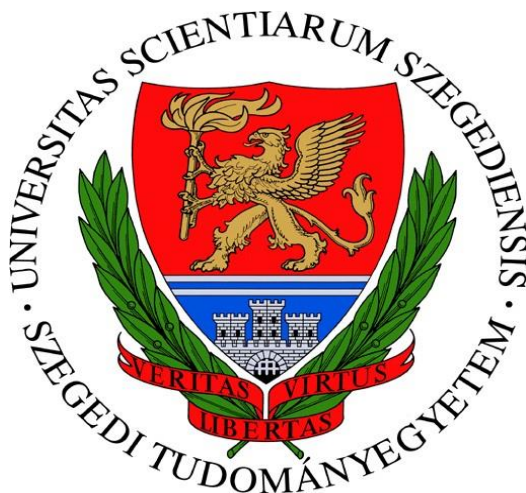


SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



OTDK-dolgozat

8-hidroxi-kinolinok és félszendvics fémkomplexeik oldatkémiai jellemzése

Egri Gergő

Általános orvos II. évf.

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Enyedy Éva Anna

egyetemi docens, MTA doktora

Pivarcsik Tamás

PhD hallgató

Szeged

2022.

Tartalomjegyzék

1.	Tartalmi összefoglaló	4
2.	Bevezetés	5
3.	Irodalmi áttekintő	6
3.1	Kemoterápia	6
3.2	Multidrog rezisztencia	6
3.3	8-hidroxi-kinolinok	7
3.4	Félszendvics ródium és ruténium komplexek	9
4.	Célkitűzések.....	12
5.	Kísérleti körülmények és mérési módszerek	13
5.1	Felhasznált anyagok.....	13
5.2	Mérési módszerek és körülmények.....	13
5.2.1	UV-látható spektrofotometria.....	13
5.2.2	Spektrofluorimetria.....	14
5.2.3	¹ H NMR spektroszkópia	15
5.2.4	Lipofilitás vizsgálat	16
5.2.5	Citotoxicitási adatok mérése.....	16
6.	Eredmények	17
6.1	A ligandumok oldatkémiai vizsgálata.....	17
6.2	A félszendvics komplexek oldatkémiai vizsgálata	21
6.3	A ligandumok és a komplexek kölcsönhatása humán szérum albuminnal (HSA)	30
6.4	A vegyületek citotoxicitása.....	32
7.	Összefoglalás	35
8.	Hivatkozások	36
9.	Köszönetnyilvánítás.....	39

Rövidítések

ATP	adenozin-trifoszfát
Cp*	pentametil-ciklopentadienil anion
Cym	<i>p</i> -cimol / <i>p</i> -izopropil-toluol
DNS	deoxiribonukleinsav
8HQ	8-hidroxi-kinolin
HQCl-pip	5-klór-7-(piperidin-1-ilmetil)-kinolin-8-ol
HQCl-pyr	5-klór-7-(pirrolidin-1-ilmetil)-kinolin-8-ol
HSA	humán szérum albumin
MDR	multidrog rezisztencia
P-gp	P-glikoprotein

1. Tartalmi összefoglaló

A kemoterápiás kezelések során fellépő mellékhatások és rezisztencia még mindig komoly problémát jelentenek. Ebből kifolyólag a gyógyszerfejlesztés során nagy hangsúlyt fektetnek olyan vegyületek fejlesztésére, amelyek szelektívebbek, rezisztens sejteken is hatásosak és jobb farmakokinetikai tulajdonságokkal bírnak a fent említett két probléma kiküszöbölésére.

A diákköri munkám során vizsgált két 8-hidroxi-kinolin Mannich-bázis származék és ezek félszendvics ruténium- és ródiumkomplexei hatékonynak bizonyultak humán rákos sejtvonalakon. Ezenfelül jelentős citotoxicitást mutattak multidrog rezisztens (MDR) sejtvonalon is. A vegyületek farmakokinetikai tulajdonságainak feltérképezése érdekében elengedhetetlen azok oldatkémiai jellemzése, továbbá szállítófehérjékkel való kölcsönhatásuknak vizsgálata is ezt a célt szolgálja. Mind a ligandumokat, mind a félszendvics komplexeket jellemeztem oldatkémiai szempontból. Proton disszociációs állandókat határoztam meg a ligandum és a komplexek deprotonálódási folyamataira, továbbá vizsgáltam a komplexek stabilitását és klorid/víz cserefolyamatát. Ehhez UV-látható spektrofotometriás és ^1H NMR spektroszkópiás technikákat alkalmaztam. A lipofilitás vizsgálatához hagyományos *n*-oktanol/víz megoszlásos módszert használtam. A komplexek humán szérum albuminhoz (HSA) való kötődését spektrofluorimetriás módszerrel jellemeztem.

A proton disszociációs állandók alapján a ligandumok semleges, illetve részben pozitívan töltött formában vannak jelen fiziológiás pH-n. A félszendvics kationokkal kivétel nélkül nagy stabilitású komplexeket képeznek. Míg a ligandumok erősen lipofil tulajdonságúak, addig a komplexek már nagyobb vízdoldhatósággal jellemezhetők, amelyet befolyásol a közeg kloridion koncentrációja. Spektrofluorimetriás mérések alapján a komplexek nagy affinitást mutattak a HSA mindkét kötőzsebe iránt.

Kulcsszavak: 8-hidroxi-kinolin, félszendvics, oldatspeciáció, albumin, MDR

2. Bevezetés

Az emberi szervezet egy rendkívül összetett halmaz, melyet szervek és azok rendszerei alkotnak. Ezek szorosan együttműködve biztosítják a belső környezetet állandóságát, a homeosztázist. Ez az egyensúlyi állapot kvantitatív paraméterekkel jellemezhető. A tartományon belüli értékek egészséget jelentenek, a fiziológiás mennyiségektől való eltérés patológiás viszonyokra utal. Ezeket a változókat folyamatos monitorozással lehet követni.

Ahogy az átlagosan várható élettartam is mutatja Magyarországon, egy újszülöttnak magasabb életkor elérést jósolnak, mint az elmúlt időszakban [1]. Ez ugyanakkor hosszabb időtartamot jelent, ami alatt expozíciónak van kitéve az emberi test. Napjainkban a társadalmat tizedelő betegségek jelentős hányadát a daganatos elváltozások jelentik [2].

A betegség manifesztálódása a szervezet építőegységei, a sejtek 180°-os fordulatával írható le. A rákos sejtek folyamatosan osztódnak, a tápanyagraktárakat felőrlik, gátolják a rendszer egészséges részének működését. Az emberi test ugyan rendelkezik különféle védelmi vonalakkal (celluláris, humorális immunitás), azonban a rákos sejtek az apoptotikus útvonalukat kiiktatják, így a szervezet nem képes megbirkózni az elváltozott sejtekkel [3].

