiségű [(Rh^{III}(Cp*)-(μ-Cl)Cl)₂ dimer vízben való feloldásával készítettük. A kloridmentesítés során ekvivalens mennyiségű AgNO₃-ot adtunk az oldathoz, majd a kivált AgCl csapadékot (szükség esetén többszöri) szűréssel távolítottuk el az oldatból. A [Rh^{III}(Cp*)]-oldatok pontos koncentrációját pH-potenciometria segítségével határoztuk meg.

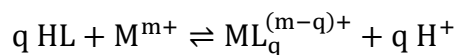
A HSA oldatokat minden mérés előtt frissen készítettünk. Mivel a kötőhely markerek vízben rosszul oldódnak, így a WF és a DG oldásához kevés NaOH-ot (kb. 5 – 8 csepp/50,00 cm³ oldat, kb. 3 csepp/10,00 cm³ oldat, c_{NaOH} = 0,1 M) használtunk, a kötőhely markerek törzsoldatait az elkészítésüktől számítva 8 órán belül felhasználtuk. A HSA, WF és DG oldatokat egyaránt hűtőszekrényben tároltuk. A védett funkciós csoporttal rendelkező modellvegyületekből készült oldatokat szintén közvetlenül a felhasználás előtt készítettük tömeg szerinti beméréssel, szükség esetén hűtőszekrényben tároltuk.

4.2. Az alkalmazott műszeres módszerek alapjai

4.2.1. pH-potenciometria: elvi alapok, kísérleti körülmények

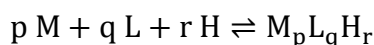
A pH-potenciometria alkalmazására az ad lehetőséget, hogy a fémion – ligandum kölcsönhatás befolyásolja a H⁺ – ligandum kölcsönhatást, azaz kompetitív reakció játszódik le a proton és a központi fémion között. Ebből következően a H⁺

koncentrációjának mérése által következtethetünk a képződő fémkomplex stabilitására. A folyamat az alábbi egyenlettel írható le:



A továbbiakban – a könnyebb áttekinthetőség végett – a töltéseket elhanyagoljuk.

Fémiont (M), teljesen deprotonált ligandumot (L) és protont (H) tartalmazó rendszerek esetén az egyensúlyi egyenletek a következőképpen írhatók fel:



Ezen egyenletek alapján a stabilitási szorzat számítási módja a következő:

$$\beta_{pqr} = \frac{[\text{M}_p\text{L}_q\text{H}_r]}{[\text{M}]^p[\text{L}]^q[\text{H}]^r}$$

A pH-potenciometriás mérések során az elektrolitoldatba merülő elektród felületén kialakuló elektródpotenciált mérjük. A potenciál ($E_{\text{elméleti}}$), valamint az azt létrehozó elektródaktív komponens koncentrációja – amely a pH-potenciometriás mérések során nem más, mint a H^+ -ionok aktivitása – között a Nernst-egyenlet teremt kapcsolatot:

$$E_{\text{elméleti}} = E^0 + \frac{RT}{zF} \times \ln a(\text{H}^+)$$

ahol:

E^0 – a rendszer standardpotenciálja;

R – egyetemes gázállandó (8,314 J/mol K);

T – hőmérséklet (K)

z – az elektronszám változása a folyamatban;

F – Faraday-állandó (96487 C/mol).

Potenciometriás titrálások során az elektródpotenciál változását mérjük a mérőoldatfogyás függvényében, mely az alábbi egyenlettel írható le:

$$E_{\text{számolt}} = E' - m_E \times \text{pH}$$

melyben:

E' – formális standard elektródpotenciál, mely figyelembe veszi a referenciaelektród potenciálját, a diffúziós potenciált, és az oldat aktuális közepes aktivitási együtthatóját;

m_E – aktuális meredekség ($2,303 \times RT/zF$).

Annak érdekében, hogy a mért elektródpotenciálból pH-t számolhassunk, az adott mérőrendszerben szükséges meghatározni a Nernst-egyenlet egyéb paramétereit, azaz kalibrálni kell azt. A mérőrendszer kalibrálása erős sav – erős bázis titrálással történt, a kapott titrálási görbéket Gran-módszerrel [44] értékeltük ki, mely alkalmas a titrált és a titrálo oldatok pontos koncentrációjának meghatározására minden olyan rendszerben, ahol a Nernst-egyenlet érvényes. A módszer szerint az egyes titrálási pontokban érvényes egyensúlyi koncentrációk kiszámításához használt összefüggéseket úgy transzformáljuk, hogy minden szükséges adat számolható legyen lineáris regresszióval. A mért pH-értékeket úgy alakítjuk át, hogy a transzformált adatokat a hozzáadott titrálo oldat térfogatának függvényében ábrázolva az x tengelyt az ekvivalenciapontban metsző egyenest kapjunk. Az oldatkoncentrációk és a mérőoldatfogyás ismeretében a pH az erős sav – erős bázis titrálás minden olyan pontjában számítható, ahol a vízmolekulák autoprotolízise elhanyagolható és az erős sav még feleslegben van. Az így számított pH érték azonban nem egyezik meg a mért értékkel, kettejük egymástól való eltérése egy állandó, melyet Irving-faktornak nevezünk [45].

$$\text{IRV} = \text{pH}_{\text{mért}} - \text{pH}_{\text{számított}}$$

Az ekvivalenciapont után a titrált és titrálo oldatok pontos koncentrációiból az oldatok pOH értéke, valamint az Irving-faktorról korrigált pH-értékek kiszámíthatók. Így a lúgos tartományban mért adatpárok a következő képlet alapján alkalmasak a vízionszorzat tízes alapú negatív logaritmusának, a pK_w értéknek a számolására:

$$\text{pK}_w = -\lg([\text{H}^+] \times [\text{OH}^-]) = \text{p}[\text{H}^+] + \text{p}[\text{OH}^-] = (\text{pH}_{\text{mért}} - \text{IRV}) - \lg[\text{OH}^-]$$

A ligandumok protonálódási állandóit és a fémkomplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás titrálásokkal határoztuk meg 25 °C±0,1-on vizes oldatban, 0,2 M KNO₃ ionerősség mellett. A titrálásokat ismert koncentrációjú (0,20 M) karbonátmentes KOH mérőoldattal végeztük. A HNO₃ és a KOH oldatok pontos koncentrációját pH-potenciometriás titrálásokkal határoztuk meg. A mérésekhez Metrohm 6.0234.100 típusú kombinált elektróddal felszerelt Orion 710A pH-mérőt és Metrohm 665 Dosimat automata bürettát használtunk. A mérések során a fémion mintabeli koncentrációját a hidrolízis vizsgálatakor ~ 1 mM értékre állítottuk be. A mal-lal, illetve a dhp-val képződő komplexek vizsgálatakor a fémion : ligandum arány 1:1 és 1:3 közé esett, a ligandum-koncentráció 1 – 2 mM volt. A méréseket pH 2,0 – 11,5 tartományban végeztük, 10,00 cm³-es kiindulási térfogatban, állandó kevertetés és argon gáz buborékoltatása mellett.

A képződő komplexek összetételének és stabilitási szorzatainak meghatározásához a PSEQUAD nevű programot [46] használtuk. Az értékelések során komponensként szerepeltek: a fémion (M) (azaz [Rh(Cp*)(H₂O)₃]²⁺); a proton (H) és a teljesen deprotonált ligandum (L). A programban bemenő adatként szerepelnek természetesen a mintához adagolt mérőoldat-térfogat – pH kísérleti adatpárok, az asszociátumok (protonált ligandum, fémion–ligandum komplexek, és hidroxido-komplexek) száma, az asszociátumok összetétele, a komponensek kiindulási teljes koncentrációja, az ismert és az ismeretlen (közelítő) stabilitási szorzatok és különböző állandók, pl. titráló oldat koncentrációja, vízionszorzat, Irving-féle korrekciós tényező. A program a keresett stabilitási szorzatokat az M, L és H komponensekre felírt anyagmérleg-egyenletek megoldásával adja meg, ahol n a rendszerben képződő asszociátumok számát, p, q, r pedig az együtthatókat jelöli.

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i}$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i}$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i}$$

A program az általunk feltételezett asszociátumok és közelítő stabilitási szorzatok figyelembe vételével, Gauss-Newton-Raphson iterációval végzi a közelítést egészen addig, amíg a titráló oldatra nézve a (V_{mért} – V_{számolt})² értékek átlaga minimumot ad, ahol V a

titráló oldat térfogata. A program minden megadott pH-értéknél kiszámolja a képződő részecskék egyensúlyi koncentrációját és az adott pontokhoz tartozó standard deviációk értékét. Az iterációsorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási szorzatokat, a kísérleti és a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó illesztési paramétert.

A koncentrációeloszlási görbék számolása a komplexek összetételének, stabilitási állandójának és a komponensek teljes koncentrációjának ismeretében a MEDUSA nevű program [47] segítségével történt.

4.2.2. UV-látható spektrofotometria

Spektrofotometriásan azon anyagok mérhetők, amelyek az adott hullámhossz-tartományban fényelnyelésre képesek, azaz kromofórok. Az UV (200 – 400 nm) és a látható fény (400 – 800 nm) tartományában a fényabszorpció a molekula vagy az atom elektroneloszlását változtatja meg, az elektronok a gerjesztés hatására a kisebb energiájú elektronpályákról a nagyobb energiájúakra kerülnek át. Az UV-látható színek tartomány abszorpciós sávjai igen szélesek, ezért minőségi analitikai alkalmazhatóságuk köre erősen korlátozott, viszont a módszer a kvantitatív analitika egyik legszélesebb körben alkalmazott módszerének tekinthető. A koncentrációmérés a – csak híg oldatokra érvényes – Lambert-Beer törvényen alapszik, mely szerint:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times l \times c$$

ahol:

A_{λ} – mért abszorbancia (adott λ hullámhosszon)

ε_{λ} – moláris abszorbancia [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

l – úthossz [cm]

c – koncentráció [M].

A spektrofotometriás méréseket egy Hewlett-Packard 8452A diódasoros spektrofotométeren, $25,0 \pm 0,2$ °C-on, állandó ionerősség (0,2 M KNO_3) és 1 cm-es úthossz mellett, 200 – 820 nm hullámhossztartományban végeztük. A karbonátmentesség érdekében nagytisztaságú argon gázt buborékolattunk át az oldatokon e mérések során is, valamint a spektrofotometriás titrálásokhoz is ismert koncentrációjú (0,2 M) karbonátmentes KOH oldatot használtunk.

A spektrofotometriás titrálásokat különböző összetételű, csak ligandumot, csak RhCp*-t, illetve fémiont és ligandumot egyaránt tartalmazó minták esetén végeztük. A ligandumok spektrofotometriás vizsgálata során a koncentrációjukat 0,11 mM (mal), illetve 0,10 mM (dhp) értékekre állítottuk be. A RhCp* velük képzett komplexeinek titrálásakor a fémion:ligandum arány 1:1 volt.

4.2.3. ^1H Mágneses magrezonancia spektroszkópia (^1H NMR)

Az NMR spektroszkópia az egyik leghatékonyabb, mágneses atommagok azonosítására alkalmazott szerkezetvizsgáló módszer, mely a zérustól eltérő magspinnel rendelkező elemek, illetve vegyületek azonosítására alkalmazható.

