

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



TDK dolgozat

**A RhCp^* (N,N) kétfogú ligandumokkal képzett komplexeinek
oldategyensúlyi vizsgálata**

Mészáros János Péter

III. Kémia BSc

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Enyedy Éva Anna

egyetemi adjunktus

dr. pharm. Dömötör Orsolya

tudományos segédmunkatárs

Szeged

2014.

Lezárás: 2014.11.13.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi háttér	6
2.1 A fémorganikus vegyületek.....	6
2.2 Rákellenes platinafém komplexek.....	6
2.3 Fémorganikus komplexek, mint potenciális gyógyszerek.....	7
2.4 A $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$, mint katalizátor és hidrid-transzfer	10
2.4.1 Koenzim-redukció kémiai módszerrel.....	10
2.4.2 Koenzim-redukció elektrokémiai módszerrel.....	11
2.4.3 Egyéb katalitikus felhasználások.....	12
2.4.4 Felhasználási problémák	12
3. Célkitűzés.....	14
4. Kísérleti rész.....	15
4.1 A felhasznált vegyszerek	15
4.2 A mérési módszerek	15
4.2.1 pH-potenciometria.....	15
4.2.2 Az ultraibolya-látható (UV-látható) spektroszkópia	17
4.2.3 A ^1H NMR-spektroszkópia	18
4.2.4 A spektrofлуorimetria.....	19
4.2.5 Az ESI-MS.....	20
4.2.6 Az ultraszűrés	21
5. Eredmények.....	22
5.1 A $\text{RhCp}^*\text{-bpy}$ rendszer	22
5.2 A $\text{RhCp}^*\text{-en}$ rendszerben képződő komplexek jellemzése	30

5.3	A RhCp* bpy és en ligandumokkal képzett komplexeinek összehasonlítása a stabilitás szempontjából és összevetése más típusú ligandumokkal	36
5.4	A két általunk vizsgált komplex kötődése humán szérum albuminhoz.....	37
5.4.1	A HSA-hoz való kötődés globális vizsgálata.....	37
5.4.2	A HSA-hoz való kötődés kötőhely-specifikus vizsgálata.....	39
6.	Összefoglalás	45
7.	Hivatkozások.....	47
8.	Köszönetnyilvánítás.....	49

Rövidítések

<i>bpy</i>	2,2'-bipiridin, $(C_5H_4N)_2$
<i>Cp</i>	ciklopentadienil anion, $C_5H_5^-$
<i>Cp^*</i>	pentametil-ciklopentadienil anion, $C_5Me_5^-$
<i>cys^+</i>	N-acetil-L-cisztein-metilészter
<i>DG</i>	danzil-glicin
<i>dhp</i>	deferipron
<i>DSS</i>	4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav
<i>en</i>	etilén-diamin, $H_2N(CH_2)_2NH_2$
<i>HSA</i>	humán szérum albumin
<i>mim</i>	1-metilimidazol
<i>pic</i>	pikolinsav
<i>RhCp^*</i>	$(\eta^5\text{-pentametil-ciklopentadienil})\text{ródium(III)}, [(\eta^5\text{-Cp}^*)Rh]^{2+}$
<i>tio1</i>	etil-3-(metiltio)-propionát
<i>tio2</i>	N-acetil-L-metionin
<i>WF</i>	warfarin

1. Bevezetés

A szerves szintetikus vegyiparnak az 1990-es években megfogalmazódott irányelvnek célszerű megfelelnie: ez a „zöld kémia”. Ennek tizenkét pontjában fontos szempont a melléktermékek és hulladékok keletkezésének megelőzése, nagy hatásfokú, kis mennyiségben szükséges katalizátorok használata, melyek reakció - és sztereospecifikusak, emellett kevésbé extrém körülményeket igényelnek (1 atm, 0 – 100 °C). Ezeknek az elvárásoknak a biológiai szervezetekben működő enzimek tökéletesen megfelelnek, így már egyre több szintézisnél a reakciókat ezek közreműködésével hajtják végre [1].

Azonban hatékonyságukat erősen befolyásolja a közeg több tulajdonsága: szűk határok között változhat a pH és a hőmérséklet, főként vizes oldatot igényelnek, illetve a működésükhöz a szervezetekben található koenzimekre, főleg ATP-re és $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ -ra van szükség. Ez utóbbi kitétel rendkívül költségessé teszi a szintézist, mivel a szükséges tisztaságú és mennyiségű koenzimek igen drágák, ráadásul oldatban hosszabb távon nem is tarthatók el.

Több kutatás irányult erre a problémára, megoldásként először összetettebb rendszereket hoztak létre [2]:

- Lehet egy enzim és szubsztrátja, mely számunkra a fő reakciót jelenti, és ez igényli a NAD(P)H -t; közben egy másik reakcióban egy másik enzim egy másik szubsztrátot alakít át, aminek során redukálódik a NAD(P)^+ .
- Lehet, hogy csak egy enzim van a rendszerben, melynek két szubsztrátja van: egyiket oxidálja, így hozva létre NAD(P)H -t; ez szükséges ahhoz, hogy a fő reakció szubsztrátját redukálja.
- A közvetlen elektrokémiai redukcióval is próbálkoztak, azonban ez dimerek és melléktermékek keletkezése miatt nem rendelkezett kellő hatásfokkal.

Mivel ezek túl érzékeny és összetett rendszerek, emellett nem érték el megfelelő hatékonyságot, egy elektrokémiai mediátor után kutatva felfedezték több molekula ilyen aktivitását: kiterjedt aromás rendszerrel rendelkező molekulák, Rh^+ -polipiridil komplexek (pl. $[\text{Rh}(\text{bpy})_3]^+$) és fémorganikus $[\text{RhCp}^*]^{2+}$ -komplexek (bpy = 2,2'-bipiridin; Cp^* = pentametil-ciklopentadienil-anion, C_5Me_5) is alkalmasak erre a célra [3]. Ezek közül a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$ komplex igen sok kutatásban szerepelt nagy hatásfoka miatt, azonban a hatékonyságának maximalizálásához szükséges oldategyensúlyi viselkedését még nem vizsgálták eddig [4].

Dolgozatom másik kiindulópontja az új gyógyszerhatóanyagok létrehozása. A betegségek mindig nagy kihívást jelentettek az emberiség számára a múltban, és jelentenek még ma is. A gyógyszerek fejlesztése ezért kulcsfontosságú feladat. Többek között az AIDS, az ebola, a Parkinson-kór, az Alzheimer-kór, a *sclerosis multiplex* és a rákos megbetegedések a még nem teljesen vagy az egyáltalán meg nem oldott problémákhoz tartoznak. Ezért intenzív vizsgálat folyik a világ számos kutatócsoportjában, felhasználva a tudomány legújabb eszközeit.

Ezek közül a rák összetett, így igen nehezen leküzdhető betegség; a nehézség felismerésében rejlik, mivel ezen sejtek a test normális sejtjeitől lényegében alig különböznek. Morfológiájuk a kialakulásuk helyétől is függ: ez alapján különböztetünk meg többek közt bőrrákot; legalább húszféle különböző tüdőrákot; emlőrákot, leukémiát és agydaganatot. Már ezekben a példákban is látszik, a daganatok a test szinte bármely pontján kialakulhatnak, bármilyen szövetből. Épp ez a változatosság akadályozza meg, hogy egyetlen gyógyszer alkalmas legyen mindegyik típusra.

A rákkezelés során a kemoterápia célja elsősorban a daganatos sejtek pusztítása és áttétek képződésének megakadályozása. Ez megköveteli, hogy a vegyület citotoxikus, antimetasztatikus (áttétképződést gátló) és/vagy antiproliferatív (sejtosztódást gátló) legyen. Ezek a tulajdonságok okozzák a súlyos mellékhatásokat is, mivel hatásuk sokszor a rákos sejtek azon tulajdonságán alapszik, hogy gyorsan osztódnak, azonban normál sejtek közt is van ilyen, így citotoxikus hatásuk rajtuk is érvényesül. A rákellenes szereket klasszikus felosztás alapján DNS-hez kötődő szerekre, antimetabolitokra, tubulin mérgekre, molekuláris támadáspontú ágensekre és hormonális terapeutikumokra oszthatjuk fel [5].

A rákterápia területén kutatások folynak a modern nanotechnológia és a molekuláris biológia mellett a fémkomplexek területén is, amiről a 2. fejezetben lesz szó. A nanotechnológiában olyan részecskékkel dolgoznak, melyek mérettartománya 1-100 nm közé esik. Az ilyen típusú kutatásokban is még sok kiaknázatlan lehetőség rejlik, mint a hipertermiás kezelés, liposzómába csomagolt gyógyszerek vagy a nanoméretű fém részecskék funkcionálizálása.

2. Irodalmi háttér

2.1 A fémorganikus vegyületek

A fémek különböző szerves molekulákkal létrehozott komplexei már régóta érdeklődés tárgyai. A figyelem központjába kerültek azok a vegyületek, melyekben közvetlen fém – szén kötés található: ilyen komplexek az aromás ligandumokkal képzett szendvicsvegyületek is. Ezek első képviselője a ferrocén, aminél egy Fe^{2+} -kationhoz két ciklopentadienil-anion (Cp) kapcsolódik, stabil és semleges vegyületet hozva létre: 1951-es véletlen felfedezésével robbantak be a köztudatba ezek a vegyületek. 1973-ban kémiai Nobel-díjat kapott Fischer és Wilkinson ezen a területen végzett munkásságukért: „*for their pioneering work, performed independently, on the chemistry of the organometallic, so called sandwich compounds*”. Különböző szubsztituensek kapcsolhatók a gyűrűkre, illetve a későbbi vizsgálatoknál más központi fémionokkal és más aromás gyűrűkkel vegyületek egész tárházát hozták létre: szerepelnek köztük szendvics, félszendvics, dimer és polimer fémorganikus komplexek is. Felhasználásuk széleskörű: új, stabilabb katalizátorok hozhatók létre általuk, például újgenerációs Ziegler-Natta-katalizátorok, enantioszelektív katalizátorok [6].

2.2 Rákellenes platinafém komplexek

A platina(II)-tartalmú ciszplatin sikerei fordították a figyelmet a fémkomplexek tumorellenes felhasználására, így a kutatások első hulláma szerkezetileg és hatásmechanizmusban is hasonló platinafém vegyületek létrehozására törekedett [7]. Heterociklusos, aromás N-tartalmú ligandumokkal a ruténium két komplexe is jelentős DNS - keresztkötésre való hajlamot és rákellenes aktivitást mutatott: ezek a *cisz*-[Ru(2-fenilazopiridin)₂Cl₂] és a *mer*-[Ru(2,2':6',2''-terpiridin)Cl₃]. Kiterjedt, aromás, planáris ligandumaikkal beékelődhetnek a bázisok közé, ezzel is stabilizálják a központi fémion kötését a DNS-hez. A NAMI-A {(ImH)⁺(*transz*-[RuCl₄(DMSO)(Im)]⁻)} (Im = imidazol) és KP1339 {Na⁺(*transz*-[RuCl₄(Ind)₂]⁻)} (Ind = indazol) is már eljutott a klinikai vizsgálatokig. A NAMI-A antimetasztatikus hatása nem a DNS - kötődésen keresztül valósul meg, mivel gyengén kötődik hozzá az *in vitro* vizsgálatok szerint; mechanizmusa ismeretlen – nagy eséllyel a szerkezeti fehérjékhez kötődik, így gátolva az áttétek leszakadását. A KP1339 szolid tumorokra hat, kimondottan végbélrák kezelésénél tesztelik [8].

Az irídium és ródium NAMI-A-val és KP1339-cel analóg komplexei kinetikailag és biológiailag inerteek, mivel lassabb a ligandum-szubsztitúció ezekben a komplexekben, így nem jön létre aktív akva-komplex. A *fac*-[M(DMSO)(pp)]-komplexek, ahol M = Rh/Ir, DMSO = dimetil-szulfoxid, pp = polipiridilek (2,2'-bipiridin, fenantrolin, és ennek származékai), jelentős rákellenes aktivitást mutattak –megjegyzendő azonban, hogy a pp ligandumok magukban is igen aktívak. Ha két kloridiont és a DMSO ligandumot lecseréljük háromfogú ligandumokra, akkor félszendvics-vegyületekhez hasonló szerkezetet érünk el: erre alkalmas ligandum a [9]aneS₃, azaz az 1,4,7-tritiaciklononán, illetve a trisz-pirazolilmetán. Ezek Rh(III)-komplexeinek tumorelles hatását vizsgálták, és a legtöbb esetben tapasztaltak aktivitást [9].

Azonban a legtöbb ilyen fémkomplex még csak *in vitro* vizsgálatokon bizonyított, néhány klinikai fázisban van, és csak töredéke vált már klinikumban használatos szerré: azok is mind a ciszplatin származékai (oxaliplatin, karboplatin) [7].

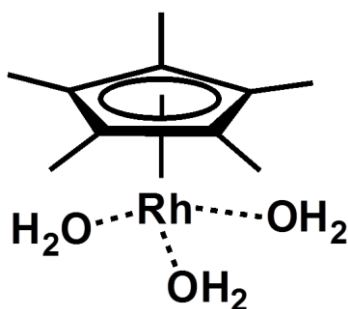
2.3 Fémorganikus komplexek, mint potenciális gyógyszerek

Az első fémorganikus vegyület, a ferrocén gyakori szubsztituens gyógyszeranalógoknál: az aromás fenilcsoportot lehet vele helyettesíteni, ráadásul annál nagyobb lipofilitást biztosít a molekulának, így nagyobb eséllyel vehetik fel a sejtek. Több ilyen próbálkozás is történt, azonban a hatás nem mindig egyezett meg a várttal: valahol csökkent, valahol növekedett, valahol teljesen más hatást váltott ki [8].

A ferrocifének a tamoxifén gyógyszer-hatóanyag fémorganikus analógjai: bennük egy szubsztituálatlan fenilcsoport lett ferrocénre cserélve. A tamoxifén specifikusan kötődik az ösztrogén-receptorokhoz, és hatásos ellenszere a mellráknak. Azonban – hatásmechanizmusából fakadóan – nem hatásos az ösztrogén-receptor negatív daganatos sejtekkel szemben, mely az esetek közel 40%-a. *In vitro* vizsgálatokból kiderült, hogy a ferrocifének kevésbé kötődnek az ösztrogén-receptorhoz, viszont a megkötött kisebb mennyiség is elegendő volt az MCF-7 (ösztrogén-receptor pozitív mellrák) sejtek szaporodásának gátlásához. Lehetséges hatásmechanizmusuk a vas oxidációszám-váltásához köthetőek: megnövekszik a reaktív oxidatív részecskék (ROS) mennyisége jelenlétükben [8,10]. Ugyancsak sikeres elgondolás volt a klorokvin ferrocén-analógja, a ferroklorokvin megalkotása. Ez az analóg a kiindulási maláriaellenes szernél sokkal kisebb koncentrációban éri el hatását, a klorokvin-rezisztens sejtek esetében is [11,12].

A titanocén-diklorid is két Cp-gyűrűt tartalmaz, azonban ezek centrumai 180° -nál kisebb szöget zárnak be: így kialakul két szabad kötőhely egyéb ligandumoknak. Mivel a titán oldataiban +4-es oxidációs állapotban van, ezért a *hard* jellegű oxigén-donoratomokkal képez szívesen komplexeket. Ebből a feltevésből kiindulva –mivel a sejtben a célmolekula, a DNS cukorfoszfat-lánca sok oxigént tartalmaz– rákellenes hatásait várták. Mivel a kiindulási vegyület semleges, viszonylag könnyen átjut a sejtmembránon. *In vitro* és *in vivo* körülmények közt kiváló IC_{50} -értékeket produkált még a ciszplatin-rezisztens sejtvonalaknál is, azonban a klinikai vizsgálatok első fázisában megakadt erős toxicitása miatt: korán elhidrolizál, így az aktív forma már a DNS-hezérés előtt elreagál. Más, kedvezőtlen folyamatokat indukál a sejtben: kloridionjait másodpercek alatt, aromás ligandumait pár óra múlva veszíti el, TiO_2 csapadékot létrehozva [13].

A másik, több fém irányában is alkalmazott út az ún. „félszendvics-elrendezés”, ahol csak egy aromás gyűrű található a fémion koordinációs szférájában, meghagyva így három másik kötőhelyet a többi ligandumnak. Ezt „*piano-stool*”-nak (1. ábra), azaz zongoraszék-elrendezésnek is nevezik. Sok átmenetifém felhasználásának gátat szabnak oldatbeli tulajdonságaik: semleges vagy már kissé savas pH-n is hidrolizálnak, oldhatatlan vagy biológiailag inaktív komplexek képződhetnek; komplexekben is kis koncentrációban oldhatók, így nem tudják elérni a hatásukhoz szükséges koncentrációt vagy éppenséggel túl inerteek. Ezekre egy lehetséges megoldást nyújt ez az elrendezés. Ezt jelzi a ligandumcsere-sebesség változása: pl. a $[Rh(H_2O)_6]^{3+}$ komplexben a vízcserére jellemző sebességi állandó $2,2 \times 10^{-9} s^{-1}$, míg ugyanez a $[RhCp^*(H_2O)_3]^{2+}$ -ben $1,6 \times 10^5 s^{-1}$, mely mintegy 14 nagyságrenddel nagyobb labilitást jelent. Azaz a Rh^{3+} inertsége itt már nem jelent akadályt [15].



1. ábra: A félszendvics-elrendezésű $[RhCp^*(H_2O)_3]^{2+}$ -komplex szerkezeti képlete

Feltételezett hatásmechanizmusuk alapján az aktív forma az akva komplex, azaz amikor már legalább egy koordinálódó ligandum lecserélődött egy koordinált vízre. Ezt elsősorban két általános tényező befolyásolja: a komplex pK_a -ja, illetve a Cl^-/H_2O -cserét jellemző

egyensúlyi állandó: előbbi esetén a OH^- koordinálódásával alakul ki az inert komplex; utóbbi azért fontos, mivel az élő közegek kloridion-koncentrációja megszabja az aktív akva komplex és az inaktív kloridokomplex arányát [14]. A kloridion koncentrációja $\sim 103 \text{ mM}$ a sejtközötti térben, $\sim 23 \text{ mM}$ a sejtplazmában és 4 mM a sejtmagban. A központi fémion, az aromás „sapka”, a kétfogú ligandum és az egyfogú távozó ligandum helyes megválasztásával finoman lehet hangolni ezt a két értéket, és ezen keresztül a citotoxicitást és a lipofilitást is [14,15]. Egy 2013-ban közölt cikkben az akva komplexek pK_a -ját részletesen vizsgálták különböző platinafém ionok és aromás ligandumok hatásának függvényében kloridos és kloridmentes közegben L. Bíró és munkatársai [16].

