

# **A ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) félszendvics kation kölcsönhatása két, hisztidin alegységet tartalmazó endogén peptiddel**

**OTDK dolgozat**

**2022**

Készítette: **Lemaitre Lucien, 12. évf. középiskolai tanuló**  
Németh László Gimnázium, Hódmezővásárhely

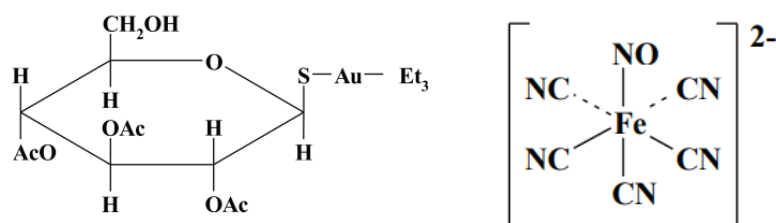
Témavezető: **Dr. Gajda Tamás** egyetemi tanár  
SZTE, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



## 1. Bevezetés, irodalmi háttér

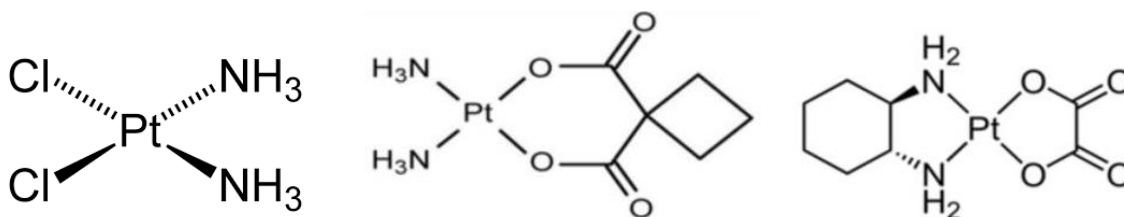
### 1.1 Fémorganikus gyógyszerek

A szervetlen kémia a gyógyászatban is jelentős, hiszen a klinikai gyakorlat része a szervetlen, különösen fémionokat tartalmazó anyagokkal történő kezelés. Fémionokat már régóta alkalmaznak, túlnyomó többségben komplex vegyületeik formájában, különböző betegségek kezelésére. Ilyen például a fekélyek gyógyítására használt Bi(III) tartalmú vegyületek, vagy az Au(I) tartalmú reumaellenes szerek (pl. Auranofin, 1. ábra), de kifejlesztettek már inzulinutánzó vanádiumkomplexeket is. Emellett több másik fémet (pl. Ti, Sn, Mn, Gd) is felhasználnak széles alkalmazási spektrummal. A legfontosabb hatóanyagok mégis a szív- és érrendszeri megbetegedések (pl. nitroprusszid, 1. ábra) és tumor kezelésére szolgálnak [1].



1. ábra: Az auranofin és nitroprussziát anion szerkezete

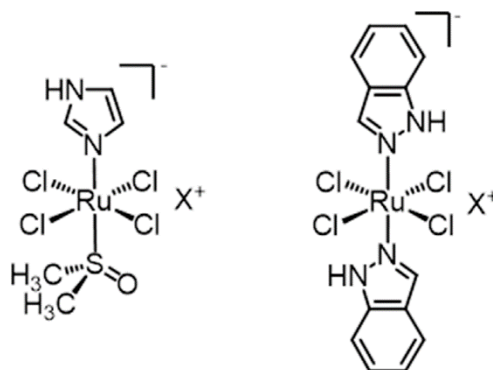
A rákos betegségek kezelésére széles körben alkalmazott tumorellenes hatóanyag a Pt-tartalmú ciszplatin (cisz-diamino-dikloro-platina(II), 2. ábra). A Food and Drug Administration (FDA) 1978-ban engedélyezte a molekula rákellenes szerként történő alkalmazását. Hatásmechanizmusa a rákos sejtek nukleáris DNS-ében létrehozott keresztkötések által gátolt replikáción és transzkripción alapszik. Ugyan a ciszplatin a rákos sejtekben dúsul, de az egészséges sejtekbe is eljut, így a klinikai gyakorlatban történő felhasználása, nephro- és neurotoxicitása miatt, komoly mellékhatásokkal jár, ezért alkalmazása döntően más citotoxikus szerekkel kombinálva valósul meg. A mellékhatásokat kevésbé mutató, nagyobb szelektivitással rendelkező származékait jelenleg is széles körben kutadják [2,3].



2. ábra: A ciszplatin, a karboplatin és az oxaliplatin szerkezete

## 1.2 Fémorganikus platinafém vegyületek, mint potenciális gyógyszerek

A ciszplatin sikerei ráirányították a figyelmet a fémkomplexek rákellenes hatására, így a kutatások első hulláma a szerkezetileg és hatásmechanizmusukban is hasonló vegyületek létrehozására irányult (pl. karboplatin, oxaliplatin, 2. ábra). Később más platinafémek (például Rh(III), Ru(II), Os(II) vagy Ir(III)) komplexeinek potenciális rákellenes hatását is elkezdték vizsgálni. Ezek a vegyületek ígéretesnek bizonyultak, mivel több olyan ráktípussal szemben is aktivitást mutatnak, melyekkel szemben a Pt-tartalmú hatóanyagok nem. Feltételezések szerint a DNS-t és bizonyos enzimeket egyszerre céloznak meg a karcinómákban, ám pontos hatásmechanizmusuk még nem tisztázott [4,5]. Pl. a Ru(III) két komplexe is jelentős DNS-keresztkötésre való hajlamot és rákellenes aktivitást mutatott: ezek a *cisz*-[Ru(2-fenilazopiridin)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] és a *mer*-[Ru(2,2':6',2''-terpiridin)Cl<sub>3</sub>]. Mivel egyes komplex vegyületek hatékonysága a ciszplatin származékokéval összemérhetőnek bizonyult, több esetben klinikai vizsgálatok is megindultak már. Többek között a NAMI-A {(ImH)(*transz*-[RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Im)])} (Im = imidazol) és KP1339 {Na(*transz*-[RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>])} (Ind = indazol) (3. ábra) is eljutott a klinikai vizsgálatokig [4,6].



3. ábra: A NAMI-A ( $X^+ = \text{ImH}^+$ ) és a KP1339 ( $X^+ = \text{Na}^+$ ) szerkezete

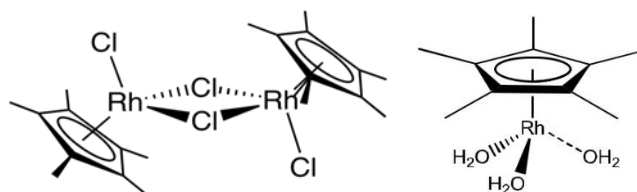
Kedvező tulajdonságaik miatt már régóta a figyelem középpontjába kerültek a platinafémek különböző aromás rendszerekkel kialakított ún. szendvics vegyületei. Ezek a molekulák ferrocén analógok, de előfordulnak ún. félszendvics változatok is, ahol csak egy aromás gyűrű koordinálódik a fémionhoz. Az utóbbi évtizedben számos félszendvics Rh(III) származék esetén ígéretes rákellenes hatást mutattak ki [4]. A fémtartalmú gyógyszerek fejlesztésével párhuzamosan, egy kiegészítő kutatási irány is létrejött, melynek elsődleges célja, a potenciális hatóanyagok és a szervezet molekulái között fellépő kölcsönhatások leírása. Ez nagy jelentőséggel bír, hiszen az emberi szervezetben rengeteg olyan vegyület található meg állandó vagy időszakos jelleggel, melyek befolyásolhatják a hatóanyagmolekula célba jutását

vagy az ott kifejtett hatékonyságát. Igaz ez még a DNS-t célzó hatóanyagokra is, melyek különösen a vérplazmában megtalálható peptidekkel és fehérjékkel kerülhetnek kölcsönhatásba ligandumcsere révén [5,6]. Ezeknek a vizsgálatoknak egy része, közvetlenül a szervezet makromolekuláival, fehérjéivel foglalkozik és vizsgálja azok kölcsönhatásra való hajlamát. Nehézséget jelent azonban, hogy fehérjék esetében csak ritkán van lehetőség pontos termodinamikai adatok kinyerésére, így egy-egy kölcsönhatás mélyebb megértéséhez más vizsgálatokra is szükség van. E célból alkalmazhatunk modellvegyületeket. Jó közelítést jelent például egy fehérje fémkötő helyét modellező néhány aminosavból felépített peptid, mely már kellően könnyen kezelhető ahhoz, hogy pontos termodinamikai információkat nyerjünk. Ismert például, hogy a félszendvics Ru(II) és Rh(III) vegyületek egyik legfontosabb kötőhelye a fehérjék felszínén elhelyezkedő hisztidinek imidazol oldalláncai [5,6]. Ebben az esetben, különböző hisztidint tartalmazó modellpeptideken keresztül ismerhetjük meg a kölcsönhatás várható erősségét. Azonban a fehérjék mellett endogén, sok esetben hisztidint tartalmazó peptidok is kölcsönhatásba kerülhetnek a fémtartalmú gyógyszerekkel.

Az utóbb említett két okból, dolgozatomban az emberi szervezetben ténylegesen is előforduló két hisztidintartalmú peptid, a karnozin ( $\beta$ -alanil-L-hisztidin) és a glicil-L-hisztidil-L-lizin (**GHK**) kölcsönhatását vizsgáltam egy Rh(III) tartalmú vegyülettel (ródiium(III)-pentametil-ciklopentadienil kation). Továbbá, e két peptid és a potenciális gyógyhatású Rh(III) tartalmú vegyületek kölcsönhatásának modellezése céljából tanulmányoztam a Rh(III)-peptid-L terner rendszereket is (ahol L = etilén-diamin vagy bipyridil).

### 1.3 A ródium(III)-pentametil-ciklopentadienil kation ( $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ )

A  $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  akvakomplex kinetikailag rendkívül inert, ám felismerték, hogy ha három faciális elhelyezkedésű ligandumát pentametil-ciklopentadienil anionra ( $\text{Cp}^*$ ) cserélik, akkor a komplex vízcseréjének sebessége jelentősen megnő. Az így származtatott félszendvics komplexben ( $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ ), melyben csak egy  $\text{Cp}^*$  kapcsolódik a fémionhoz, a három szabad kötőhely kinetikai sajátsága a ciszplatinéhoz válik hasonlatossá az aromás gyűrű transz-hatása



4. ábra: A  $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)Cl}_2]_2$  dimer és az akvakomplex szerkezete

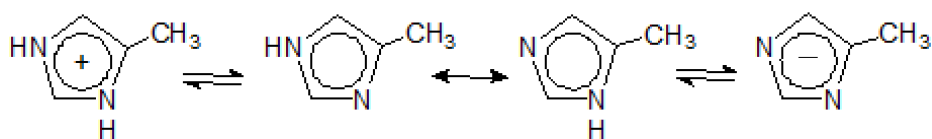
miatt [6]. Ez a szerkezet, melyet „piano-stool” -nak is neveznek, megfelelő megoldást kínálhat a Rh gyógyászatban történő alkalmazására [6]. Kereskedelmi forgalomban a vegyület dimer kloro-komplexe kapható, mely vízben disszociál és a kloridionokat vízmolekulák szubsztituálják, ligandumcsere történik. Az akvakomplex azonban már savas pH tartományon elhidrolizál, hidroxido-komplexekeket hozva létre, melyek alacsony lipofilitásuk révén nem képesek önmagukban bejutni a sejtbe.

A megfelelő farmakokinetikai sajátosság elérése céljából szükséges a lipofilitás növelése pl. a ligandum gondos megválasztása révén [6]. Az SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai tanszékén korábban már vizsgálták a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  kation komplexképzését etiléndiamin, bipyridil, maltol, allomaltol, pikolinát és deferipron ligandumokkal vizes közegben. Mindemelett számos ligandummal alkot olyan komplexeket, melyeket *in vitro*, még a fent említett, már klinikai fázisban lévő Ru komplexeknél is aktívabbnak találtak bizonyos daganattípusokkal szemben [6].