A tudományos közösség számos módon próbál fellépni a rákos sejtek képezte tumorokkal szemben. Az alapvető sebészi technikáktól kezdve, a hő – és sugárterápián át, a molekuláris szinten való kezelést is számban tartva alkalmaz kémiai vegyületeket.

Köztudatba kerülésekor ígéretesnek bizonyult a kemoterápia. A kezdeti sikereket hanyatlás követte, aminek legfontosabb okai az alábbiak voltak:

- Rezisztencia: akárcsak a baktériumok antibiotikumra mutatott ellenállóképessége, úgy a rákos sejtek is képesek így reagálni az őket ért ingerekre, ezzel további komplikációkat okozva [4].
- Mellékhatások: a kemoterápia fő problémáját a kezelés során felmerülő súlyos mellékhatások jelentik, amelyeket a szelektivitás hiánya okoz [4].

A kutatások célja az újabb rákellenes és jobb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkező vegyületek fejlesztése. Kemoterápiás szerek körében a fémkomplexek, azon belül is a Pt-tartalmú komplexek hatásosnak bizonyultak. Azonban a fent említett komoly hátrányok itt is jelen vannak. A platinafémek csoportja, mint például a ruténium- vagy ródiumkomplexek alternatívát jelenthetnek ebből a szempontból.

3. Irodalmi áttekintő

3.1 Kemoterápia

A daganatellenes eljárások rövidtávú célja a tumorkezelés, a hosszabbtávú pedig az azt kialakító tényezők feltárása és elfojtása. A lokális kezelési módok a jól körül határolható gócok esetén vehetők számításba, minden más esetben a kemoterápia a javasolt.

A kemoterápia során olyan vegyületeket juttatnak a páciens szervezetébe, amelyek gátolni képesek a sejtburjánzást. Ma már széles spektrumon mozognak azok a vegyületek, amelyekkel képes az orvoslás befolyást szerezni a korlátlan osztódás felett. Ezen vegyületek mechanizmusuk szerint – többek között – az alábbi csoportokba oszthatók [5]:

- Alkilálószeresek: Jelenlétükben szubsztituált guaninok keletkeznek, melyek helytelen bázispárosodást okoznak. Emellett az interkalálódni képes vegyületek is ebbe a csoportba tartoznak (Pl.: nitrogénmustárok, hidrazinok, platina-tartalmú ágensek) [5].
- Antimetabolitok: Purin és pirimidin analógok. A DNS szintézisét gátolják, nagyfokú hasonlóságot mutatva a szintézisben kulcsszerepet játszó molekulákkal.
- Mitotikus orsó gátlók: Felülírják az orsót alakító mikrotubulusokat, így nem megy végbe a mitózis metafázisa. Így indukálnak sejthalált a taxánok és a vinca alkaloidok [6].
- Topoizomeráz inhibitorok: Olyan anyagok (pl.: doxorubicin), amelyek gátolják a topoizomerázok működését, ezzel akadályozva a DNS replikációt [7].

A számos alcsoportnak és a vegyületek erős citotoxikus hatásának köszönhetően a kemoterápia még mindig egy elterjedt és hatásos módszer a rákkezelésben. Mindazonáltal, a kezelés során súlyos mellékhatások léphetnek fel. A nem elfajzott, egészséges sejtek az ingerek hatására roncsolódhatnak [3,4]. A megfelelő szelektivitás hiánya mellett a rezisztencia kialakulása is problémát jelent [4,5].

3.2 Multidrog rezisztencia

A multidrog rezisztencia (MDR) fogalma gyakori a rákkutatásban. Kialakulása során a rákos sejt szerkezetileg – akár nagymértékben is – eltérő vegyületek ellen alakít ki rezisztenciát védekező mechanizmusként [5]. Kialakulása többek között az ún. ABC (ATP-binding cassette) transzport fehérjék túlzott expresszáldásának eredménye. Ezen fehérjék –

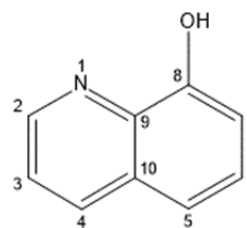
működésük során – képesek a sejtbe jutott gyógyszermolekulákat a sejten kívüli térbe juttatni, így hatástalanítani őket. Az egyik ilyen, jól ismert és széleskörűen vizsgált fehérje a P-glikoprotein (P-gp), melynek inhibíciója egy hatásos módszer lehet multidrog rezisztens sejtek ellen [8]. A rezisztencia felderítése során tesztelt 'MDR inhibitorok' három csoportba sorolhatók [9]:

- Az *első generációs* blokkolók hatásosnak bizonyultak mesterséges körülmények között, de adott vérszérumi koncentrációban kardiovaszkuláris problémákhoz vezettek az immunrendszer gyengítése mellett. (pl.: cyclosporin-A)
- A *második generációs* inhibitorok esetében az elérendő cél a védelem hatásfokának növelése és a toxicitás csökkentése volt. *In vitro* az előbbi sikerült, míg az állatmodelleken való kísérlet az utóbbit cáfolta. (pl.: valspodar)
- A *harmadik generációs* blokkolók a P-gp-hez kapcsolódó receptorokon keresztül fejtették ki a hatásukat. (pl.: zosuquidar)

Azonban a számításba vett gyógyszerjelöltek nagy része – ha el is jutott klinikai fázisba – sikertelennek bizonyult a fejlesztés során. Ebből kifolyólag új és hatékony P-gp inhibitorok fejlesztése a továbbiakban is indokolt. Mindazonáltal, a P-gp inhibíciója nem szükséges feltétele az MDR szelektivitás eléréséhez. Számos olyan vegyületet találtak melyek nem a P-gp gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat a rezisztens sejtekkel szemben. Szakács Gergely és munkatársai rámutattak arra, hogy az ilyen vegyületekben gyakran vannak kelátképző csoportok, pl. ilyenek egyes tioszemikarbazonok vagy 8-hidroxi-kinolinok [10,11].