Az eljárás a mágneses mag és a külső mágneses tér közötti kölcsönhatáson alapul. A magok mágneses momentuma a külső mágneses tér irányába áll be, és mint tengely körül kering. A külső mágneses tér hatására a mag energiája $2I+1$ (I = impulzusmomentum) energianívóra hasad fel, amelyek közötti energiakülönbség arányosan nő a külső mágneses térrel. Az energianívók között megfelelő mágneses sugárzással átmenetek hozhatók létre. Az átmenet létrejöttéhez adott frekvenciájú sugárzás szükséges. Ennek következtében az eljárásnak rezonancia jellege van. Az atommagot körülvevő elektronfelhőben a külső mágneses tér diamágnességet indukál, amely megváltoztatja a külső mágneses tér értékét a mag helyén, ezáltal árnyékoló hatást fejt ki. Ez minden atomnál más és más rezonanciafrekvenciánál jelenik meg. A kémiai környezet ilyen jellegű befolyásoló hatását kémiai eltolódásnak (δ) nevezzük. A kémiai eltolódás információt ad a kémiai szerkezetéről. A kémiai eltolódáson a mag saját rezonanciafrekvenciája és egy referenciaként választott anyag (pl. tetrametil-szilán (TMS), 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav (DSS)) rezonanciafrekvenciájának a különbségét értjük. A jelek intenzitása arányos az értük felelős magok számával, tehát meghatározható a különböző kémiai környezetben előforduló azonos magok relatív száma is. A szomszédos magok spinjei kölcsönhatnak egymással, melynek következtében az egyes magok jelei felhasadnak. A jelfelhasadás miatt a mag NMR-jele nem egy szingulett, hanem egy jelcsoport, valamilyen multipliett lesz. A multipliett jelei közti távolságot, Hz-ben kifejezve, csatolási állandónak nevezzük.

A méréseinket Bruker Ultrashield 500 Plus készüléken végeztük. Referenciaanyagként DSS-t alkalmaztunk. A minták elkészítéséhez oldószerként 10%

(v/v) D₂O/H₂O elegyet használtunk. A vízjel elnyomását a WATERGATE programmal végeztük.

A RhCp* pH-függő ¹H NMR spektrumainak felvétele ~ 2 mM-os RhCp*-koncentráció mellett történt. A mal-lal képzett 1:1 komplex vizsgálata során a fémion és a ligandum koncentrációját egyaránt 1,10 mM értékűnek, a dhp-val képződő 1:1 komplex vizsgálatakor pedig 0,95 mM értékűnek választottuk. A pH-t minden esetben ismert koncentrációjú, karbonátmentes KOH oldattal állítottuk be a megfelelő értékre.

A védett funkciós csoportokat tartalmazó modellvegyületekkel való kölcsönhatás vizsgálata során a fémion (illetve valamely komplexe) és a választott modellvegyület koncentrációját egyaránt 0,75 mM értékre állítottuk be. Szükség esetén – az oxigénmentességet biztosítandó – argont buborékolattunk át a mintákon és a törzsoldatokon egyaránt.

4.2.4. Spektrofluorimetriás mérések

A spektrofluorimetria napjaink közkedvelt vizsgálati módszere, mely népszerűségét elsősorban kis anyagigényének (kis térfogat, µM-os koncentráció) és egyszerű használatának köszönheti. Főleg biokémikusok alkalmazzák fehérjék, illetve azokkal kölcsönható anyagok vizsgálatára. Nagy hátránya azonban, hogy a mért intenzitásváltozásokból csak közvetve következtethetünk a kötődés helyére, továbbá a kötőhely marker anyagokkal történő kompetíciós vizsgálatok csak az adott kötőhelyről való leszorítást jelzik, ami nem feltétlenül egyezik a fehérjéről való teljes leszorítással.

A módszer azon alapszik, hogy bizonyos vegyületek az UV-látható sugárzás abszorpciója következtében fotolumineszcenciát mutatnak, azaz fényt emittálnak. Amennyiben a fény kisugárzása a gerjesztés után 10⁻⁴ másodpercnél rövidebb idő alatt következik be, fluoreszcencia jelenségről beszélünk.

A fehérjékben három aromás szerkezetű, ezáltal fluoreszcens aminosav található: ezek a fenil-alanin (Phe), tirozin (Tyr) és a triptofán (Trp). Amennyiben a HSA-ban a 214-es helyzetben egyedülként előforduló Trp gerjesztése a célunk, úgy a besugárzó fény hullámhosszát λ_{EX} = 295 nm hullámhosszúságúnak kell választanunk. A Trp(214) a IIA domén „hidrofób zsebe” közelében helyezkedik el, ahol egy ligandumnak az egyes kötőhelyre (IIA) való bekötődésével megváltoznak a hidrofób-hidrofil viszonyok, ami a Trp emissziójának intenzitására hatással van. Az ilyen típusú vizsgálatok az ún. „kioltás” (kvencselés, angolul quenching) jelenségén alapulnak: a HSA kezdeti emissziós intenzitása

valamely vegyület hozzáadásával folyamatosan csökken, a csökkenés mértékéből pedig a fehérje és a ligandum közti kölcsönhatásról, a köztük kialakuló kötés erősségéről kaphatunk információt.

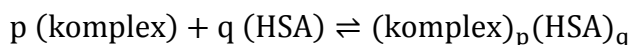
Alkalmas gerjesztés mellett a HSA bizonyos vegyületekkel komplexet képezve intenzív fluoreszcenciát mutat, ilyen vegyületek az általunk kötőhely markerként felhasznált WF és DG (ld. korábban).

A kioltásos vizsgálatok során a Trp gerjesztése 295 nm-en történt, 305 – 450 nm-es hullámhossz-tartományban vettük fel a spektrumokat. A RhCp* vagy valamely komplexének koncentrációja 0–16 μM között változott.

A kizorításos mérések során a HSA és a választott marker anyag koncentrációját az egyedi mintákban egyaránt 1 – 1 μM -nak választottuk, a mintasorozatban a RhCp*, vagy valamely komplexének mennyiségét változtattuk 0–20 μM koncentrációtartományban.

A mérések kvantitatív kiértékelésére használt PSEQUAD programot [46] használtuk, mely több szempontból is előnyös számunkra: teljes spektrumok analízisére alkalmas, illetve több komponens emisszióját képes egyszerre kezelni.

A program a következő adatok alapján számol: az egyedi mintáknál nyert intenzitás értékek; a mintában található komponensek koncentrációja; a rendszerben megtalálható komponensek és asszociátumok megadása (pl. HSA, komplex, HSA+komplex); az emittáló vegyületek megjelölése; a képződő asszociátumok közelítő stabilitási állandói. A program az adatsorokból az alábbi anyagmérlegek alkalmas matematikai módszerrel való megoldásával számítja a keresett kötési állandókat, azok szórását és az emittáló komponensek „egyedi spektrumát”. Ez utóbbi lényegében az abszorpciós spektroszkópiából ismert moláris abszorbancia megfelelője a fluorimetriában.



$$\beta_{pq}^* = \frac{[(\text{komplex})_p(\text{HSA})_q]}{[\text{komplex}]^p[\text{HSA}]^q}$$

$$c_{\text{komplex}} = [\text{komplex}] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pi}^* [\text{komplex}]^{p_i} [\text{HSA}]^{q_i}$$

$$c_{\text{HSA}} = [\text{HSA}] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pq}^* [\text{komplex}]^{p_i} [\text{HSA}]^{q_i}$$

ahol:

β_{pq}^* – látszólagos kötési állandó HSA-komplex adduktumra

c_x – x komponens analitikai (teljes) koncentrációja

$[x]$ – x komponens egyensúlyi koncentrációja

$q, p - 1$ (Fluorimetriás körülmények között a nagy hígítások miatt csak 1:1 arányú komplexek létrejöttével számolhatunk.)

komplex – RhCp* vagy RhCp*-ligandum

Spektrófluorimetriában a mért intenzitás a következő összefüggésben áll a komponensek/asszociátumok koncentrációjával:

$$I_i = \Phi_{\text{komplex}}^i \times [\text{komplex}] + \Phi_{\text{HSA}}^i \times [\text{HSA}] + \Phi_{\text{HSA-komplex}}^i \times [\text{HSA} - \text{komplex}]$$

ahol:

I_i – fluoreszcenciás emisszió intenzitása az “i”-edik hullámhosszon

ϕ_x^i – „moláris intenzitás”.

A méréseket és a törzsoldatokból készített hígításokat is PBS* pufferben végeztük, melynek kloridion koncentrációja és Na^+/K^+ aránya megegyezik a vérérszérumával ($c(\text{KCl}) = 1,5 \text{ mM}$, $c(\text{NaCl}) = 100 \text{ mM}$, $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 12 \text{ mM}$, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 3 \text{ mM}$).

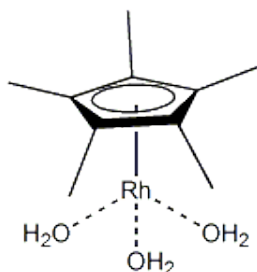
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTELMEZÉSÜK

5.1. A RhCp* hidrolízisének vizsgálata kloridmentes közegben

A $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ dimer vegyület vízben való feloldásával nyert $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ fémorganikus vegyület hidrolízisét 0,2 M KNO_3 ionerősség mellett vizsgáltuk.

A pH-potenciometriás titrálások során az egyensúly beállta a kloridionokat tartalmazó rendszerhez hasonlóan gyors. A képződő komplexek sztöchiometriájának és stabilitási állandójának számolása a pH-potenciometriás mérésekkel történt, de a speciáció igazolásának érdekében ^1H NMR spektrumokat is vettünk fel különböző pH értékeken.

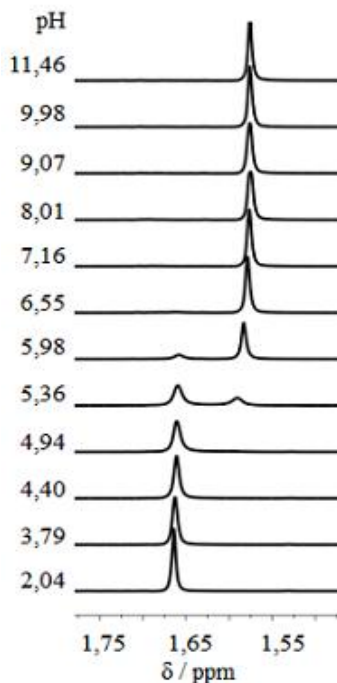
Kloridionmentes közegben, savas pH-n a $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ dimer vegyület oldása és kloridmentesítése után az ún. zongoraszék geometriájú akvakomplex részecske ($[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$) van jelen, melynek szerkezetét a 8. ábra mutatja. A koordinálódó vízmolekulák kloridionok jelenlétében részben vagy teljesen lecserélődhetnek kloridionokra (ld. irodalmi áttekintés).



8. ábra: $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ szerkezeti képlete [34]

A $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ pH-függő ^1H NMR spektrumainak (9. ábra) elemzéséből az alábbi megállapításokat tettük: i) miközben a Cp*-gyűrű metilcsoportjaiban található protonokhoz rendelt csúcsok intenzitása a pH növekedésével csökken; pH 5,5 körüli értéken egy új csúcs jelenik meg az NMR spektrumokon, mely az egyre bázikusabb közegben a kisebb kémiai eltolódások felé mozdul el, egészen a pH ~ 8 értékig, majd változatlan marad. Ez az NMR időskálán gyors cserefolyamat. Összehasonlítva kloridionokat tartalmazó rendszerrel, azt látjuk, hogy a kétféle közegben igen hasonlóak a változások. Így ebben a kloridmentes közegben is kétféle hidroxido komplex képződését

tartjuk valószínűnek. A közbűlső pH-tartományban, hasonlóan a kloridionokat tartalmazó rendszerhez, képződik a biszhidroxido-dimer részecske, $[(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*))_2(\mu\text{-OH})_2\text{Z}_2]$, $([\text{M}_2\text{H}_2])$.