## 1.4 A vizsgált hisztidintartalmú peptidek sajátosságai és szervezetben betöltött szerepük

### 1.4.1 Az imidazolgyűrű tulajdonságai

A fehérjéket felépítő  $\alpha$ -aminosavak közül kiemelkedően sokrétű szerepe van a hisztidinnak (H, His), mely első sorban az oldallánc imidazolgyűrűjének reaktivitásán alapszik. Az imidazolgyűrű egyik említésre méltó sajátossága a benne jelenlévő két N eltérő természete (pirrol-N és piridin-N), és a semleges imidazolgyűrű ebből következő amfotériája (5. ábra). Ezáltal a gyűrű pufferként is viselkedhet, melyet számos tanulmány megmutatott, hiszen az emberi szövetekben a pufferkapacitás nagyrészt a hisztidin koncentrációjával áll összefüggésben [7]. A semleges gyűrű további érdekes sajátossága a tautomeria, mivel a proton mindkét nitrogénhez kötődhet (5. ábra). A fémkötő (koordinációs) sajátosságát tekintve, a piridin-N nemkötő elektronpárja miatt a gyűrű erős  $\sigma$ -donornak és gyenge  $\pi$ -akceptornak tekinthető. Ennek következtében nagy stabilitású komplexeket képez, jellemzően a késői átmenetifém-ionokkal (Ni(II), Cu(II), Zn(II)). A fentiek miatt a hisztidin számos enzimátikus folyamatban sav-bázis katalízist valósít meg, és nagyszámú metalloproteidben, ligandumként a fémion megkötésében van szerepe.



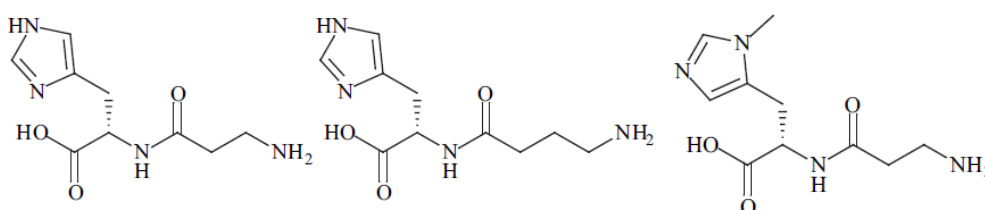
5. ábra: Az imidazol amfotériája és tautomeriája

Ezen kívül, a fehérjék poszttranszlációs átalakulásaiban is jelentős szerepet kap, mivel a hisztidin imidazolgyűrűje foszforilálódni képes.

A hisztidin nem csak fehérjékben, de emellett kisebb peptidek formájában is nélkülözhetetlen szerepet tölt be. Példaként álljanak a nyálban megtalálható, hisztidinben gazdag hisztatinok, melyek antibakteriális, antifungális és sebgyógyulást elősegítő tulajdonsággal bírnak. Mindez közvetett, de meggyőző módon hangsúlyozza a kisebb, hisztidin-tartalmú peptidek szervezetben betöltött jelentőségét is [7].

#### 1.4.2 A karnozin

A karnozin ( $\beta$ -alanil-L-hisztidin) egy vízdoldható, az emlősök szervezetében is előforduló (endogén) dipeptid. A szervezetben további két jelentős származéka is megtalálható (6. ábra), a homokarnozin ( $\gamma$ -aminobutiril-L-hisztidin) és az anszerin ( $\beta$ -alanil-3-metil-L-hisztidin) [8].

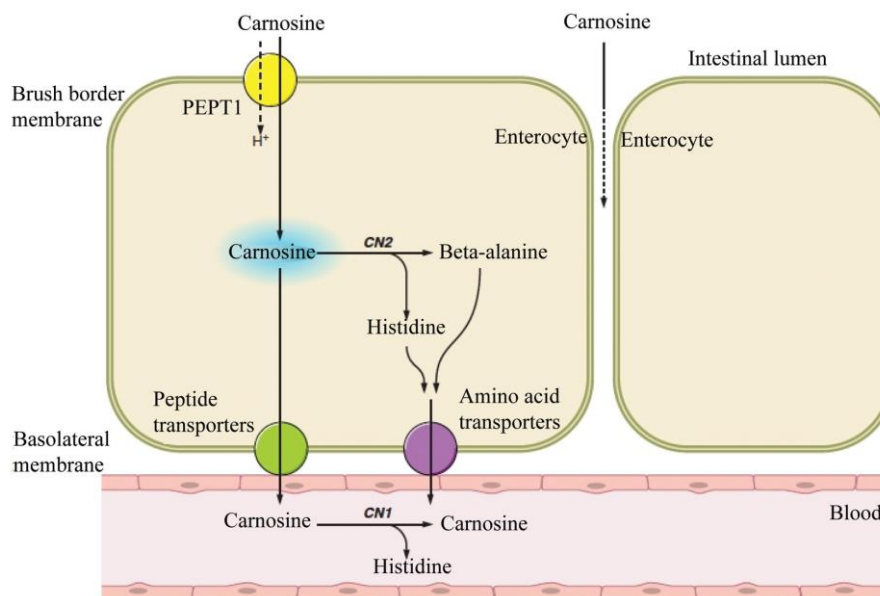


6. ábra: A karnozin, homokarnozin és anszerin szerkezete

A karnozint elsőként 1900-ban izolálták húsból [8], melyet aztán számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálat követett, a karnozin fiziológiai és biokémiai tulajdonságainak megértése céljából. Egyik legfontosabb biokémiai funkciója, hisztidin tartalmú peptid lévén, az átmenetifémionokkal történő kelátképzés. A szervezetben elsősorban Zn(II) és Cu(II) ionokkal képződő komplexében van jelen. Fiziológiai szerepet tölt be emellett pH pufferként és antioxidánsként. Így farmakológiai szempontból gyulladáscsökkentő, öregedést lassító és idegvédő molekulának tekintik [7,8,9,10]. Az újabb vizsgálatok rámutattak a karnozin inhibitor szerepére is a nem enzimatis oxidatív folyamatokban [9], ideértve a többségében membránlipidek peroxidációjából képződő  $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehidek által okozott oxidatív stressz csökkentését, a fehérje-fehérje és DNS-fehérje keresztkötések kialakulásának gátlását. Ezek az eredmények hozzájárultak a molekula klinikai gyakorlatban történő alkalmazásához, krónikus betegségek (Diabetes mellitus, Nephropathia diabetica, egyéb szív és érrendszeri és különböző neurodegeneratív betegségek) megelőzése céljából [7,9,11]. Egy 2018-as tanulmány azonban már arról számol be, hogy a karnozin, eddig ismeretlen mechanizmus révén, de feltehetőleg több enzim hatását egyszerre gátolva, képes visszaszorítani bizonyos típusú

daganatos gyomor sejtek (SGC-7901) aerob glikolízisét, illetve mitokondriális energiatermelését [12].

A táplálékkal elfogyasztott (vagy étrendkiegészítő formájában bevitt) karnozin a bélrendszerből, a mikroboholy rendszeren keresztül szívódik fel [9]. A sejtplazmába jutva, egy részét a szöveti karnozináz enzim (CN2) aminosav alegységekre hidrolizálja (7. ábra), másik része a blasztolaterális membránon keresztül az érrendszerbe kerül. Itt a szérum karnozináz enzim (CN1) szintén aminosav alegységekre bontja a dipeptid nagy részét [9].



**7. ábra:** A karnozin felvételének javasolt mechanizmusa [9]

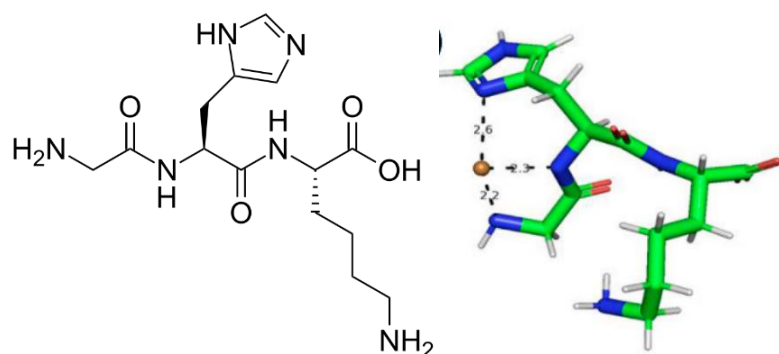
Több szövettípusban, a vázizmokban, a szívizomban és bizonyos agyi régiókban, és például a szaglóközpontban karnozináz nincs jelen, viszont kifejeződik egy karnozin szintáz nevű enzim, mely a két alkotó aminosav alegység jelenlétében képes szintetizálni a dipeptidet [9,11]. Ez azt jelenti, hogy az említett szövettípusok jelentős, milimólos (mM) nagyságrendben tartalmazhatják a peptidet, szemben a karnozin szintázzal nem rendelkező szövetekkel, ahol jóval kisebb koncentrációban van jelen. Az emberi szervezet karnozin készletének 99%-a vázizmokban található, ahol a molekula koncentrációja akár a 20 mM-os értéket is elérheti, mely a szövet ATP koncentrációjával összemérhető érték [9].

A két aminosavalegység közül a hisztidin felelős a dipeptid biokémiai aktivitásáért. A  $\beta$ -alanin alegység a karnozin szintézist befolyásolja, hiszen a karnozin szintáz működése elsősorban a rendelkezésre álló  $\beta$ -alanin mennyiségétől függ. Utóbbi az uracil és timin májban történő lebontásának, és a húsfogyasztásból származó egyéb dipeptidek lebontásának eredménye [9].

### 1.4.3 A glicil-L-hisztidil-L-lizin

A glicil-L-hisztidil-L-lizin (GHK) tripeptid szintén megtalálható az emberi szervezetben, elsődlegesen a vérplazmában, a nyálban és a vizeletben. A vészérum átlagos GHK koncentrációja egy 20 éves ember esetében 200 ng/mL, mely az ember 60 éves koráig 80 ng/mL értékre csökkenhet [13,15]. A tripeptidet először 1973-ban májsejtek növekedését serkentő faktorként azonosították, majd további vizsgálatok megmutatták, hogy több további sejtvonal növekedésére is kedvező hatást gyakorol [13]. Később arra is rámutattak, hogy a GHK számos egyéb biológiai aktivitással bír, melyek legjobb tudásunk szerint egészségre gyakorolt hatásuk szerint pozitívnak mutatkoznak. Ilyen a képződő szövet angiogenezisének serkentése, a szöveti regeneráció, a sebgyógyulás elősegítése, a csontszöveti sérülés gyógyulásának gyorsítása, gyulladáscsökkentő hatásása, kollagén- és elasztinfehérjék képződésének stimulálása, így bőrvédő hatása, illetve antioxidánsként betöltött funkciója [13,14]. Friss kutatások arra is rávilágítanak, hogy a GHK a genetikai szabályozásban is részt vehet, ezáltal az epigenetikai módosító anyagok csoportjába tartozhat, hiszen a vizsgálatok igazolták a GHK módosító hatását hiszton-deacetiláz-2 enzim működésére nézve [15]. Így egyfelől potenciális öregedés gátló hatást is tulajdonítanak a tripeptidnek, másrészt kezdenek feltárulni a tripeptid jótékony biológiai funkciói mögött rejlő mechanizmusok.