3.3 8-hidroxi-kinolinok

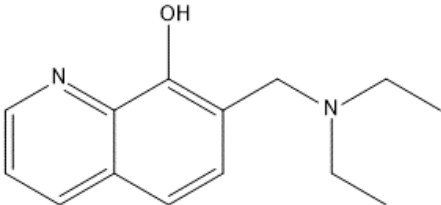
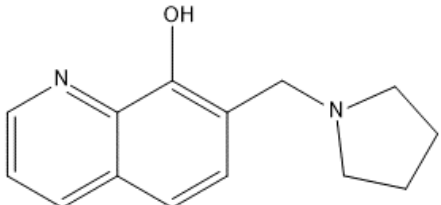
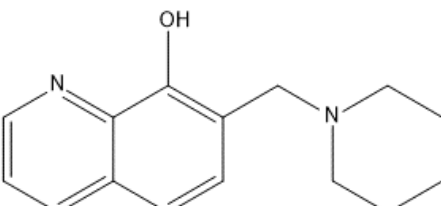
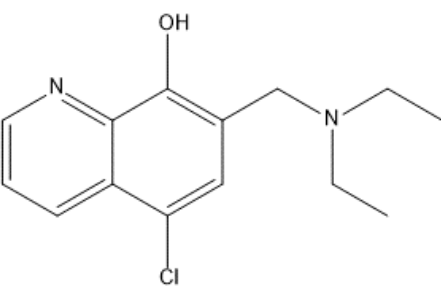
A 8-hidroxi-kinolin (8HQ) (1. ábra) alapváz egy nitrogéntartalmú heterociklus, amelyben egy fenol és egy piridin molekula kondenzáltan kapcsolódik össze. Mind a 8HQ alapváz és a belőle – különböző szintetikus utakon – előállítható származékok széles körben vizsgáltak kedvező és szignifikáns bioaktivitásuk miatt. Kezdetben a 8HQ-t gombaellenes- és tartósítószerként használták, későbbiekben antibakteriális és rákellenes hatása keltette fel a figyelmet [12]. A belőle származtatott analógoknak szélesspektrumú bioaktivitásuk van: a rákellenes és antibakteriális hatásuk mellett találunk antivirális és gombaellenes tulajdonságú származékokat is [13,14]. Azonban, a rossz vízoldhatóság – amely a legtöbb vegyületére jellemző – korlátozza gyógyszerként való felhasználásukat. Kutatócsoportunkban, korábban



1. ábra. A 8-hidroxi-kinolin

vizsgáltak olyan származékokat is, amelyek kiváló vízoldhatósággal rendelkeztek [15]. Ezt a 7-es pozícióban lévő, ikerionos szerkezetű CH₂-N(prolin) egység beépítésével érték el. Továbbá, így az MDR szelektivitásukat is növelték, ami az előbb említett 7-es pozíciójú CH₂-N csoportnak köszönhető. Mind az aromás gyűrű, mind a metilén-amin csoport szubsztitúciója megvalósítható, így nagyon sokféle származék előállítása lehetséges. Számos eredmény született, amelyek különféle 8HQ analógokhoz vezetnek (1. táblázat).

1. táblázat – 8HQ származékok citotoxicitása [16] érzékeny MES-SA (humán méh szarkóma) és az MDR MES-SA/Dx5 sejtvonalakon mérve. Az IC₅₀ azt a koncentrációt jelöli, aminél a sejtek 50%-a elpusztul az alkalmazott inkubációs idő alatt. A szelektivitási arány az érzékeny és az MDR sejteken kapott IC₅₀ értékek hányadosa.

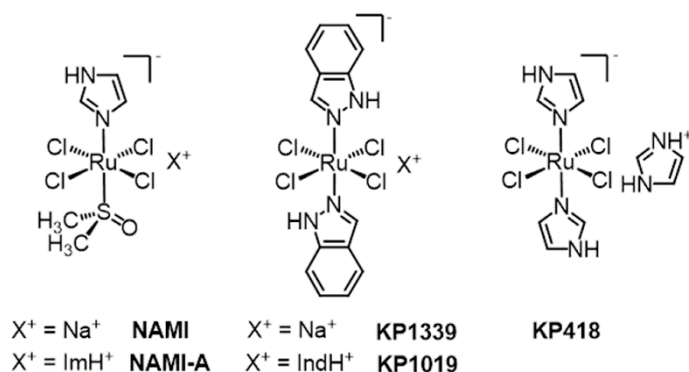
Szerkezeti képlet	IC ₅₀ / μM MES-SA	IC ₅₀ / μM MES-SA/Dx5	Szelektivitási arány
	7,35 ± 1,28	1,64 ± 0,24	4,49
	4,64 ± 0,82	1,47 ± 0,25	3,16
	5,21 ± 0,95	0,85 ± 0,18	6,13
	2,97 ± 0,33	0,35 ± 0,06	8,44

A kutatások során a legjellemzőbb csoport az alifás nitrogén a metilén-csoporton, továbbá jellemző az aromás gyűrű klórozása, nitrálása az 5-ös pozícióban. A vizsgált származékok jelentős szelektivitást mutattak az MDR MES-SA/Dx5 sejtvonallal szemben [16].

Emellett, megfigyelték, hogy a legtöbb származék kedvező tulajdonságai (citotoxicitás, MDR szelektivitás) az endogén fémionokkal (Fe(II/III) , Cu(II) , Zn(II)) való komplexképzésükkel hozható összefüggésbe [11,16,17]. Egyes hipotézisek annak tulajdonítják a kiemelkedő biológiai eredményeket, hogy a molekula a rákos sejtbe bejutva, az ott található létfontosságú fémionokkal – elsősorban vassal – komplexet képezve kerül eltávolításra a P-gp pumpák által [17]. Ez a mechanizmus vashiányos állapotot eredményez a sejtnek, ami így destabilizálódik, majd elpusztul [17]. Az erős komplexképzési képesség az aromás (N,O) donoratom kombináció eredménye, melyben a fémion egy öttagú kelátgyűrűben helyezkedik el. Ebből kifolyólag számos rákellenes átmenetifém-komplexet állítottak már elő, legkiemelkedőbb a KP46 kódnévvel ellátott vegyület, amely a 8HQ Ga(III)-ionnal alkotott trisz-komplexe [18]. A komplexképzés eredményeként a fizikai-kémiai tulajdonságok jelentősen változhatnak (töltés, méret, vízzoldhatóság, lipofilitás), így a vegyület farmakokinetikai és farmakodinámiai jellemzői is. A nagy oldatbeli stabilitás kritikus paraméter bioaktivitás szempontjából, hisz a komplex a ligandum szállítását is szolgáltathatja a target biomolekulához, vagy épp maga a fémkomplex viselkedhet szubsztrátként/inhibitoroként.