A vas rákellenes félszendvics komplexei nemrég jelentek meg az irodalomban. Ezekben egy koordinálódó Cp van, illetve egy (P,P)-kétfogú ligandum és egy aromás nitrogénnel koordinálódó imidazol-származék. *In vitro* rákellenes hatásuk a ciszplatinnal hasonló nagyságrendű vagy még jobb is [17].

A félszendvics ródium- és irídiumvegyületek aromás liganduma a legtöbb esetben a Cp^* : ezek komplexeit különböző kétfogú komplexekkel már sok cikkben leírták. A ródium(III) oxigén, nitrogén, foszfor és kén donoratomokkal is képez stabil komplexeket. Kutatócsoportunkban már korábban vizsgálták a RhCp^* komplexképzését maltol, allomaltol, pikolinátok és deferipron ligandumokkal vizes közegben, melyek közül a pikolinsav-komplex nem mutatott biológiai aktivitást. Részletesen jellemezték a képződő komplexek összetételét, stabilitását, illetve a RhCp^* hidrolízisét kloridion tartalmazó, illetve kloridion-mentes közegben [18,19].

Egy összefoglaló cikkben Y. Geldmacher és munkatársai közölték, hogy az általunk vizsgált két komplex, a $[\text{RhCp}^*\text{Cl}(\text{bpy})]^+$ és a $[\text{RhCp}^*\text{Cl}(\text{en})]^+$ (en = etilén-diamin) IC_{50} -értéke $100 \mu\text{M}$ fölött van, azaz nem tekinthetők igazán rákellenes komplexeknek, azonban a bpy-től kismértékben eltérő fenantrolinnal alkotott komplex már igen [9]. Emellett ismert a $[\text{RhCp}^*\text{Cl}(\text{bpy})]\text{ClO}_4$ [15], illetve a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})](\text{OTf})_2$ komplexek röntgen diffrakciós szerkezete is az irodalomban [20].

A ruténiumnak biztatóak az ez irányú fejlesztései is: fontos megjegyezni, hogy az általunk vizsgált $[\text{RhCp}^*\text{Cl}(\text{en})]^+$ -nal izoelektronos $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{RuCl}(\text{en})]^+$ és $[(\eta^6\text{-biph})\text{RuCl}(\text{en})]^+$ (biph = 1,1'-bifenil) *in vitro* rákellenes hatást mutatott (p-cym = para-cimol, 4-izopropiltoluol). További érdekes vegyületek a RAPTA-komplexek, melyben 1,3,5-triaza-7-foszfadamentán az egyfogú, állandó ligandum, és két kloridion vagy egy (O,O) kétfogú ligandum a távozócsoporthoz tartozik. Ezek rákellenes aktivitása is jelentős [14]. Ha az ebben a dolgozatban tárgyalt $[\text{RhCp}^*\text{Cl}(\text{bpy})]^+$ fémionját ruténiumra, a sapkáját Cp-re és a Cl^- -t

trifenil-foszfínra cseréljük, akkor egy *in vitro* vizsgálatoknál igen kis IC₅₀-értékeket produkáló komplexet kapunk ciszplatina rezisztens sejtvonalak esetén is [22].

2.4 A [RhCp*(bpy)]²⁺, mint katalizátor és hidrid-transzfer

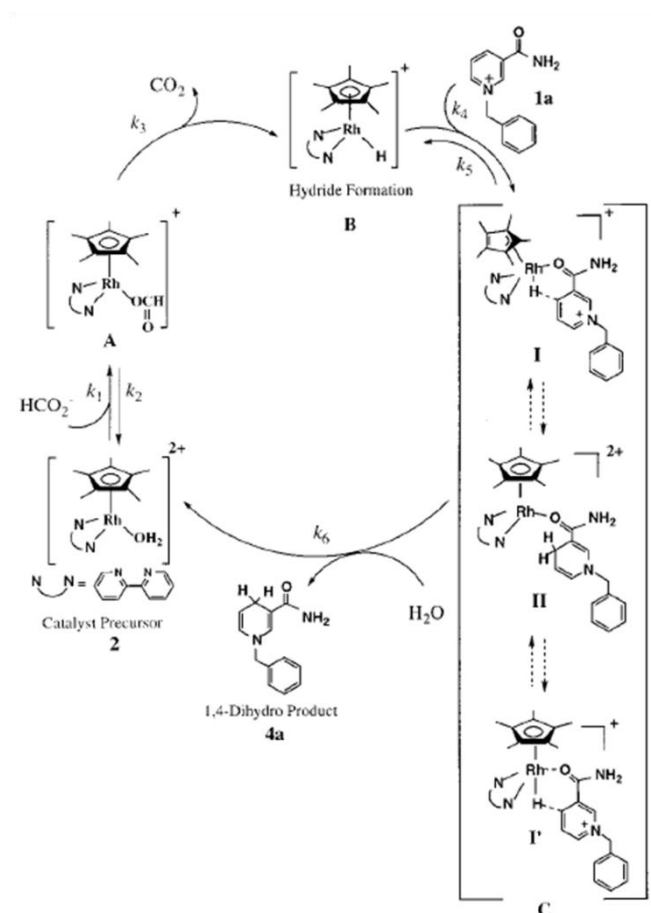
Közölt cikkek szerint a [RhCp*(bpy)]²⁺ megoldást nyújthat a reakció során elhasználódott NAD(P)H és FADH₂ *in situ* regenerálására NAD(P)⁺-ból és FAD⁺-ból [4]. Ez a komplex hidrid-transzferként képes regenerálni az oxidált formát: ezt kémiai és elektrokémiai módszerrel is megtehetjük.

2.4.1 Koenzim-redukció kémiai módszerrel

Kémiai módszer esetén nátrium-formiát a hidridion-forrás, mivel a komplex az 1. egyenlet szerint katalizálja a formiátion bomlását szén-dioxidra és hidridionra:



Ennek mechanizmusa szerint először koordinálódik a formiátion a kötött víz helyére, majd CO₂ kilépése közben kialakul a [RhCp*(bpy)H]⁺ hidridkomplex. Majd az oxidált koenzim koordinálódik, felveszi a H⁻-t, így keletkezik a redukált forma. Végül ez disszociál és a közegtől függően víz vagy Cl⁻ koordinálódik a helyére. Ezt a folyamatot a 2. ábra mutatja be, egy NAD(P)⁺-modellel (1-benzilnikotinamid) [20,22].



2. ábra: Egy NAD(P)^+ -modell kémiai redukálásának feltételezett reakciómechanizmusa $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ segítségével [20]

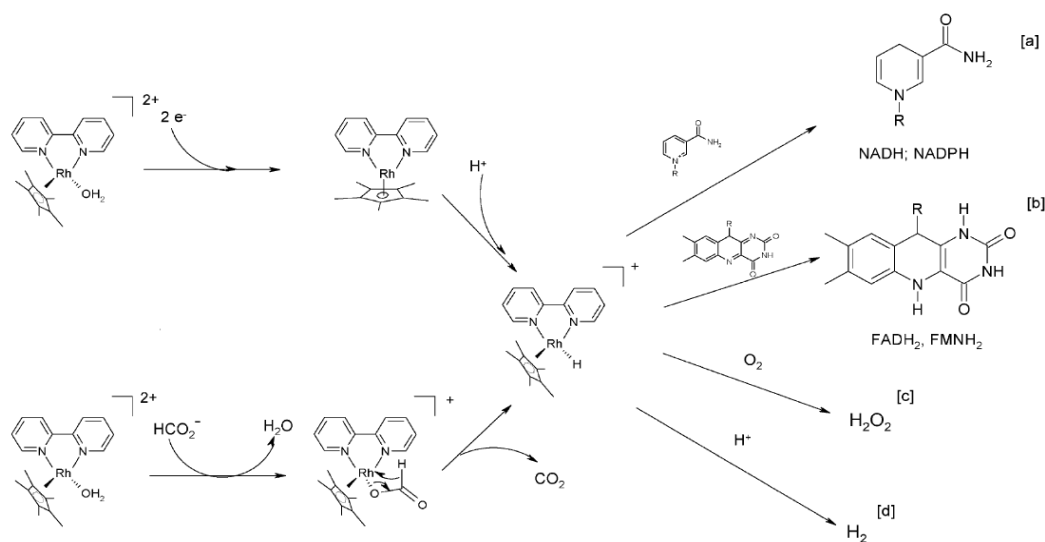
2.4.2 Koenzim-redukció elektrokémiai módszerrel

A közvetlen elektrokémiai redukció a legideálisabb módszer lehetne, hiszen egy katódot kellene csak az oldatba tenni, így a rendszer nem tartalmazna a minimálisnál több vegyszert, illetve az elektromos áram viszonylag olcsó alapanyag; azonban a redukció során nem csak 1,4-NAD(P)H keletkezik: a kétlépéses redukció során gyökök képződnek, melyek rekombinációs sebessége gyorsabb, mint a második elektron felvétele [22]. Ezért olyan megoldást érdemes keresni, ahol a NAD^+ redukciója egy lépésben történik meg, pl. H^- -felvételével. Ha egy mediátort használunk, mint a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ -komplexet, akkor elérhetjük a kívánt szelektivitást és a nagy hatásfokot az indirekt elektrokémiai módszerrel. A ródium vegyértékváltó fém, mivel +1-es és +3-as oxidációs állapota is viszonylag stabil. Ez a tulajdonsága teszi alkalmassá erre a feladatra: a katódon két elektron felvételével $\text{RhCp}^*(\text{bpy})$ képződik, melyben Rh^+ található. Ez a pK_a -jánál kisebb pH-jú közegben protonálódik: ez izoelektronos a hidridkomplexszel, amivé át is alakul: a Rh^+ redukálja a koordinált protont

hidridionná, miközben önmaga Rh^{3+} -ná oxidálódik. Ezután a folyamat úgy folytatódik, mint a formiátion általi kémiai módszernél [2].

2.4.3 Egyéb katalitikus felhasználások

A 3. ábrán látható, hogy a hidridkomplex az oldott/átbuborékoltatott O_2 -nel hidrogén-peroxidot képez. Ez a mellékreakció fontossá válik, ha a komplex felhasználása során olyan enzimet használunk, melynek egyik reagense éppen az O_2 . Az ábrán látható másik reakció savas közegekben játszódik le: látható fényel megvilágítva a TiO_2 szemcséket egy elektronforrást nyerünk, aminek segítségével redukálódik a ródium-komplex, létrehozva a hidridkompleket. Ezután egy H^+ és a koordinált H^- egymással reagálva H_2 -t hoz létre. A TiO_2 -ben keletkező pozitív „lyukakat” egy elektrondonor oxidálásával regeneráljuk, mely lehet maga az oldószer, pl. a víz is [23].



3. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$ -mint hidrid-transzfer- sokoldalú felhasználása [4]

2.4.4 Felhasználási problémák

Két fő problémát tárgyal egy 2010-es cikk: eddig egyetlen kutatás történt annak érdekében, hogy kiderítsék, vajon csak a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ az aktív komplex ezekben a folyamatokban, vagy a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ is [24]. Kulcskérdés ez, mivel szívesen képez kloridokompleket a ródium: a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ -előállításához is $[\text{RhCp}^*(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ -ot használnak fel. Továbbá az ionerősség beállításához is gyakori a KCl/NaCl felhasználása, illetve a gyógyszerjelölt fémkomplexeknél csak az akva komplex az aktív, ld. ciszplatin hatásmechanizmusa [25]. A pufferek és egyéb halogenidek használata is inhibíálhatja a

$[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ komplexet a koenzim-regenerálásban, mivel a nagy koncentrációban levő koordinálódó részecskék kompetícióban vannak a formiátióval és a koenzimmel [24].

A biológiai molekulák kötődése is hatással van a komplex hatékonyságára, azt csökkenti. Itt megvizsgálták a különböző enzim- és aminosav-oldatokban a koenzim regenerálásának hatásfokát. Az enzimeknél azonban nem 1:1 arányban adták egymáshoz a két reagenst, hanem 0,02 mM volt a fémkomplex és 375 mg/dm³ volt a fehérje koncentrációja. Az aminosavak közül a nitrogén és kén donoratomokat tartalmazó oldalláncúak csökkentették leginkább a hatást [24].

Érdekes, hogy a RhCp^* fenantrolinnal alkotott komplexe több mint kétszer aktívabb az analóg 2,2'-bipiridilkomplexnél koenzim-regenerálásban [26]. Ha figyelembe vesszük, hogy a rákellenes aktivitása is a fenantrolin-komplexnek nagyobb [9], akkor egyfajta kapcsolat elképzelhető a két tulajdonság közt.

3. Célkitűzés

A $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$ képes az oxidált koenzimek *in situ* regenerálására, kémiai és elektrokémiai úton. Azonban bizonyos körülmények hatására leromlik a hatásfoka mind a használt enzimnek, mind a mediátornak. Ilyen irányban már volt kutatás, azonban ezekből nem lehet eltérő körülményekre megjöszolni a valószínűleg aktív akva komplex $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ koncentrációját.

A $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$ és a $[\text{RhCp}^*(\text{en})]^{2+}$ rákellenes hatása csekély, azonban a velük analóg szerkezetű komplexek már aktívak: egyrészt akkor, ha a fémiont cseréljük le, másrészt akkor, ha (N,N)-kétfogú polipiridil komplexeket használunk ligandumként.

A kutatásokban azonban kifejezett hiányok találhatók, melyeket e dolgozattal szeretnénk kipótolni. Céljaink a következők:

- Az oldategyensúlyokat megszabó állandók meghatározása kloridos és kloridmentes (nitrátos) közegben: a választott két fémkomplex ($[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$ és $[\text{RhCp}^*(\text{en})]^{2+}$) stabilitási szorzata ($\beta(\text{ML})$), a fémkomplexek savi disszociációs állandója (K_a), illetve a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ ligandumcserére jellemző állandó ($K'[\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-]$). Ezek segítségével adott fémkomplex és kloridion koncentrációk mellett le lehet írni tetszőleges rendszerek pontos egyensúlyi összetételét.
- Humán szérum albuminnal (HSA) való kölcsönhatásuk jellegének és mértékének vizsgálata közvetett és közvetlen módszerekkel. Közvetetten a kötőhely-markerek segítségével határozzuk meg az ismert kötőhelyekre való kötődés mértékét, közvetlenül pedig ultraszűrés segítségével az összes megkötött mennyiséget mérjük.
- A komplexek kölcsönhatásának vizsgálata védett aminosavakkal, melyek modellezik a fehérje aminosav oldalláncainak egyfogú kötőhelyeit (kötőhely-modellek).
- A kapott eredmények összehasonlítása a kutatócsoportunk által már vizsgált más RhCp^* -komplexekkel (pl. maltol, pikolinsav, deferipron).

4. Kísérleti rész

4.1 A felhasznált vegyszerek

A mérések során felhasznált $[\text{Rh(III)Cp}^*(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$, etilén-diamin, 2,2'-bipiridin, 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav (DSS), 1-metilimidazol, N-acetil-L-cisztein-metilészter, etil-3-metiltio-propionát, N-acetil-L-metionin, warfarin (WF), danzil-glicin (DG) és humán szérum albumin (HSA) a Sigma Aldrich terméke. A KNO_3 , KCl , AgNO_3 , KOH , KH_2PO_4 , HCl , HNO_3 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 és Na_2HPO_4 a Reanal Finomvegyszergyár ZRt.-től származnak. Ezeket további tisztítás nélkül használtuk fel. Oldószernek ioncserélt és kétszer desztillált Milli-Q vizet használtunk.

A RhCp^* , a ligandumok és a fehérjemodell-vegyületek törzsoldatai tömeg szerinti beméréssel készültek, ahol a RhCp^* és a ligandumok pontos koncentrációját pH-potenciometriás titrálások és a HYPERQUAD nevű programmal határoztuk meg [27]. A kloridmentes RhCp^* -törzsoldatnál sztöchiometrikus mennyiségű AgNO_3 -oldat segítségével választottuk le a RhCp^* -törzsoldat kloridion-tartalmát AgCl csapadék formájában, melyet leszűrtünk, majd a fémion koncentrációt a fent leírt módon határoztuk meg. Ezek a törzsoldatok hűtőszekrényben voltak tárolva.

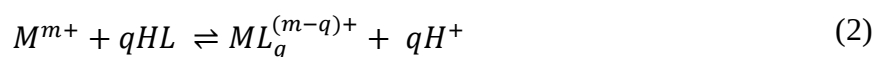
A puffereelt mintákat PBS^* -oldattal állítottuk pH=7,4-es értékre. Ez 1,5 mM KCl -ra, 100,5 mM NaCl -ra, 12 mM Na_2HPO_4 -ra és 3 mM KH_2PO_4 -ra nézve. Ha szükséges volt, a pH-t kis mennyiségű sav vagy lúg hozzáadásával állítottuk a pontos értékre. A puffer összetétele a vérérszérumban levő K^+ , Na^+ és Cl^- koncentrációival egyezik meg.

A HSA-ból minden mérési sorozat előtt friss törzsoldatot készítettünk, tömeg szerinti beméréssel. A WF és DG törzsoldatának készítésekor pár csepp 0,1 M-es NaOH -oldattal gyorsítottuk meg az oldódást.

4.2 A mérési módszerek

4.2.1 pH-potenciometria

A pH-potenciometria fontos része a komplexek stabilitási állandóinak meghatározásához. A ligandum kötőhelyeiért kompetitív reakció zajlik a fémion és a hidrogénionok közt, ezt a



2. egyenlet írja le.

A reakció a következő általános egyenlettel írható fel (az egyszerűség kedvéért a töltéseket nem jelöljük):



3. egyenlet, melyre a stabilitási szorzat:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r} \quad (4)$$

4. egyenlettel számítható. Ezáltal, ha titrálás során mérjük az egyensúlyi pH-t, akkor abból nagy pontossággal meghatározhatjuk a létrejövő komplexek stabilitását. A pH méréséhez fontos, hogy elektródunk kövesse a Nernst-egyenletet. A pH-potenciometriás méréseknél a H^+ az elektródaktív komponens.