A GHK másik fontos tulajdonsága, hogy igen nagy affinitással köti a réz(II) iont. A szervezetben megtalálható GHK említett jótékony hatásainak egy része, több szerző szerint, a tripeptid 1:1 fém-ligandum arányú rézkomplexének tulajdonítható, míg más része a szabad peptidnek. Bizonyos például, hogy az említett struktúrféherjék képződésének serkentése közvetlenül a Cu(II) jelenlétéhez kötött, míg egyéb génmodulációs folyamatokban főként a szabad peptidnek van szerepe [13,14].



**8. ábra:** A GHK tripeptid szerkezete és a GHK-Cu(II) 1:1 arányú komplex röntgenkristallográfiával nyert szerkezete

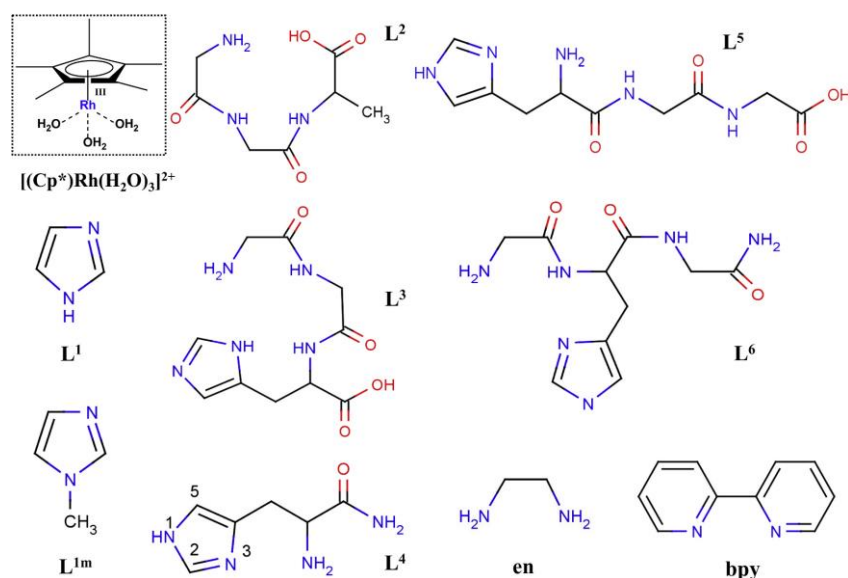
A szervezetben a GHK az extracelluláris mátrix lebomlásakor keletkezik kollagénból és a SPARC nevű fehérjéből lehasadva [14,15]. A lehasadt tripeptid, illetve annak Cu(II) komplexe hozzájárul az extracelluláris mátrix újraképződéséhez. A kis koncentrációban jelenlévő Cu(II)-GHK komplex serkenti az angiogenezis folyamatát azáltal, hogy erős hatást gyakorol a véredény rendszer kiépítéséért felelős kapilláris sejtekre. Továbbá stimulálja az elhalt mátrixtörmelék eltüntetését végző makrofágokat is [15].

### 1.5 Célkitűzés

A fenti irodalmi adatok megmutatják, hogy a karnozin és a GHK peptidek milyen sokrétű szerepet töltenek be az emberi szervezet normál működésében. Mivel viszonylag nagy mennyiségben vannak jelen, feltételezhető e peptidek és a Rh tartalmú hatóanyagok szervezeten belüli kölcsönhatása. Emiatt szükséges e peptideknek a  $[(\text{Cp}^*)\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$  kationnal, valamint utóbbi komplexeivel való kölcsönhatásának vizsgálata.

### 1.6 A $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ kation hisztidintartalmú peptidekkel képződő komplexeinek előzetes irodalmi eredményei [5]

Az SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai tanszékén korábban már vizsgálták a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  kation kölcsönhatását hisztidin-tartalmú peptidekkel és alkotóikkal ((imidazol[L<sup>1</sup>], (N-Me) imidazol[L<sup>1m</sup>], GGA-OH[L<sup>2</sup>], GGH-OH[L<sup>3</sup>], H-amid[L<sup>4</sup>], HGG-OH[L<sup>5</sup>], GHG-NH<sub>2</sub>[L<sup>6</sup>])), mivel a fehérjék imidazolgyűrűi kitüntetett kötőhelyek az (arén)Ru(II)/Rh(III) típusú kationok számára [5]. E kutatások célja a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  komplexek biospeciációjára és biotranszformációjára vonatkozó termodinamikai faktorok jobb megértése volt.



9. ábra: Az [5] irodalomban vizsgált ligandumok

A vizsgálatok első körében szisztematikus termodinamikai, oldatszerkezeti méréseket és kvantumkéimiai számításokat végeztek a peptidszekvencia különböző pozícióiban elhelyezkedő hisztidin koordinációs sajátosságainak tanulmányozása érdekében. Másodsorban, vizsgálták a különböző fém-peptid(A)-ligandum(B) terner rendszereket, mellyel a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) alapú potenciális rákellenes hatóanyagok szerkezetbeli, fehérjékkel történő kölcsönhatását modellezték. Az „A” ligandum a vizsgált peptideket, még „B” ligandum a 2,2’-bipiridil (bpy) vagy etilén-diamin (en) modellvegyületeket jelentette. Utóbbiak erős kölcsönhatást alakítanak ki a vizsgált Rh(III) tartalmú kationnal, és rákellenes hatással is rendelkeznek [6].

Az oldatkéimiai vizsgálatok (pH-potenciometria, UV-Vis,  $^1\text{H}$  NMR, ESI-MS) eredményeinek összehasonlító kiértékelése azt jelezte, hogy az összes tanulmányozott ligandum stabil komplexet képez a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) kationnal. Az is bebizonyosodott, hogy ha termodinamikailag stabil 5 vagy 6 tagú kelátgyűrű képződhet amino- vagy imidazol-nitrogén részvételével, a fémion-indukált amid-deprotonálódás már jóval pH 7 alatt lejátszódhat, így a vizsgált peptidek többsége fiziológiás pH-n háromfogú ligandumként kötődik a fémionhoz, az amid-nitrogén részvételével. Az egyes ligandumok esetén kiszámított  $\text{pM}^*$  értékek, melyek közvetlenül utalnak azok fémion affinitására, a következők:  $\text{L}^1(6,82) \sim \text{L}^{1m}(6,89) < \text{L}^2(8,57) < \text{L}^3(10,47) < \text{L}^4(13,07) < \text{L}^5(13,94) < \text{L}^6(14,48)$ . Látszik tehát, hogy a tapasztalt kötési erősség alapvetően függ a hisztidin peptiden belüli pozíciójától. A hisztidin-tartalmú peptidek közül a leggyengébb kölcsönhatást a GGH-OH alakítja ki, mivel az csak 4N-es komplexeiben rendelkezik kiemelkedő fémion-affinitással. A hisztidin-amid és HGG-OH esetében megvalósuló 3N-es  $\{\text{N}_{\text{im}}^3, \text{NH}_2, \text{N}^-\}$  koordináció már jóval erősebb kölcsönhatást eredményez. Ugyanakkor meglepő, hogy a fémion a GHG-NH<sub>2</sub> ligandumhoz kötődik legerősebben, annak ellenére, hogy ebben az esetben a fémion környezete feltehetően erősen torzult, hiszen ez a peptid alapvetően a meridionális koordinációs geometriát preferálja, a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) kation pedig a faciálisat [5].

A terner rendszerek vizsgálatakor azt találták, hogy pH 7,4-nél (fiziológiás pH-n) az igen erősen kötődő, kétfogú (N,N)-ligandumként viselkedő bipiridil vagy etilén-diamin által üresen hagyott pozícióban az összes hisztidin-tartalmú ligandum képes volt az imidazolgyűrűjének  $\text{N}^1$  nitrogénjén keresztül egyfogú ligandumként koordinálódni. Ugyanakkor az  $\text{L}^4$ ,  $\text{L}^5$  és  $\text{L}^6$  ligandumok esetében az NMR spektrumon a fémion-peptid biner komplexek jelei is megjelentek, ami arra utal, hogy ezek a ligandumok képesek kiszorítani a fémion koordinációs szférájából a két erőteljesen kötődő modellvegyületet. Ennek a

viselkedésnek fontos következményei lehetnek a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -tartalmú potenciálisan gyógyhatású vegyületek biospeciációjára.

## 2. Kísérleti módszerek

### 2.1 pH-potenciometria

Az oldategyensúlyi vizsgálatokhoz, a ligandum protonálódási és a komplexek képződési állandóinak meghatározásához, a pH-potenciometria módszerét alkalmaztuk. Ez az eljárás egy kvantitatív analitikai módszeren, a sav-bázis titráláson alapszik. A protonálódási állandók meghatározása során ismert koncentrációjú erős savat (HCl) és ligandumot tartalmazó oldatot lúggal (KOH) titráltunk, és minden lúgadagolás után megmértük az oldat pH-ját. Az adagolt lúg mennyiségének, a pH-nak, valamint a koncentrációk ismeretében számítható a savként viselkedő ligandum titráltsági foka, és így protonálódási állandója. Ha az oldat fémiont is tartalmazott, a fémion és proton kompetíciója miatt, a ligandum donorcsoportjai alacsonyabb pH-n deprotonálódtak mint fémion távollétében. A koncentrációk, a pH és a ligandum protonálódási állandói ismeretében ilyenkor számítható a komplexképződés foka, és így a komplexek képződési állandói.

A méréseket vizes közegben, folyamatosan temperált standard hőmérsékleten (25 °C), argongáz (Ar) védőatmoszférában, az argon közvetlen oldatba buborékoltatása mellett végeztük el. Utóbbira a CO<sub>2</sub> gáz beoldódása nyomán keletkező pozitív hiba kiküszöbölése miatt volt szükség. Méréseink során az ionerősséget állandó értéken (200 mM) tartottuk. Az ionerősség beállítására minden esetben analitikai tisztaságú KCl-ot (VWR) használtunk.

Mérőoldatként KOH (100 mM és 100 mM KCl) vizes oldatát használtuk, mely védve volt az elkarbonátosodástól. A titráló oldatunk KOH-ra vonatkoztatott pontos koncentrációját analitikai tisztaságú kálium-hidrogén-ftalát (Fluka) segítségével határoztuk meg. A titrálásokhoz egy számítógép vezérelt Dosimat 665 automatabürettát (Metrohm), egy Orion 710A pH mérőt és egy pH szelektív kombinált üvegelektrodát (Metrohm Micro pH üvegelektrod [típus: 6.0234100]) használtunk. Minden mérés előtt kalibráltuk az elektródunkat, melynek során pontos koncentrációjú híg HCl oldatot titráltunk a KOH mérőoldatunkkal. A kalibráció kiértékelését a módosított Nerst egyenlet (1) segítségével végeztük el [16],

$$E = E^0 + K * \lg[\text{H}^+] + J_H * [\text{H}^+] + J_{OH} * \frac{K_w}{[\text{H}^+]} \quad (1)$$

ahol  $K_w$  a víz autoprotolízisének egyensúlyi állandója (ideális értéke  $10^{-13,76}$  [17]).  $K$ ,  $J_H$  és  $J_{OH}$  a nemlineáris illesztés 3 paramétere.  $K$  ideális értéke 59,1 mV ( $= \frac{R \cdot T \cdot \ln 10}{Z \cdot F}$ ),  $J_H$  és  $J_{OH}$  az üvegelektrod savas és lúgos hibájának, valamint a folyadék–folyadék határfelületi potenciálból adódó hibáknak a korrekciójára szolgáló illesztési paraméterek. A kalibrációt csak akkor fogadtuk el, ha az illesztési paraméterek értékei egy meghatározott tartományba estek.

A fémion törzsoldatának pontos koncentrációját is pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg, mivel a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  kation vízzeloldható hidroxokomplexeket képez, így lúggal megtitrálható.