3.4 Félszendvics ródiom- és ruténiumkomplexek

A klinikai gyakorlatban próbált fémtartalmú kemoterápiás gyógyszerek a DNS-támadásközpontú Pt(II)-komplexek voltak az első időszakban [19]. Ezek egy része még ma is nemzetközileg elismert hatóanyag egyedüli, de kombinált használatban is a rákterápiában. A ciszplatint ($\text{cis-[Pt(II)Cl}_2(\text{NH}_3)_2]$) még mindig sikeresen alkalmazzák kemoterápiás kezeléseknél, azonban a korábban említett súlyos mellékhatások és a rezisztencia kialakulása komoly problémát jelent [4]. A platina(II)komplexek kezdeti sikere révén kerültek a középpontba az egyéb platinafémek (Rh, Ru) komplexei is. A NAMI-A, KP1019 és a BOLD-100 a három nevezetes ruténium(III)komplex (2. ábra), melyek elérték a klinikai fázist [20].

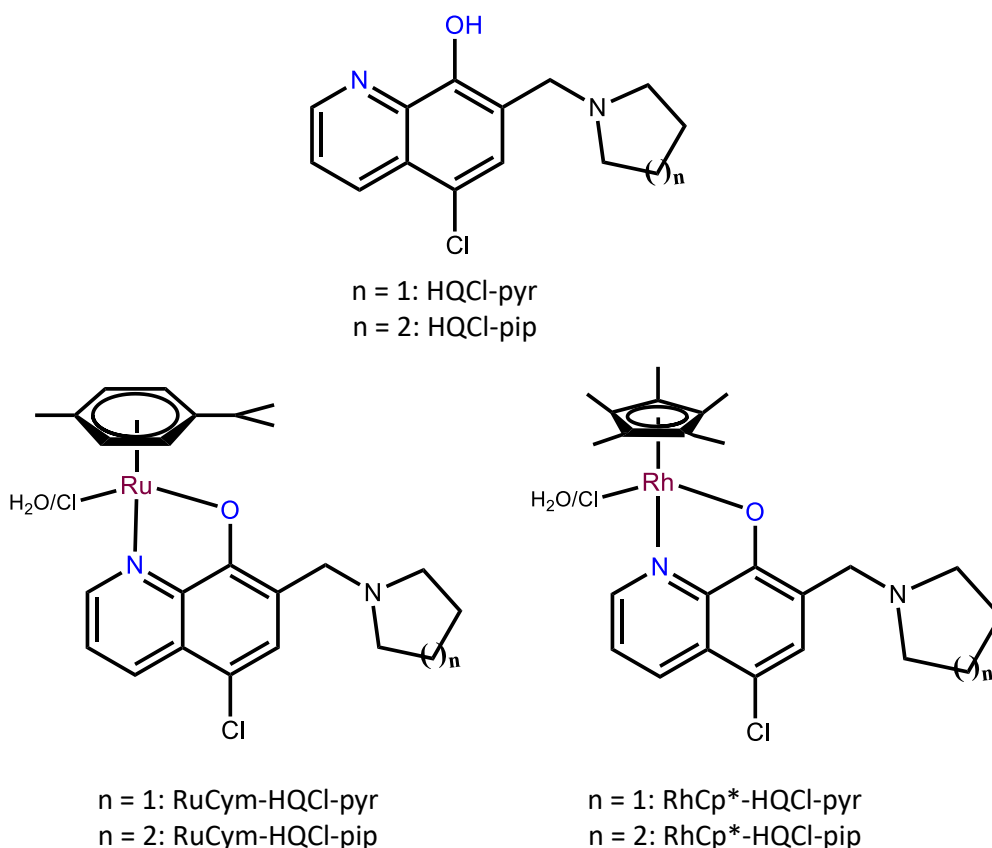


2. ábra – Klinikai vizsgálatba került rákellenes ruténium(III)komplexek szerkezeti képletei [20]

Szintén figyelemreméltóak a Ru(II) félszendvics komplexei, melyben a fémion koordinációs helyeiből hármát egy arén-gyűrű – jellemzően *p*-cimol (*p*-izopropil-toluol, Cym) – foglal el. Ilyen elrendezésben az arén-gyűrű számos kedvező tulajdonságot ad: csökkenti a hidrolízis mértékét, fokozott kinetikai labilitást ad és stabilizálja az alacsony oxidációs állapotot. A ruténium +2-es oxidációs állapotban van, amely felelős a kedvező biológiai aktivitásért. Ilyen komplex a RAPTA-C névvel ellátott vegyület, melyben a maradék három koordinációs helyet két klorid és egy 1,3,5-triaza-7-foszfadecahydro-4H-phthalazine (PTA) ligandum foglalja el. Platinafémek közül a félszendvics pentametil-ciklopentadienil-Ru(III) (RhCp*) – a Rh(III) Ru(II)-ionnal való izoelektronossága révén – komplexek is széleskörben vizsgáltak. 1,10-fenantrolinnal képzett komplexe erős citotoxicitást mutatott több rákos sejtvonalon is, emellett jelentős MDR szelektivitására is felfigyeltek [21]. Az ilyen típusú komplexekben a kétfogú ligandum mellett, egy labilis, egyfogú ligandum – jellemzően klorid vagy víz – foglal helyet. A donoratom kombinációtól (X,Y) függően, mely általában X,Y = N, S, O heteroatomok, változatos stabilitással, farmakokinetikai tulajdonságokkal és bioaktivitással rendelkező vegyületek nyerhetők. Az előző fejezetben részletezett 8-hidroxi-kinolinok (N,O) nagy stabilitású komplexet képeznek félszendvics Ru(II) és Rh(II) fémorganikus kationokkal. Hartinger kutatócsoportja számos ilyen félszendvics fémorganikus komplexet állított már elő halogéntartalmú 8HQ származékkal, azonban rossz vízoldhatóságuk korlátozza felhasználásukat [22]. Az oldhatóság növelésére több lehetőség is rendelkezésre áll: Csökkenthetjük mind az arén-gyűrű mind a 8HQ ligandum lipofilitását, vagy éppen az egyfogú ligandum variálásával érhetjük el ezt az eredményt. Egy vegyület lipofil-hidofil tulajdonságának optimalizálásával óvatosan kell eljárni, hiszen több esetben a túlzott vízoldhatóság a bioaktivitás romlását vagy éppen teljes elvesztését eredményezheti. Korábban, kutatócsoportunkban, a vízoldhatóság javítását egy szulfonált származék, a 8-hidroxi-kinolin-

5-szulfonát ligandum segítségével sikerült elérni, azonban ez a rákellenes hatás elvesztését is eredményezte [23]. Szoros előzményként tekinthető diákköri munkámnál az ikerionos prolin, illetve homoprolin egységek 7-es pozícióba való beépítése is, ami szintén kitűnő vízdoldhatóságot adott a vegyületeknek és emellett a citotoxikusságuk is csak kisebb mértékben csökkent. RhCp* komplexek jelentős citotoxicitást és szelektivitást mutattak humán rákos sejtvonalakon [15,24].