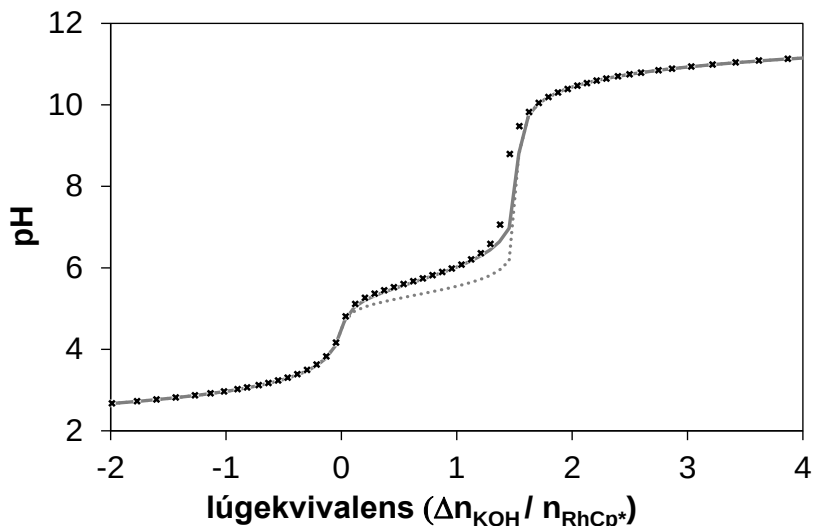


9. ábra: $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ pH-függő ^1H NMR spektrumai kloridmentes közegben az alifás tartományban ($c_M = 2,38 \text{ mM}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,2 \text{ M (KNO}_3)$)

Nagyobb pH-n kloridionok jelenlétében és hiányában is egyaránt egyféle, azonos kémiai eltolódásnál megjelenő csúcsot látunk a spektrumokon. Ez a részecske valószínűleg kétmagvú, trisz(μ -hidroxido) komplex, $[(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*))_2(\mu\text{-OH})_3]^+$ $([\text{M}_2\text{H}_3]^+)$, mely a kloridos és nitrátos közegben is egyaránt megjelenik, kémiai eltolódása független az oldat ionerősségét beállító ionok (Cl^- , NO_3^-) anyagi minőségétől. Röntgenszerkezete is ismert az irodalomban [48].

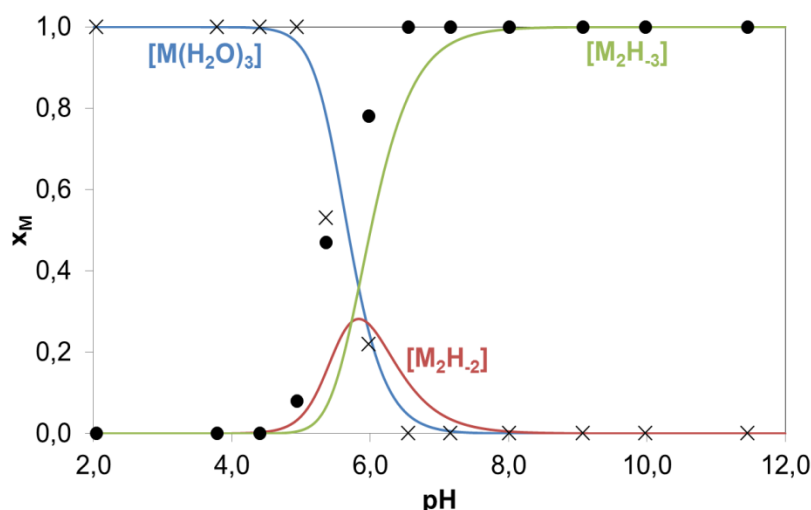
A $0,2 \text{ M KNO}_3$ ionerősség mellett kapott, illetve az irodalomban szereplő $0,2$, valamint $0,1 \text{ M KCl}$ ionerősség melletti titrálási görbék [34] alapján elmondható, hogy kloridionok jelenlétében a hidrolízis nagyobb pH-n indul. A titrálási görbék adataiból az is számítható volt, hogy a $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ komplexekre szintén $1,5$ lúgekvivalensnyi KOH fogy. Ez igazolja, hogy az $[\text{M}_2\text{H}_3]^+$ részecske az uralkodó pH 8 felett a kloridmentes közegben.

Továbbá kloridmentes közegben is a mért adatokból kapott titrálási görbékhez jobban illeszthetők azok a számolt görbék (10. ábra), melyeknél a $[(\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*))_2(\mu\text{-OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, $[\text{M}_2\text{H}_2]$ részecske megjelenését is figyelembe vesszük.



10. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ titrálási görbéje (x) és az $[\text{M}_2\text{H}_2]$ részecskét figyelembe vevő (folyamatos szürke vonal), illetve az azt nem tartalmazó modell (szürke pontozott vonal) alapján számolt görbék ($c_M = 1,2 \text{ mM}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,20 \text{ M (KNO}_3)$)

A koncentrációeloszlási diagramok (11. ábra) számolása a pH-potenciometriásan meghatározott hidrolízis állandók (2. táblázat) segítségével történt. Emellett az ^1H NMR spektrumok alapján is számoltunk eloszlást. A nitrátos közegben felvett NMR-spektrumokon az egy- és kétmagvú komplexek jele jól elkülönült, így integrálásukkal a fémiont tartalmazó különböző részecskék móltörtjeit számolni lehetett, mely a pH-potenciometriás mérések adataival jó egyezést mutat. A stabilitási állandók, illetve a koncentrációeloszlási görbék alapján elmondhatjuk, hogy a kloridionokat tartalmazó rendszerrel az általunk mért kloridmentes rendszert összehasonlítva a kloridion jelenlétében a RhCp^* hidrolízise nagyobb pH-kon játszódik le. Megjegyezzük, hogy a hasonló elektronszerkezettel rendelkező $[\text{Ru}^{\text{II}}(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Z}_3]$ részecske hidrolízise esetében is hasonló folyamat figyelhető meg [37].



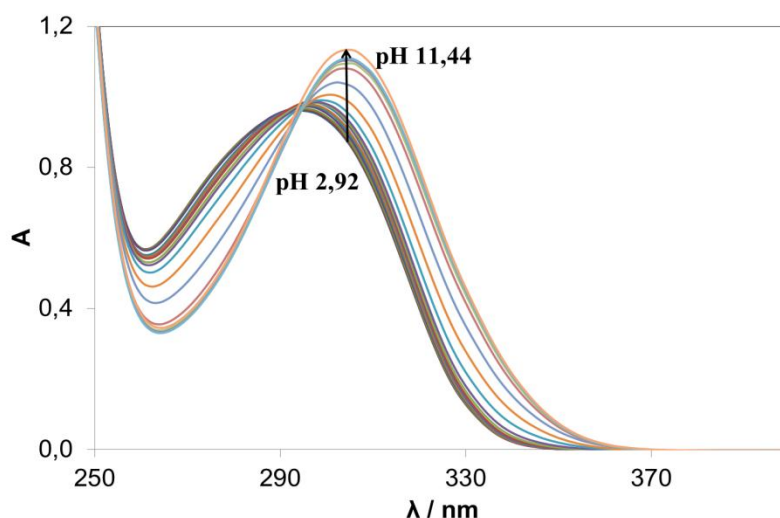
11. ábra: $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ koncentrációeloszlási diagramja (jelmagyarázat: folytonos vonalak: stabilitási szorzatok alapján számolt móltörtek; jelölők: ^1H NMR spektrumok csúcsainak integrálásával számolt részecskeeloszlás, $\times$: $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3]$, $\bullet$: $[\text{M}_2\text{H}_i]$, $i = 2, 3$) kloridmentes közegben ($c_M = 0,794 \text{ mM}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$)

2. táblázat: $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ hidrolízis állandói $0,2 \text{ M KCl}$ [34], valamint $0,2 \text{ M KNO}_3$ ionerősség mellett ($t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

	0,2 M KCl [34]	0,2 M KNO ₃
$\lg\beta(\text{M}_2\text{H}_2)$	-11,12	-8,53±0,07
$\lg\beta(\text{M}_2\text{H}_3)$	-19,01	-14,26±0,04

5.2. A ligandumok sav-bázis tulajdonságai és spektrális változásai

Mindkét vizsgált ligandum, a mal és a dhp egyaránt a (O,O) donor ligandum. A ligandumok proton disszociációs folyamatainak megismerésére pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás méréseket (12. ábra) végeztünk pH 2,0 – 11,5 tartományban. A ligandumok proton disszociációs állandói ugyan ismertek az irodalomban [33, 36], mégis szükséges volt a mi laboratóriumi körülményeink között is elvégezni ($0,2 \text{ M KNO}_3$) ezen méréseket, mivel a RhCp^* vegyülettel történő komplexképződés vizsgálatához mindenképpen szükségesek a körülményeinknek megfelelő pK_a -k.



12. ábra: *A mal pH-függő UV spektrumai* ($c_L = 0,053 \text{ mM}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$)

A mal kloridos közegben mért proton disszociációs állandójával ($\text{pK}_a = 8,44$) [38] jó egyezést mutat az általunk kloridmentes közegben meghatározott állandó: $8,45 \pm 0,01$.

A dhp proton disszociációs folyamatait is hasonlóan próbáltuk értelmezni. A méréseink alapján az irodalmi adatokkal [36] jó egyezést adó $\text{pK}_{a1} = 3,67 \pm 0,01$ és $\text{pK}_{a2} = 9,66 \pm 0,02$ értékeket kaptuk. A dhp proton disszociációs állandói közül pK_1 a piridinon-N hidrogénjének disszociációjához pK_2 pedig az OH-csoport deprotonálódásához köthető.

5.3. A komplexképződési folyamatok vizsgálata

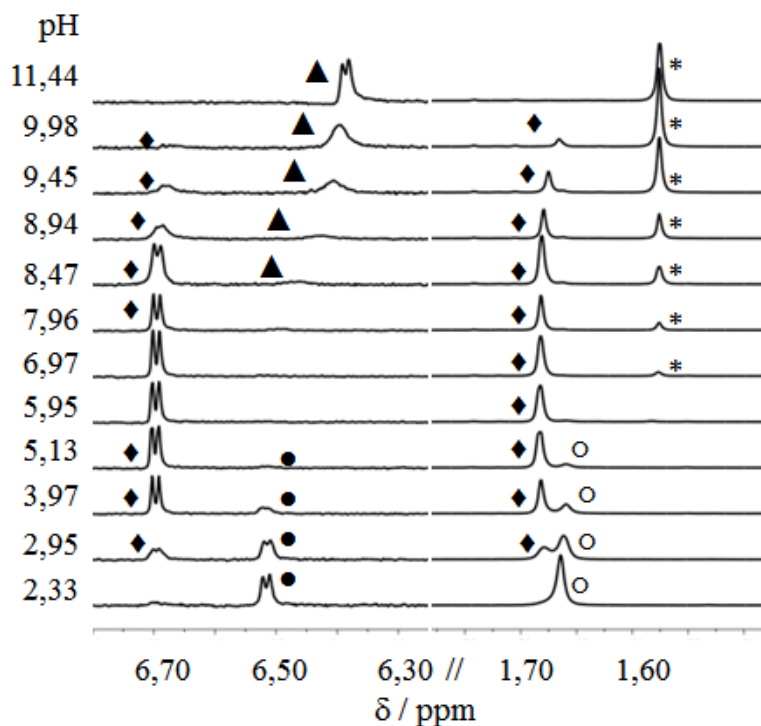
Az általunk vizsgált $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\text{H}_2\text{O})_3]$ komplexképződését (O,O) típusú donor ligandumokkal, a mal-lal és a dhp-val vizsgáltuk, kloridionoktól mentes közegben. A komplexképződés folyamatait pH-potenciometriásan, UV-látható spektrofotometriásan, illetve ^1H NMR módszerekkel követtük. A speciáció kétféle részecskével ($[\text{ML}]$, $[\text{MLH}_{-1}]$) jól leírható; mivel a ligandumok további disszociálabilis protont nem tartalmaznak, így az $[\text{MLH}_{-1}]$ vegyület tulajdonképpen vegyes hidroxido komplexnek ($[\text{ML}(\text{OH})]$) tekinthető. A speciáció igazolására ^1H NMR spektrumok felvételére került sor mindkét ligandummal való komplex képzése esetén.