A rendszerekben képződő részecskék az alábbi általános egyensúlyi folyamattal (2) ill. képződési állandóval (3) jellemezhetőek:



$$\beta_{M_pH_qL_r} = \frac{[M_pH_qL_r]}{[M]^p[H]^q[L]^r} \quad (3)$$

ahol M a fémion, L a protonátlan ligandumot jelöli. A dolgozatban az egyszerűség kedvéért eltekintünk a komplexek töltésének jelölésétől, ám ezek könnyen számíthatóak, ha figyelembe vesszük, hogy a teljesen protonált formák összetétele és töltése a következő: karnozin ( $LH_3^{2+}$ ) és GHK ( $LH_3^{3+}$ ).

A protonálódási és komplexképződési állandók meghatározása a HYPERQUAD nevű számítógépes programmal történt [18]. A protonálódási és komplexképződési állandók meghatározásához négy-négy független titrálást végeztünk mindkét peptid esetén. Az egyes adatsorok egyenként 47-85 adatpontot tartalmaztak. Méréseink során, a fém-ligandum arány a karnozin esetében 1:1, 1:2 és 1:3, még a GHK esetében 1:1 és 1:2 volt, a fémion koncentrációt  $1.5 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-3}$  M tartományban változtattuk.

## 2.2 UV-Vis spektrofotometria

Méréseink során az UV-Vis vagy elektrongerjesztési spektroszkópiát is alkalmaztuk. A mérési technika alapja a  $\sim 200\text{-}1000$  nm-es hullámhossz-tartományba eső elektromágneses hullámok (melyek energiája már elég nagy ahhoz, hogy az elektronokat magasabb energiájú pályára gerjesszék) elnyelődésének mérése. Az általunk vizsgált oldatokra tipikusan három fajta elektronátmenet jellemző. Az UV-tartományban a ligandumok saját kromofór csoportjai

(például az amid-csoportok vagy a hisztidin aminosavak imidazol oldalláncai) mutatnak elnyelést. Az UV és látható tartomány határán jelentkeznek az előbbinél kisebb intenzitású ún. töltésátviteli (vagy CT - charge transfer) sávok. Ezek a koordinációs vegyületekre alkalmazott molekulapálya-módszer alapján értelmezhetőek, az elektron egy döntően fémion-karakterű molekulapályájáról gerjesztődik egy döntően ligandum-karakterű pályára, vagy fordítva [19]. A látható fény tartományában pedig a fémion ún. d-d átmeneteit detektálhatjuk, ami a fémion és ligandumok (mint például a víz, vagy akár nagyobb molekulák is, mint a peptidek) kölcsönhatásának következtében felhasadt d-pályák közötti átmenetekhez rendelhetőek. Utóbbiak intenzitása jellemzően kicsi, hiszen ezen átmenetek gyakran tiltottak. A komplexképződés előrehaladtáról a CT és d-d sávok adnak a legtöbb információt. Ugyanis a koordinálódó ligandumok/donorcsoportok cseréjekor (kiindulási oldatainkban minden esetben a fémion akvakomplexe volt jelen) az elnyelési sávok eltolódnak.

Ha besugárzunk egy oldatot egy  $I_0$  intenzitású, adott hullámhosszúságú (monokromatikus) fénysugárral, annak intenzitása a fényelnyelés miatt lecsökken  $I$ -re. A fényelnyelést egy mértékegység nélküli mennyiség, az abszorbancia jellemzi, ami a Beer-Lambert törvény (4) szerint

$$A = \frac{I}{I_0} = cl\varepsilon \quad (4.)$$

ahol  $c$  a fényelnyelő részecske koncentrációja,  $l$  az oldat rétegvastagsága (melyet cm-ben fejezünk ki),  $\varepsilon$  pedig az adott részecskére jellemző, az alkalmazott hullámhossztól függő mennyiség, az ún. moláris abszorbancia. Ha az oldatban több fényelnyelő részecske van jelen, azok fényelnyelése (abszorbanciája) összeadódik. Ha a mintánk fényelnyelését a besugárzott (monokromatikus) fény hullámhosszának függvényében ábrázoljuk, akkor a minta abszorpciós spektrumához jutunk. Az abszorpciós spektrum pH-függésének és a pH-potenciometriás titrálások együttes kiértékelése az oldatban jelenlévő komplex részecskék és azok képződési állandóinak pontosabb meghatározását teszi lehetővé.

Méréseinket egy Thermo Scientific Evolution 200 spektrofotométeren végeztük, 2 cm optikai úthosszal rendelkező kvarcküveták használatával. Az abszorpciós spektrumok pH-függésének vizsgálatánál az egyes spektrumokat ~0,3 - 1,0 pH-egységenként vettük fel. Méréseinket 1:1 fém-ligandum arány mellett végeztük el. Az ionerősség a potenciometriához hasonlóan 200 mM volt (KCl). A kiértékelés során 200-500 nm-es hullámhossz-tartományt használtuk fel. A

komplexek egyéni UV-Vis spektrumai a PSEQUAD [20] nevű számítógépes program segítségével számoltuk ki, a spektrumok megjelenítésére az Origin nevű szoftvert használtuk.

## 2.3 NMR spektroszkópia

Az NMR vagy mágneses magrezonancia spektroszkópia az egyik leghatékonyabb molekulaszervezet vizsgálati módszer, amit a bioszervetlen kémiai kutatások is széles körben és változatos célokra használnak. A módszer lényege [19] az, hogy külső mágneses tér hatására az  $I > 0$  magspinű magok mágneses momentumának vektora a külső mágneses tér irányához viszonyítva  $2I+1$  db különböző pozíciót vehet fel, melyek különböző energiaszinteket képviselnek és energiakülönbségük függ a külső mágneses tér nagyságától. Megfelelő gerjesztő elektromágneses (rádiorékvenciás) sugárzás hatására e szintek között átmenet érhető el (a mag gerjesztődik, annak spinállapota megváltozik).  $I = \frac{1}{2}$  spinű mag esetén (pl.  $^1\text{H}$ ) a gerjesztő sugárzás energiája a következő egyenlettel adható meg (5)

$$h\nu = \Delta E = \frac{h\gamma B_k}{2\pi} \quad (5)$$

ahol  $B_k$  a külső mágneses tér erőssége és  $\gamma$  a vizsgált atommag ún. giromágneses tényezője (a mag pálya- és mágneses momentumának a hányadosa). A giromágneses tényező magról-magra (izotópról-izotópra) eltérő értéket vesz fel, így a különböző elemek magjai egymástól elkülönülten vizsgálhatóak.

Minthogy a molekulák atommagjai elektronokkal vannak körülvéve, a vizsgálatok során alkalmazott külső mágneses tér a magot körülvevő elektronfelhőben diamágnesességet indukál, amely a külső mágneses tér értékét a mag helyén megváltoztatja az elektronfelhő szerkezetétől (elektronsűrűségétől) függő mértékben. Ez utóbbi a molekula kémiai kötéseinek a függvénye, így egy adott atommag különböző vegyületekben, tehát különböző elektronfelhővel körülvéve, az NMR spektrumban más-más rezonanciafrekvenciával bír. A rezonanciafrekvenciának az elektronhéj szerkezetétől, illetve az ezt meghatározó kémiai szerkezettől függő változását nevezzük kémiai eltolódásnak. A kémiai eltolódást ppm-ben (milliomod részben) fejezzük ki, mivel ez praktikusabb, mint Hz-ben megadni. A ppm skálázás egyben azt is jelenti, hogy így egy relatív skála jön létre, azaz szükségünk van egy viszonyítási pontra, melyhez a többi anyag relatív eltolódását tudjuk viszonyítani. Általában a tetrametilszilánt ( $\text{Si}(\text{Me})_4$ ) alkalmazzák referens anyagként, aminek kémiai eltolódását zérusnak tekintik ( $\delta=0$ ). A saját méréseinknél belső referensként metanolt ( $\text{MeOH}$ ) használtunk, majd ennek

kémiai eltolódás értékét ( $\delta_{\text{MeOH}} = 3,35$ ) felhasználva konvertáltuk át a kapott adatokat a TMS-hoz viszonyítva.

Amennyiben a szomszédos magok  $I > 0$  magspinnel rendelkeznek, természetesen ezek mágneses momentuma is egyenként  $2I+1$  különböző orientációt vehet fel a külső mágneses tér irányához képest, ami igen kis mértékben ugyan, de jól mérhető módon megváltoztatja a vizsgált mag környezetében a mágneses tér nagyságát. Ez az ún. spin-spin kölcsönhatás a jelek további felhasadását eredményezi, a kölcsönhatás mértékét az ún. spin-spin csatolási állandóval jellemezzük.

A jelet nem abszorpció spektrumként detektáljuk, hanem a gerjesztett állapotnak a relaxációját (az alapállapotba való visszatérését, a makroszkopikus mágnesezettség elvesztését) követjük nyomon. Ez a folyamat viszonylag lassú (pl.  $^1\text{H}$  esetén 0.1-10 s). A makroszkopikus mágnesezettségnek a külső mágneses térrel azonos irányú komponensének elvesztését longitudinális (spin-rács), az arra merőleges irányú mágnesezettség elvesztését transzverzális (spin-spin) relaxációnak nevezzük, az e folyamatokra jellemző időállandót  $T_1$ -el illetve  $T_2$ -vel jelöljük. Előbbi az NMR jel intenzitásával, utóbbi a jelszélességgel van szoros kapcsolatban. Mindkét relaxáció több mechanizmus szerint játszódhat le, melyekben alapvető szerepe van a (különböző frekvenciával) fluktuáló mágneses tereknek. Ezek közül általában kiemelkedő jelentőségű a téren keresztül ható (egy adott részecske kötésrendszerében egymástól távoli, de a 3D szerkezet miatt mégis térközele protonok hatása miatti) ún. dipol-dipol kölcsönhatás, mely az adott atomok (mágneses dipólusok) közötti távolság ( $r$ ) hatodik hatványával fordítottan ( $r^{-6}$ ) arányos.

Az NMR spektroszkópia tehát minden detektált jel esetén négy alapvető információval szolgál: (i) a jelintenzitás, ami a koncentrációval hozható közvetlen kapcsolatba, (ii) a kémiai eltolódás, amely az atommag környezetének elektronsűrűségéről, s így a jelet létrehozó atom kémiai minőségéről ad információt, (iii) a spin-spin csatolási állandó, amely a vizsgált maghoz kémiai kötésekön keresztül kapcsolódó szomszédos csoportokról ad felvilágosítást, ill. (iv) a relaxációs idők, melyek többek között a molekula 3 dimenziós szerkezetének meghatározásában játszanak kulcsfontosságú szerepet (Nuclear Overhauser Spectroscopy, NOESY).

A munkám során elvégzett  $^1\text{H}$  NMR méréseink egy Bruker Ultrashield 500 Plus készüléken történtek. A mintáinkat NMR csövekben (5mm átmérőjű) és egy maximum 10%  $\text{D}_2\text{O}$ -t tartalmazó  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  oldószerkelegben végeztük. Ez a  $\text{D}_2\text{O}$  koncentráció már lehetővé teszi a vizsgálatokat, de még nem gyakorol jelentős hatást a rendszerek egyensúlyi állandóira. Mint mindig, az ionerősség a mérés megkezdése előtt beállításra került ( $I = 200 \text{ mM KCl}$ ).

Továbbá az összes mérés esetében a kívánt pH-t HCl és/vagy KOH oldat segítségével állítottuk be.

## 2.4 Tömegspektrometria (MS)

A ligandumok azonosításának és a kialakuló komplexek összetételének meghatározása céljából tömegspektrometriás méréseket is végeztünk. A tömegspektrometria (MS) az egyik leggyakrabban használt módszer szerves és szervetlen vegyületek minőségi és mennyiségi elemzésére, mivel alkalmas nagyon kis mennyiségű anyagok analitikai vizsgálatára is. A mintát a tömegspektrométerben ionizáljuk, majd az ionokat tömeg/töltés arányuk alapján szétválasztjuk. Az általunk használt elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) a lágy ionizációs technikák közé sorolható. Előnye, hogy a spektrumban többnyire az egyszeresen vagy többszörösen töltött molekulaionok jelennek meg, a lágy ionizáció miatt a mérendő anyag általában nem fragmentálódik.