Itt azonban csak elméleti potenciálról beszéltünk. A mért potenciálból és az elméleti potenciálból számított pH között állandó különbség van, ez az érték az Irving-faktor [28].

A pH méréséhez a közegtől függően kétféle üvegelektrodra volt szükség: kloridos közegben Metrohm 6.0234.100 kombinált elektródot, kloridmentes közegben Metrohm 6.0255.100 *double-junction* elektródot használtunk. Utóbbi külső töltete telített KNO_3 -oldat volt, a kloridionok oldatba szivárgásának megelőzésére, ami mérési hibát okozna, mivel a RhCp*-nak nem elhanyagolható a kloridion-affinitása. Ezeket az elektródokat Omega 710A pH-mérőhöz csatlakoztattuk. Az ismert koncentrációjú ($\sim 0,20$ M) KOH-mérőoldatot Metrohm 665 Dosimat automata bürettával adagoltuk, igen nagy pontossággal ($0,001$ cm³), számítógépes program segítségével.

A titrálásokat argon atmoszféra alatt végeztük, termosztáttal $25,0 \pm 0,1$ °C-on tartva a hőmérsékletet. A rendszert minden nap kalibráltuk erős sav titrálásával, ekkor a sav koncentrációját, az Irving-faktort és a vízion-szorzatot a Gran-módszerrel számoló Abu9x nevű programmal értékeltük ki [29].

A minták 1-2 mM-ben tartalmazták az adott fémiont és ligandumot, ezek egymáshoz viszonyított aránya 1:2, 1:1,5 illetve 1:1 volt, ahol a ligandum koncentrációja mindenhol azonos. Az ionerősség 0,20 M (KCl/KNO_3) volt. A titrálás kezdetekor a pH $\sim$ 2 volt és pH=11,5-ig adagoltuk a lúg mérőoldatot, kivárva minden pontban az elektrokémiai egyensúlyt.

A stabilitási szorzatokat a PSEQUAD nevű program segítségével számoltuk [30]. Itt a bemenő fájl tartalmazza az adagolt mérőoldat térfogatát és mért pH-értékeket, a komponenseket (M, L, H), és az ezekből felépíthető, az adott rendszerben várt asszociátumokat (pl. ML, M_2H_2 , MLH_1), emellett a komponensek analitikai koncentrációit, a mérőoldat koncentrációját, az Irving-faktort és a vízion-szorzatot. Az asszociátumok

stabilitási szorzatai – megfelelő közelítő értékeket megadva – a 5., 6. és 7. egyenletek által leírt anyagmérlegek alapján a komponensekre felírhatók, és iterálhatók a megfelelő értékre.

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (5)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (6)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (7)$$

Mivel a pH-potenciometria viszonylag egyszerű, de pontos mérési módszer, így kiválóan megfelelt a méréseim bázisául.

4.2.2 Az ultraibolya-látható (UV-látható) spektroszkópia

Ultraibolya-látható spektrofotometriával azok az anyagok vizsgálhatóak, melyek 200-800 nm-es hullámhosszak közötti fotont elnyelő kromofór csoportot tartalmaznak. Gerjesztés hatására az elektronok alacsonyabb energiájú molekulapályákról magasabb energiájú szintekre kerülnek, például kötő pályáról lazítóra vagy nemkötőre. Fémkomplexek esetében elnyelést okozhatnak a fémion d-d átmenetei, a fémion és a ligandum közötti töltésátviteli sáv (CT-sáv), illetve a ligandum molekulán belüli elektronátmenetei.

A mérések során az abszorbanciát mértük, amit a

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad (8)$$

8. egyenlettel definiálunk, ahol I_0 a belépő fény intenzitása, I a kilépőé. Az abszorbancia koncentrációtól való függését adott λ hullámhosszon a Beer-Lambert-törvény fejezi ki:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \times c \times l \quad (9)$$

Itt ε_λ a moláris abszorbancia ($M^{-1} \times cm^{-1}$), c a mérendő anyag koncentrációja (M), l a fény úthossza (cm).

A dolgozatban szereplő két fémkomplex vizsgálatakor CT-sávok jelennek meg; a bpy-nél a ligandumsávok változása is megfigyelhető. A CT-sávok a látható hullámhossz-tartományban okozzák az oldatok jellegzetes narancssárga és citromsárga színét. A ligandumsávok az UV-tartományban vannak, nagyobb moláris abszorbancia jellemzi őket. A komplexképződésre mindkét sávtípus érzékeny.

A mérések során a bpy esetében 100 μM -os, míg en-nél 200 μM -os koncentrációjú oldatokat vizsgáltunk. 5 és 10 milliméteres kvarcküvetákat használtam, illetve a kinetikai méréseknél 10 mm-es úthosszú tandemküvetát. A spektrumokat egy Hewlett-Packard 8452A diódasoros spektrofotométerrel vettük fel, 0,20 M KCl/KNO₃ mellett, 190 nm-től 820 nm-ig. A mérések során a hőmérséklet itt is 25,0 $\pm$ 0,1 °C volt.

A spektrumokat a PSEQUAD nevű programmal értékeltük ki [30].

4.2.3 A ¹H NMR-spektroszkópia

Ennél a mérési módszernél azt a jelenséget használjuk ki, hogy mágneses térben a magspinnel rendelkező ¹H-atommagok energiája eltér egymástól: a ¹H magspinje I=1/2, így 2I+1=2 energiaszint alakul ki, melyek energiakülönbsége függ a mágneses indukcióvektorok nagyságától, azaz attól, mekkora mágneses térben van a rendszerünk. A két szint közti átmenethez olyan foton szükséges, melynek frekvenciája 10⁷ és 10⁸ Hz körül van. Az NMR-készülékeknél ez a frekvencia állandó, ehhez állítják be a mágneses tér erősségét úgy, hogy megtörténjen az átmenet. Méréseink során 500 MHz-es készülékkel dolgoztunk, egy Bruker Ultrashield 500 Plus típusú készülékkel.

Ennyi azonban nem tenné alkalmassá a ¹H NMR-spektroszkópiát szerkezet-meghatározásra: a különböző protonok – kémiai környezetüktől függően – más és más erősségű mágneses teret érzékelnek, a körülöttük keringő elektronok árnyékoló hatása eredményeként. Így Hz-ben mérhető eltérések jelentkeznek a spektrumban, létrehozva ennek finomszerkezetét. A szomszédos szénatomokon levő protonok magspinjei egymással kölcsönhatnak, ennek eredményeként felhasadhatnak a jelek multiplettekké, információt adva a szomszédos magok számáról. Emellett a jelek intenzitása arányos a jelt adó magok számával, így a jeleket integrálva is tájékoztatást kapunk a szerkezetről. Ezek alapján a rendszerben levő részecskék szerkezetéről fontos információkat nyerhetünk, illetve a titrálások során a kémiai eltolódások változása titrálási görbe szerint változik (gyors csere esetén), így pK és stabilitási szorzat is számolható a PSEQUAD nevű programmal ez alapján [30].

Mivel a műszer frekvenciájától függ a spektrum x-tengelyének skálázása, ezért bevezettük a kémiai eltolódást, melyet a 10. egyenlettel definiálunk:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \times 10^6 \quad (10)$$

Itt δ a kémiai eltolódás (ppm), ν az adott atommag rezonancia-frekvenciája (Hz), míg ν_0 a mérőműszer frekvenciája (Hz).

Méréseink során 1 és 2 mM-os mintákat vizsgáltunk, ezek 10% (v/v) D₂O-t tartalmaztak, referencia-anyagként DSS-t használtunk.

4.2.4 A spektrofluorimetria

A spektrofluorimetria napjaink közkedvelt vizsgálati módszere. Előnye, hogy kis koncentrációjú oldatok mérhetők vele, így alkalmas a fehérjék, fehérjékkel kölcsönható vegyületek vizsgálatára, így főleg a biokémikusok, molekuláris fizikusok alkalmazzák. 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 elméleti háttere a következő: bizonyos vegyületek az UV-sugárzás abszorpciója következtében fotolumineszcenciát mutatnak, azaz fényt bocsátanak ki. Amennyiben a fény kisugárzása a gerjesztett szingulett állapotok valamelyikéről (S_1 , S_2) történik, úgy fluoreszcenciáról beszélünk, ahol a gerjesztett állapot élettartama 1-100 ns.

Fehérjék esetében három olyan aminosav van, amely fluoreszcens: aromás jellegüknél fogva a fenilalanin, a tirozin és a triptofán (Trp). A HSA-ban egyetlen Trp található a 214-es helyzetben [31]. Amennyiben szelektíven ezt az aminosavat akarjuk gerjesztetni a fehérjében, úgy a besugárzó fény hullámhosszát $\lambda_{EX} = 295$ nm-nek választjuk, mivel így a másik két aminosav gyakorlatilag már nem gerjesztődik. A Trp(214) a IIA domén hidrofób zsebének (=I-es kötőhely) közelében helyezkedik el. Így, ha az I-es kötőhelyhez bekötődik egy vagy több vegyület (ligandum), akkor ott megváltoznak a hidrofób-hidrofíl viszonyok, ami hatással van a Trp emissziójának intenzitására. 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-ligandum kölcsönhatásról, a kötés erősségéről nyerhetünk információt [31].

Alkalmas gerjesztés mellett a HSA bizonyos vegyületekkel komplexet képezve intenzív fluoreszcenciát mutat. Ilyen vegyületek az általunk kötőhely markerként felhasznált WF és DG.

Kompetíciós mérések esetén az adott arányú HSA-kötőhely markert tartalmazó mintát titráljuk valamely ligandummal/fémkomplexszel. A kötött kötőhely marker koncentrációja

folyamatosan csökken – helyét a bekötődő ligandum/fémkomplex veszi át – ezzel együtt a kezdeti intenzitás is csökken. A kiértékelést nehezíti, hogy nem csak a HSA-kötőhely marker komplex, hanem önmagában a kötőhely marker molekula is emittál, ráadásul esetünkben ugyanez elmondható a bpy-ről, mely HSA-hoz kötve még nagyobb intenzitású is lesz.

A fluorimetriás méréseket igen híg oldatban végeztük: HSA-ra és markerre nézve 1 μM , míg a fémkomplexre nézve 10 μM . Ez fontos a jelentős önabszorpció elkerülése miatt, viszont az alacsony koncentráció a disszociációnak kedvez.

Az oldatok pH-ja 7,40-re volt beállítva PBS* puffer segítségével, a mérést Hitachi F-4500 típusú spektrofluoriméterrel végeztük 1 cm úthossz mellett. A mintáktól függően eltért a gerjesztés hullámhossza és a kibocsátott fény detektálási tartománya, amit az 1. táblázat mutat.

1. táblázat: A különböző fluorimetriás mérésekhez használt gerjesztő és emissziós hullámhosszak

Mérés típusa	Gerjesztő hullámhossz	Emissziós tartomány
HSA	295 nm	305 - 450 nm
WF	310 nm	320 - 500 nm
DG	335 nm	420 - 600 nm

4.2.5 Az ESI-MS

A tömegspektrometria (MS) az egyik leggyakrabban használt módszer szerves és szervetlen vegyületek minőségi és mennyiségi elemzésére, mivel alkalmas nagyon kis mennyiségű anyagok analitikai vizsgálatára. A mintát a tömegspektrométerben ionizáljuk, majd az ionokat tömeg/töltés alapján választjuk szét. Az általunk használt elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) a lágy ionizációs technikák közé sorolható. A módszer előnye, hogy a spektrumban többnyire az egyszeresen vagy többszörösen töltött molekulaiont látjuk, a lágy ionizáció miatt a mérés során az anyag általában nem fragmentálódik.

A vizsgálandó vegyületet oldat formájában porlasztjuk be a készülékbe, általában olyan poláris oldószerben oldjuk, melyben legalább kis mértékben oldódik. Az oldat a légtérbe egy nagyfeszültségű kapillárison keresztül jut, itt töltött cseppeket tartalmazó, monodiszperz permet képződik. A cseppek erős párolgásának eredményeképpen kisméretű, nagy töltésszámú, szinte szétrobbanó cseppek, majd végül pozitív töltésű ionok képződnek. A szabaddá vált ionok gyorsítás után az analizátorban elválaszthatók tömeg/töltés hányadosuk

szerint. A mért jel intenzitásából az adott ion relatív mennyiségére is tudunk következtetni. Az elektro spray mérésekhez igen kis koncentrációjú oldat is elég (10^{-4} és 10^{-6} M).

Mérésünket egy Waters Q-TOF Premier (Micromass MS Technologies, Manchester, UK) ESI-ionforrással ellátott spektrométeren végeztük. A készüléket pozitív ion módban használtuk, a kapillárisfeszültség 3,8 kV volt, ködképző gázként N_2 -t használtunk.

4.2.6 Az ultraszűrés

Az ultraszűrés segítségével a fehérjéhez kötött és a nem-kötött frakciót választjuk el az egyensúly beállítását követően. Az összeállított mintát, mely HSA-t és fémkomplexet tartalmazott, megfelelő idejű és körülményű inkubálás után egy speciális szűrőre visszük fel, mely a 10 kDa-nál kisebb molekulákat engedi át. A megfelelő ideig tartó és alkalmas fordulatszámon végzett centrifugálást követően két frakciót nyernek: a szűrőn fennmaradt rész a nagy molekulatömegű (HMM), míg a szűrőn átjutott rész a kis molekulatömegű (LMM) frakció. A szűrőn marad tehát a fehérje és a hozzá kötött fémion/ligandum/fémkomplex, míg a nem-kötődő anyagok átjutnak. Mindkét frakció összetétele vizsgálható arra alkalmas analitikai módszerrel, pl. UV-látható spektrofotometria, ICP-AES, AAS stb.

A méréseket $0,50\text{ cm}^3$ térfogatban és $25,0\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ -on végeztük. A mintákban a HSA koncentrációja állandó, $\sim 50\text{ }\mu\text{M}$, a hozzáadott RhCp*-komplexek koncentrációja pedig mintánként 50, 150 és $450\text{ }\mu\text{M}$ volt.

A minták összeállítását követően két esetben 1 óra, a többinél 1 nap inkubáció után centrifugálást végeztünk. Erre a célra Eppendorf Minispin Plus centrifugát használtunk, 5 - 10 percig, 10000 rpm fordulatszámon. A szűrő Microcon YM-10, Amicon, Millipore membránszűrő volt. Az így szétválasztott mintáknak a fehérjementes LMM frakcióját Hewlett Packard 8452A spektrofotométerrel vizsgáltuk. A detektáló módszer esetén előzetes kalibrációt végeztünk a fémkomplexekkel.

5. Eredmények

Az általunk vizsgált pH-tartományban pH = 0,7 - 11,5 a korábbi mérések alapján a RhCp* fémorganikus egység nem bomlik el, így a dolgozat tárgyalása során ezt tekinthetjük fémionnak, melyet M-mel jelölünk [18]. Vizes közegben ^1H NMR spektroszkópia segítségével a Cp* metil-hidrogénjeinek kémiai eltolódás-változásán keresztül információt kaphatunk a fémion kémiai környezetének változásáról. A fémion kloridmentes közegben, savas pH-n $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ formában van jelen, míg kloridos közegben csak az általánosabb $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]$ képlet használható, ahol Z koordinálódó vizet és kloridiont is jelent. (A töltést emiatt nem jelöljük, ahol Z szerepel a képletben.) Ezek a részecskék a pH növekedtével hidroxido-hidas dimereket képeznek, melyek a $[\text{RhCp}^*(\mu\text{-OH})\text{Z}]_2$ ($[\text{M}_2\text{H}_{-2}]$) és a $[(\text{RhCp}^*)_2(\mu\text{-OH})_3]^+$ ($[\text{M}_2\text{H}_{-3}]$) képletekkel írhatók le; az $[\text{M}_2\text{H}_{-3}]$ kloridmentes közegben pH > 6 felett, kloridos közegben pH > 8 felett az uralkodó részecske. A méréseim során számolt stabilitási szorzatok az irodalomban ismertekkel megegyeztek (2. táblázat) [18,32].

2. táblázat: A $(\text{RhCp}^*(\text{Z})_3)$ hidroxido-hidas dimereinek stabilitási szorzatai a két, általam vizsgált közegben [18]

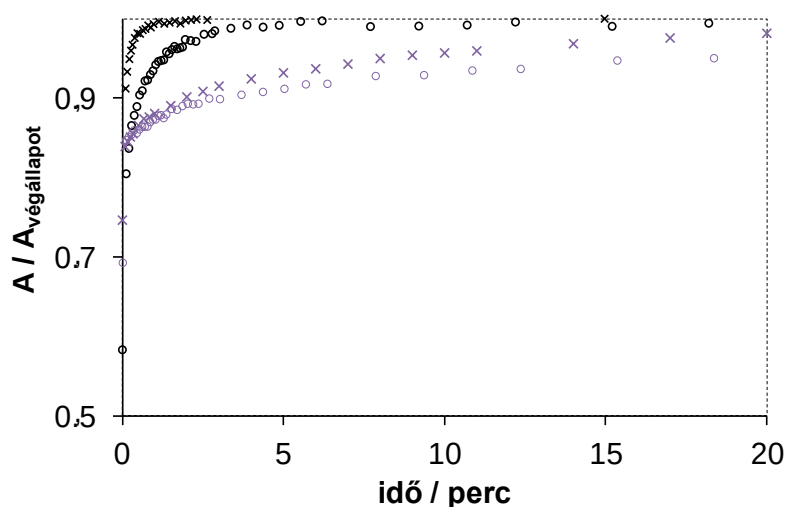
	0,20 M KCl	0,20 M KNO ₃
$\lg\beta[\text{M}_2\text{H}_{-2}]$	$-11,12 \pm 0,01$	$-8,53 \pm 0,07$
$\lg\beta[\text{M}_2\text{H}_{-3}]$	$-19,01 \pm 0,01$	$-14,26 \pm 0,04$

5.1 A RhCp*-bpy rendszer

Az (N,N)-kétfogú ligandum, a bpy proton-akzeptorként viselkedik savas oldatokban: bázicitása kicsi, egy savi disszociációs értéke van az általunk vizsgált pH-tartományban (3. táblázat): még egy másik deprotonálódási folyamat is lejátszódik erősen savas közegben is ($\text{pK}_a < 1$), így ezt nem vettük figyelembe a számítások során. A ligandum disszociációjára kapott állandók jól egyeznek az irodalomban közölt értékekkel [33].