5.3.1. $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -mal rendszer vizsgálata

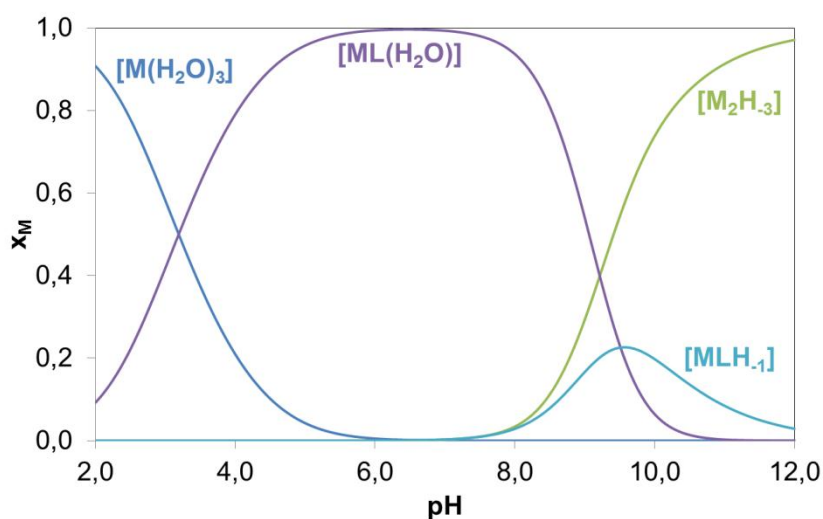
Kutatócsoportunkban részletesen vizsgálták a mal komplexképzését RhCp^* -vel kloridos közegben [34]. Ezt összehasonlítva a kloridmentes közegben vizsgált rendszerrel alapvető különbséget tapasztaltunk már a komplexképződés pH-tartományát illetően is. A kloridionok hiányában a komplexképződés jóval kisebb pH-n indul a mal-lal, feltehetően azért, mert a kloridionok kompetícióra kész részecskék. A komplexképződés az NMR időskálán lassú folyamat, az ^1H NMR spektrumban a ligandum, illetve a RhCp^* metilcsoportjai jeleinek változásából is követhető. Az aromás régióban (ligandumhoz tartozó jelek) megfigyelhetők az induló, savas pH-kon a szabad ligandum jelei, melyeknek intenzitása a pH növelésével csökken, majd pH ~ 3 -nál elindul a komplexképződés, amit jelez egyrészt a HL forma jelének csökkenése, másrészt új csúcs megjelenését és annak kisebb kémiai eltolódások felé való elmozdulását látjuk, mely az $[\text{ML}]$ komplex képződéséhez, majd annak deprotonálódásához köthető. A jel intenzitása pH 9 körül csökkenni kezd, majd a szabad, deprotonált ligandum (L^-) jele figyelhető meg a komplex disszociációjának következtében (13. ábra). A pH-potenciometriás mérésekkel meghatározott állandókat a 3. táblázatban tüntettük fel, és az ezek alapján számolt koncentrációeloszlási görbéket a 14. ábrán mutatjuk be.

3. táblázat: A $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -mal és -dhp rendszerekben képződő komplexek stabilitási szorzatai ($I = 0,2 \text{ M KNO}_3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

	$[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -mal	$[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -dhp
$\lg\beta(\text{ML})^+$	$8,45 \pm 0,01$	$10,90 \pm 0,01$
$\lg\beta(\text{MLH}_{-1})$	$-1,06 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,03$



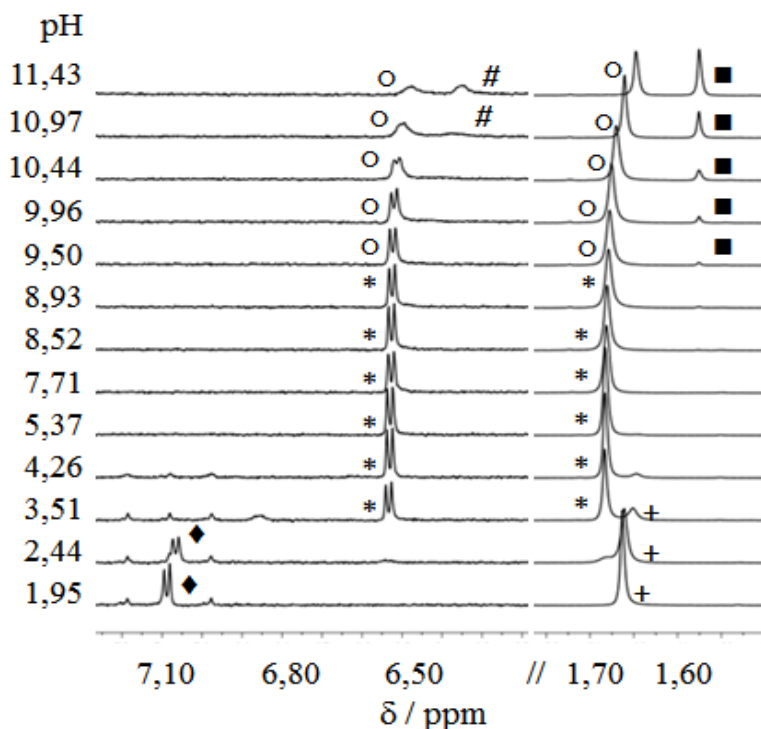
13. ábra: A $[RhCp^*(H_2O)_3]^{2+}$ -mal (1:1) rendszer pH-függő 1H NMR spektrumai aromás (jelmagyarázat: ●: [HL], ◆: [ML], [MLH₋₁], ▲: [L⁻]) és alifás régióban (jelmagyarázat: ○: [M(H₂O)₃], ◆: [ML], [MLH₋₁], *: [M₂H₋₃]) ($c_M = 1,012$ mM; $c_L = 1,10$ mM, $t = 25$ °C, $I = 0,2$ M (KNO₃), 10% D₂O)



14. ábra: $[RhCp^*(H_2O)_3]^{2+}$ -mal (1:1) rendszer koncentrációeloszlási diagramja ($c_M = 1,071$ mM, $c_L = 1,098$ mM; $t = 25$ °C, $I = 0,2$ M (KNO₃))

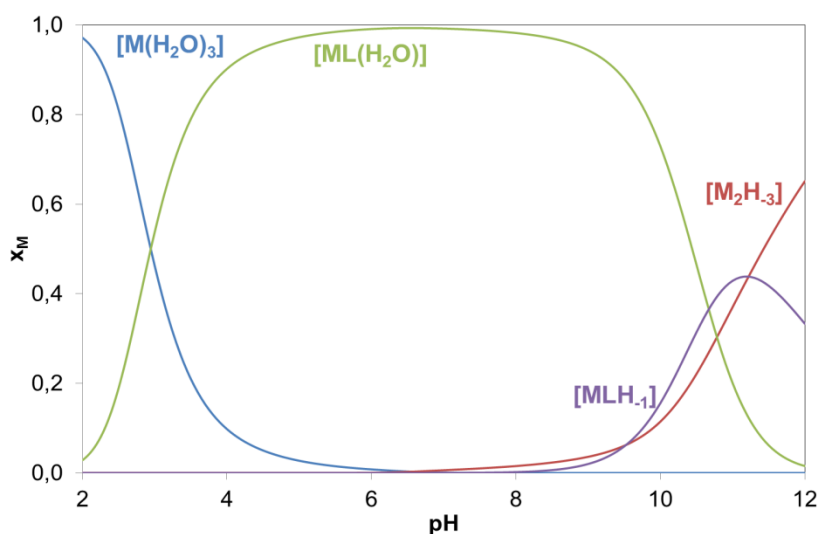
5.3.2. $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -dhp rendszer vizsgálata

A mal esetén látottakhoz hasonló folyamatokkal találkozunk a dhp-val alkotott komplexek esetén is. A pH-függő NMR spektrumok (15. ábra) azt mutatták, hogy a szabad ligandum jelintenzitásának csökkenésével párhuzamosan pH 3,5-nél megjelenik a képződő 1:1 összetételű komplexhez tartozó jelcsoport. A képződő [ML] komplexhez tartozó jel intenzitása pH 9,5 után kezd el csökkenni, majd a jel helye megváltozik feltehetően a komplex hidrolízise miatt. Másrészt pH 11,5 körül már a deprotonált szabad ligandum jelét is látjuk. A folyamatot a fémion jele változásainak oldaláról nézve azt látjuk, hogy a dhp-val képzett komplex stabilisabb, mint a mal-lal képzett, mert pH 3 körül a fémion jelentős része komplexben kötött, és kötve is marad pH 9-ig. A mal esetében az [ML] komplex csak pH 5-8 tartományban domináns. A pH-potenciometriás mérésekkel meghatározott állandókat az 3. táblázatban tüntettük fel és az ezek alapján számolt koncentrációeloszlási görbéket a 16. ábrán mutatjuk be.



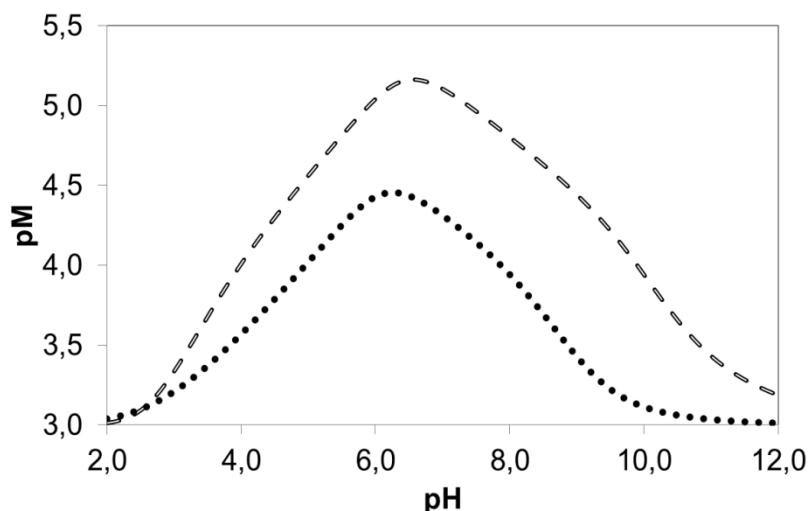
15. ábra: $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -dhp komplex pH-függő NMR spektrumai aromás

(jelmagyarázat: ◆: $[\text{H}_2\text{L}]^+$, *: $[\text{ML}]$, ○: $[\text{MLH}_{-1}]$, #: $[\text{L}]$) és alifás (jelmagyarázat: +: $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$, *: $[\text{ML}]^+$, ○: $[\text{MLH}_{-1}]$, ■: $[\text{M}_2\text{H}_{-3}]^+$) kémiai eltolódású területei ($c_M = 0,950$ mM; $c_L = 0,954$ mM, $t = 25$ °C, $I = 0,2$ M (KNO_3), 10% D_2O)