Munkám során két 8-hidroxi-kinolin Mannich bázis (5-kloro-7-(pirrolidin-1-ilmetil)kinolin-8-ol (HQCl-pyr) és 5-kloro-7-(piperidin-1-ilmetil)kinolin-8-ol (HQCl-pip)) és félszendvics RuCym és RhCp* komplexeik (3. ábra) oldatkémiai tulajdonságait jellemeztem. Rákellenes hatásukat humán rákos sejtvonalakon (MES-SA, MES-SA/Dx5, Colo205, Colo320) teszteltük, valamint a vegyületek humán szérum albuminnal (HSA) való kölcsönhatását is tanulmányoztam.



3. ábra – A két vizsgált 8-hidroxi-kinolin Mannich bázis és félszendvics RuCym és RhCp* komplexeinek szerkezeti képlete

4. Célkitűzések

Egy gyógyszerjelölt molekula farmakokinetikai tulajdonságainak megismeréséhez elengedhetetlen annak oldatkémiai jellemzése. Így kaphatunk információt arról, hogy a vegyületünk hogyan viselkedik vizes oldatban különböző körülmények között. Dolgozatomban két MDR-szelektív aktivitást mutató 8HQ származék és azok félszendvics $[\text{Rh}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ és $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ kationokkal képzett komplexeinek minél szélesebb körű oldatkémiai jellemzését tűztem ki célul:

- [1] A ligandumok proton disszociációs folyamatainak jellemzése UV-látható és ^1H NMR spektroszkópiával.
- [2] A komplexképződés sebessége és a kialakult komplexek protoncsere egyensúlyainak vizsgálata UV-látható spektroszkópiával.
- [3] A komplexek stabilitási állandóinak meghatározása.
- [4] A komplexekben koordinálódott $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cl}^-$ ligandumcsere folyamat egyensúlyi vizsgálata UV-látható spektroszkópiával.
- [5] Klasszikus *n*-oktanol/víz megoszláson alapuló lipofilitás vizsgálat különböző kloridion koncentrációk mellett.
- [6] A komplexek humán szérum albuminnal (HSA) való kölcsönhatásának vizsgálata spektrofлуorimetriás módszerrel.

5. Kísérleti körülmények és mérési módszerek

5.1 Felhasznált anyagok

Vegyszerek közül a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$, KOH, KH-ftalát, D_2O , *n*-oktanol, 2,2'-bipiridin, HSA, danzil-glicin (DG) és trimetil-szilil-propánszulfonát a Merck Kft. terméke. KCl, NaCl, KNO_3 , HNO_3 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 Molar vagy Reanal termékek. Pufferelő közegként foszfát (20 mM) vagy PBS* puffert használtam. PBS* a PBS ('phosphate-buffered saline', foszfát pufferes sóoldat) puffer egy módosított változata, amelyben a K^+ , Na^+ és Cl^- ionok koncentrációja megközelítőleg annyi, mint az emberi vérérumban, összetétele: 1,5 mM KCl, 100,5 mM NaCl, 12,0 mM Na_2HPO_4 , 3,0 mM KH_2PO_4 . A törzsoldat és egyéb oldat készítéshez Milli-Q vizet használtam. A ligandumokat (HQCl-pyr, HQCl-pip) Szatmári István (SZTE, GYTK, Gyógyszerkémiai Intézet) kutatócsoportja, a RuCym és RhCp* komplexeket pedig egyik témavezetőm, Pivarsik Tamás PhD hallgató állította elő és karakterizálta.

A HSA oldatokat a mérés napján PBS* pufferben oldva készítettem. A danzil-glicin kötőhely markerből a törzsoldathoz körülbelül 1 ekvivalens lúg (KOH) került hozzáadásra. A ligandumok törzsoldatát szilárd beméréssel készítettem. A komplex törzsoldatokat a ligandumok, $[\text{Rh}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ és $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ triakva kationok ismert koncentrációjú törzsoldatából, 1:1 arányú összeméréssel állítottam elő.

5.2 Mérési módszerek és körülmények

5.2.1 UV-látható spektrofotometria

Az UV-látható spektroszkópia segítségével azok a vegyületek vizsgálhatóak, amelyek elnyelik az ultraibolya (200 – 400 nm), illetve a látható (400 – 800 nm) hullámhossz tartományba eső sugárzást. Az elnyelés során a molekula elektronjai gerjesztődnek, azaz egy magasabb energiájú pályára kerülnek. Az így kapott UV-látható spektrum minőségi és mennyiségi információt is tartalmaz, azonban, elsősorban mennyiségi meghatározásra alkalmazzák. Az anyag koncentrációja és az elnyelése (abszorbanciája) közötti összefüggést a Lambert-Beer törvény írja le:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (1)$$

melyben:

A_λ : λ hullámhosszon mért abszorbanca

ϵ_λ : λ hullámhosszon a moláris abszorbanca ($M^{-1}cm^{-1}$)

c : moláris koncentráció (M)

l : úthossz (cm)

A méréseket egy Agilent Carry 8454 típusú készülék segítségével, 190–1100 nm-es hullámhossztartományban, a megfelelő úthossz megválasztásával (amelyet továbbiakban mindig az ábraalírásban tüntetem fel), kvarc küvettával végeztem. A spektrumok mindig háttér- és alapvonal korrigáltak. Egyensúlyi állandókat a HypSpec programmal [25] számoltam.

5.2.2 Spektrofluorimetria

A spektrofluorimetria segítségével olyan vegyületek vizsgálhatóak, amelyek fluoreszcens tulajdonságúak. A megfelelő hullámhosszú sugárzás elnyelése során a molekula gerjesztődik, majd ezt az energiátöbbletet fénykibocsátás közben adja le. A fénybesugárzás megszűnésével a fényemisszió is megszűnik. Az ilyen molekulákra jellemző a merev, sík szerkezet, továbbá a konjugált kettős kötés és az aromás szerkezet. Mind a gerjesztő fénysugárzás hullámhossza, illetve az emittált fény hullámhossz-tartománya is anyagi minőségtől függő tényező. Gyakran alkalmazzák ezt a technikát fehérjék vizsgálatára is, ugyanis a biomolekulákban található fenilalanin, tirozin, és triptofán (Trp) fluoreszcens sajátosságúak. A HSA-ban található egyetlen Trp-214 aminosav a fehérje I-es kötőhely közvetlen közelében található. Ez az aminosav szelektíven gerjeszthető 295 nm hullámhosszúságú sugárzással. Ha ennek a kötőhelynek megváltozik a lipofil-hidrofil környezete (pl. kismolekula megkötése során) akkor ez a Trp-214-hez köthető fényemisszió csökkenésével jár, amelyet kioltásnak (kvencselésnek) nevezünk és ebből következtethetünk a ligandum-HSA kötés erősségére. Végezhetünk méréseket kötőhely markerek segítségével is. Ilyen marker például a warfarin vagy danzil-glicin. Ennek során a marker megkötődik a HSA kötőhelyére, változik az emissziós spektruma, majd egy kompetitor segítségével követni tudjuk ennek a markernek a disszociációját a fehérjéről, amelyet általában emisszió csökkenés követ, majd visszkapjuk a szabad marker emissziós spektrumát. Erre a folyamatra meghatározható egy kiszorítási állandó.