A vizsgálandó vegyületet vizes oldat formájában porlasztjuk be a készülékbe. Az oldat a légtérbe egy nagyfeszültségű kapillárison keresztül jut, itt töltött cseppeket tartalmazó, monodiszperz permet képződik. A cseppek erős párolgásának eredményeképpen először kisméretű, nagy töltésszámú cseppek, majd végül pozitív töltésű ionok képződnek. A szabaddá váló ionok, gyorsítás után, az analizátorban elválaszthatók tömeg/töltés hányadosuk szerint. A mért jel intenzitásából az adott ion relatív mennyiségére is tudunk következtetni. Az ESI-MS mérésekhez kis koncentrációjú oldat ( $10^{-4}$  és  $10^{-6}$  M) szükséges.

Méréseinket az SZTE Orvosi Vegytan Intézetében egy Waters Q-TOF Premier (Micromass MS Technologies, Manchester, UK) ESI-ionforrással ellátott spektrométeren végeztük pozitív ion módban.

### 3. Kísérleti eredmények és értékelésük

#### 3.1 A vizsgált ligandumok (de)protonálódási folyamatai

Vizsgálatainkat a karnozin és GHK peptidek oldatkémiai vizsgálataival kezdtük, melynek során pH potenciometriásan meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit (1. táblázat). Megállapíthattuk, hogy a mért értékek jól egyeznek az irodalmi adatokkal, hiszen ezek mindkét peptid esetében már több szerző által is meghatározásra kerültek [21]. Adatainkat az 1. táblázatban foglaltam össze:

**1. táblázat** A vizsgált ligandumok protonálódási állandói ( $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ), valamint  $pK$  értékei.

| Speciesz (pqr)         | $\log \beta_{pqr}$ |           | $pK_s$   |       |
|------------------------|--------------------|-----------|----------|-------|
|                        | Karnozin           | GHK       | Karnozin | GHK   |
| H <sub>4</sub> L (041) | -                  | 27,88 (4) | -        | 2,84  |
| H <sub>3</sub> L (031) | 18,82 (1)          | 25,04 (2) | 2,68     | 6,54  |
| H <sub>2</sub> L (021) | 16,14 (1)          | 18,50 (2) | 6,77     | 7,94  |
| HL (011)               | 9,37 (1)           | 10,56 (1) | 9,37     | 10,56 |

A karnozin esetében három (de)protonálódás figyelhető meg, melyek a karboxilát-, imidazol- és aminosocsoportokhoz rendelhetők. A tripeptid esetében négy (de)protonálódási lépés tapasztalható, melyek rendre a karboxilát-, imidazol-, terminális amino- és a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjához rendelhetők.

#### 3.2 A vizsgált ligandumok ( $\eta^5\text{-Cp}^*\text{Rh(III)}$ ) komplexei

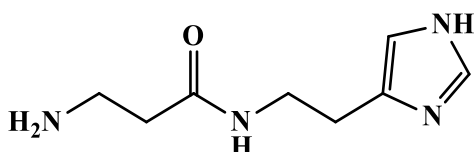
A peptidek ( $\eta^5\text{-Cp}^*\text{Rh(III)}$ ) kationnal alkotott komplexek vizsgálatához pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás, illetve NMR spektroszkópiás méréseket végeztünk. Csapadékképződést a vizsgálataink során nem észleltünk. A Rh(III) ion akvakomplexe nagyon lassú, de még a ( $\eta^5\text{-Cp}^*\text{Rh(III)}$ ) kation is viszonylag lassú ligandumcserével bír. Így a pH-potenciometriás méréseknél azt tapasztaltuk, hogy pH 8-at követően az egyensúly beállításához szükséges idő jelentősen megnő, ezért a titrálásokat csak pH  $\sim 8$ -ig értékeltük ki. Ennek megfelelően az eloszlás görbét is csak pH 8-ig ábrázoltam.

Kísérleti adataink (pH-metria, UV-Vis és NMR spektroszkópia) együttes kiértékelése szerint, mind a karnozin, mind a GHK esetében 3-3 részecske képződésével kell számolnunk

az említett pH tartományon. Ezek eltérő tulajdonságai miatt a két peptid ( $\eta^5\text{-Cp}^*$ )Rh(III) komplexeit külön-külön mutatom be. Az NMR vizsgálatokat illetően fontos kiemelni, hogy az egyes komplexek ligandumcsere folyamatai lassúak az NMR időskáláján, így azok jelei nem átlagolódnak, minden komplexhez egyedi jelsorozat tartozik.

### 3.2.1 A ( $\eta^5\text{-Cp}^*$ )Rh(III)-karnozin rendszer leírása

A ( $\eta^5\text{-Cp}^*$ )Rh(III)-karnozin rendszer mérési eredményeinek értelmezéséhez felhasználok a kutatócsoport által már előzetesen vizsgált karcinin ( $\beta$ -alanil-hisztamin, 12. ábra) mérési eredményeit is, hiszen a két peptid közötti eltérést egyetlen karboxilát csoport jelenti, így hasonló szerkezetű komplexek megjelenése várható a két rendszerben. A meghatározott komplexképződési állandókat a 2. táblázat, még a képződő komplexek eloszlásgörbéit a 13. ábra mutatja be.

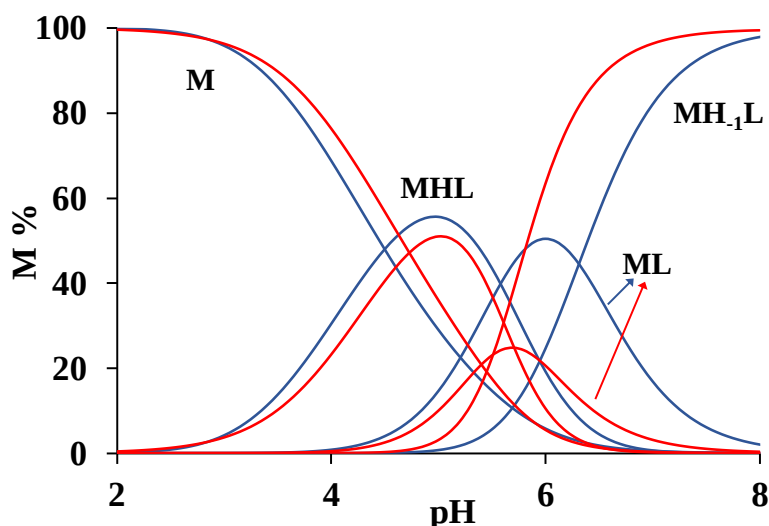


**12. ábra:** A karcinin ( $\beta$ -alanil-hisztamin) molekula szerkezete

**2. táblázat** A ( $\eta^5\text{-Cp}^*$ )Rh(III)-karnozin/karcinin rendszerben kialakuló komplexek képződési állandói ( $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ ), valamint  $pK_s$  értékei.

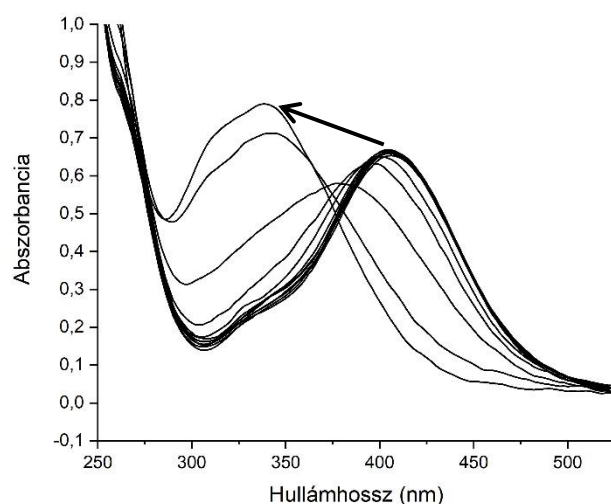
| részecske (pqr)               | $\log \beta_{pqr}$ |                  | $pK_s$      |             |
|-------------------------------|--------------------|------------------|-------------|-------------|
|                               | karnozin           | karcinin         | karnozin    | karcinin    |
| <b>MHL (111)</b>              | <b>15,07 (1)</b>   | <b>14,64 (1)</b> | <b>5,51</b> | <b>5,71</b> |
| <b>ML (101)</b>               | <b>9,56 (1)</b>    | <b>8,93 (1)</b>  | <b>6,32</b> | <b>5,51</b> |
| <b>MH<sub>1</sub>L (1-11)</b> | <b>3,24 (2)</b>    | <b>3,42 (2)</b>  | -           | -           |
| <b>pM*<sub>7.4</sub></b>      | <b>9,58</b>        | <b>9,87</b>      | -           | -           |

$pM^*_{7.4} = -\log([M] + 2[M_2(OH)_2] + 2[M_2(OH)_3])$ ,  $pH = 7,4$  és  $c_M = c_L/10 = 1 \text{ }\mu\text{M}$  mellett ( $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $I = 0.20 \text{ M (KCl)}$ )



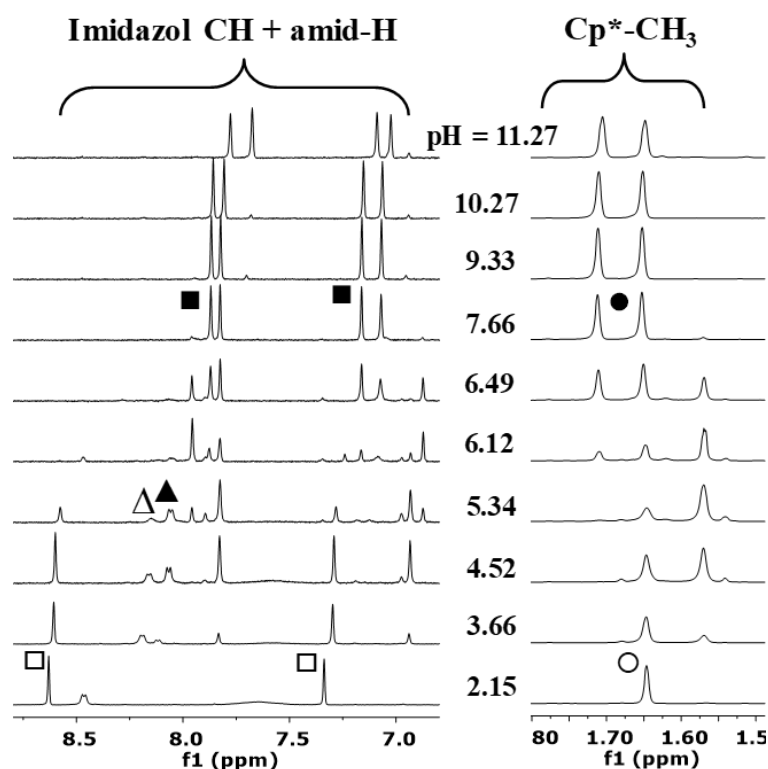
**13. ábra:** A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  –karnoszin (kék) és –karcinin (piros) rendszerekben képződő komplexek eloszlásgörbéi

Ezt a speciációt megerősítik spektrofotometriás méréseink (14. ábra), melyek a két végállapot (M és MH<sub>1</sub>L) között legalább egy további részecske képződésére utalnak. A képződési állandókból és az eloszlásgörbékről is látszik, hogy az ML részecske nagyobb stabilitással rendelkezik a karnoszin esetén, ugyanakkor a következő deprotonálódás pK-ja közel egy egységgel kisebb a karcinin komplexében. Minthogy a két peptid mindössze egy karboxilát csoportban különbözik egymástól, ez az eltérés is ennek a különbségnek tulajdonítható. A karcinin ML komplexében kialakuló  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}\}$  koordináció egy karboxilát csoporttal egészül ki a karnoszin esetén ( $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^- \}$ ), ami extra stabilitást eredményez. Viszont ez az extra