16. ábra: $[RhCp^*(H_2O)_3]^{2+}$ -dhp (1:1) rendszer koncentrációeloszlási diagramja ($c_M = c_L = 1,00 \text{ mM}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$)

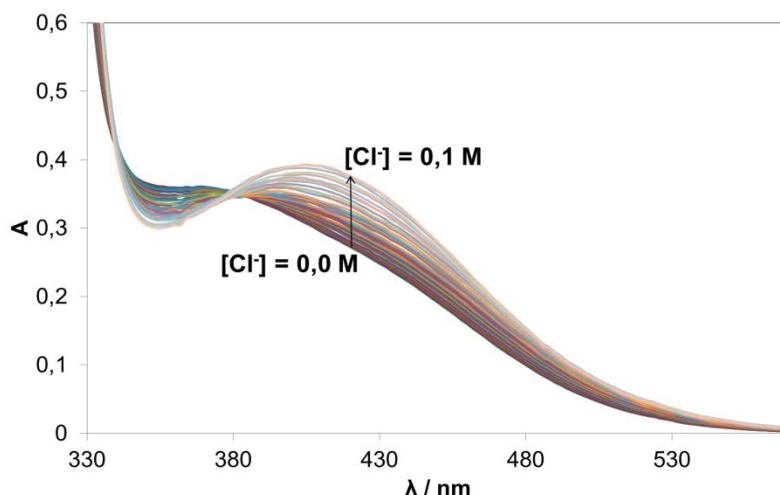
Annak érdekében, hogy a piron típusú mal-lal, illetve a piridinon típusú dhp-val képzett komplexek stabilitását egymással összevethessük, pM értékeket ($pM = -\log [M_{\text{összes}}]$, $[M_{\text{összes}}] = [[M(H_2O)_3]^{2+}] + [[M_2H_{-2}]^{2+}] + [[M_2H_{-3}]^+]$) számoltunk $c_M = c_L = 1 \text{ mM}$ koncentrációjú rendszerekre a korábban kapott stabilitási állandók alapján. (Tehát minél több fémion van [ML] vagy [ML(OH)] formában komplexben kötve, annál nagyobb a pM.) A számolt pM értékeket a pH függvényében a 17. ábrán mutatjuk be. Amint az ábrán is látszik, a dhp jelenlétében a komplexképződés savasabb pH-értéken indul el, illetve a komplex tovább marad stabilis a pH növelésével. Emellett látjuk, hogy a mal kevésbé, ám a dhp sokkal inkább képes a fémet a hidrolízistól megóvni. Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a két (O,O) donor ligandum közül a dhp-val képzett komplex a stabilisabb. A dhp-val nagyobb stabilitású komplexek képződését már sok más fémion esetén is leírták az irodalomban, mint pl. Zn^{2+} , VO^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} stb. [38, 49].



17. ábra: pM-értékek a pH függvényében a RhCp*-mal (pontozott vonal) és a RhCp*-dhp (szaggatott vonal) komplexek esetén ($c_M = c_L = 1 \text{ mM}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,2 \text{ M (KNO}_3\text{)}$)

A $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -dhp [ML] komplexében a fémion szabad koordinációs helyén lévő vízmolekula kloridionra cserélődhet, ha a rendszer tartalmaz kloridionokat. Ez a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ cserefolyamat az UV-látható spektrumban karakterisztikus változásokat okoz (18. ábra), így ezzel a vizsgálati módszerrel határoztuk meg a $\lg K' = 0,77 \pm 0,01$ értékű látszólagos állandót a $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)\text{L}(\text{H}_2\text{O})]^+ + \text{Cl}^- \rightleftharpoons [\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Cp}^*)(\text{L})\text{Cl}] + \text{H}_2\text{O}$ folyamatra, fiziológias pH-n. Összehasonlítva a mal esetén kapott $\lg K' = 1,17$ állandóval [34], elmondhatjuk, hogy míg a RhCp*-mal komplex esetében 61% a klorokomplex aránya, addig a dhp esetében ez csupán 38%, 0,1 M kloridkoncentráció mellett. (A vérérszékben a kloridion koncentrációja $\sim 0,1 \text{ M}$.)

A további vizsgálatokat, melyek a HSA-hoz mint transzportmolekulához való kötődés felderítését célozták meg, már csak a dhp-val képzett, mal-hoz képest stabilisabb komplexszel végeztük. Emellett a vizsgálatokba bevontuk a pic komplexet (4. ábra) is.

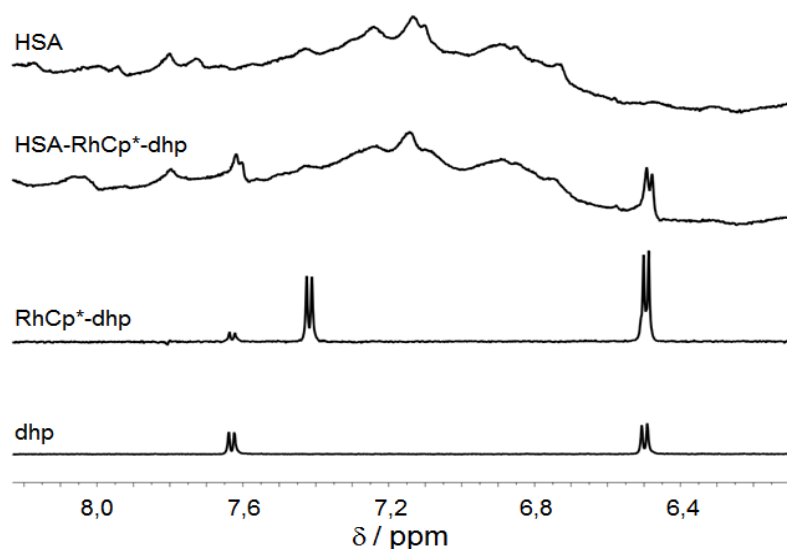


18. ábra: $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ -dhp komplex $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ cserefolyamatának UV-látható spektrumai ($c_M = 0,266 \text{ mM}$, $c_L = 0,250 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,40$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

5.4. A RhCp^* , valamint dhp-val, illetve pic-val alkotott komplexeinek kölcsönhatása humán szérum albuminnal

Tanszékünk korábbi, nem publikált eredményei [50] alapján a vizsgálatokba bevontuk a pic-t, mely mint (O,N) donor ligandum erősebben képes a fémion kötőhelyeihez koordinálódni fiziológiás pH-n, ezáltal képes lehet annak HSA-hoz való kötődését valamilyen mértékben gátolni. Így a további vizsgálatokat (O,O) és (O,N) típusú ligandumok komplexeivel folytattuk.

A RhCp^* fémorganikus vegyület, valamint a dhp-val és pic-val alkotott komplexeinek HSA-nal való kölcsönhatásáról ^1H NMR spektrumok felvételével, illetve spektrofotometriás módszerekkel gyűjtöttünk információkat. A méréseket PBS* pufferben végeztük. Kiindulópontként ^1H NMR spektrumokat vettünk fel RhCp^* -t vagy RhCp^* -dhp komplexet, illetve HSA-t tartalmazó mintáknál annak érdekében, hogy a spektrumok esetleges változásai alapján eldönthessük, kialakul-e egyáltalán kölcsönhatás a fenti vegyületek és a fehérje között (19. ábra).



19. ábra: A $RhCp^*-dhp$ komplex és a HSA kölcsönhatásának vizsgálatára felvett 1H NMR spektrumok aromás régiói ($c_{komplex} = 1\text{ mM}$, $c_{HSA} = 0,5\text{ mM}$, $pH = 7,40$ (PBS*), 10% D_2O)

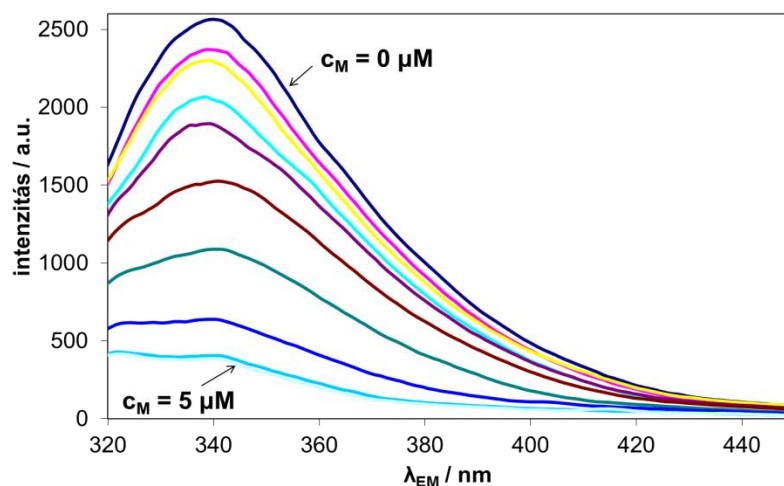
Mivel a mérés során önállóan a fémion (= $RhCp^*$), valamint a komplex jele egyaránt megváltozott a HSA jelenlétében, így megállapítottuk, hogy valóban történik kölcsönhatás a fémion, illetve a komplex, valamint a fehérje között. A fémion oldalára koncentrálna a jelek kiszélesedését, új jelcsoportok megjelenését figyelhettük meg. Emellett a $RhCp^*-dhp$ komplex esetében a spektrumon nem kötött dhp jelét ($\delta = 7,6\text{ ppm}$) is látjuk, melyből arra következtethetünk, hogy a fémion fehérjéhez való koordinációja során a ligandum disszociál, a fémion az így felszabaduló vegyértékeivel képes az albuminhoz kötődni.

5.4.1. Spektrofluorimetriás kioltásos és kizorításos vizsgálatok

A fehérjéhez történő kötődés több módon valósulhat meg. Gyakorlati tapasztalatok alapján elmondhatjuk, hogy amennyiben a molekula a fehérje valamelyik hidrofób zsebébe (pl. I. vagy II. kötőhely) „ül be” valamilyen másodlagos kölcsönhatással kapcsolódva a HSA-hoz, akkor a kötődés gyors egyensúlyi folyamat. Ha viszont a fehérjéhez való kötődés annak pl. His-N-jén vagy Cys-SH-csoportján keresztül valósul meg, úgy a koordinációhoz feltehetően több idő kell.

Spektrofluorimetriásan vizsgáltuk a fehérjén való lehetséges kötődést oly módon, hogy a HSA egyetlen Trp aminosavát (mely az I-es kötőhely közelében található) $\lambda = 295\text{ nm}$ hullámhosszon gerjesztettük. Ha egy molekula az I-es kötőhelyre bekötődik, akkor az

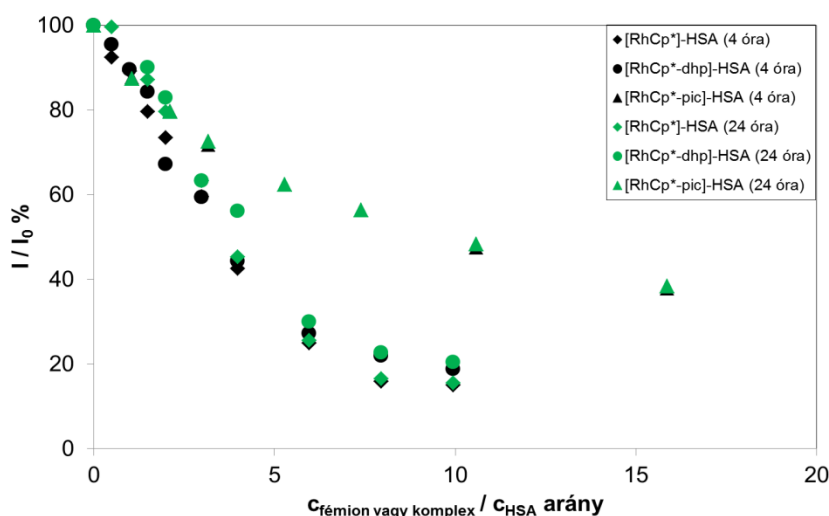
emittált fény intenzitása lecsökken, kioltás (angolul *quenching*) figyelhető meg. A kioltásos vizsgálatok során a mintákban a fémion vagy komplex/fehérje koncentrációjának arányát általában 0 – 15 között változtattuk.