A RhCp* és a bpy komplexképződési egyensúlyait elsősorban pH-potenciometriás és ^1H NMR spektroszkópiás mérésekkel vizsgáltuk 0,20 M KCl és 0,20 M KNO₃ ionerősség mellett. Mivel ezen semleges ligandum esetén várható volt, hogy a komplexképződés lassabb, mint a negatív töltésű ligandumokkal [15], ezért előzetes mérésenként UV-látható fotometriásan követtük a komplexek kialakulását az idő függvényében. Savas közegben (pH = 1,9) 200 s után már nem volt látható spektrális változás egyik vizsgált közegben sem. (4. ábra) A komplexképződés során a bpy ligandumsávjának megváltozása kíséri, egyik csúcsa

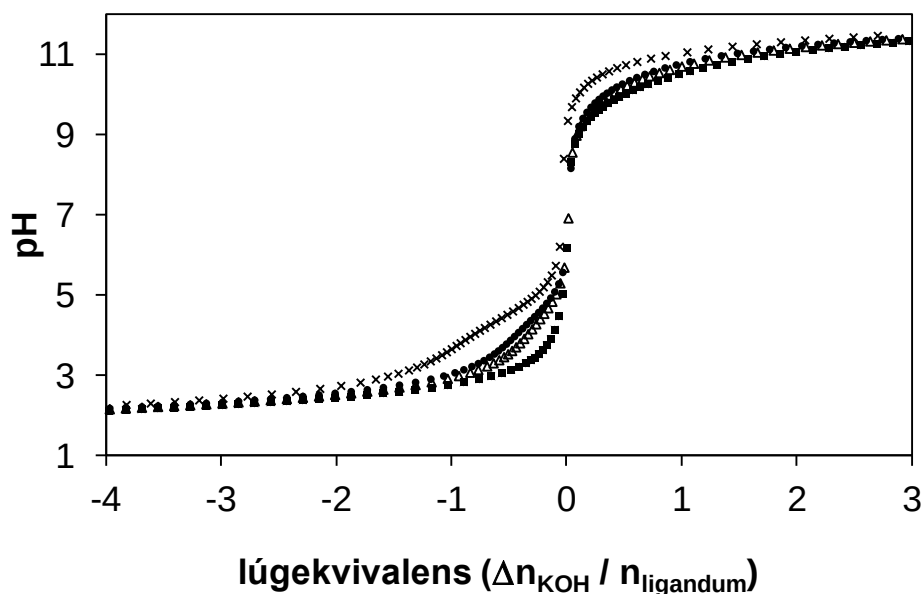
jellegzetesen megkettőződik, illetve a CT-sáv is eltolódik. pH = 7,4-en és 11-en az egyensúly beálltához szükséges idő 10 s alá csökken, azaz igen gyorsan kialakul a komplex. A 4. ábrán látható még, hogy kloridionokat tartalmazó közegben valamivel gyorsabban áll be az egyensúly. Ezek alapján alkalmasnak találtuk a pH-potenciometriás módszert a komplexképződési folyamatok követésére. A RhCp* három koordinációs helye miatt azt várjuk, hogy 1:1 arányú [ML] komplexek képződjenek a kétfogú bpy ligandummal, a harmadik helyre a közegtől és a pH-tól függően víz, kloridion, illetve hidroxidion is koordinálódik.



4. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]\text{-bpy/en}$ rendszerben savas pH-n az idő függvényében felvett UV-látható spektrumok alapján számolt $A/A_{\text{végállapot}}$ görbék. {bpy: pH = 1,90; $c_L = c_M = 100 \mu\text{M}$ (fekete jelölők); en: pH = 3,80; $c_L = c_M = 200 \mu\text{M}$ (lila jelölők); 0,20 M (KCl): $\times$; 0,20 M (KNO_3): $\circ$; Z = $\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}$; T = 25 °C}

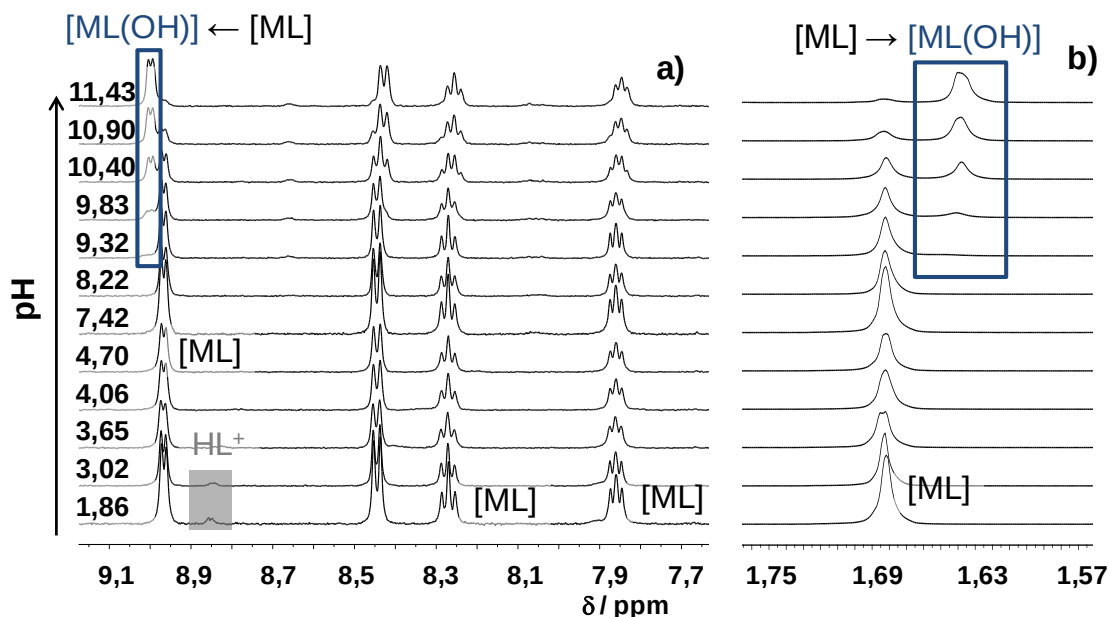
A pH-potenciometriás titrálások során azt tapasztaltuk, hogy teljes a protonok leszorítása a ligandumról a fémionok által pH = 2-n, így a képződő, feltehetően [ML] komplex stabilitási állandóját nem tudtuk meghatározni egyik közegben sem. Ezért pH = 2 alatti tartományban kellett méréseket végeznünk, ahol a pH-mérés már nagyobb hibával terhelt. Ezért UV-látható spektrumokat rögzítettünk pH = 0,7 - 2 között: az ionerősséget állító KNO_3/KCl mennyiségét az egyedi mintákban fokozatosan erős savra cseréltük, az ionerősséget állandó értéken hagyva. pH = 0,7 alatt már az ionerősség nagyobb 0,20 M-nél, így ez volt a legkisebb választott érték. A minták pH-ját itt már csak számolás alapján lehetett meghatározni, a minta erős sav tartalma alapján. Azonban a spektrum a pH csökkentése során nem változik egyik közegben sem a pH = 2-n rögzítettethez képest, azonban eltért az alkotó fémion és ligandum spektrumától, így csak becsült állandót lehet megadni az [ML] komplexre. Ennél a becslésnél abból a feltevésből indulunk ki, hogy ~5%-os disszociációt még nem tudnánk spektrálisan

követni. Az alkalmazott analitikai koncentrációt (100 μM) és a ligandum protonálódási állandóját figyelembe véve, a feltételezett $[\text{ML}]$ komplex stabilitási állandójának logaritmusa legalább 10,5. Ezt az értéket rögzítettük a pH-potenciometriás görbék (reprezentatív példaként a kloridos közegre az 5. ábra) kiértékelésekor, és így határoztuk meg az $[\text{MLH}_{-1}]$ komplex stabilitási szorzatát (3. táblázat). Ez a komplex vegyes hidroxido komplex, a harmadik koordinációs helyen OH^- van.



5. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]\text{-bpy}$ rendszer pH-potenciometriás titrálási görbéi kloridionokat tartalmazó közegben különböző fémion-ligandum arányoknál: $\times$: ligandum; $\bullet$: 1:2; Δ : 1:1,5; $\blacksquare$: 1:1. $\{c_L = 1 \text{ mM}; t = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl)}; Z = \text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}\}$

Az eredmények alátámasztása érdekében $\text{pH} = 2 - 11,5$ tartományban ^1H NMR és UV-látható spektrumokat is vettünk fel.



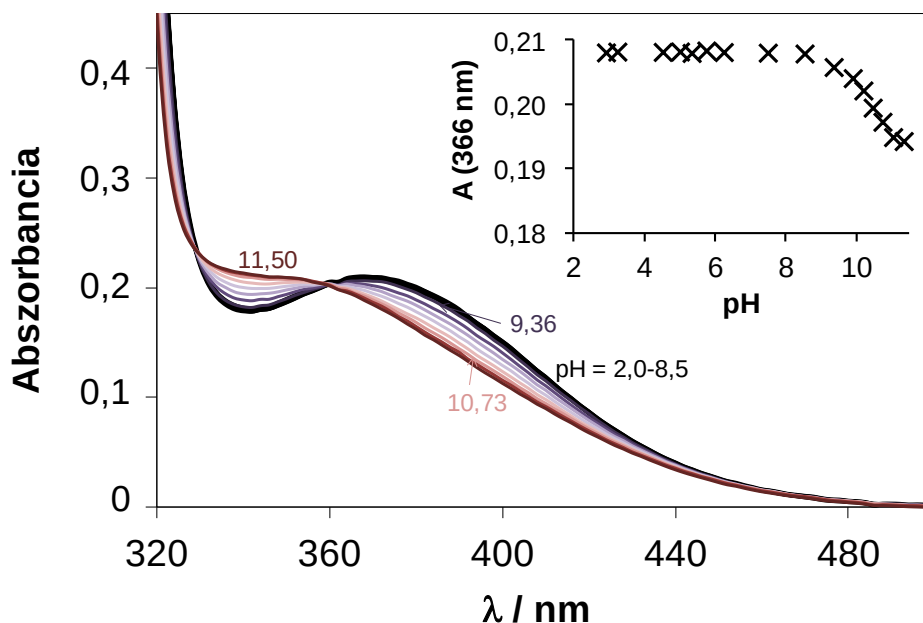
6. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]\text{-bpy}$ rendszer pH-függő ^1H NMR spektrumai kloridionokat tartalmazó közegben az aromás **(a)** és alifás **(b)** régiókban. $\{c_M = c_L = 1 \text{ mM}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl)}; 10\% \text{ (v/v) D}_2\text{O}; Z = \text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}\}$

A ^1H NMR-spektrumok azt mutatták, hogy mindkét közegben csak a kezdeti savas oldatokban ($\text{pH} \sim 2$) volt elhanyagolható mennyiségű szabad ligandum és fémion, mely a kapott viszonylag nagy stabilitási szorzatokkal összhangban van. A ligandum és a fémion szabad és kötött állapotainak jelei jól elkülönülnek egymástól, köszönhetően az NMR-időskálán lassú cserefolyamatoknak. Kloridmentes közegben az $[\text{ML}]$ komplex deprotonálódása jól követhető mind az aromás, mind az alifás jelek pH-függő eltolódásait figyelve, melyből savi disszociációs állandót is tudunk számolni (3. táblázat, $\text{pK}_a[\text{ML}]$). A 6. ábrán látható a kloridos közegben rögzített $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]\text{-bpy}$ rendszer ^1H NMR-spektrumai mutatják, hogy $\text{pH} = 9,32$ felett új jelcsoportok jelennek meg, ami az NMR időskálán lassú cserének felel meg: e jelek biztosan nem a szabad ligandumhoz és fémionhoz tartoznak. Ezen jelcsoportok kémiai eltolódása megegyezik a kloridmentes közeg deprotonálódás utáni jeleinek eltolódásaival, ami jelzi, hogy valószínűleg ugyanaz a részecske jelenik meg mindkét esetben: ez pedig nagy eséllyel az $[\text{ML}(\text{OH})]$ vegyes hidroxido komplex. A jelek alatti területek arányának segítségével szintén meghatározható a deprotonálódási állandó (3. táblázat, $\text{pK}_a[\text{ML}]$).

A kloridmentes közegbeli gyors cserefolyamat a koordinálódott víz deprotonálódását jelzi, míg a kloridos közegben a lassú csere a koordinálódott Cl^- -ok OH^- -ra való közvetlen cseréjére utal. (A $0,20 \text{ M KCl}$ közegben a meghatározott $\lg K'[\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-]$ állandó (ld. később) alapján gyakorlatilag az $[\text{MLZ}]$ komplexben csak kloridionok koordinálnak ($Z = \text{Cl}^-$).) A két

méréssel számolt állandók azonban eltértek kis mértékben, így UV-látható fotometriával is követtük e változásokat.

A pH-függő UV-látható spektrumokon jól követhető ez a deprotonálódásai folyamat; a kloridos közegben nagyobb abszorbancia-változást okozott, mint a kloridmentes közegben. A kloridos közegű spektrumokat a 7. ábrán láthatjuk.

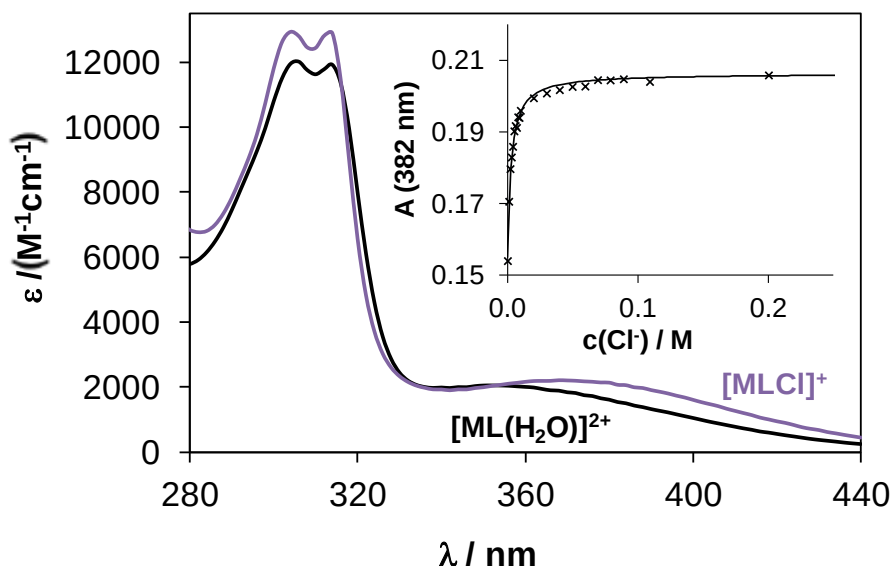


7. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]\text{-bpy}$ rendszer UV-látható spektrumai különböző pH értékeken. A beszűrt ábra a 366 nm-n mért abszorbancia pH-függését mutatja. $\{c_L = c_M = 100 \mu\text{M}; T = 25^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl)}; Z = \text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}\}$

A spektrumokon látható a CT-sáv ($\lambda_{\text{max}} = 366 \text{ nm}$), mely kb. $\text{pH} = 9,3$ felett kezd el a kisebb hullámhosszak felé tolódni. A $\text{pH} = 2,0 - 8,5$ oldatok spektrumainak maximumán mért abszorbancia-változás látható a pH függvényében a beszűrt ábrán, mely egy szigmoidális görbét ír le. Így fotometriás titrálással, mely $\text{pH} = 2\text{--}11,5$ közötti tartományban történt, sikerült meghatározni az $[\text{MLH}_1]$ komplexek stabilitási szorzatát mindkét közegben, a rögzített $[\text{ML}]$ komplex stabilitási állandójának felhasználásával (3. táblázat). Ez igen jó egyezésben van a ^1H NMR-mérésekkel kapott értékekkel. A $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ pK_a -ja 8,5-ként ismert az irodalomban, azonban itt nem tüntették fel a mérési körülményeket [24]. Egy másik közleményben 8,2 értéket találunk 25°C -on és $0,5 \text{ M (NaClO}_4)$ ionerősség mellett [15].

Az eddigi mérések során megfigyelhető a közeg kloridion koncentrációjának oldategyensúlyt befolyásoló szerepe, így a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ komplexekben a víz kloridionra történő cseréjét is jellemeztük. Mivel a kloridokomplex képződése az akva

komplexből jellegzetes spektrális változással jár együtt, ezért különböző kloridion koncentrációk mellett UV-látható spektrofotometriás spektrumokat vettünk fel (8. ábra) olyan pH-n, ahol még az $[MLZ]$ forma a domináns.



8. ábra: A $[RhCp^*(bpy)(H_2O)]^{2+}$ és $[RhCp^*(bpy)Cl]^+$ komplexek egyedi számolt moláris spektrumai. (A spektrumokat a $[RhCp^*(bpy)(H_2O)]^{2+}$ komplex kloridionokkal való titrálásakor kapott UV-látható spektrumok felbontásával számoltuk.) A beszűrt ábra a 382 nm-n mért abszorbania (x) kloridion koncentráció függését mutatja az ezekre illesztett görbével (folyamatos vonal) együtt. {pH = 7,40; $c_L = c_M = 200 \mu M$; $c_{Cl^-} = 0-0,20 M$; $T = 25 \text{ }^\circ C$; $l = 0,5 \text{ cm}$ }

Látható, hogy a kloridokomplex kialakulása során a ligandumsávok moláris abszorbanciája megnő, a CT-sáv a nagyobb hullámhosszak felé tolódik el. A mért spektrumok felbontásával meghatároztuk a $[ML(H_2O)]^{2+} + Cl^- \rightleftharpoons [MLCl]^+ + H_2O$ egyensúlyra vonatkozó $K'[H_2O/Cl^-]$ állandót (3. táblázat). A meghatározott állandó alapján a kloridokomplex képződése igen kedvezményezett. Ez több mint egy nagyságrenddel nagyobb a $RhCp^*$ (O,O) donor hidroxipiron és hidroxipiridinon ligandumok állandóinál [18,19].