A számolás során figyelembe kell vennünk a belső filter hatást és az önabszorpciót. Az előbbi során a fluoreszkáló komponens elnyeli a fényforrásból érkező sugárzást, míg önabszorpció során fluoreszkáló komponens képes a saját maga által kibocsátott fény elnyelésére. A korrekció során az alábbi egyenletet alkalmazzuk:

$$F_{kor} = F_{mért} \cdot 10^{(A(EX)+A(EM))/2} \quad (2)$$

amelyben:

F_{kor} : korrigált fluoreszcens intenzitás

$F_{mért}$: mért fluoreszcens intenzitás

$A(EX)$: minta abszorbanciája a gerjesztett hullámhosszon

$A(EM)$: minta abszorbanciája az emissziós hullámhosszon

A kísérletek elvégzéséhez egy Fluoromax (Horiba Jobin Yvon) típusú spektrofluoriméter állt rendelkezésre termosztálható mintatartóval. A méréseket 25 °C-on, 1×1 cm-es kvarc küvetával végeztük. A monokromátor résszélessége 4 nm volt a gerjesztő és az emissziós oldalon is. A minták 1 μM HSA-t, illetve 1 μM markert tartalmaztak, a komplex koncentráció 0 és 51 μM között változott. A kísérlet típusától függően eltérő gerjesztési hullámhosszt alkalmaztam: Trp-kioltás: 295 nm; danzil-glicin kiszorítás: 335 nm. Az egyensúlyi állandókat szintén a HypSpec programmal számoltam [25].

5.2.3 ¹H NMR spektroszkópia

A mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) módot ad a mágneses tulajdonságokkal rendelkező atommagok vizsgálatához. A módszer alapja az atommagok mágneses momentuma és a külső mágneses tér kölcsönhatása, melyet az atommag körüli elektronok befolyásolják. Akkor a legerősebb, ha az atommag csupasz, ekkor nincs szerepe a kémiai árnyékolás jelenségének, amit az atommagot körülvevő elektronok okoznának a külső térrel szemben. A kémiai árnyékolást kifejezésére szolgál a kémiai eltolódás, ami függ a kémiai környezettől. Az eltolódás mértéke (a frekvencia értéke) annál nagyobb, minél árnyékoltabb az atommag. A mérés során kapott NMR spektrumban jelek és csúcsok vannak. Előbbiek intenzitása arányos a magok számával, míg az utóbbiak hasadásuk révén információt szolgáltatnak a szomszédos magokról. Az általam használt ligandumok oldatkémiai jellemzésére alkalmas a ¹H NMR spektroszkópia, valamint a ligandumok mellett a diamágneses komplexek képződének követése során is relevanciája van a módszernek.

A ^1H NMR spektroszkópiás méréseket Bruker Avance III HD Ascend 500 Plus típusú készülékkel végeztük WATERGATE vízelnyomásos módszerrel 10% (v/v) $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ és nátrium-trimetil-szilil-propánszulfonát (DSS) belső standard jelenlétében. A ligandum esetében pH-függő spektrumokat vettünk fel, a kezdő koncentráció 300 μM volt, 0,2 M-os ionerősség (KNO_3) mellett. Egyensúlyi állandókat a HypSpec programmal [25] számoltam.

5.2.4 Lipofilitás vizsgálat

A lipofilitás vizsgálatot klasszikus *n*-oktanol/víz megoszlásos módszerrel vizsgáltam pH = 7,40-en, pufferelő közegként 20 mM-os foszfát puffer használtam. A komplexek esetében eltérő kloridion koncentráció (4, 24 és 100 mM) mellett. A fázisok elválasztása után, mindkét fázis UV-látható spektrumát felvettem. A számolás az alábbi egyenleten alapult:

$$D_{7,4} = \left[\frac{Abs_{\text{törzsoldat}}}{Abs_{\text{elválasztás utáni vizes fázis}}} - 1 \right] \times \frac{V_{\text{vizes fázis}}}{V_{\text{n-oktanolos fázis}}} \quad (3)$$

ahol:

$D_{7,4}$: megoszlási hányados pH = 7,4-en

$Abs_{\text{törzsoldat}}$: törzsoldat abszorbanciája

$Abs_{\text{elválasztás utáni vizes fázis}}$: vizes fázis abszorbanciája elválasztás után

$V_{\text{vizes fázis}}$: vizes fázis térfogata

$V_{\text{n-oktanolos fázis}}$: *n*-oktanolos fázis térfogata

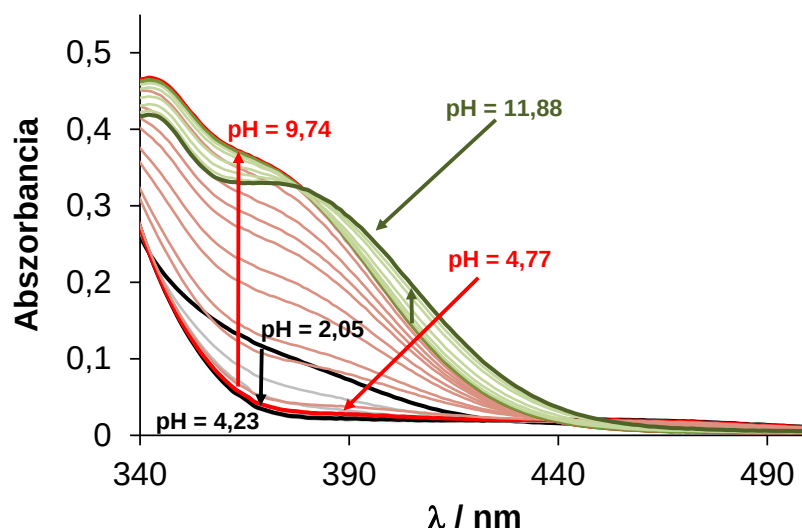
5.2.5 Citotoxicitási adatok mérése

A biológiai mérések Dr. Spengler Gabriella (SZTE, SZAOK, Mikrobiológiai Intézet) kutatócsoportjának, valamint Dr. Szakács Gergely és Dr. Tóth Szilárd (ELKH, TTK, Enzimológiai Intézet) kutatócsoportjának munkája révén valósultak meg.