20. ábra: A RhCp* és a HSA kölcsönhatásának vizsgálata spektrofluorimetria segítségével
($c_{\text{RhCp}^*} = 0 - 5 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7,40$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

A 20. ábrán látható, hogy a HSA kezdeti viszonylag magas fluoreszcens intenzitása a hozzáadott RhCp* mennyiségének növekedésével csökkenést mutat, a kötődő fémion kioltja a fehérje intenzitását. Ez alapján tehát megállapítottuk, hogy valóban történik kölcsönhatás közöttük. (Bár meg kell jegyeznünk, hogy ezzel a mérési technikával nem tudjuk a dinamikus és a statikus kioltást megkülönböztetni. Mivel feltehetően itt valóban létrejön egy adduktum (ld. ^1H NMR vizsgálatok), így valószínűleg statikus kioltást mérünk.)

Emellett ahhoz, hogy megvizsgálhassuk, a RhCp*, valamint a RhCp*-dhp/RhCp*-pic komplexek és a HSA közötti egyensúly kialakulásához mennyi idő szükséges, ezáltal pedig pontosabb képet kapjunk a fémion/komplex–HSA kölcsönhatás jellegéről, részletesen vizsgáltuk a rendszerek időbeli változásait: a mintasorozatból egy minta esetében időfüggő fluoreszcencia spektrumokat is felvettünk. Megállapítottuk, hogy az egyensúly gyorsan beáll, ehhez kb. 10-15 perc elegendő. A többi mintát illetően a spektrumokat 4 óra inkubációs idő után vettük fel, mivel – ahogyan a 21. ábrán is látszik – nem tapasztaltunk jelentős különbséget a 4, illetve 24 óra inkubálás után felvett spektrumok között, a folyamat gyorsnak mondható.



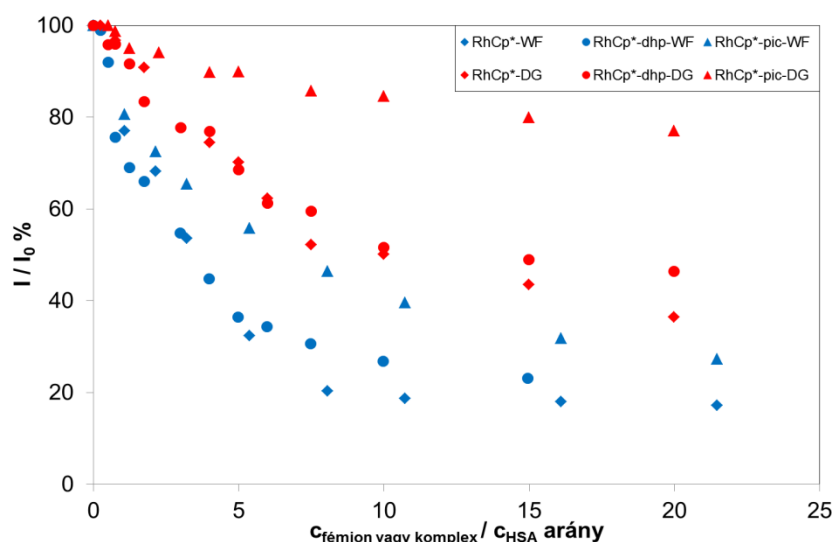
21. ábra: $RhCp^*$ -HSA, $[RhCp^*-dhp]$ -HSA és $[RhCp^*-pic]$ -HSA fluoreszcens intenzitásai az emissziós hullámhossz maximumon 4 óra és 24 óra inkubációs idő után ($\lambda_{EX} = 295$ nm, $\lambda_{EM} = 340$ nm, pH = 7,40, $t = 25$ °C)

A 21. ábra alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy mind önállóan a $RhCp^*$, és mind a dhp-vel alkotott komplexe esetén van mérhető kölcsönhatás a fehérjével. A spektrumok emissziós maximumain mért intenzitások az ábrán együtt futnak, ami arra utalhat – a 1H NMR spektrumok eredményét megerősítve ezzel –, hogy a $RhCp^*-dhp$ komplex a HSA-hoz való kötődése során szinte teljes mértékben megválízik a hozzá kötődő ligandumtól, és önállóan lép kapcsolatba a fehérjével. A ligandumot tehát a fehérje képes lehet leszorítani a fémről. A Trp jelének intenzitáscsökkenése a kölcsönhatás következtében mindenképp arra utal, hogy a fémion a Trp közelében kötődik a fehérjéhez ez pl. a fehérje His-N-jein keresztüli koordináció útján elképzelhető. Ezzel szemben a $RhCp^*-pic$ komplex HSA-on való kötődésének megismerésére irányuló vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az intenzitáscsökkenés a kioltásos vizsgálatok során kisebb mértékű (22. ábra), mint önállóan a $RhCp^*$, vagy a $RhCp^*-dhp$ komplex esetében. Ez alapján azt valószínűsíthetjük, hogy a pic képes gátolni a $RhCp^*$ fehérjén való megkötődését. (Emellett maga a ligandum önállóan is képes megkötődni a HSA-on [51], ami szintén a jelintenzitás csökkenésével jár.) A közvetlen kölcsönhatás vizsgálatok spektrális változásai alapján számolt kötési állandókat a 4. táblázatban tüntettük fel.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, történik-e kölcsönhatás a fémion/komplex, valamint a fehérje között a két fő hidrofób kötőhelyen, az I-es kötőhely markereként a WF-

t, a II-es kötőhely markereként pedig a DG-t vontunk be a vizsgálatokba. Tanulmányoztuk önmagában a HSA és a kötőhely markerek kölcsönhatását, a meghatározott kötési állandók az irodalmi adatokkal jó egyezést mutattak [42].

A marker önmagában kis intenzitását a fehérjéhez való kötődés jelentősen megnöveli, azonban amint a fémion, vagy valamelyik komplexe az adott helyre bekötődik, ez az intenzitás lecsökken. A RhCp*, illetve a komplexei vizsgálata során is intenzitáscsökkenést tapasztaltunk.



22. ábra: A RhCp*, illetve dhp-val és pic-val alkotott komplexeinek WF kizorítása az I-es, illetve DG kizorítása a II-es kötőhelyről ($\text{pH} = 7,40$, $t = 25^\circ\text{C}$, inkubálás: 4 h)

Az I-es kötőhelyről történő WF kizorítás vizsgálata során (22. ábra) a várakozásnak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a fémion és komplexei egyaránt képesek kizorítani a markermolekulát a hidrofób zsebből. A RhCp*-dhp komplex esetén rögzített intenzitásmaximumok értéke együtt fut az önállóan is vizsgált RhCp* megfelelő értékeivel. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a ligandum disszociál a fémről, így az felszabaduló vegyértékeivel képes a fehérjéhez való kötődésre. Tehát a dhp az I-es kötőhelyre való bekötődést nem képes visszaszorítani, ezért úgy véljük, hogy a dhp lényegében nem befolyásolja azon a kötőhelyen a kölcsönhatás kialakulását. A RhCp*-pic komplex azonban valamivel kisebb mértékű kizorítást látunk ezen a kötőhelyen, úgy gondoljuk, hogy a fémhez valamivel erősebben kötődő (O,N) donor pic nem távozik olyan könnyedén, kevésbé adva ezzel lehetőséget a fémnek a fehérjéhez való koordinációra.

A II-es kötőhelyen is hasonló eredményeket vártunk (22. ábra). A RhCp* önállóan hasonló mértékben koordinálódik a fehérjéhez, mint dhp-komplexe. A pic-komplex esetében itt is jóval kisebb mértékű az intenzitás csökkenése, mint önállóan a fémion, illetve a dhp-komplex esetében. A DG esetében egy RhCp*-dhp:HSA:DG = 5:1:1 arányú minta időbeli változásait is követtük spektrofotometriásan. Azt tapasztaltuk, hogy a mért intenzitás nagyon rövid idő alatt (kb. 20 – 30 perc) lecsökken, majd változatlan marad. Ebből arra következtetünk, hogy a RhCp*-dhp komplex a DG-t gyorsan leszorítja a fehérjéről.

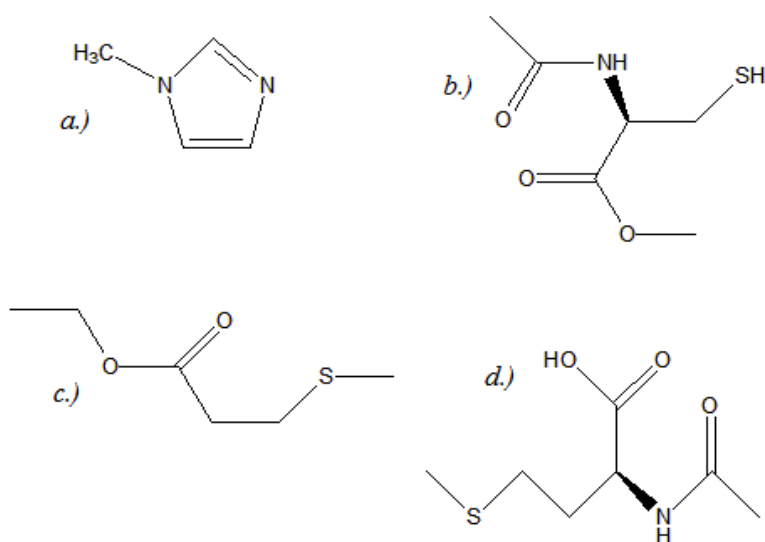
A kioltásos és a kötőhely markeres vizsgálatok eredményeképpen a PSEQUAD programmal számolt kötési, illetve kiszorítási állandókat a 4. táblázatban foglaltuk össze. A számolt állandók értéke a RhCp* és a RhCp*-dhp esetében hasonló, a RhCp*-pic komplex esetében alatta marad az előzőeknek. Ez azt bizonyíthatja, hogy a fémion a fehérjével való kölcsönhatás közben megvált az addig hozzá koordinálódott dhp molekulától, és önmagában lép kölcsönhatásba az albuminnal. A RhCp*-pic komplex esetében számolt kisebb értékű látszólagos kötési/kiszorítási állandók azzal magyarázhatóak, hogy a pic-val mint (O,N) donor molekulával erősebb a fém kölcsönhatása, így a fémkomplex kisebb mértékben disszociál az albuminnal való kölcsönhatás során. A közvetlen kölcsönhatás látszólagos állandóinak értéke közel megegyezik az I-es kötőhelyre való koordináció folyamatára vonatkozó állandóival, ezek valamivel nagyobbak, mint a II-es kötőhely esetében számolt értékek.