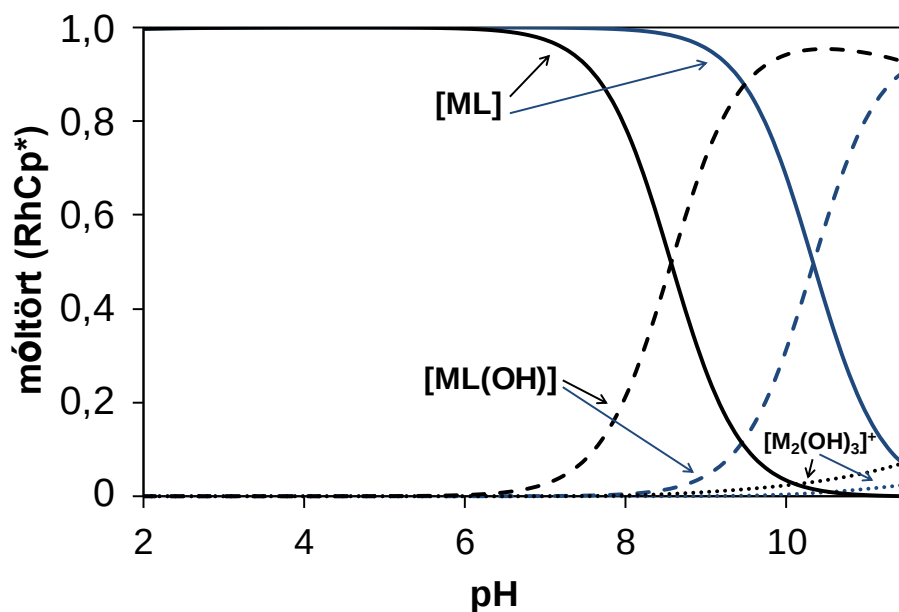
Mivel a meghatározott állandók a három módszer esetében nem teljesen egyeztek, külön-külön is feltüntettük őket a 3. táblázatban, alattuk pedig átlagaikat. (Megjegyzendő azonban, hogy a kloridos közegben kapott állandókat látszólagos állandóknak kell tekintetünk: a kloridion koordinációja miatt ezen stabilitási állandók értékei a kloridion analitikai koncentrációjától függenek.)

3. táblázat: A RhCp*-bpy rendszerben képződő komplexek stabilitási állandói kloridmentes és kloridos közegben (T = 25 °C)

	0,20 M KNO ₃	0,20 M KCl	Módszer	Megjegyzés
pK _a [HL]	4,41 ± 0,02	4,52 ± 0,01 ^a	pH-metria	
lgβ[ML]	≥10,5	≥10,5	UV-látható	egyedi minták, pH = 0,7-2
lgβ[MLH ₋₁]	2,07 ± 0,01 1,89 1,84 ± 0,03 1,93	0,25 ± 0,05 0,11 0,11 ± 0,02 0,16	pH-metria ¹ H NMR UV-látható <i>átlag</i>	lgβ[ML] = 10,5 (rögzítve) = lgβ[ML] – pK _a [ML] titrálás pH= 2-11,5
pK _a [ML]	8,43 8,61 ± 0,02 8,66 8,57	10,25 10,39 ± 0,05 10,39 10,34	pH-metria ¹ H NMR UV-látható <i>átlag</i>	= lgβ[ML] – lgβ[MLH ₋₁] titrálás pH= 2-11,5 = lgβ[ML] – lgβ[MLH ₋₁]
lgK'[H ₂ O/Cl ⁻]	2,58 ± 0,01		UV-látható	pH = 7,40; c _L = c _M = 200 μM

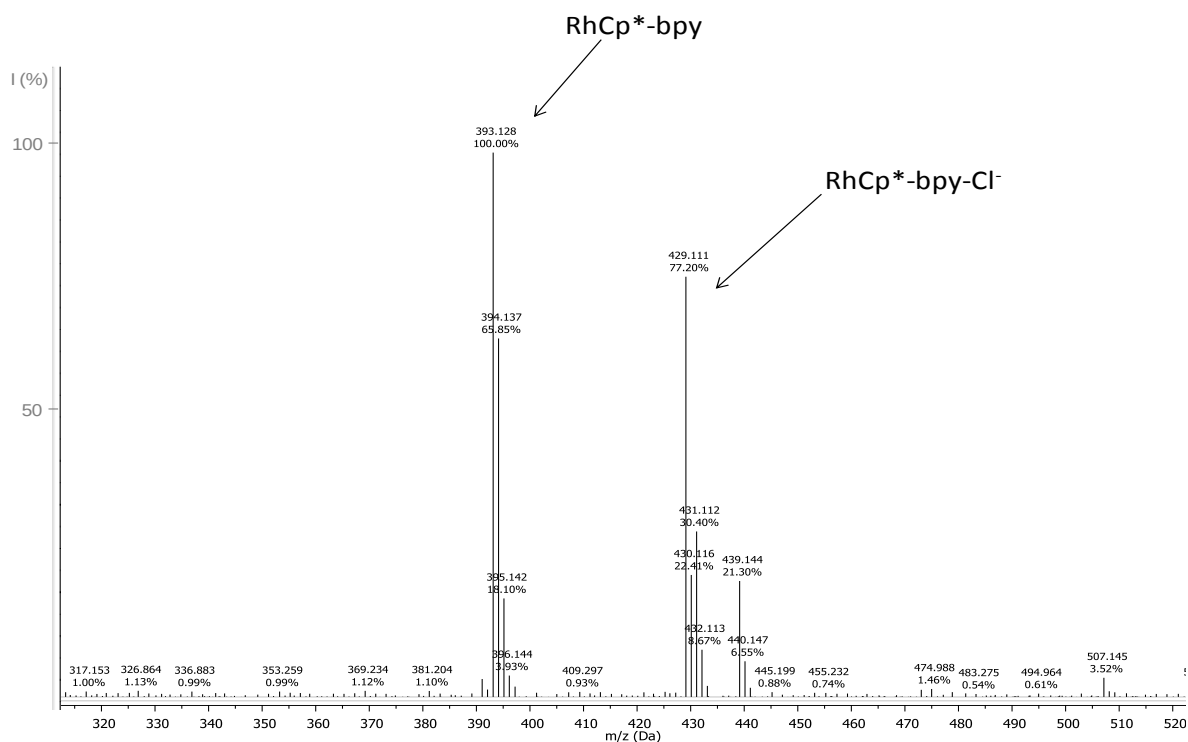
^a: pK_a[HL] = 4,53 ± 0,01 ¹H NMR alapján

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a kloridion jelenléte visszaszorítja a komplex hidrolízisét (az [ML(OH)] komplex képződését); a pK_a értéke majdnem 2 nagyságrenddel kisebb a nitrátos közegben, ahogyan a stabilitási szorzatok alapján számolt koncentrációeloszlási-görbék is igen szemléletesen mutatják a 9. ábrán. A Tanszéken korábban vizsgált ligandumoknál is hasonló trend figyelhető meg [18,19]. A szabad fémion és ligandum jelenléte a teljes vizsgált pH-tartományban (pH = 0,7-11,5) elhanyagolható mind a kétféle közegben. A felhasználás szempontjából (katalízis és gyógyszer) fontos kémhatáson, fiziológiás pH-n az [ML] komplex a domináns részecske mindkét közegben. 1 μM-os analitikai koncentrációja esetén a kapott stabilitási állandók alapján elmondható, hogy 0,20 M KCl közegben 99% [ML] és 1% [ML(OH)]; 0,20 M KNO₃ közegben: 93% [ML] és 7% [ML(OH)] van jelen. Azaz a komplex bomlása még ilyen kis koncentrációknál is elhanyagolható.



9. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]\text{-bpy}$ rendszer koncentrációeloszlási-görbéi kloridionokat tartalmazó (kék vonalak) és kloridion-mentes (fekete vonalak) közegben. A számolás a háromféle kísérleti módszerrel kapott stabilitási állandók átlagaival történt. $\{c_L = c_M = 1 \mu\text{M}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl/KNO}_3)\}$

Kiegészítésként ESI-MS spektrumot vettünk fel fiziológiás pH-n (10. ábra): itt látható, hogy az $[\text{ML}]$ (393 Da) és az $[\text{MLCl}]$ (429 Da) megfelelő jelek vannak a spektrumban, a várakozásunknak megfelelően.



10. ábra: A $\text{RhCp}^*\text{-bpy}$ tömegspektruma $\{\text{pH} \approx 7,4; c_{\text{fém}} = c_{\text{bpy}} = 100 \mu\text{M}; \text{pozitív mód}\}$

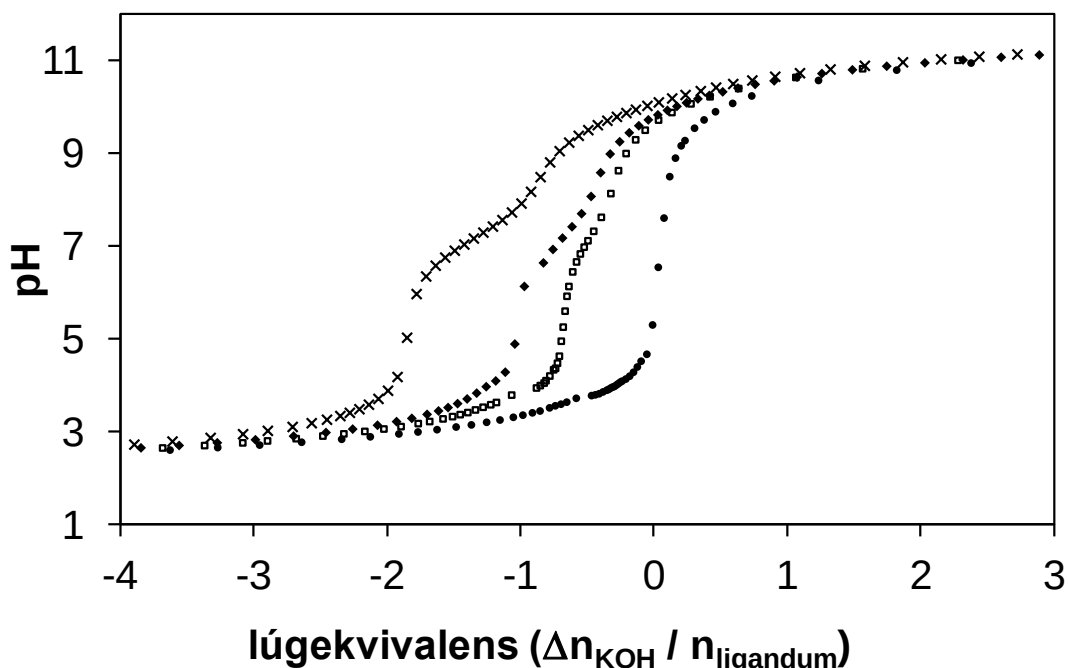
Megjegyzendő azonban, hogy az ESI-MS mérések során a spektrumban koordinált víz és egyéb vegyületek könnyen eltávoznak a fémionok egy részétől, emellett Na^+ , K^+ és Cl^- hozzákapcsolódhatnak egy másikhoz.

5.2 A RhCp^* -en rendszerben képződő komplexek jellemzése

Az en szintén (N,N) donor ligandum, gyenge bázis, két protonálódási állandója van az általunk vizsgált pH-tartományban [36]; az általunk mért proton disszociációs állandók (4. táblázat) jól egyeznek az irodalomban ismertekkel.

A RhCp^* és az en a bpy-hez hasonlóan 1:1 arányú komplexet képez, a harmadik kötőhelyen víz, Cl^- vagy OH^- lehet. Így a $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]$ -en rendszerek is leírhatók $[\text{ML}]$ és $[\text{MLH}_{-1}]/[\text{ML}(\text{OH})]$ típusú részecskék képződésével. A pH-metriás mérések előtt itt is végeztünk tandem küvetás, időfüggő spektrofotometriás méréseket, melyek azt mutatták, hogy semleges és lúgos közegben kevesebb, mint 10 s alatt állandósultak a spektrumok. Viszont pH = 3,8 esetén (4. ábra) ehhez már kloridos közegben ~40 percre, kloridmentesben ~100 percre volt szükség. Az en-nak nincs kromofór csoportja, így ligandumsávok nem figyelhetők meg, azonban a komplexképződés során a RhCp^* CT-sávjának maximuma a kisebb hullámhosszak felé vándorol.

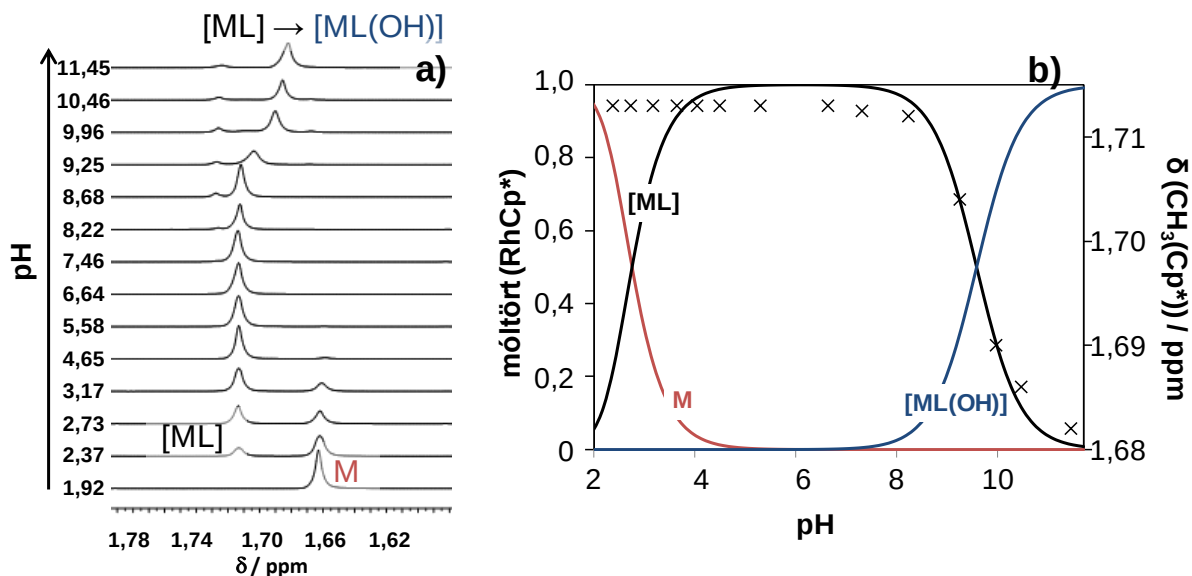
A pH-potenciometriás méréseket az előzetes mérések alapján kézzel kellett végezni, hogy kivárjuk az egyensúly beállását a titrálás savas tartományában. Reprezentatív titrálási görbéket mutat a 11. ábra, 0,20 M KCl ionerősség mellett. A titrálási adatokból az $[\text{ML}]$ komplex stabilitási állandóját sikerült meghatároznunk (4. táblázat), viszont a $\lg\beta[\text{MLH}_{-1}]$ értékét csak nagy hibával tudtunk számolni mind a kétféle közegben.



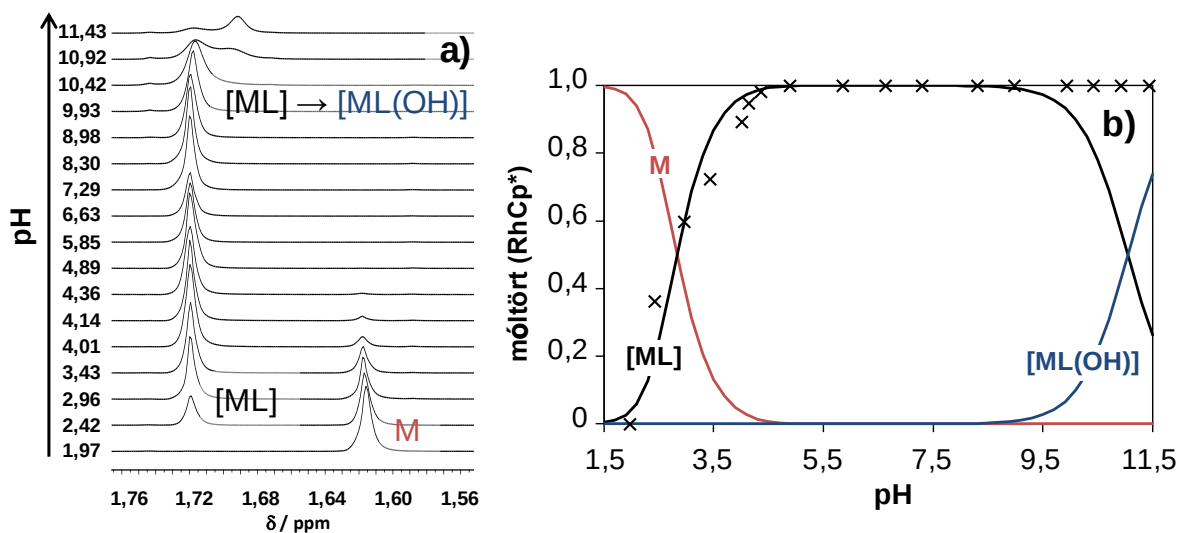
11. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]$ -en rendszer pH-potenciometriás titrálási görbéi kloridionokat tartalmazó közegben különböző fémion-ligandum arányoknál: $\times$: ligandum; $\blacklozenge$: 1:2; $\square$: 1:1,5; $\bullet$: 1:1. $\{c_L = 1 \text{ mM}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl)}; Z = \text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}\}$

Az $[\text{ML}]$ komplex deprotonálódási állandóinak meghatározásához ^1H NMR spektrumokat vettünk fel, $\text{pH} = 2\text{--}11,5$ között. Az NMR spektrumokon jól követhető a komplexképződés: ez mindkét közegben az NMR időskála szerinti lassú cserének számít, mivel a szabad fémion jele jól elkülöníthető a megjelenő komplexben kötött fémion jelétől (12.a és 13.a ábra). A jelek alatti integrálok arányai megadják a részecskék molarányát, ezek jó egyezést mutatnak a pH-potenciometria alapján kapott állandók segítségével számoltakkal (13.b ábra). Eközben a ligandum jele is változást szenved: egy éles csúcsból egy szélesebb multiplett jelenik meg kloridos közegben, míg kloridmentes közegben nem látszik e jel finomszerkezete. A kloridmentes közegben a jelek elvándorolnak $\text{pH} = 8,68 - 11,45$ között, mely folyamat a 12.a ábrán jól nyomon követhető. Kloridos közegben – a $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]$ - bpy rendszerhez hasonlóan – itt is lassú csere történik bázikus pH-n, új jelek jelennek meg a komplex deprotonálódása során (13.a ábra). Valószínűleg ez mindkét esetben a deprotonálódási folyamat: a két közeg végül azonos részecske jeleit mutatja lúgos pH-n, mely metilcsoportjainak jele 1,68-1,69 ppm-nél van (12.b ábra): ez eltér mind a szabad, mind a komplexekben kötött fémion jeleitől. Kloridmentes közegben a jeltolódásból számíthattunk állandót, mely a 4. táblázatban látható. Azonban a kloridos közegben levő $[\text{ML}(\text{OH})]$ jele jelentősen átfed a komplexben kötöttével, illetve a deprotonálódás sem játszódott le teljes mértékben, így erre pK_a -t nem határozhattunk

meg: ezért kloridos közegben UV-látható fotometriás titrálást végeztünk ezen állandó meghatározása céljából.