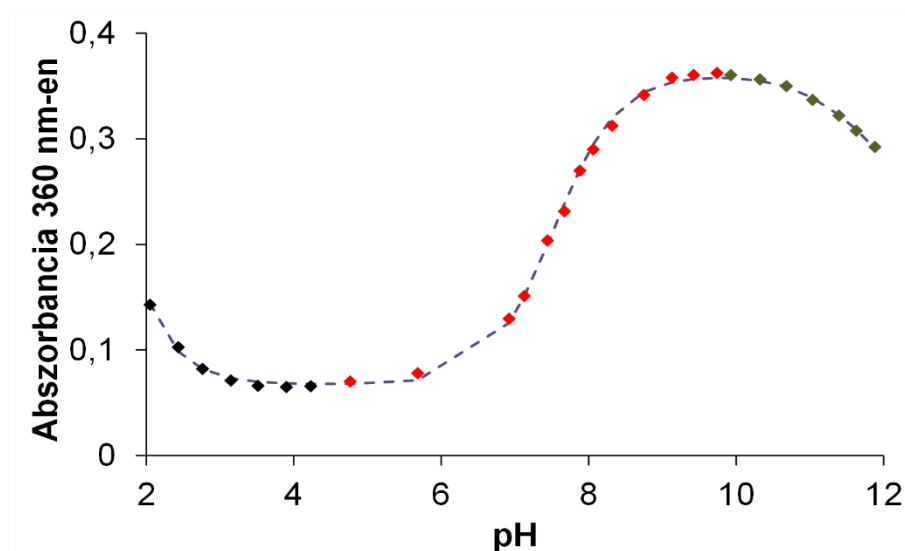
6. Eredmények

6.1 A ligandumok oldatkémiai vizsgálata

Az általam vizsgált két ligandumnak (HQCl-pyr, HQCl-pip, 3. *ábra*) teljesen protonált formában 3 disszociálabilis csoportja van, ezek a deprotonálódás sorrendjében: a kinolínium-nitrogén (N_qH^+), a hidroxilcsoport (OH) és a pirrolidínium/piperidínium ($N_{pyr/pip}H^+$) rész nitrogénje. Az ezekhez tartozó proton disszociációs állandókat (pK_a) UV-látható spektrofotometriás és 1H NMR spektroszkópiás módszerekkel határoztam meg, melyeket a 2. *táblázatban* tüntettem fel. A kutatócsoportban korábban vizsgált analóg szerkezetű 8HQ-(h)prolin hibridmolekulák esetében csak egy pK_a volt megbízhatóan meghatározva, ami a hidroxilcsoporthoz volt köthető, ugyanis a kinolínium-nitrogénhez és a gyűrűs, alifás nitrogénhez tartozó deprotonálódási folyamat az előbbinél erősen savas ($pH < 2$) illetve az utóbbinál erősen lúgos ($pH > 11$) pH-tartományba esett [15,24]. Ez az 5-ös pozícióban található klór szubsztituens negatív induktív hatásának [26], valamint a hidroxilcsoport és az alifás nitrogén között létrejövő intramolekuláris H-híd kötésnek az eredménye (ami az előbbi csoport pK_a -ját csökkenti az utóbbihoz köthetőt pedig növeli) [24], ezek a hatások az itt tárgyalt ligandumoknál is jelen vannak. Az UV-látható spektrofotometriás titrálást $pH = 2-12$ közötti tartományban végeztem, a folyamatokhoz karakterisztikus spektrális változások tartoztak (4. *ábra*). Az abszorbancia értékeket egy adott hullámhosszon a pH függvényében ábrázolva 3 folyamat különíthető el (5. *ábra*), azonban, ennél a két ligandumnál is csak a „középső” folyamatra lehetett proton disszociációs állandót meghatározni, ahogy ez az ábrán is látszik (a két „szélső” folyamatnál nem lehet detektálni a folyamat elejét, illetve végét). Ez a pH 5 és 9 között lejátszódó spektrális változás az -OH csoport deprotonálódásához köthető.



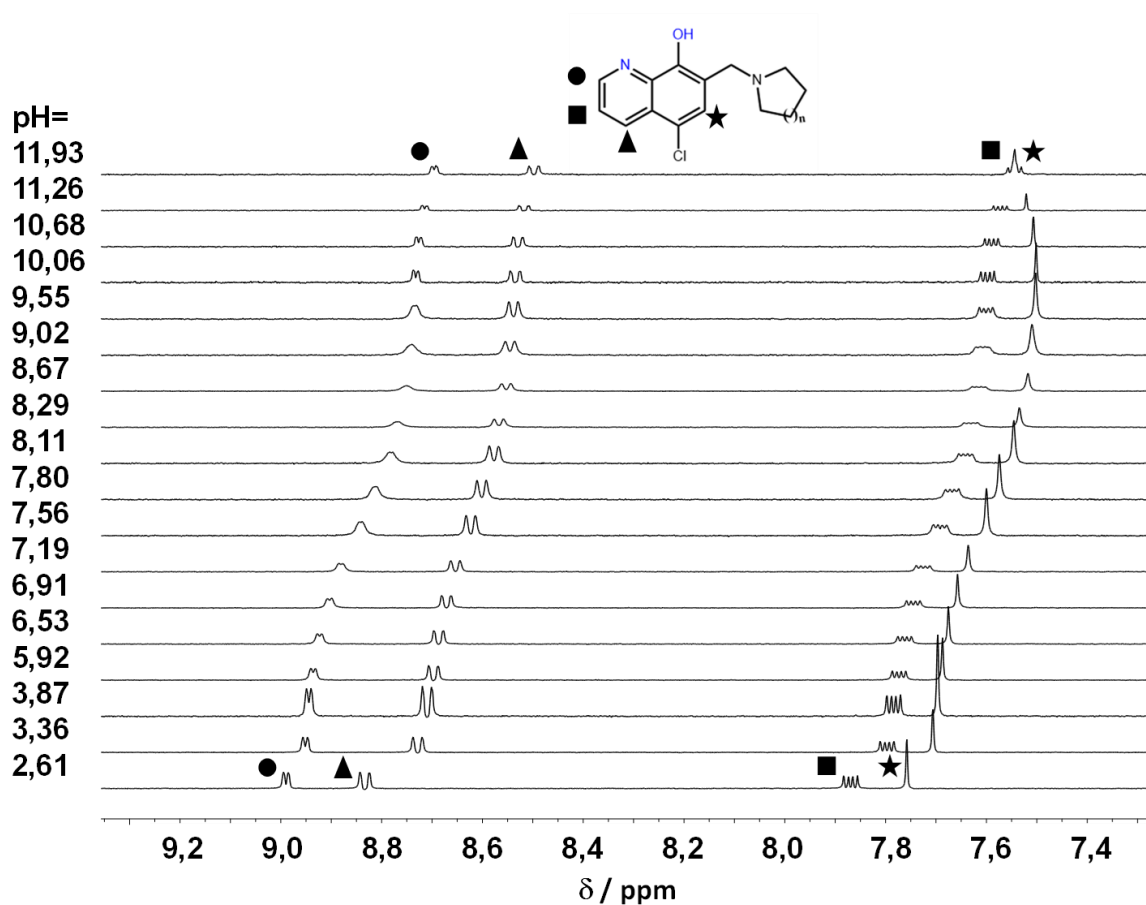
4. ábra. A HQCl-pyr ligandum UV-látható spektrumai különböző pH-n. $\{c_{\text{lig}} = 81 \mu\text{M}; l = 2 \text{ cm}; I = 0,20 \text{ M (KNO}_3\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}\}$