4. táblázat: A kioltásos (Q), illetve a kiszorításos vizsgálatok alapján számolt kötési állandók

<i>lgK'</i>	RhCp*	RhCp*-dhp	RhCp*-pic
Q	5,9±0,1	5,9±0,1	5,1±0,1
WF	6,1±0,1	6,2±0,1	5,6±0,1
DG	5,8±0,1	5,8±0,1	4,7±0,1

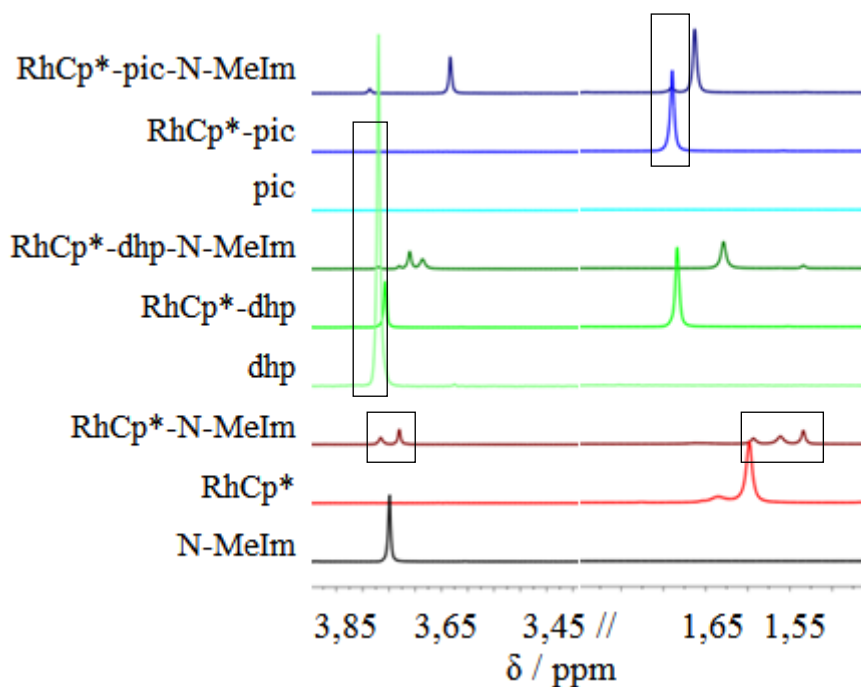
5.4.2. Kölcsönhatás aminosav oldallánc modell vegyületekkel

Az előzőekben vizsgált I-es és II-es kötőhelyeken a kölcsönhatás másodlagos kötésekön keresztül történhet meg. Ám a HSA számos olyan aminosavval rendelkezik, melyek oldalláncai potenciális kötőhelyek lehetnek a RhCp*, illetve komplexei számára, ahol is felmerül a koordinatív kötés lehetősége valamely oldallánc kén- vagy nitrogénatomján keresztül. E lehetséges kötődés felderítésére ún. kötőhely modelleket használtunk fel a kölcsönhatás felderítése során. A vegyületek (N-MeIm, Cys*, MS, AM) szerkezetét a 23. ábrán szemléltetjük. Ezen oldatokhoz a fémiont (RhCp*), illetve mindkét vizsgált komplexét adagolva ^1H NMR spektrumokat vettünk fel. Azt tapasztaltuk, hogy a 10 perc, valamint a 24 óra inkubációs idő után felvett spektrumok között nincs mérhető különbség, tehát a komplexek kialakulása (amennyiben van kölcsönhatás) igen gyors.



23. ábra: Az általunk használt modellvegyületek szerkezeti képlete: a.) N-MeIm, b.) Cys*, c.) MS, d.) AM

Az N-MeIm esetében a RhCp* metil-protonok jeleinek változásából arra következtetünk, hogy ezek a metilcsoportok legalább háromféle különböző kémiai környezetben lehetnek a rendszerben (24. ábra). Ez a folyamat a modellvegyület metilcsoportjának jelváltozására koncentrálva is látható, ennek a spektrumrészletnek az alapján legalább kétféle kémiai környezetben lehetnek a ligandum metil-protonok, de a rendszer teljesebb megismeréséhez még további vizsgálatok szükségesek.



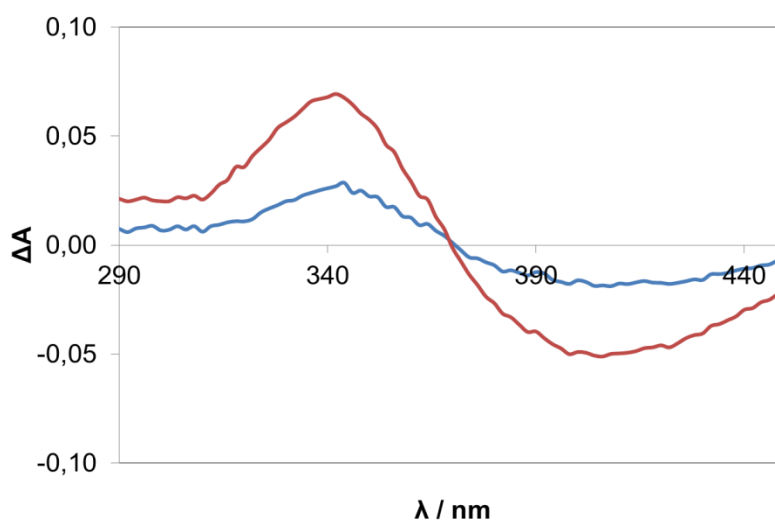
24. ábra: Az N-MeIm–RhCp* / N-MeIm–RhCp*-dhp / N-MeIm–RhCp*-pic 1:1 rendszerek kölcsönhatásának ^1H NMR spektroszkópiás vizsgálata ($c_{\text{RhCp}^*} = c_{\text{komplex}} = c_{\text{N-MeIm}} = 0,75$ mM, $t = 25$ °C, $\text{pH} = 7,40$, 10% D_2O)

Az N-MeIm és a RhCp*-dhp komplex kölcsönhatásának vizsgálata során a ^1H NMR spektrumok alapján látható, hogy kialakul RhCp*-N-MeIm komplex a rendszerben. Erre utal, hogy i) a RhCp*-N-MeIm rendszerben látott kémiai eltolódások itt is megjelennek, illetve ii) szabad dhp jelét látjuk a spektrumban. Mindenképpen meg kell említenünk, hogy a legnagyobb intenzitású jel sem a RhCp*-dhp komplexhez, sem a RhCp*-N-MeIm komplexhez nem rendelhető csúcs a spektrumon, mely alapján úgy gondoljuk, hogy vegyes ligandumú komplex alakul ki a rendszerben. A modellvegyület nem fordul elő szabadon a rendszerben, csak RhCp*-N-MeIm törzskomplekként, vagy vegyes komplekként, tehát mindenképpen komplexben kötve van jelen. A RhCp*-dhp komplex jelét nem detektáltuk a rendszerben, a fémiont vagy az N-MeIm köti komplexben, vagy pedig az általunk feltételezett vegyes komplexben fordul elő. Ez a komplex elképzelhető úgy, hogy a RhCp* vegyülethez két O-atomon keresztül a dhp, míg egy N-atomon keresztül az N-MeIm koordinálódik. Az egyensúly beállta ebben a rendszerben is gyors.

A RhCp*-pic és az N-MeIm egyensúlya ettől eltérő képet mutat. A spektrumok alapján elmondhatjuk, hogy a rendszerben kialakul a vegyes ligandumú RhCp*-pic-N-MeIm komplex, ám emellett marad valamennyi RhCp*-pic törzskomplex is. RhCp*-N-

MeIm komplex ebben a rendszerben nem alakul ki, vélhetően azért, mert az N-MeIm nem képes disszociációra kényszeríteni a pic-at (szabad pic-hoz vagy RhCp*-modell vegyülethez tartozó jelet nem láttunk a spektrumban). A spektrumokban a megfelelő komplexek jelének integrálásával igyekeztünk megadni, hogy milyen arányban van jelen a rendszerben a törzskomplex (M-A), a modellel képzett komplex (M-B), illetve a vegyes komplex (M-A-B), a százalékos arányokat az 5. táblázatban foglaltuk össze.

A kölcsönhatás további vizsgálata UV- látható spektrofotometria segítségével történt. A mérés során a komplex – modell rendszer mellett a komplex, valamint a modell spektrumait is felvettük önállóan. Az együttes spektrumból a külön-külön megmért, majd összegzett spektrumokat kivonva különbségspektrumokat számoltunk, melyek megerősítik, hogy történik kölcsönhatás a modell és a komplexek között, ez már a minta összeállítását követően néhány perc alatt detektálható, 24 óra múltán pedig még határozottabban látható. Példaként a RhCp*-pic-N-MeIm rendszer különbségspektrumait a 25. ábrán mutatjuk be.



25. ábra: RhCp*-pic és N-MeIm kölcsönhatásának vizsgálata UV-látható különbségspektrumok segítségével (kék: 5 perc után, piros: 24 óra után felvett spektrumokból számolt különbségek) ($C_{\text{RhCp}^*} = C_{\text{komplex}} = C_{\text{N-MeIm}} = 0,10 \text{ mM}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,40$)

A Cys* és a RhCp* kölcsönhatásának vizsgálatára felvett ^1H NMR spektrumaink alapján azt mondhatjuk, hogy az N-MeIm modellel ellentétben az egyensúly beállta lassabb folyamat, mely a fémion és a ligandum oldaláról egyaránt követhető. A

kölcsönhatás kismértékű, a Cys* jelének intenzitása az idő előrehaladtával csökken. Azonban nem zárhatjuk ki a Cys* oxidációjának lehetőségét. Az RhCp*-dhp komplexszel kapcsolatban szintén azt a megállapítást tehetjük, hogy a kölcsönhatás igen kismértékű, nagyon lassú (> 1 nap) folyamat. A dhp jelenlétében vegyes komplex nem detektálható, a fő jel a RhCp*-dhp komplex jele marad. A RhCp*-pic komplex esetében a korábbiakhoz hasonló megállapításokat tehetünk: a komplex és a modellvegyület között kölcsönhatás valószínűleg nem alakul ki, a komplex nem disszociál, szabad ligandum vagy turner komplex megjelenését nem láttuk a spektrumokon. Mivel a Cys* oxidációja nem volt kizárható, így a további UV-látható spektrofotometriás méréseket oxigénmentes körülmények között végeztük, a mintákon argon gázt buborékolattunk át. Itt szintén csak kismértékű, inkább a ligandumsávokat érintő változást tapasztaltunk a Cys* jelenlétében, aminek oka (a gondos argonozás ellenére) lehet, hogy a Cys* egy része oxidálódott a kísérletek során. Ezen mérések alapján azt mondhatjuk, hogy az N-MeIm által modellezett His-N erősebb kötőhelynek tűnik.

5. táblázat: A RhCp*-A-B rendszerekben képződő részecskék százalékos aránya (jelölések: M-A: törzskomplex, M-B: modellel képzett komplex, M-A-B: vegyes komplex)

	M-A	M-B	M-A-B
RhCp*-dhp-N-MeIm	0	9	91
RhCp*-pic-N-MeIm	8	6	85
RhCp*-dhp-AM	9	9	82
RhCp*-pic-AM	18	18	64
RhCp*-dhp-MS	0	0	100
RhCp*-pic-MS	75	0	25

A fehérjén való egyfogú koordináció lehetőségét további két tioéter modellvegyülettel (MS, AM, 23. ábra) is vizsgáltuk ¹H NMR spektroszkópia segítségével. Megállapítottuk, hogy a komplexek és a modellek közötti kölcsönhatás gyorsan lejátszódik, a minta összeállítása után 15 perccel és 24 órával felvett spektrumok között nem láttunk különbséget, a komplexképzés minden esetben gyors. A jelek változása alapján úgy véljük, hogy mindkét modellel képződnek vegyes komplexek a folyamat során. A ¹H NMR spektrumok megfelelő jeleinek integrálásával próbáltuk meghatározni a törzskomplexek,

valamint a vegyes komplex arányát a rendszerben, a kapott százalékos arányokat az 5. táblázatban foglaltuk össze.