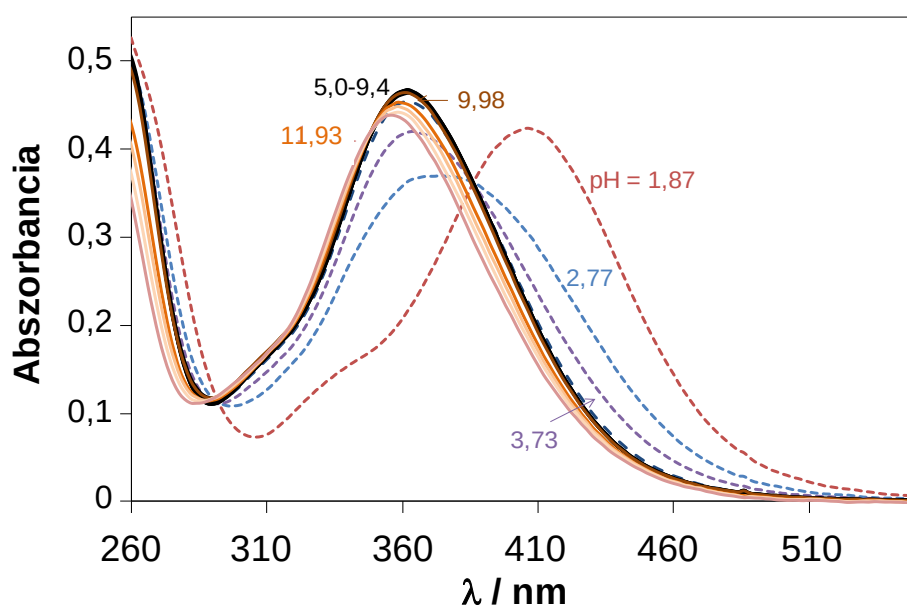


12. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]$ -en rendszer pH-függő ^1H NMR spektrumai a RhCp^* metilcsoportjainak régiójában, kloridion-mentes közegben (a). A $[\text{RhCp}^*(\text{H}_2\text{O})_3]$ -en rendszerre számolt koncentráció-eloszlási görbék és a komplexben kötött RhCp^* ($[\text{ML}]$ és $[\text{ML}(\text{OH})]$) metilcsoportjainak kémiai eltolódása (x) (b). $\{c_{\text{M}} = c_{\text{L}} = 1 \text{ mM}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KNO}_3\text{); 10\% (v/v) D}_2\text{O}\}$



13. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]$ -en rendszer pH-függő ^1H NMR spektrumai a RhCp^* metilcsoportjainak tartományában, kloridionokat tartalmazó közegben (a). $\{c_{\text{M}} = c_{\text{L}} = 1 \text{ mM}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl); 10\% (v/v) D}_2\text{O}; Z = \text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}\}$ A komplexben kötött RhCp^* ($[\text{ML}]$ és $[\text{ML}(\text{OH})]$) metilcsoportjainak NMR csúcsintegráljai alapján (x) és a stabilitási szorzatok segítségével (folytonos vonalak) számolt koncentráció-eloszlási görbék (b).

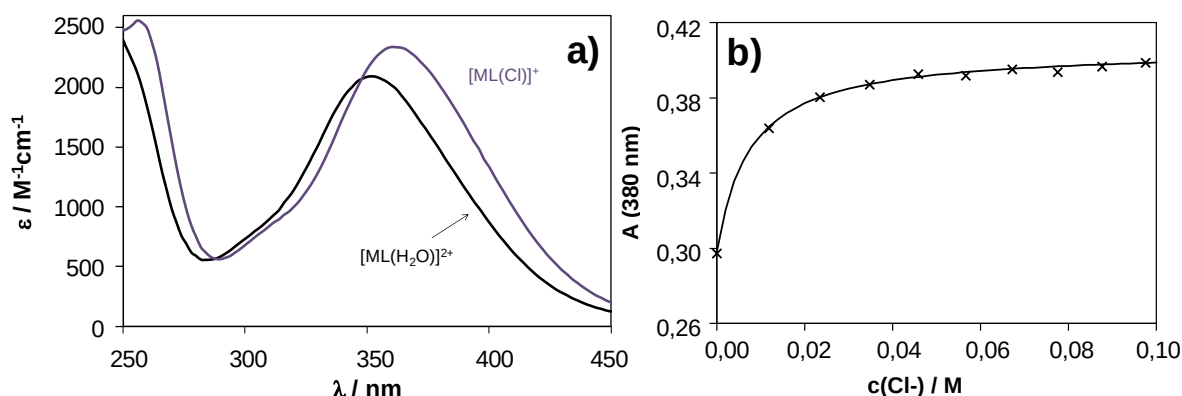
A pH-függő UV-látható spektrumokban a CT-sáv változását követhetjük nyomon a komplexképződés és a deprotonálódás során. Az 14. ábrán látható, hogy az első folyamat (komplexképződés) jóval nagyobb változást okoz a spektrumban. Azonban így is elegendő a spektrális változás a $pK_a[ML]$ állandó meghatározásához. Ehhez $pH \approx 12$ -ig vettünk fel pH-függő spektrumokat. Az állandó $pK_a = 11,05$ -nek adódott, szemben a kloridmentes közegben kapott 9,58-as értékkel, azaz a kloridionok a $RhCp^*$ -en rendszerben is jelentősen visszaszorítják az $[ML]$ komplex deprotonálódását.



14. ábra: A $[RhCp^*(Z)_3]$ -en rendszer ($Z = Cl^-/H_2O$) UV-látható spektrumai különböző pH értékeken.

$\{c_L = c_M = 200 \mu M; T = 25^\circ C; I = 0,20 M (KCl); l = 1 cm\}$

A komplexek két közegben kapott állandóit befolyásolja a kloridionok analitikai koncentrációja, így fontos volt itt is megállapítani a $[RhCp^*(bpy)(H_2O)]^{2+}$ komplexekben a víz Cl^- -ra történő cseréjét jellemző állandót. Ez spektrális változással jár együtt, így UV-látható spektrofotometriás titrálást végeztünk, a $c_{(Cl^-)} = 0-0,5 M$ közötti tartományban. A $[RhCp^*(en)(H_2O)]^{2+}$ és $[RhCp^*(en)Cl]^+$ komplexek számolt moláris abszorbancia görbéit a 15. ábrán mutatjuk. A kloridokomplex képződése kismértékben a nagyobb hullámhossz-tartomány felé tolja a CT-sáv maximumát ($352 nm \rightarrow 362 nm$), emellett maximumának moláris abszorbanciája is megnő. Külön jellegzetessége a kloridos spektrumnak $256 nm$ -nél egy sávmaximum, mely a kloridmentes közegbeli spektrumtól eltérés.



15. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ és $[\text{RhCp}^*(\text{en})\text{Cl}]^+$ komplexek egyedi számolt moláris spektrumai (a). (A spektrumokat a $[\text{RhCp}^*(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ komplex kloridionokkal való titrálásakor kapott UV-látható spektrumok felbontásával számoltuk.). A 380 nm-n mért abszorbania (x) kloridion koncentráció függése az illesztett görbével (folyamatos vonal) együtt (b). {pH = 7,40; $c_L = c_M = 200 \mu\text{M}$; $c_{\text{Cl}^-} = 0-0,50 \text{ M}$; T = 25 °C; l = 1 cm}

A 4. táblázatban láthatók a $\text{RhCp}^*\text{-en}$ rendszerben képződő komplexekre meghatározott állandók.

4. táblázat: A $\text{RhCp}^*\text{-en}$ rendszerben képződő komplexek stabilitási állandói kloridmentes és kloridos közegben (T = 25 °C)

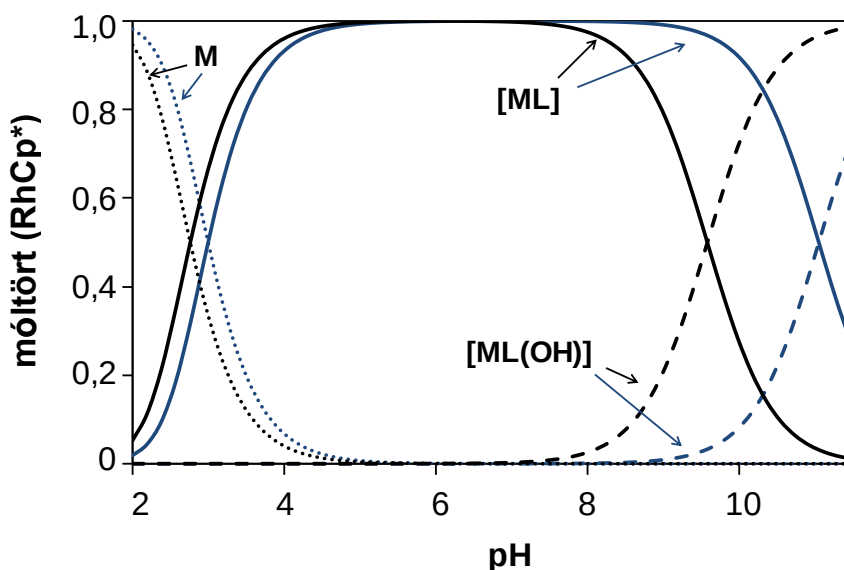
	0,20 M KNO_3	0,20 M KCl	Módszer	Megjegyzés
$\lg\beta[\text{HL}]$	$10,01 \pm 0,01$	$9,98 \pm 0,01^a$	pH-metria	
$\lg\beta[\text{H}_2\text{L}]$	$17,26 \pm 0,01$	$17,17 \pm 0,01^a$	pH-metria	
pK_1	7,25	7,19 ^a		
pK_2	10,01	9,98 ^a		
$\lg\beta[\text{ML}]$	$15,04 \pm 0,05$	$14,48 \pm 0,01$	pH-metria	
$\lg\beta[\text{MLH}_{-1}]$	5,46	-	^1H NMR	$= \lg\beta[\text{ML}] - \text{pK}_a[\text{ML}]$
	-	3,43	UV-látható	$= \lg\beta[\text{ML}] - \text{pK}_a[\text{ML}]$
$\text{pK}_a[\text{ML}]$	$9,58 \pm 0,02$	-	^1H NMR	titrálás pH= 2-11,5
	-	$11,05 \pm 0,01$	UV-látható	titrálás pH= 2-11,5
$\lg K_{\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-}$	$2,14 \pm 0,01$		UV-látható	pH = 7,40 ; $c_L = c_M = 200 \mu\text{M}$

^a: ^1H NMR alapján: $\lg\beta[\text{HL}] = 10,04 \pm 0,01$; $\lg\beta[\text{H}_2\text{L}] = 17,25 \pm 0,01$, $\text{pK}_1 = 7,21$; $\text{pK}_2 = 10,04$

A mért spektrumok kiértékelésével meghatározott $\lg K'[\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-]$ (4. táblázat) alapján a kloridokomplex képződése ennél a komplexnél is kedvezményezett. A vérérumban, ahol $c_{\text{Cl}^-} = \sim 103 \text{ mM}$, a $[\text{RhCp}^*(\text{en})]^{2+}$ komplex 94%-a kloridokomplex, és csak 7% az akva komplex, míg ugyanez a $[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$ esetében 97% és 3%. Ha feltételezzük, hogy az akva komplex az aktív részecske a hidrid-transzfer és citotoxikus folyamatokban, akkor kijelenthető, hogy a közeg kloridion-koncentrációja tényleg lényeges e komplexek hatékonyságában.

A Tanszéken korábban vizsgált $[\text{RhCp}^*(\text{maltol})]^+$ és $[\text{RhCp}^*(\text{dhp})]^+$ (dhp = deferipron) komplexek esetében $\lg K'[\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-]$ állandó kisebbnek adódott, és rákellenes aktivitásuk is nagyobb volt [18]. A $[\text{RhCp}^*(\text{pic})]^+$ (pic = pikolinsav) kloridion-affinitása szintén nagy, és ez is csak kismértékű biológiai aktivitást mutat az en és bpy komplexekhez hasonlóan.

A meghatározott stabilitási állandókkal számolt koncentrációeloszlási-görbék (16. ábra) jól mutatják a kloridionok hatását, illetve összehasonlítva a 9. ábrával azt is, hogy az en [ML] komplexének hidrolízise nagyobb pH-n következik az azonos közegű bpy-komplexhez képest.

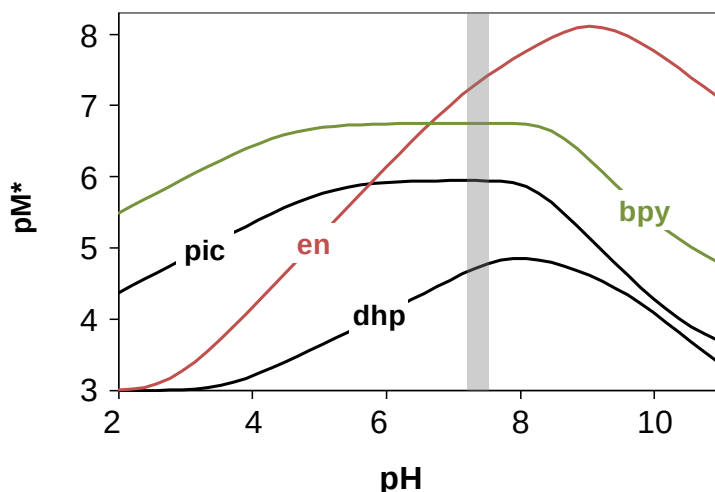


16. ábra: A $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]\text{-en}$ rendszer koncentrációeloszlási-görbéi kloridionokat tartalmazó (kék vonalak) és kloridion-mentes (fekete vonalak) közegben. A számolás a háromféle kísérleti módszerrel kapott stabilitási állandók átlagaival történt. $\{c_L = c_M = 1 \mu\text{M}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl/KNO}_3)\}$

Fiziológias pH-n itt is az [ML] komplex az uralkodó részecske, $1 \mu\text{M}$ koncentrációja esetén a kapott stabilitási állandók alapján elmondható, hogy $0,20 \text{ M KCl}$ közegben 100% [ML], míg $0,20 \text{ M KNO}_3$ közegben 99% [ML] és 1% [ML(OH)] van az oldatban. Azaz a komplex disszociációja a biológiailag releváns koncentrációknál elhanyagolható.

5.3 A RhCp* bpy és en ligandumokkal képzett komplexek összehasonlítása a stabilitás szempontjából és összevetése más típusú ligandumokkal

Az eltérő bázicitású ligandumok fémkötő sajátságát jól szemléltethetjük pM értékek számolásával. Minél nagyobb az adott körülmények között számolt pM érték, annál stabilisabb komplexek képződnek. A RhCp* esetén a ligandumhoz nem kötött frakcióhoz nemcsak a szabad M fémion tartozik, hanem a $[M_2H_2]$ és $[M_2H_3]$ hidrolízis részecskék is, így ezek összegzett egyensúlyi koncentrációját számoltuk ($=pM^*$). A 17. ábrán a két (N,N) donor ligandummal képzett komplex mellett a Tanszéken két korábban vizsgált ligandumot is feltüntetünk, ahol a dhp egy (O,O) donor hidroxipiridinon-származék, illetve a pic egy (N,O) donor ligandum [18,19]. Az ábra mutatja, mennyi a szabad (nem kelátkomplexben kötött) fémion mennyisége a pH függvényében. Látható, hogy a dolgozatomban vizsgált két ligandum köti a legnagyobb fémion-mennyiséget. Az en a bpy-nél és a pic-nél magasabb pH-kon kezdi meg a komplexképzést, azonban a semleges-lúgos tartományban, azaz szürkével jelölt fiziológiás pH-n (~7,4) is, az en már meghaladja a többi ligandum által megkötött mennyiséget; azonban figyelembe kell venni, hogy a RhCp*-bpy komplex esetén a stabilitási állandónk minimum határértékét használtuk.



17. ábra: A $[RhCp^*(Z)_3]$ -ligandum (1:1) rendszerekre számolt pM^* értékek pH-függése kloridionokat tartalmazó közegben. $pM^* = [M] + [M_2H_2] + [M_2H_3]$ { $c_L = c_M = 1$ mM; $T = 25$ °C; $I = 0,20$ M (KCl); $lg\beta[ML]$ becsült minimumérték a RhCp*-bpy komplexnél}

5.4 A két általunk vizsgált komplex kötődése humán szérum albuminhoz

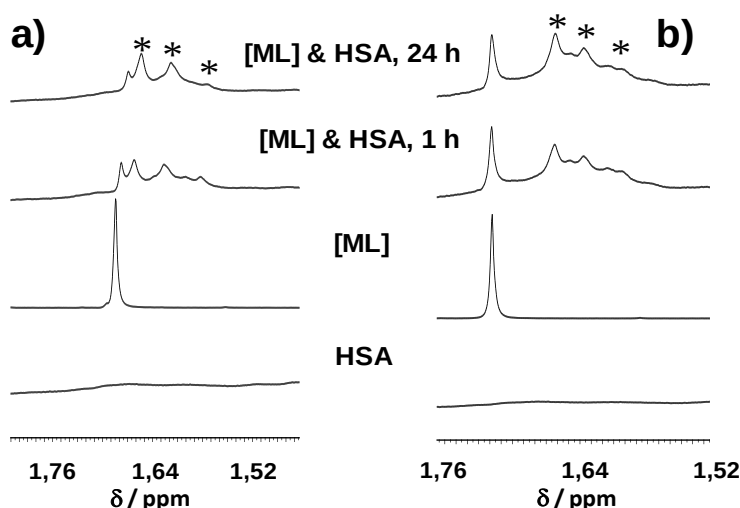
Modellfehérjénk a humán szérum albumin (HSA), melynek fémkötő képessége jelentős, hiszen ez a vérben a legnagyobb koncentrációban található szállítófehérje. Ez a fehérje felelős a tápanyagok és gyógyszerek szállításáért a vérben. Szerepe két okból is fontos: a gyógyszermolekulák és fémkomplexek a HSA-n való kötődésükkel tovább keringenek a vérben, lassabban távoznak a vérből. Másodrészt a rákos sejtek környezetében – részben fokozott anyagcseréjük következtében – több albumin halmozódik fel, így a rákellenes szerek fontos transzportfehérjéje. Három hidrofób kötőhelye és számos fémkötő része is van [31].