**14. ábra:** A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -karnoszin rendszer pH-függő UV-Vis spektrumai

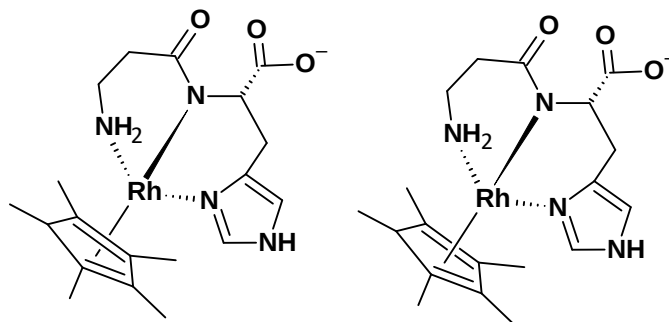
stabilitás a következő deprotonálódást ( $ML = MH_{-1}L + H^+$ ) a magasabb pH-k irányába tolja el (minthogy a fémionnak csak három szabad koordinációs helye van, az újabb donorcsoport ki kell, hogy szorítsa a karboxilátot a fémion koordinációs szférájából). Ez a deprotonálódás, tekintettel a dipeptidek szerkezetére, feltehetően az amid-csoport fémion-indukált protonvesztéséhez rendelhető. Ennek alátámasztására és a komplexek szerkezetének meghatározása céljából pH-függő NMR spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk (15. ábra). A fémionhoz kötött ligandum spektrumában pH 4-6 között még megjelenő amid-proton jele pH 6 felett eltűnik a spektrumból, a szabad ligandumhoz képest jelentősen eltolódnak az imidazolgyűrű és a  $\beta$ -alanin alegység metil-protonjainak a jelei, ami megerősíti az  $MH_{-1}L$  komplex  $\{NH_2, N^-_{amid}, N_{im}\}$  típusú koordinációját.



**15. ábra:** pH-függő  $^1H$  NMR spektrumok a  $(\eta^5-Cp^*)Rh(III)$ -karnozin rendszerben (○ és ●:  $Cp^*$  metil-protonok jelei, □ és ■ az imidazol-protonok jelei a szabad ligandumban/fémionban és az  $MH_{-1}L$  komplexben; Δ és ▲ az amid-proton jelei a szabad ligandumban és az  $ML$  komplexben)

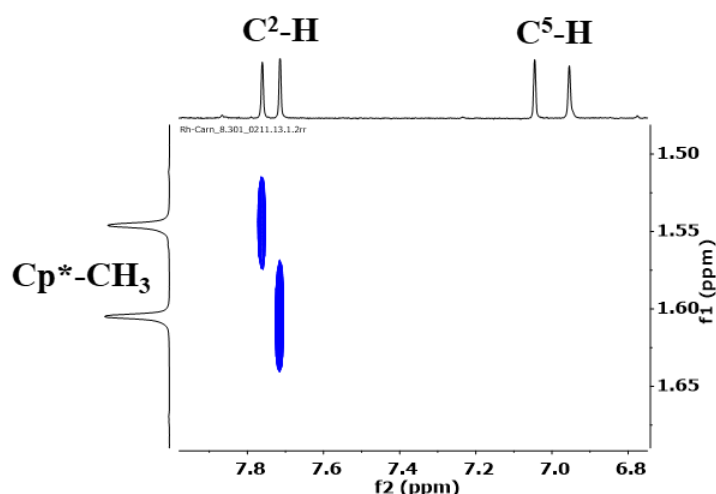
Ugyanakkor a fiziológias pH-n domináns  $MH_{-1}L$  részecske megjelenése a kötött ligandum jelének megduplázódását eredményezi, ami izomerek megjelenésére utal. Az egyik lehetőség ennek magyarázatára a kb. azonos mennyiségben jelenlévő monomer ( $MH_{-1}L$ ) és dimer ( $M_2H_{-2}L_2$ ) komplexek kialakulása. Ezt azonban cáfolják ESI-MS méréseink, melyek

kizárólag monomer komplex(ek) jelenlétére utalnak. Így a jelek megduplázódását csak két, kb. azonos koncentrációban kialakuló diasztereoizomer megjelenésével magyarázhatjuk. Mivel a peptidnek csak egyetlen királis szénatomja van, a diasztereoizomerek képződése úgy lehetséges, hogy a fémion környezete is királissá válik, és a két lehetséges enantiomer ( $R_{Rh}S_{\alpha C^*}$  és  $S_{Rh}S_{\alpha C^*}$ , 16. ábra) közel azonos energiátartalommal bír. Ez a jelenség viszonylag gyakori a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  ion komplexei esetén [4-6].



**16. ábra:** A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -karnosin rendszerben képződő  $\text{MH}_{-1}\text{L}$  részecske két diasztereoizomerjének ( $R_{Rh}S_{\alpha C^*}$  és  $S_{Rh}S_{\alpha C^*}$ ) javasolt szerkezete

A teljesség kedvéért megemlítem, hogy a karcinin esetén nem tapasztalható jelDuplázódás, hiszen benne nincs királis szénatom, így csak a ródium körül alakulhat ki királis környezet, ami viszont NMR-rel megkülönböztethetetlen enantiomereket eredményez. Amint azt a bevezetőben említettem, a tautomer formák miatt, az imidazolgyűrű mindkét nitrogénje képes fémionhoz koordinálódni. Azonban a 16. ábrán látható  $(\text{N}^{\text{amid}}, \text{N}_{\text{im}})^-$  kelát kialakulása



**17. ábra:** A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -karnosin rendszer (pH = 8) NOESY spektrumának részlete

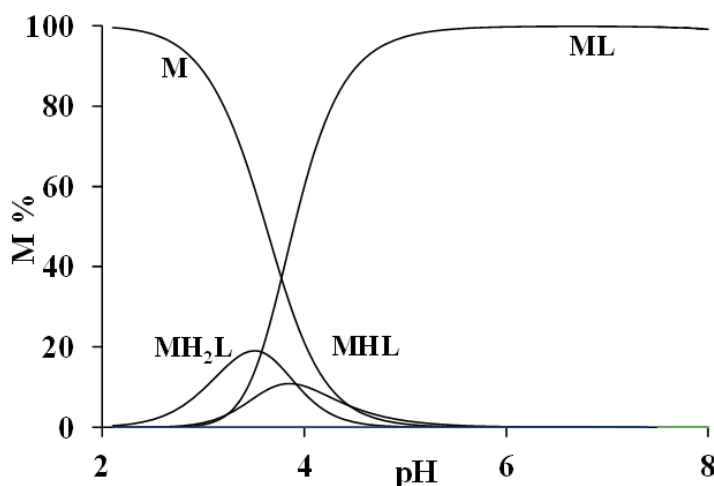
miatt a kisebb gyűrűtagszámot eredményező (ezért stabilabb) N<sup>3</sup>-nitrogén koordinációja a valószínűbb. Ezt a pH 8-nál felvett 2D NMR NOESY spektrum is megerősíti, hiszen a Cp\*-gyűrű metil-protonjai az imidazolgyűrű C<sup>2</sup>-H protonjával mutat térközei állapotot (ld. a Cp\*-metilek és a C<sup>2</sup>-H közötti dipol-dipol kölcsönhatás miatt megjelenő keresztcsúcsok a 17. ábrán).

### 3.2.2 A ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-GHK rendszer leírása

A ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-GHK rendszerrel kapcsolatos eredményeket szintén a pH-potenciometriás, UV-Vis és NMR eredmények összevetésével értékeltük ki. A komplexek képződési állandóit a 3. táblázat foglalja össze, a számolt eloszlásgörbéket a 18. ábra mutatja be.

**3. táblázat:** A ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-GHK rendszerben kialakuló komplexek képződési állandói (I = 0,2 M (KCl), T = 298 K), valamint pK értékei.

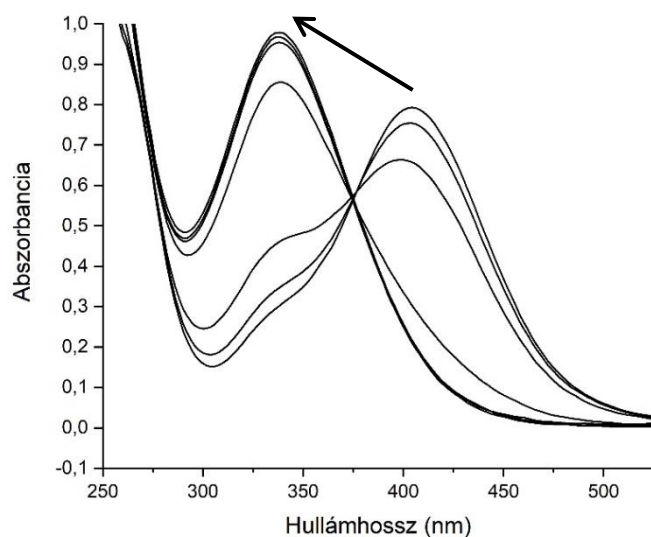
| részecske (pqr)         | GHK                |                 |
|-------------------------|--------------------|-----------------|
|                         | $\log \beta_{pqr}$ | pK <sub>s</sub> |
| MH <sub>2</sub> L (121) | 24.35 (7)          | 3,91            |
| MHL (111)               | 20.44 (8)          | 3,24            |
| ML (101)                | 17.20 (2)          | -               |
| pM* <sub>7.4</sub>      | 14.30              |                 |



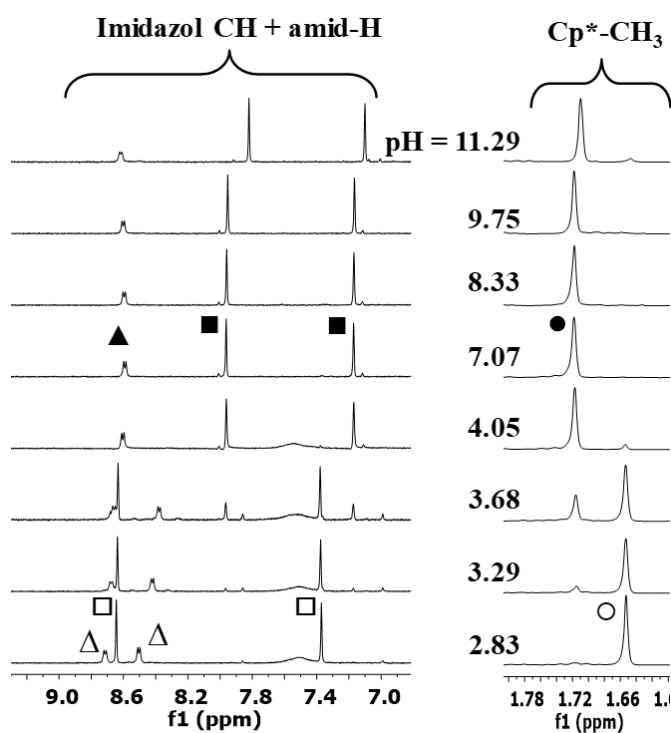
**18. ábra:** A ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-GHK rendszerben képződő komplexek eloszlásgörbéi

Az eloszlásgörbék arra utalnak, hogy a szabad fémion két, csak kis mennyiségben képződő protonált részecske kialakulása után, meglehetősen szűk pH-tartományban, a fiziológias pH-n domináns ML komplexszé alakul. Ezt megerősítik UV-Vis spektrofotometriás méréseink is,

hiszen a pH-függő spektrumok (19. ábra) egy viszonylag jól definiált izobesztikus pontot eredményeznek.