Összefoglalva a modellvegyületekkel való kölcsönhatást felderítő méréseinket, RhCp*-dhp, illetve –pic komplexek esetén elmondhatjuk, hogy a His-N-t modellező N-MeIm mellett a kéntartalmú oldalláncok modelljeiként alkalmazott tioéterekkel is kölcsönhatnak a törzskomplexek, mindegyik rendszerben legnagyobb arányban vegyes komplexet képezve a jelen lévő modellvegyülettel.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a $[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ fémorganikus vegyület piron (mal), valamint piridinon (dhp) típusú ligandumokkal való komplexképződését vizsgáltuk oldategyensúlyi módszerekkel (pH-potenciometrián, UV-látható spektrofotometria segítségével, ^1H NMR spektroszkópiával) kloridmentes közegben. A célkitűzésünket teljesítve meghatároztuk a ligandumok proton disszociációs- és a RhCp^* hidrolízisállandóit (melyre kloridmentes közegben eddig nem volt irodalmi adat). Emellett új eredményként megállapítottuk, hogy kloridmentes közegben a RhCp^* -mal és a RhCp^* -dhp rendszerben egyaránt mono-ligandum komplexek képződnek, melyek stabilitási szorzatát meghatároztuk. Kloridiont tartalmazó rendszerek irodalmával összehasonlítva méréseinket, arra a következtetésre jutottunk, hogy a kloridion mint kompetitív részecske, képes a komplexképződést nagyobb pH-tartományba eltolni.

A $[\text{Rh}^{\text{III}}\text{Cp}^*\text{Z}_3]$ ($\text{Z} = \text{H}_2\text{O} / \text{Cl}^-$) vegyületnek, valamint piridinon (dhp) és piridinkarbonsav (pic) típusú molekulákkal képzett komplexeinek humán szérum albuminnal való kölcsönhatását vizsgáltuk, mely folyamatokat spektrofluorimetrián és ^1H NMR mérésekkel követtünk.

A humán szérum albuminnal való kölcsönhatás felderítését célzó méréseink alapján megállapítottuk, hogy a fémion önmagában is képes kötődni a fehérjéhez, valamint komplexeire is hasonló folyamatok jellemzők, bár a RhCp^* -pic komplex esetében meg kell jegyeznünk, hogy az (O,N) donor ligandum képes valamilyen mértékben gátolni ennek a kötődésnek a kialakulását. Kötőhely markerek bevonásával zajló kizorításos vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy a fehérje két hidrofób zsebe potenciális kötőhely lehet a fémion számára. Emellett modellvegyületek felhasználásával történt méréseink alapján valószínűsíthetjük, hogy a fehérje aminosav oldalláncainak His-N-jeihez is képes koordinálódni a RhCp^* , vagy valamelyik komplexe. A további, tioéter modellekkel folytatott vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy az itt is gyors kölcsönhatás során mindkét modellel vegyes komplexek képződnek, így céljainknak megfelelően a fémion, valamint a komplexek fehérjén való kötődésének egyik legvalószínűbb helyére is sikerült javaslatot tennünk.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna; Farmakológia, Farmakológia és farmakoterápia I., Medicina Könyvkiadó Zrt.: Budapest, **2007**
- [2] F. Muggia; Gynecologic Oncology 112, **2009**, 275-281.
- [3] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger B.K. Keppler; Dalton Trans. **2008**, 183–194
- [4] M.J. Clarke; Coord. Chem. Rev. 232, **2002**, 69-93.
- [5] Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P.J. Sadler; Chem. Commun. **2005**, 4764-4776.
- [6] A. Levina, A. Mitra, P.A. Lay; Metallomics 1, **2009**, 458-470.
- [7] G. Süss-Fink; Dalton Trans. 39, **2010**, 1673-1688.
- [8] J. Reedijk; Platinum Met. Rev. 52, **2008**, 2-11.
- [9] F. Muggia; Gynecologic Oncology 112, **2009**, 275-281.
- [10] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler; J. Inorg. Biochem. 100, **2006**, 891-904
- [11] G.S. Smith, B. Therrien; Dalton Trans. 40, **2011**, 10793-10800.
- [12] L.R. Bernstein; Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine (Eds: Gielen and Tiekink), **2005**, John Wiley&Sons Ltd., 259-277.
- [13] I. Haiduc, C. Silvestru; „Cobalt, Rhodium and Iridium” in Organometallics in Cancer Chemotherapy, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1990**, pp.169-207.
- [14] N.Katsaros, A. Anagnostopoulou; Crit. Rev. Oncol. 42, **2002**, 297-308.
- [15] A. Taylor, N. Carmichael; Cancer Studies 2, 1953, 36; Chem. Abstr. 48, **1954**, 3565.
- [16] R.G. Hughes, J.L. Bear, A.P. Kimball; Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 13, **1972**, 120.
- [17] L. Helm, A.E. Merbach; Coord. Chem. Rev.187, **1999**, 151-181.
- [18] G. Mestroni, E. Alessio, A. Sessanti o Santi, S. Geremia, A. Bergamo, G. Sava, A. Boccarelli, A. Schettino, M. Coluccia; Inorg. Chim. Acta 273, **1998**, 62-71.
- [19] Y. Geldmacher, M. Oleszak, W.S. Sheldrick; Inorg. Chim. Acta 393, **2012**, 84-102.
- [20] H.K. Liu, P.J. Sadler; Acc. Chem. Res. 44, **2011**, 349-359.
- [21] S. Schäfer, W.S. Sheldrick; J. Organomet. Chem. 692, **2007**, 1300-1309.

- [22] M.A. Scharwitz, I. Ott, Y. Geldmacher, R. Gust, W.S. Scheldrick; *J. Organomet. Chem.* 693, **2008**, 2299-2309.
- [23] M. Gras, B. Therrien, G. Süss-Fink, A. Casini, F. Edafe, P.J. Dyson; *J. Organomet. Chem.* 695, **2010**, 1653-1659.
- [24] S. Wirth, C.J. Rohbogner, M. Cieslack, J. Kazmierczak-Baranska, S. Donevski, B. Nawrot, I.P. Lorenz; *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, **2010**, 429-440.
- [25] U. Sliwinska, F.P. Pruchnik, S. Ulaszewski, M. Latocha, D. Nawrocka-Musial; *Polyhedron* 29, **2010**, 1653-1659.
- [26] K.E. Erkkila, D.T. Odom, J.K. Barton; *Chem. Rev.* 99, **1999**, 2777-2795.
- [27] M.J. Cleare, P.C. Hydes; *Met. Ions Biol. Syst.* 11, **1980**, 1-62.
- [28] M.J. Cleare; *Coord. Chem. Rev.* 12, **1974**, 349-405.
- [29] D.A. Medvetz, K.D. Satkleff, T. Schreiber, P.D. Custer, K. Hindi, M.D. Panzner, D.D. Blanco, M.J. Taschner, C.A. Tessier, W.J. Youngs; *J. Med. Chem.* 50, **2007**, 1703-1706.
- [30] L. Dadci, H. Elias, U. Frey, A. Hörnig, U. Koelle, A.F. Merbach, H. Paulus, J.S. Schneider; *Inorg. Chem.* 34, **1995**, 306-315.
- [31] W.H. Ang, A. Casini, G. Sava, P.J. Dyson; *J. Organomet. Chem.* 696, **2011**, 989-998.
- [32] A.M. Pizarro, M. Melchart, A. Habtemariam, L. Salassa, F.P.A. Fabbiani, S. Parsons, P.J. Sadler; *Inorg. Chem.* 49, **2010**, 3310-3319.
- [33] W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S.M. Meiner, H. Henke, B.K. Keppler, C.G. Hartinger; *J. Organomet. Chem.* 696, **2012**, 999-1010.
- [34] O. Dömötör, S. Aicher, M. Schmidlehner, M.S. Novak, A. Roller, M.A. Jakupc, W. Kandioller, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, É.A. Enyedy; *J. Inorg. Biochem.* 134, **2014**, 57-65.
- [35] M.S. Eisen, A. Haskel, H. Chen, M.M. Olmstead, D.P. Smith, M.F. Maestre, R.H. Fish; *Organometallics* 14, **1995**, 2806-2812.
- [36] É.A. Enyedy, L. Horváth, K. Gajda-Schranz, G. Galbács, T. Kiss, *J. Inorg. Biochem.* 100, **2006**, 1936-1945.
- [37] L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó; *Dalton Trans.* 41, **2012**, 285-291.
- [38] T. Kiss, T. Jakusch, D. Hollender, É. A. Enyedy, L. Horváth; *J. Inorg. Biochem.* 103, **2009**, 527-535
- [39] I. Ivanovic, S. Grguric-Sipka, N. Gligorijevic, S. Radulovic, A. Roller, Z.L. Tesic, B.K. Keppler; *J. Serb. Chem Soc.* 76, **2011**, 53-61.

- [40] É.A. Enyedy, O. Dömötör, C.M. Hackl, M. Novak, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, W. Kandioller, J. Coord. Chem. (beküldött kézirat).
- [41] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi; Mol. Aspects Med. 33, **2012**, 209-290.
- [42] O. Dömötör, C.G. Hartinger, A.K. Bytze, T. Kiss, B.K. Keppler, É.A. Enyedy; J. Biol. Inorg. Chem. 18, **2013**, 9-17.
- [43] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca; Talanta 43, **1996**, 1739-1753.
- [44] G. Gran; Acta Chem. Scand. 4, **1950**, 559–577.
- [45] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Petit; Anal. Chim. Acta 38, **1967**, 475-482.
- [46] L. Zékány, I. Nagypál, in: Computational Methods for the Determination of Stability Constants (Ed.: D. L. Leggett); Plenum Press, New York, **1985**, 291-353.
- [47] Ignasi Puigdomenech, Medusa (Making equilibrium diagrams using sophisticated algorithms); Royal Institute of Technology, Stockholm, **2009**
- [48] A. Nutton, P.M. Baily, P.M. Mairtis; J. Chem. Soc. Dalton Trans. **1981**, 1997-2002.
- [49] P. Buglyó, E. Farkas; Dalton Trans. 39, **2009**, 8063-8070.
- [50] O. Dömötör, É.A. Enyedy; még nem közölt eredmények.
- [51] É.A. Enyedy, L. Horváth, A. Hetényi, T. Tuccinardi, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss; Bioorg. Med. Chem. 19(14), **2011**, 4202-4210.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőimnek: **Dr. Enyedy Éva Anna** egyetemi adjunktusnak és **dr. pharm. Dömötör Orsolya** tudományos segédmunkatársnak segítőkész szakmai irányításukért, türelmükért és a munkám során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldásában nyújtott segítségükért, melyek nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm **Dr. Galbács Gábor** tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy lehetővé tette dolgozatom elkészítését a Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén.

Köszönetet szeretnék mondani a **Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport** vezetőjének, **Prof. Dr. Kiss Tamás** egyetemi tanárnak, a csoport tagjainak, hallgatóinak és volt hallgatóinak hasznos tanácsaikért, melyekkel segítették munkámat.

Köszönet illeti **Szűcsné Tóth Katalin** technikust a labormunkám során nyújtott gyakorlati tanácsaiért.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