Az albuminhoz való kötődést vizsgáltuk globálisan és kötőhely-specifikusan. A fehérjékhez való kötődés jellege gyakran másodlagos kölcsönhatás, de fémionok, fémkomplexek esetén koordinatív kötésen is alapulhat.

Bár az általunk vizsgált fémkomplexek rákellenes hatása csekély, úgy gondoljuk, a szerkezetileg hasonló, biológiailag aktív fémkomplexeknek megfelelő modelljei lehetnek a HSA-nal való kölcsönhatásuk szempontjából; másrészt ennek a kölcsönhatásnak a vizsgálata hozzájárulhat inaktivitásuk megértéséhez.

5.4.1 A HSA-hoz való kötődés globális vizsgálata

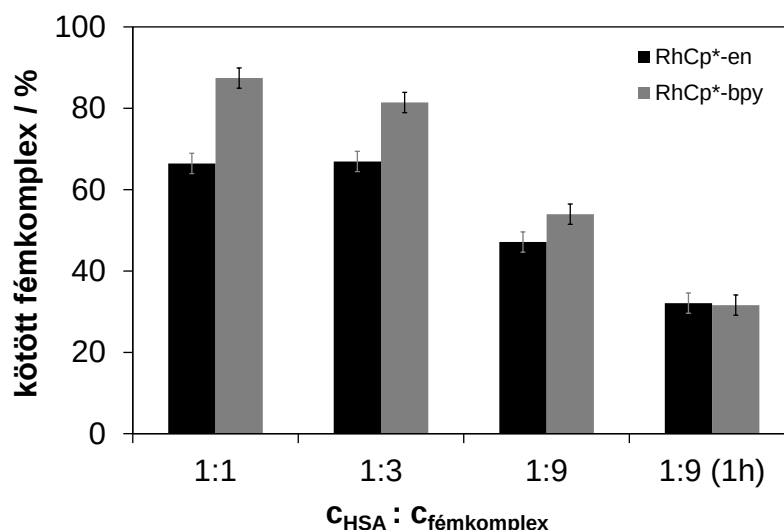
Mindkét komplexünk tájékozódó méréséhez felvettünk egy-egy ^1H NMR spektrumot HSA jelenlétében, hogy lássuk, van-e egyáltalán kölcsönhatás közöttük (18. ábra).



18. ábra: A RhCp* bpy (a) és en (b) ligandumokkal képzett [ML] komplexeinek ^1H NMR spektrumai a HSA jelen-, ill. távollétében és a HSA spektruma önmagában fiziológias körülmények között. $\{c_L = c_M = 1 \text{ mM}; c_{\text{HSA}} = 0,5 \text{ mM}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40 \text{ (PBS* puffer)}\}$

A 18. ábrán látható spektrumok alapján, ahol összehasonlítjuk a fémkomplexek spektrumait az albumin jelen- és távollétében, feltételezhető a kölcsönhatás: a Cp* metilcsoportjainak jelei megsokszorozódtak (*-gal jelölve), azaz különböző kémiai környezetbe került a fémionok egy része. Az egyórás spektrumok kis mértékben térnek el a 24 órástól: arányaiban csökkennek a csak fémkomplexben kötött fémionok mennyiségei, azonban nem kötődtek a fehérjéhez 100%-ban. A közeg a vérérszér pH-jával és kloridion-koncentrációjával megegyezik. A koncentráció-eloszlási görbék (9. és 16. ábra) alapján elmondható, hogy a fémkomplex gyakorlatilag $[MLCl]^+$ formában van jelen ilyen körülmények között, a szabad fémion és ligandum mennyisége elhanyagolható. A RhCp*-en HSA jelenlétében felvett 1H NMR-spektrumán látható a szabad ligandum jele, mely jelzi a fémkomplex disszociációját a fehérjéhez való kötődés során. A RhCp*-bpy komplex esetén nemcsak a RhCp*, hanem a ligandum jelein is látszódik kötődés, azonban ebből nem állapítható meg, hogy ez fehérjéhez kötött szabad vagy fehérjéhez kötött fémkomplexben levő ligandum. Úgy gondoljuk, hogy a RhCp*-bpy/en komplexek maguk is kötődnek a fehérjéhez, mivel a fémion protonjai több jelet is adnak, melyek a két fémkomplex esetén eltérnek egymástól, illetve a RhCp*-HSA rendszerben mért jelektől is (ezt nem mutatjuk).

Mivel tapasztaltunk kötődést, ultraszűréssel megvizsgáltuk ennek mértékét különböző HSA:fémkomplex arányok mellett. Méréseink során UV-látható spektrofotometria segítségével mértük a kis molekulatömegű (LMM)-frakció fémkomplex-tartalmát. Ennek eredményét a 19. ábra mutatja.



19. ábra: A $[RhCp^*(bpy)]^{2+}$ (szürke) és a $[RhCp^*(en)]^{2+}$ (fekete) komplexek kötődésének aránya százalékban, ultraszűrés után. $\{C_{HSA} = 50 \mu M; C_{ML} = 50 \mu M, 150 \mu M \text{ és } 450 \mu M; T = 25 \text{ } ^\circ C; t = 24 \text{ h}; pH = 7,40 \text{ (PBS* puffer)}; l = 1 \text{ cm}; t_{szűrés} = 6 \text{ min}\}$

Előzetesen megvizsgáltuk, hogy a fémkomplexek milyen mértékben jutnak át a szűrőn: ez mindkét esetben 95%-nál több volt. A mintákat 24 órán át inkubáltuk, illetve 1:9 aránynál egyórás mintákat is vizsgáltunk. Lehet, hogy nem állt be a termodinamikai egyensúly a mintákban még 24 óra után sem, azonban egy napnál hosszabb inkubálási időt nem érdemes vizsgálni, mivel a fehérjeoldat nem stabil és a további várakozás biológiailag sem releváns.

Egy óra után, 1:9 arány esetén még közel azonos ($\sim 1/3$) arányú kötődés tapasztalható a két komplexnél, azonban 24 óra után ez 54% és 47%-ra nő a bpy- és az en-komplexnél. Ez azt jelenti, hogy legalább négy-öt kötőhely található a HSA-n e komplexek számára. Látható, hogy több fémkomplex kötődik meg a fehérje arányának növelésével, 1:1 aránynál már a RhCp*-en komplex 66%-a, míg a RhCp*-bpy komplex 87%-a van kötve.

A RhCp*-en komplexéből mindegyik aránynál kevesebb kötődött meg, mint a RhCp*-bpy komplexből: ez köszönhető az előbbi nagyobb fokú inertségének is. Az UV-látható spektrumoknál mért szabad ligandum mennyiséget sajnos nem lehet követni ezzel a módszerrel, mivel az en nem tartalmaz kromofór részt. A bpy LMM-frakciójában felvett spektrumok sem utalnak szabad ligandum jelenlétére, mely azt jelentheti, hogy [ML] komplexként kötődött a HSA-hoz; de emellett elképzelhető az is, hogy mégis disszociál, és a ligandum és a fémion külön-külön megkötődött a fehérje más-más kötőhelyein.

A kutatócsoportunkban mások már megmérték a szabad fémion (RhCp*) HSA-hoz való kötődését: itt még az 1:9 aránynál is közel 100%-os kötődés volt jellemző, azaz e két (N,N) ligandum nagymértékben visszaszorítja kötődési képességét. Ezen felül az (O,O) típusú dhp és (N,O) típusú pic komplexei is nagyobb arányú kötődést mutattak, bár ezeknél jellemző volt a disszociációbilis kötődés, akárcsak kismértékben az en-nál [18].

5.4.2 A HSA-hoz való kötődés kötőhely-specifikus vizsgálata

Mivel négy-öt kötőhellyel biztos alakít ki kölcsönhatást a dolgozatomban vizsgált két fémkomplex, bizonyos részben [ML] formában, ezért érdemes megvizsgálni, hogy a HSA két hidrofób kötőhelyre (I. és II.) kötődnek-e: mivel ezekben található aromás (Cp*, illetve bpy) rész, melyekkel másodlagos (stacking és diszperziós) kölcsönhatás alakítható ki, ennek nagy a lehetősége. Kötődésük arányát spektrofotometriás mérésekkel közvetetten megmérhetjük, kötőhely-markerek segítségével.

Az I. kötőhely kioltásos („kvencselés”) mérésével és a WF kötőhely-marker kompetíciós vizsgálatával történt. A kioltásos méréseknél, ahol az alkalmazott 295 nm-es gerjesztéssel az I. kötőhelyen lévő Trp-214 aminosavat gerjesztjük szelektíven, kiderült, a bpy önmagában is

kötődik a HSA-hoz, és a kötőhely-markerekhez hasonlóan a HSA-bpy komplex fluoreszcenciája is nagyobb intenzitású (170%-a) a fehérje-oldathoz képest. Ha a RhCp*-bpy komplex disszociáltan kötődik a fehérjéhez, a bpy intenzitás-növelő hatása a RhCp* hatását ellensúlyozhatja, így e mérési módszer nem képes megbízható eredményt adni e komplex kötődésével kapcsolatban. A két fémkomplex egynapos inkubációs idő után, tízszeres felesleg esetén sem mutatott számottevő kölcsönhatást az I. kötőhellyel a kioltásos kísérlet szerint, mivel az intenzitáscsökkenés 2% a bpy és 8% az en esetében (5. táblázat).

5. táblázat: A spektrofotometriás módszerekkel mért intenzitások arányai százalékban [$F_0 = F_{\text{HSA}}$ (kvencselésnél), $F_0 = F_{\text{HSA-marker}}$ (markereknél)] { $c_{\text{HSA}} = c_{\text{marker}} = 1 \mu\text{M}$, $c_{\text{fémkomplex}} = 10 \mu\text{M}$; $T = 25^\circ\text{C}$; $t = 10 \text{ min}$; $\text{pH} = 7,4$ (PBS*); $l = 1 \text{ cm}$ }

$F_{\text{mért}}/F_0(\%)$	$\lambda_{\text{EM}}(\text{nm})$	$[\text{RhCp}^*(\text{en})]^{2+}$	$[\text{RhCp}^*(\text{bpy})]^{2+}$	RhCp*	Bpy
kvencselés	340	92 (24h)	98 (24 h)	4	170
WF kiszorítás ^a	380	79	67	16	-
DG kiszorítás ^a	470	111	95	14	-

^a: A szabad WF és DG is emittál önmagában, ez 16% és 4% a HSA-kötőhely-marker 1:1 arányú oldatához képest

A kinetikai mérések nem mutattak a kioltásos módszernél nagymértékű emissziós intenzitásarány-változást, így feltételeztük, hogy a kötőhely-markerek kiszorításához elegendő a tízperces inkubálási idő, mivel a másodlagos diszperziós kölcsönhatások kialakulása gyors folyamat. A kötőhely-markerek kiszorításos mérések azon alapulnak, hogy a marker emissziós intenzitása sokszorosára nő a fehérjéhez való kötődés során és ennek megfelelően a marker emissziós intenzitása sokszorosára nő a fehérjéhez való kötődés során és ennek megfelelően a marker kiszorítása intenzitás csökkenéssel jár. A WF- és DG kiszorításos méréseknél látszódik, hogy az intenzitáscsökkenés jóval kisebb mértékű a szabad fémionéhoz képest. A DG esetében, mely a II. hidrofób kötőhelyről ad információt, csekély mértékű kölcsönhatás mutatkozik (5. táblázat).

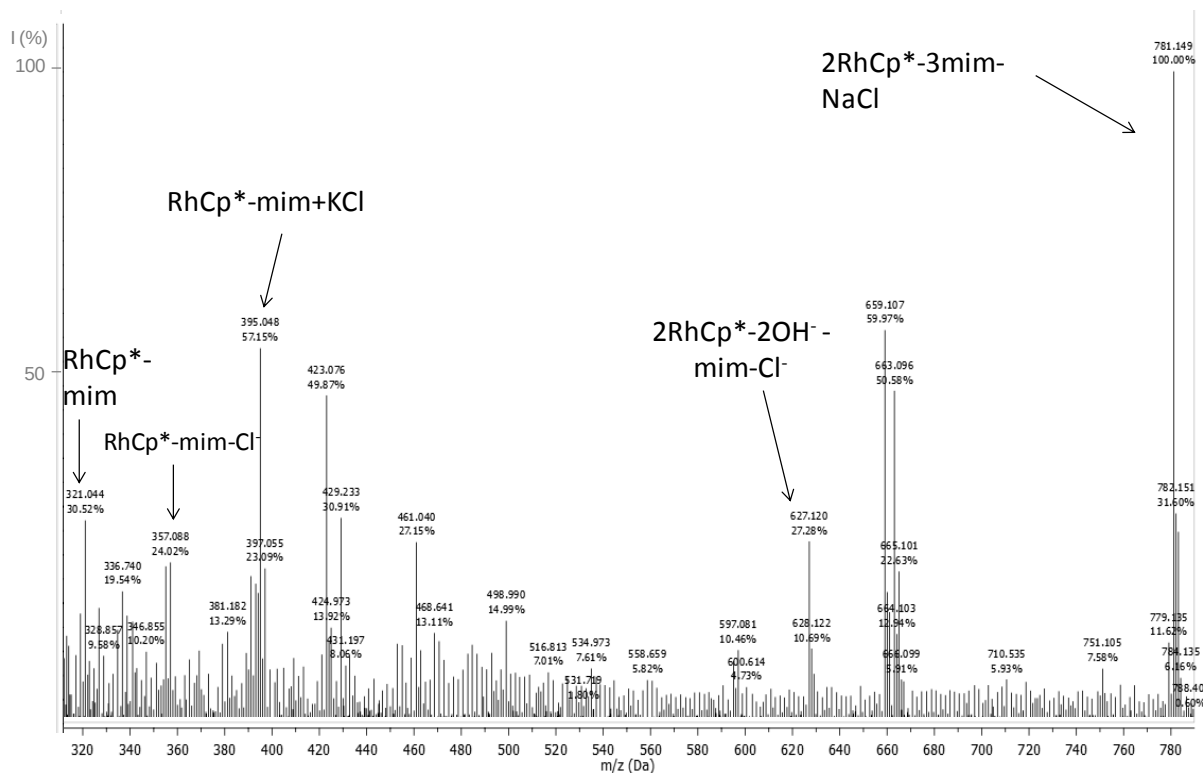
Összességében megállapítható, hogy elsősorban nem ezen hidrofób kötőhelyeken kötődnek meg a dolgozatban vizsgált fémkomplexek, szemben a szabad fémionnal, mely gyakorlatilag teljesen kiszorította a WF-t az I. kötőhelyről. Így a fehérjét alkotó aminosavak oldalláncaiból kialakuló fémkötő-helyek a lehetséges kötőhelyek e két fémkomplex esetén.

Ehhez kapcsolódóan már az irodalomban találtunk mérési eredményeket: a bpy-komplex hidridtranszfer-aktivitásának csökkenését vizsgálták aminosavakkal, azonban ott nem csak az

oldalláncok, hanem a karboxil- és aminocsoportok is koordinálódhattak. A hisztidin, a triptofán, a metionin és a cisztein is viszonylag jelentős aktivitás-csökkenést okozott [24].

Vizsgálatunk során a következő kötőhely-modelleket használtuk: 1-metilimidazolt (mim) a *hisztidin*, N-acetil-L-cisztein-metilésztert (cys^+) a *cisztein*, etil-3-(metiltio)-propionátot (tio1) és N-acetil-L-metionint (tio2) a *metionin* oldalláncának modellezésére. ^1H NMR-spektroszkópiásan vizsgáltuk a RhCp^* , $\text{RhCp}^*\text{-en}$ és a RhCp^*bpy komplexek kölcsönhatását ezekkel a kötőhely-modellekkel. Ha a kötőhely-modellek jelenlétében megkapjuk a szabad ligandum jelét és emellett olyan komplexek jeleit, melyek RhCp^* kötőhely-modell törzskomplexekre utalnak, akkor egyértelmű, hogy disszociált az eredeti fémkomplex. Az összehasonlításhoz ezért a RhCp^* és a kötőhely-modellek spektrumainak felvétele is lényeges, bár ezen törzrendszer teljes megismerése nem célja a dolgozatunknak.

A fémion és a modell-ligandumok minden esetben komplexeket képeztek az alkalmazott 1:1 aránynál, de igen összetett rendszereket mutattak: pl. a mim esetében a fémion legalább három különböző kémiai környezetben van az ^1H NMR spektrum alapján. A 20. ábra a $\text{RhCp}^*\text{-mim}$ rendszer ESI-tömegspektrumát mutatja, melyen több intenzív csúcs is van, köztük többek közt a $\text{RhCp}^*\text{-mim}$ 1:1 (395 Da), 2:1 (427 Da) és 2:3 (781 Da) arányú komplexeire is utalnak a jelek.



20. ábra: A $\text{RhCp}^*\text{-mim}$ rendszer ESI-MS spektruma $\{c_{\text{fém}} = c_{\text{mim}} = 100 \mu\text{M}$; pH = 7,4; pozitív mód}

Az ^1H NMR spektrumok részletes tanulmányozásával megállapítottuk, hogy a tio1-nél jól követhető az észtercsoport bekötődése is; a tio2 komplexnél sajnos a nem védett karboxil-csoport is koordinálódik, azaz nem ideális modelljei a metioninnak. A cys^+ a várttal ellentétben igen kis mértékben koordinálódott, melynek lehetséges oka a ligandum tiolcsoportjának oxidálódása, melyet intenzív argonozással és a törzsoldatának savas pH-n tartásával próbáltunk megakadályozni.