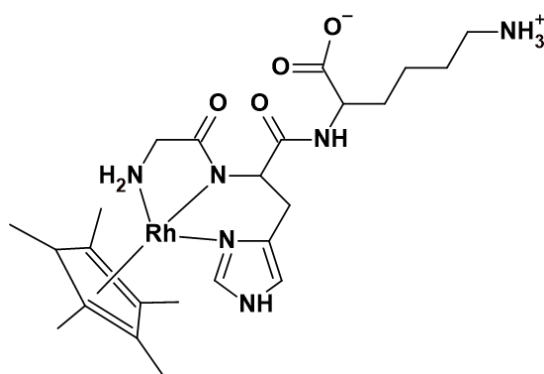


19. ábra: A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)-GHK}$  rendszer pH-függő UV-Vis spektrumai



20. ábra: pH-függő  $^1\text{H}$  NMR spektrumok a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)-GHK}$  rendszerben (O és ●: Cp\* metil-protonok jelei, □ és ■ az imidazol-protonok jelei a szabad ligandumban/fémionban és az ML komplexben, Δ és ▲ az amid-protonok jelei a szabad ligandumban/fémionban és az ML komplexben)

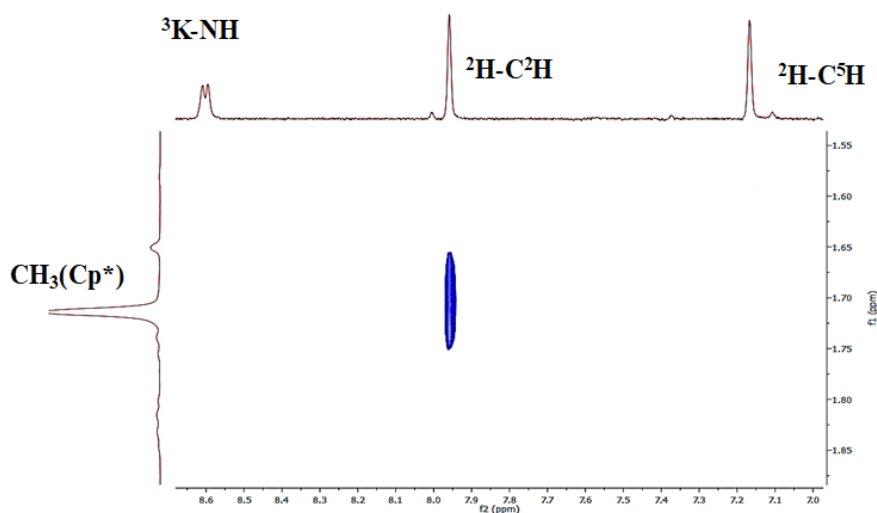
Az ML komplex szerkezetének meghatározása céljából itt is pH-függő  $^1\text{H}$  NMR spektrumokat vettünk fel. A két domináns részecske jelenlétét ezek a spektrumok is jól mutatják. pH 3 felett, a kötött ligandumhoz tartozó jelcsoportból a hisztidin alegységhez tartozó amid NH jele fokozatosan eltűnik, ugyanakkor a lizin alegység amid NH-ja pH 11-ig detektálható. Mindez arra utal, hogy az ML komplex valójában  $\text{MH}_{-1}(\text{LH})$  formában is felírható, azaz a lizin  $\varepsilon$ -aminocsoportja pH 5-8 között protonált, viszont a hisztidin alegység amid-nitrogénje már igen alacsony pH-n fémion-indukált deprotonálódást szenved. Ez a  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{amid}}^-, \text{N}_{\text{im}}\}$  koordinációjú ML komplex (21. ábra) kiemelkedő termodinamikai stabilitására utal, amit jól példáz a  $\text{pM}^*_{7.4}$  értékek közel öt nagyságrend különbsége a GHK és karnozin esetén. Ez a figyelemre méltó különbség már csak azért is meglepő, mert a két pH 7,4-en domináns komplex koordinációs módja azonos. Az egyetlen eltérés a terminális aminocsoportot magában foglaló kelátgyűrű tagszámában mutatkozik, azaz a két rendszer összehasonlítása jól mutatja az 5-ös tagszámú kelátgyűrű kiemelkedő stabilitását. Említésre méltó, hogy az  $\text{MH}_2\text{L} = \text{MHL} + \text{H}^+$  és az  $\text{MHL} = \text{ML} + \text{H}^+$  folyamatok  $\text{pK}$  értékei közül az utóbbi a kisebb (ld. 3. táblázat), azaz az MHL  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}\}$  koordinációs módjának kialakulása, kooperatív módon segíti elő a köztes amid-nitrogén deprotonálódását, és így a csatolt kelátgyűrűk kialakulását.



**21. ábra:** A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)-GHK}$  rendszer ML komplexének javasolt szerkezete

Az NMR spektrum nem utal a karnozinnál tapasztalt jelkettőződésre, noha elvileg itt is lehetséges lenne. Erre két magyarázat is lehetséges. Egyrészt elképzelhető, hogy a két közel azonos energiatartalmú diasztereoizomer az NMR időskálájához viszonyítva gyorsan egymásba alakul, így a spektrumon csak az átlaguk látszik. Ez a kevésbé valószínű magyarázat, ugyanis a félszendvics  $\text{Rh(III)}$  komplexekre jellemző az NMR időskáláján lassú ligandumcsere, ráadásul a GHK esetében kialakuló (5,6)-tagú csatolt kelát kevésbé flexibilis, mint a karnozinnál megjelenő (6,6) csatolt kelát. Ennek megfelelően az a valószínűbb, hogy a két diasztereoizomer eltérő energiatartalommal bír, így azok közül csak az egyik van jelen detektálható koncentrációban.

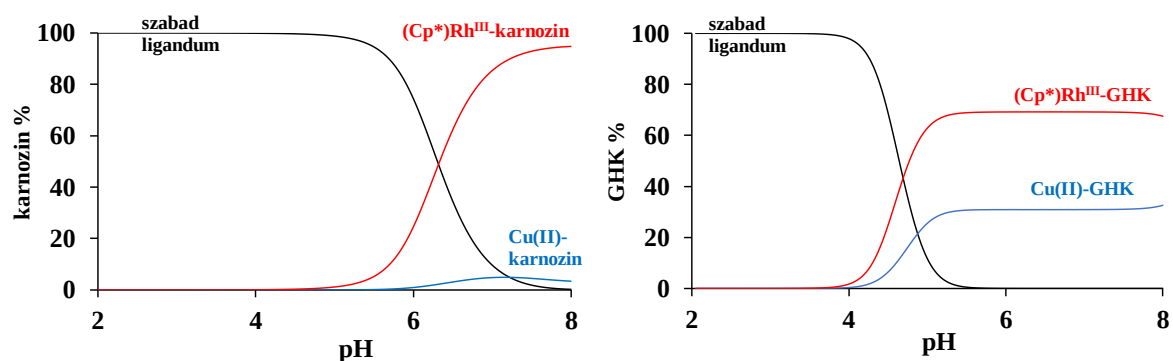
Az ( $N_{\text{amid}}^-, N_{\text{im}}$ ) kelátgyűrű azonos a karnozin és GHK fiziológias pH-n domináns komplexeiben, így a 2D NOESY spektrum (22. ábra) ebben az esetben is az imidazolgyűrű  $N^3$ -nitrogénjének koordinációját mutatja (a  $Cp^*$ -gyűrű metilprotonjaihoz az imidazolgyűrű  $C^2$ -H hidrogénje van térközei helyzetben).



22. ábra: A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)-GHK}$  rendszer NOESY spektrumának részlete

### 3.3 A vizsgált ligandumok $\text{Cu(II)}$ és $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ komplexeinek termodinamikai összehasonlítása

Amint az a Bevezetőben említésre került, mindkét peptid jórészt réz(II)-komplexe formájában fordul elő az élő szervezetben, melyeknek, főként a GHK komplexnek, igen nagy a termodinamikai stabilitása. Ezért felmerül a kérdés, hogy vajon a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  ion képes-e kiszorítani a réz(II)-t peptid komplexeiből, azaz van-e tényleges lehetőség arra, hogy karnozin és GHK biospeciációját a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  kation érdemben befolyásolja.

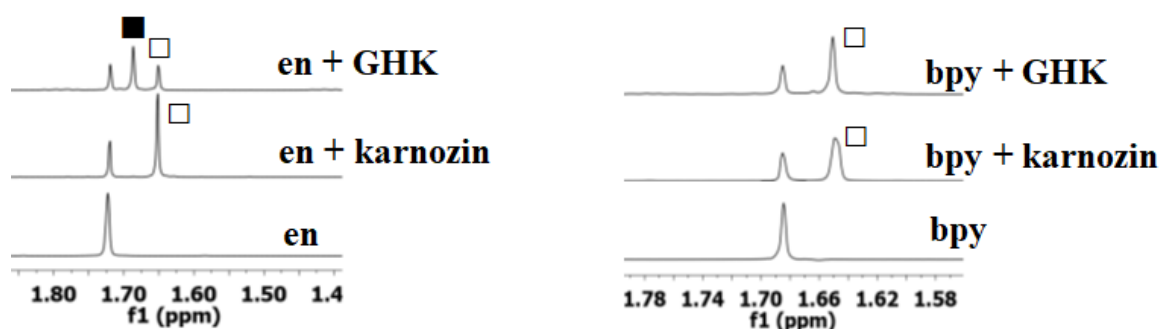


23. ábra: A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)-Cu(II)-karnozin}$  (1:1:1) terner rendszer predominancia diagramja ( $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = [(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}]_{\text{tot}} = [\text{peptid}]_{\text{tot}} = 1 \mu\text{M}$ ,  $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ )

Ennek eldöntésére szimulációt végeztünk annak feltételezésével, hogy kétmagvú heterofémis komplexek nem képződnek. Az így nyert 1:1:1 arány mellett számolt, a biológiai rendszerekben releváns koncentrációkat (1  $\mu$ M) figyelembe vevő ún. predominancia diagrammokat a 23. ábra mutatja be. Mint az látható, a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) kation mindkét peptidről képes leszorítani a rezet, a karnozin esetén közel 100 %-ban, a GHK esetén az egyensúlyi rendszerben a peptid 2/3-a ródiumhoz koordinálódik pH 7,4-nél. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált két peptid erős, a réz(II)-nél is erősebb, kölcsönhatást alakít ki a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) kationnal.