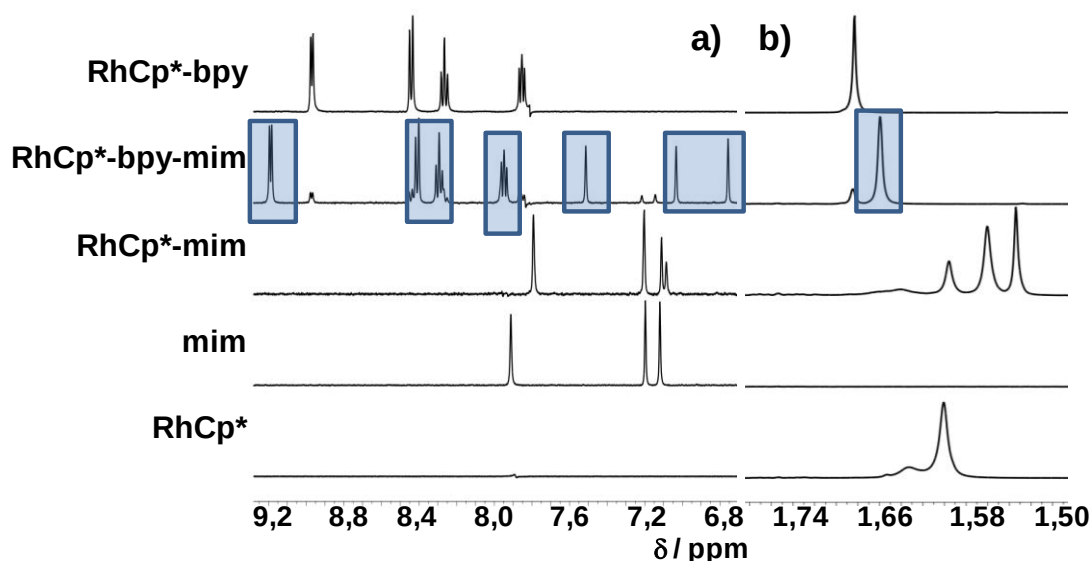
A vártak megfelelően detektáltuk vegyes komplexek képződését mindegyik kötőhely-moddal, azonban a RhCp^* -en komplex a két tioéterrel nem reagált egynapos inkubációt követően sem. Ez a már tapasztalt inertséget támasztja alá. A 6. táblázatban van feltüntetve a RhCp^* százalékos megoszlása a RhCp^* / (N,N)-ligandum / kötőhely-modell terner rendszerekben. Látható, hogy a mim-lal a legkedvezményezettebb a vegyes komplex képződése mindkét komplex esetén (86% és 73%), illetve a cys^+ itt is csekély reaktivitást mutat (<10%): a RhCp^* -en- cys^+ rendszerben RhCp^* - cys^+ és szabad en jelenik meg egynapi inkubáció során, azonban vegyes komplex nem. Ez utalhat tisztán képződésére, mely szterikus okoknál fogva a tapasztalatokat részben magyarázhatná.

6. táblázat: A RhCp^* -bpy/en komplexek kölcsönhatása a fehérjemodellekkel ^1H NMR alapján (a jelek alatti integrálok arányai) {A = (N,N) ligandum (en / bpy); B = fehérjemodell ligandum (mim / cys^+ / tio1 / tio2); $C_{\text{komplex}} = C_{\text{fehérjemodell}} = 0,75 \text{ mM}$; $t=24 \text{ h}$; $\text{pH} = 7,40$; 10% (v/v) D_2O }

	RhCp^* -A	RhCp^* -B	RhCp^* -A-B
RhCp^* -bpy-mim	14%	0%	86%
RhCp^* -en-mim	21%	6%	73%
RhCp^* -bpy- cys^+	92%	0%	8%
RhCp^* -en- cys^+	95%	5%	0%
RhCp^* -bpy-tio1	77%	10%	13%
RhCp^* -en-tio1	100%	0%	0%
RhCp^* -bpy-tio2	67%	0%	33%
RhCp^* -en-tio2	100%	0%	0%

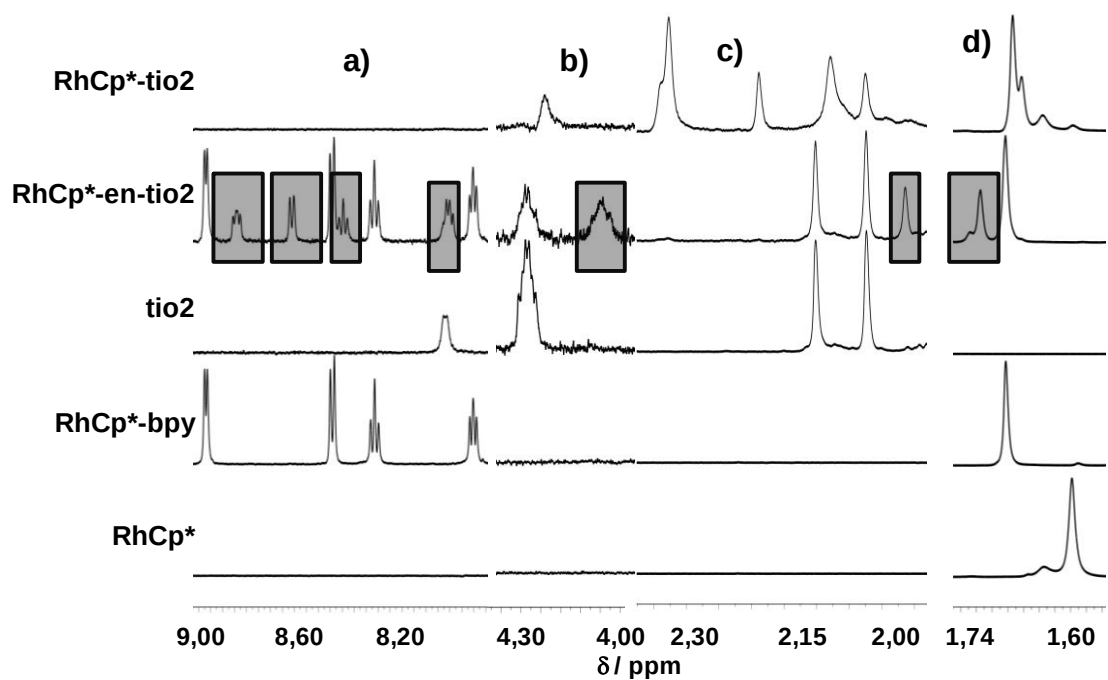
A 21. ábrán egyik reprezentatív példaként a RhCp^* -bpy-mim rendszer látható, összehasonlításképpen az alkotóelemek spektrumai is fel vannak tüntetve. Látható, hogy a

vegyes komplex jelei nem találhatók meg az alkotórészek spektrumain; ezek aránya a tízperces, az egyórás és az egynapos spektrumok során folyamatosan növekszik, míg a RhCp*-bpy jeleinek aránya csökken. Disszociáció nem figyelhető meg.



21. ábra: A RhCp*-bpy, a mim és terner rendszerük ^1H NMR spektruma; az aromás (a) és a Cp* metil-hidrogénjeinek (b) tartományában, fiziológias körülmények között. A vegyes komplex jelei bekeretezve. { $t = 24$ h; $c_L = c_M = 0,75$ mM; $T = 25$ °C; $\text{pH} = 7,40$ (PBS* puffer)}

A 22. ábrán az egyik metionin-modell, a tio2-vel alkotott vegyes rendszer spektruma látható. A b) spektrumrészleten a karboxilcsoport melletti proton jele látható, mely vegyes komplexet jelenlétét jelzi. Azonban a c) részleten a metilcsoportok egy új jele látható, mely nagy valószínűséggel a koordinálódó tioéter melletti metilcsoport jele lehet. Így már érthető, miért is van kétféle új jel a Cp* metilprotonjainak tartományában: kétféle vegyes komplex keletkezett, melyekben a tio2 egy csoportja karboxilcsoporttal, másik része tioéterrel koordinálódhatott. Ennek részletes vizsgálata meghaladja e dolgozat kereteit, azonban érdekes lehet a további vizsgálatok eredménye.



22. ábra: A RhCp*-bpy, a tio2 és közös oldatuk ^1H NMR spektruma együtt; az aromás **(a)**, a metionin-modell jeleinek **(b,c)** és a Cp* metil-hidrogénjeinek **(d)** tartományában, fiziológias körülmények között. A vegyes komplex jelei bekeretezve. { $t = 24$ h; $c_L = c_M = 0,75$ mM; $T = 25$ °C; pH = 7,40 (PBS* puffer)}

6. Összefoglalás

Munkánk során a $[\text{RhCp}^*(\text{Z})_3]$ rendszer kölcsönhatását vizsgáltuk két (N,N) donor ligandummal (2,2'-bipiridin és etilén-diamin) kloridionokat ($\text{Z} = \text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}$) tartalmazó és kloridion mentes ($\text{Z} = \text{H}_2\text{O}$) közegekben ($I = 0,20 \text{ M KCl/KNO}_3$) pH-potenciometriás titrálások, ^1H NMR és UV-látható spektroszkópia felhasználásával. A feltételezett monoligandum $[\text{ML}]$ komplexek képződésével jól leírhatók ezek a rendszerek.

A mérésekből kapott ligandum-protonálódási állandók és a fémion hidrolízis állandói jól egyeztek az irodalomban ismert értékekkel. Meghatároztuk mind a négy rendszerben a stabilitási állandókat az $[\text{ML}]$ és $[\text{MLH}_{-1}]$ részecskékre, melyet eddig még nem vizsgáltak a $\text{RhCp}^*\text{-bpy}$ komplex elterjedt használatának ellenére.

A kapott stabilitási állandók igen nagyok az $[\text{ML}]$ komplexekre nézve mind a kloridmentes, mind a kloridos közegben: fiziológiás pH-n ezek a legtöbb fémiont kötő ligandumok a kutatócsoportban korábban vizsgáltakkal ((O,O) és (O,N) kétfogú ligandumok) összevetve. A vizsgált pH-tartományban ($\text{pH} = 0,7 - 11,5$) elenyésző a szabad fémion mennyisége a 2,2'-bipiridint tartalmazó rendszerekben még $1 \mu\text{M}$ -os fémkomplex koncentrációnál is; az etilén-diamin esetében az $[\text{ML}]$ komplexképződés magasabb pH-n kezdődik, azonban ezekben a rendszerekben is nagystabilitású $[\text{ML}]$ komplex jön létre.

A kloridionok jelenléte jelentősen befolyásolja ezen állandók értékét: a komplexek deprotonálódását jelentősen visszaszorítják. Ez hatással lehet a biológiai és ipari felhasználásban, ezért volt fontos a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ ligandumcserét jellemző állandót is meghatároznunk mindkét komplex esetén: ez nagy állandónak adódott a $\text{RhCp}^*\text{-bpy}$ és $\text{RhCp}^*\text{-en}$ komplexeknél, mely magyarázhatja az *in vitro* vizsgálatokban való rákellenes aktivitás hiányát. Ezen értékek közel egy nagyságrenddel nagyobbak a rákellenes hatást mutató (O,O) donor ligandumokat (maltol, deferipron) tartalmazó komplexek állandóinál, de a szintén inaktív $\text{RhCp}^*\text{-pikolinsav}$ komplex állandója hasonló nagyságú.

A humán szérum albuminnal való kölcsönhatás jellegét és mennyiségét is vizsgáltuk ultraszűrőssel, spektrofluorimetriás és ^1H NMR spektroszkópiákkal: ez a fehérje felelős főként a fémkomplexek vérben való szállításáért, illetve ezen modellfehérjéhez való kötődés jellegéből következtethetünk, hogy a szintézisekhez használt enzimekhez milyen mértékben fog kötődni. A mérésekből kiderült, hogy e két komplex főként koordinatív módon kötődik a fehérjéhez, legalább 4-5 kötőhelyen a HSA-ban. A $\text{RhCp}^*\text{-en}$ komplex egy része disszociált állapotban, a $\text{RhCp}^*\text{-bpy}$ komplex inkább csak disszociálatlanul kötődik a fehérjéhez.

A kötőhely-modellekkel folytatott vizsgálatok alapján kiderült, a hisztidin oldalláncok vesznek részt főként a komplexek megkötésében. Az irodalom alapján a cisztein is potenciális kötőhelynek számít, azonban méréseink során valószínűleg védett aminosav oxidálódása miatt csak kismértékű volt a koordinációja.

Céljaim közt van a RhCp*-en komplex röntgen diffrakciós vizsgálatra alkalmas kikristályosítása, illetve további érdekes terület lehet a RhCp* és a kötőhely-modellek igen összetett rendszerének részletes tanulmányozása, illetve biológiai aktivitást megszabó tényezők vizsgálata a RhCp*-bpy/en komplexekkel analóg vegyületek körében, például lipofilitás vizsgálata a vészérummal megegyező közegben.

7. Hivatkozások

- [1] P. T. Anastas, J. C. Warner: Green Chemistry: Theory and Practice; Oxford University Press: New York, 1998.
- [2] H. Wu; C. Tian; X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, Green Chem. 15 (2013) 1773-1789.
- [3] R. Wienkamp, E. Steckhan, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 21 (1982) 782-783.
- [4] F. Hollmann, B. Witholt, A Schmid, J. Mol. Catal B-Enzym. 19-20 (2003) 167-176.
- [5] S. H. Kaufmann, D. Peereboom, C. A. Buckwalter, P. A. Svingen, L. B. Grochov, R. C. Donehower, E. K. Rowinsky, J. Natl. Cancer I. 88 (1996) 734-741.
- [6] A. Togni, R. L. Haltermann: Metallocenes, WILEY-VCH Verlag GmbH., 1998.
- [7] H. S. Oberoi, N. V. Nukolova, A. V. Kabanov, T. K. Bronich, Adv. Drug Deliver. Rev. 65 (2013) 1667-1685.
- [8] M. Gielen, E. R. T. Tiekink: Methallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents, John Wiley & Sons, Ltd., 2005.
- [9] Y. Geldmacher, M. Oleszak, W. S. Sheldrick, Inorg. Chim. Acta 393 (2012) 84-102.
- [10] S. Top, A. Vessières, C. Cabestaing, I. Laios, G. Leclercq, C. Provot, G. Jaouen, J. Organomet. Chem., 637-639 (2001) 500-506.
- [11] B. Pradines, T Fusai, W. Daries, V. Laloge, C. Rogier, P. Millet, E. Panconi, M. Kombila, D. Parzy, J. Antimicrob. Chemoth. 48 (2001) 179-184.
- [12] A. L. Noffke, A. Habtemariam, A. M. Pizzaro, P. J. Sadler, Chem. Commun. 48 (2012) 5219-46.
- [13] E. Y. Tshuva, D. Peri, Choordin. Chem. Rev. 253 (2009) 2098-2115.
- [14] A. M. Pizarro, A. Habtemariam, P. J. Sadler, Top. Organomet. Chem. 32 (2010) 21-56.
- [15] L. Dadci, H. Elias, U. Frey, A. Hörnig, U. Koelle, A. E. Merbach, H. Paulus, J. S. Schneider, Inorg. Chem. 34 (1995) 306-315.
- [16] L. Bíró, A. J. Godó, Zs. Bihari, E. Garribba, P. Buglyó, Eur. J. Inorg. Chem. 17 (2013) 3090-3100.
- [17] A. C. Gonçalves, T. S. Morais, M. P: Robalo, F. Marques, F. Avecilla, C. P. Matos, I. Santos, A. I. Tomaz, M. H. Garcia, J. Inorg. Biochem. 129 (2013) 1-8.
- [18] É.A. Enyedy, O. Dömötör, C.M. Hackl, M. Novak, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, W. Kandioller; Solution equilibria and antitumor activity of pentamethylcyclopentadienyl

- rhodium complexes of picolinic acid and deferiprone, *J. Coord. Chem.* (beküldött kézirat)
- [19] O. Dömötör, S. Aicher, M. Schmidlehner, M. S. Novak, A. Roller, M. A. Jakupec, W. Kandioller, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, É. A. Enyedy, *J. Inorg. Biochem.* 134 (2014) 57-65.
- [20] H. C. Lo, C. Leiva, O. Buriez, J. B. Kerr, M. M. Olmstead, R. H. Fish, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 6705-6716.
- [21] A. I. Tomaz, T. Jakusch, T. S. Morais, F. Marques, R. F. M. de Almeida, F. Mendes, É. A. Enyedy, I. Santos, J. C. Pessoa, T. Kiss, M. H. Garcia, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 261-269.
- [22] A. Damian, Kh. Maloo, S. Omanovic, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 21 (2007) 21-32.
- [23] U. Kölle, M. Grützel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 567-570.
- [24] M. Poizat, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *J. Mol. Catal B-Enzym.* 63 (2010) 149-156.
- [25] S. Dasari, P. B. Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364-378.
- [26] J. Canivet, G. Süß-Fink, P. Štěpnička, *Eur. J. Inorg. Chem.* 30 (2007) 4736-4742.
- [27] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* 43 (1996) 1739-1753.
- [28] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Petit, *Anal. Chim. Acta* 38 (1967) 475-482.
- [29] G. Gran, *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 559-577.
- [30] L. Zékány, I. Nagypál, in: *Computational Methods for the Determination of Stability Constants* (Ed.: D. L. Leggett), Plenum Press, New York, 1985., 291-353.
- [31] Theodor Peters, Jr.: *All about albumin*, Academic Press, 1996., 10-11, 39-43, 79-127.
- [32] M. S. Eisen, A. Haskel, H. Chen, M. M. Olmstead, D. P. Smith, M. F. Maestre, R. H. Fish, *Organometallics* 14 (1995) 2806-2812.
- [33] E. Farkas, É. A. Enyedy, G. Micera, E. Garibba, *Polyhedron* 19 (2000) 1727-1736.
- [34] T. Jakusch, P. Buglyó, A. I. Tomaz, J. C. Pessoa, T. Kiss, *Inorg. Chim. Acta* 339 (2002) 119-128.
- [35] M. S. Mohan, D. Bancroft, E. H. Abbott, *Inorg. Chem.* 18 (1979) 2468-2472.
- [36] A. Avdeef, *Anal. Chim. Acta* 148 (1983) 237-244.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni Dr. Enyedy Éva Annának és dr. pharm. Dömötör Orsolyának segítségüket és türelmüket kérdéseim és gondolataim megvitatásában, melyek által közelebb kerültem dolgozatom témájához, annak megértéséhez és megírásához.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Kiss Tamás és Dr. Galbács Gábornak a lehetőségért, hogy az SZTE TTIK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén végezhettem el a TDK-dolgozathoz szükséges méréseket.

Ezúton szeretném megköszönni Szűcsné Tóth Katalin technikusnak gyakorlati tanácsait, melyek mindegyike igen hasznosnak bizonyult munkám során.

Köszönettel tartozok a Bioszervetlen Kutatócsoport tagjainak segítőkész megjegyzéseikért.

Köszönöm Dr. Kele Zoltánnak az ESI-MS spektrumok felvételének lehetőségét.

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.