### 3.4 Az etilén-diamin/bipiridil ligandumok és a vizsgált peptidek ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) komplexeinek termodinamikai összehasonlítása

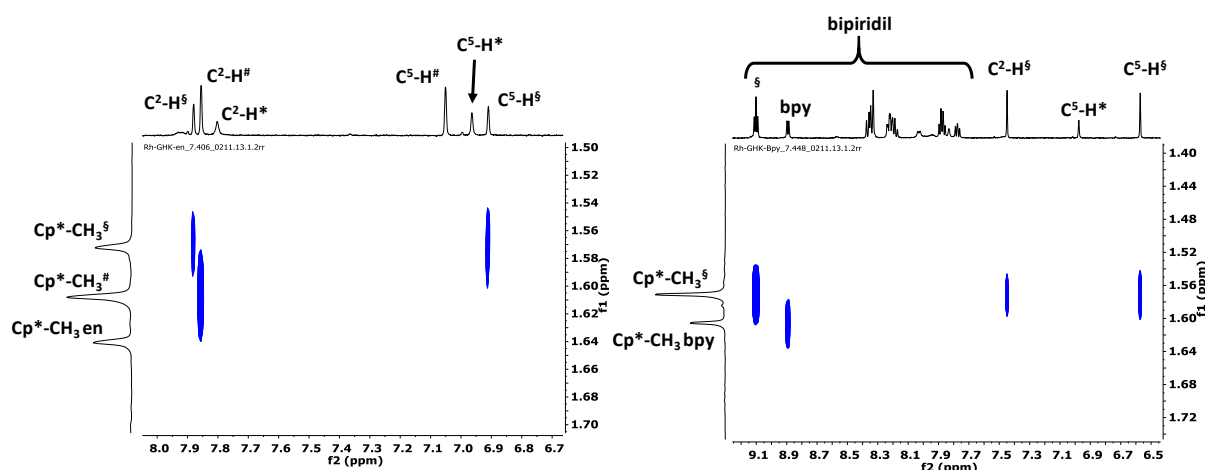
A teljes kép kialakításához, fentiek mellett, annak a vizsgálata is szükséges, hogy vajon a két peptid képes-e érdemben megváltoztatni a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) tartalmú potenciálisan gyógyhatású vegyületek (amiket jelen dolgozatban a félszendvics ródium kation etilén-diamin (en) és bipiridil (bpy) komplexével modelleztünk) biospeciációját. Ennek érdekében  $^1\text{H}$  NMR technikával vizsgáltuk a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-en/bpy-peptid terner rendszerek egyensúlyi speciációját pH = 7,4-nél. Méréseink során *in situ* előállítottuk a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-en/bpy komplexeket, majd ehhez az oldathoz ekvivalens mennyiségben hozzáadtuk a peptideket és vizsgáltuk az egyensúlyi rendszerben (kb. 48 óra után) előálló speciációt (24. ábra).



**24. ábra** A Cp\*-CH<sub>3</sub>  $^1\text{H}$  NMR jelek a különböző 1:1:1 terner rendszerekben ([en/bpy]<sub>tot</sub> = [( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)]<sub>tot</sub> = [peptid]<sub>tot</sub> = 1 mM, *I* = 0,2 M (KCl), *T* = 298 K)  
 □ : [(Cp\*)Rh(N,N)(peptid)] terner komplex,  
 ■ : [(Cp\*)Rh(peptid)] biner komplex

A 24. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált peptidek mind a négy rendszerben jelentős mennyiségű terner komplexet képeznek, sőt a ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-en-GHK terner rendszerben a biner ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III)-GHK komplex jele is megjelenik. Ez utóbbi arra utal, hogy a GHK

peptid képes kiszorítani az erősen kötődő kétfogú etilén-diamint a ródium koordinációs szférájából. Fenti egyensúlyi oldatok 2D NOESY spektruma alapján az is megállapítható, hogy a terner komplexekben a peptid egyfogú ligandumként koordinálódik a fémionhoz, mégpedig N<sup>1</sup>-nitrogénjén keresztül, hiszen a NOESY spektrum (25. ábra) tanúsága szerint mind a C<sup>2</sup>-H, mind a C<sup>5</sup>-H hidrogének térközei helyzetben vannak a Cp\*-gyűrű metilprotonjaihoz képest, ami csak az N<sup>1</sup>-nitrogén koordinációja esetén képzelhető el. Összefoglalóan elmondható, hogy a vizsgált két peptid és a (η<sup>5</sup>-Cp\*)Rh(III) tartalmú potenciálisan gyógyhatású vegyület kölcsönhatása képes utóbbi biospeciációját befolyásolni, akár még az eredeti ligandumot is képes kiszorítani a fémion koordinációs szférájából, így a fenti és analóg peptidekkel való kölcsönhatást minden esetben figyelembe kell venni egy (η<sup>5</sup>-Cp\*)Rh(III) tartalmú potenciálisan gyógyhatású vegyület farmakológiai vizsgálatánál.



**25. ábra:** A (η<sup>5</sup>-Cp\*)Rh(III)-GHK-en (bal) és (η<sup>5</sup>-Cp\*)Rh(III)-GHK-en (jobb) rendszerek NOESY spektrumának részletei (#: biner peptid komplex, §: terner komplex, \*: szabad peptid, en/bpy: biner en/bpy komplex)

#### 4. Összefoglalás

TDK dolgozatomban a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  félszendvics kationt tartalmazó potenciálisan rákellenes hatású komplexek biospeciációját meghatározó termodinamikai faktorok jobb megértése céljából vizsgáltuk a karnozin ( $\beta$ -alanil-L-hisztidin) és GHK (glicil-L-hisztidil-L-lizin) endogén peptidek  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  félszendvics kationnal képzett komplexeit. A biner rendszerek mellett tanulmányoztuk a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -peptid-L terner rendszereket is (ahol L= etilén-diamin (**en**) vagy bipiridil (**bpy**) kétfogú ligandumok). Utóbbi  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -**en** és -**bpy** komplexek a potenciálisan rákellenes vegyületet modellezték, így következtetéseket vonhattunk le arra nézve, hogy a vizsgált endogén peptidek ténylegesen képesek-e befolyásolni a rákellenes  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  származékok biospeciációját. E vizsgálatok jelentőségét az adja, hogy mindkét peptid viszonylag nagy koncentrációban van jelen az emberi szervezetben, így feltételezhető a Rh(III) tartalmú hatóanyag és az említett peptidek kölcsönhatása. Vizsgálataim során pH-potenciometriás, UV-Vis spektrofotometriás és NMR spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk, a termodinamikai sajátságokra ezek eredményeinek együttes kiértékelésével következtettünk.

Eredményeink azt mutatták, hogy mindkét peptid erős kölcsönhatást alakít ki a félszendvics kationnal, de a GHK komplexek stabilitása kiemelkedően nagy. Fiziológias pH-n a csatolt kelátgyűrűk  $\{\text{NH}_2, \text{N}^-_{\text{amid}}, \text{N}_{\text{im}}\}$  típusú koordinációt eredményeznek, a két peptid csak a gyűrűk tagszámban mutat eltérést. Mivel mindkét peptid döntően Cu(II) komplexek formájában található meg az élő szervezetben, irodalmi adatok felhasználásával vizsgáltuk a réz(II)-peptid- $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  terner rendszereket is. Megállapítottuk, hogy a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  kation jelentős mértékben képes kiszorítani a réz(II)-t karnozin/GHK komplexéből. A  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -peptid-L terner rendszerek vizsgálata arra utalt, hogy minden vizsgált rendszerben jelentős mennyiségű terner komplex képződik a peptidek imidazolgyűrűjének egyfogú ( $\text{N}^1$ -nitrogénen keresztül) koordinációja révén. Sőt a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -**en**-GHK terner rendszerben a biner  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$ -GHK komplex is megjelenik, azaz a GHK képes kiszorítani az erősen kötődő kétfogú etilén-diamint a ródium koordinációs szférájából.

Összefoglalva, a vizsgált két peptid valóban képes lehet a Rh(III)-tartalmú potenciálisan gyógyhatású vegyületek biospeciációját befolyásolni, akár még az eredeti ligandumot is képes kiszorítani a fémion koordinációs szférájából. Így a fenti és analóg peptidekkel való kölcsönhatást minden esetben figyelembe kell venni a  $(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh(III)}$  tartalmú potenciálisan gyógyhatású vegyületek farmakológiai vizsgálatánál.

## 5. Irodalomjegyzék

- [1] Kelemen Hajnal, Székely-Szentmiklósi Blanka, Hancu Gabriel, Biológiaiilag aktív fémvegyületek gyógyászati alkalmazása, *Orvostudományi Értesítő*, 2013, **86**, 29-35.
- [2] Dr. Máthé Csaba, Doktori értekezés, Cisplatin nephrotoxicitás, Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola (Budapest, 2014)
- [3] Barbara Seroka, Zenon Łotowski, Agnieszka Hryniewicka, Lucie Rárová, Rafal R, Sicinski, Aneta M, Tomkiel, Jacek W, Morzycki, Synthesis of New Cisplatin Derivatives from Bile Acids, *Molecules*, 2020, **25**, 655
- [4] Klaudia Málíková, Lukáš Masaryk and Pavel Štarha, Anticancer Half-Sandwich Rhodium(III) Complexes, *Inorganics*, 2021, **9**, 26
- [5] Azza Ahmed Hassoon, Attila Szorcsik, Ferenc Bogár, Ibolya Zita Papp, Livia Fülöp, Zoltán Kele, Tamás Gajda, The interaction of half-sandwich ( $\eta^5$ -Cp\*)Rh(III) cation with histidine containing peptides and their ternary species with (N,N) bidentate ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, **216**, 111330
- [6] Enyedy Éva Anna, Rákellenes fémkomplexek oldatkémiája és farmakokinetikai viselkedésüket befolyásoló tulajdonságaik, MTA doktori értekezés (Szeged), 2019
- [7] Giulio Vistoli, Carnosine in the Context of Histidine-Containing Dipeptides, From the book: Imidazole Dipeptides: Chemistry, Analysis, Function and Effects, Royal Society of Chemistry, 2015
- [8] Andrea Guiotto, Andrea Calderan, Paolo Ruzza and Gianfranco Borin, Carnosine and Carnosine-Related Antioxidants: A Review, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, **20**, 2293 - 2315
- [9] Lujuan Xing, MacKenzie E, Cheeb, Hua Zhang, Wangang Zhanga, Yoshinori Mine, Carnosine—a natural bioactive dipeptide: bioaccessibility, bioavailability and health benefits, *Journal of Food Bioactives*, 2019, **5**, 8-17
- [10] Masahiro Kawahara, Ken-ichiro Tanaka, Midori Kato-Negishi, Zinc, Carnosine, and Neurodegenerative Diseases, *Nutrients*, 2018, **10**, 147
- [11] S, De Marchis, C, Modena, P, Peretto, A, Migheli, F, L, Margolis, and A, Fasolo, Carnosine-Related Dipeptides in Neurons and Glia, *Biochemistry*, 2000, **7**, 824-833

- [12] Jiao-yan Cheng, Jian-bo Yang, Yuan Liu, Min Xu, Yu-yan Huang, Jing-jing Zhang, Pei Cao, Jian-xin Lyu, Yao Shen, Profiling and targeting of cellular mitochondrial bioenergetics: inhibition of human gastric cancer cell growth by carnosine, *Acta Pharmacologica Sinica*, 2019, **40**, 938–948
- [13] Chung-Der Hsiao, Hsin-Hui Wu, Nemi Malhotra, Yen-Ching Liu, Ying-Hsuan Wu, Yu-Nung Lin, Ferry Saputra, Fiorency Santoso, Kelvin H.-C. Chen, Expression and Purification of Recombinant GHK Tripeptides Are Able to Protect against Acute Cardiotoxicity from Exposure to Waterborne-Copper in Zebrafish, *Biomolecules*, 2020, **10**, 1202
- [14] Loren Pickart, Anna Margolina, Regenerative and Protective Actions of the GHK-Cu Peptide in the Light of the New Gene Data, *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, **19**, 1987
- [15] Yan Dou, Amanda Lee, Lida Zhua, John Morton, Warren Ladiges, The potential of GHK as an anti-aging peptide, *Aging Pathobiology and Therapeutics*, 2020, **2**, 58-61
- [16] F, J, C, Rosotti, H, Rosotti, The determination of stability constants, McGraw-Hill Book Co., New York, **1962**, 149
- [17] E, Högfeltdt, Stability Constants of Metal-Ion Complexes, Part A, Inorganic Ligands, Pergamon, New York, **1982**, 32
- [18] <http://www.hyperquad.co.uk/HQ2013.htm>, 28. 06. 2022
- [19] Kiss Tamás, Gajda Tamás, Gyurcsik Béla, Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Tankönyvkiadó, Budapest, 2007
- [20] L, Zékány, I, Nagypál és G, Peintler, „PSEQUAD for chemical equilibria, Technical,” Technical Software Distributors, Baltimore, MD, 1991.
- [21] IUPAC Stability Constants Database, <https://www.acadsoft.co.uk/scdbase/scdbase.htm>, 28. 06. 2022