5. ábra – A HQCl-pyr ligandum abszorbancia értékei 360 nm-en a pH függvényében. A különböző színnel jelölt pontok a 3 deprotonálódási folyamatot jelzik, a szaggatott vonal pedig a HypSpec [25] program során, az adatsorra kapott illesztést. $\{c_{\text{lig}} = 81 \mu\text{M}; l = 2 \text{ cm}; I = 0,20 \text{ M (KNO}_3\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}\}$

A ligandumok alacsony vízben való oldhatósága ($<1 \text{ mM}$) miatt a pH-potenciometriás mérések nem jöhettek szóba, azonban ilyen oldhatóság mellett még a ^1H NMR spektroszkópiás titrálás megbízhatóan kivitelezhető. Ilyenkor, a titrálás során, a pH növelésével a jelek kémiai eltolódása változik, amiből pK_a állandót is számolni tudunk. A 6. ábrán az HQCl-pyr ligandum aromás protonjainak kémiai eltolódásainak a változása látható különböző pH-kon. Jól látható, hogy ezek a protonok érzékenyebbek a hidroxilcsoport

deprotonálódására, és kevésbé az alifás nitrogén deprotonálódására, amely messzebb helyezkedik el az aromás résztől.



6. ábra – A HQCl-pyr ligandum ($n = 1$) ^1H NMR spektruma különböző pH-kon az aromás protonok régiójában. $\{c_{\text{lig}} = 300 \mu\text{M}; 10\% \text{ (v/v) } \text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O} + \text{DSS}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}\}$

A számolás során hasonlóan csak a hidroxilcsoport pK_a -ját lehetett meghatározni, a másik kettőre csak határértéket tudtam megadni (2. táblázat).

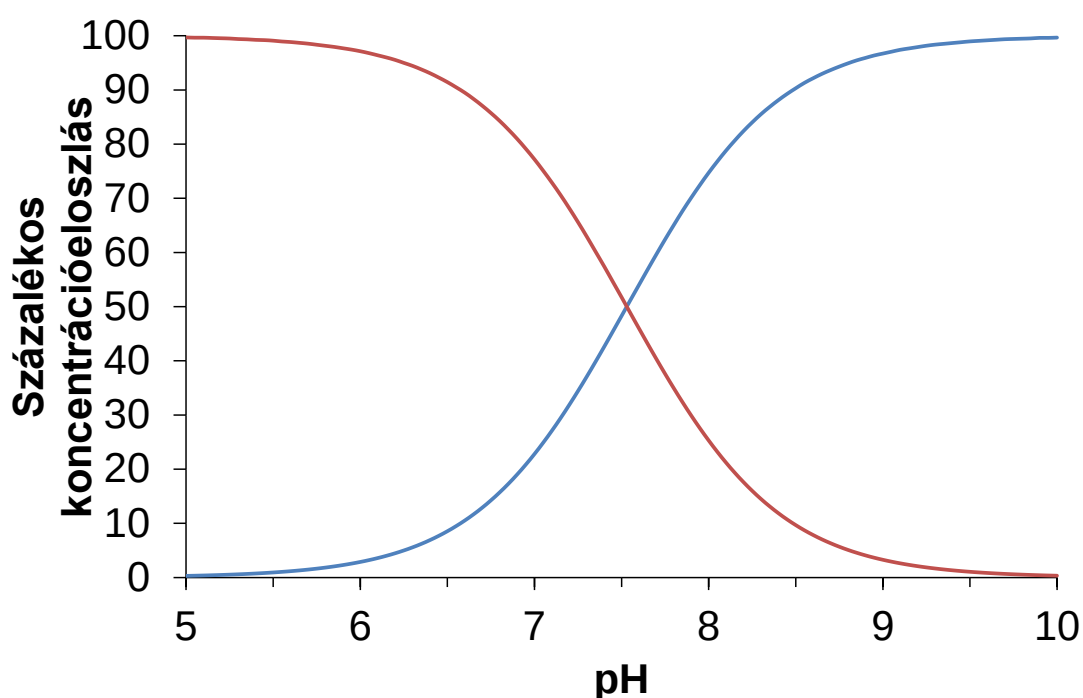
2. táblázat – A ligandumok proton disszociációs állandói különböző módszerrel meghatározva. $\{T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KNO}_3)\}$

Módszer	Ligandum	$\text{N}_\text{q}\text{H}^+$	OH	$\text{N}_{\text{pyr/pip}}\text{H}^+$
UV-látható sp.	HQCl-pyr	$< 2,00$	$7,54 \pm 0,01$	$> 11,00$
	HQCl-pip	$< 2,00$	$7,42 \pm 0,01$	$> 11,00$
^1H NMR sp.	HQCl-pyr	$< 2,00$	$7,68 \pm 0,03$	$> 11,00$
	HQCl-pip	-	-	-

A gyógyszerek mechanizmusában kulcsszerepet játszik azok szervezetben való disztribúciója (szétterjedése), valamint a sejtbe való bekerülése. Ezt, és a sejtmembránokon való átjutást is befolyásoló tényező a molekula töltése. A 3 disszociálható proton közül a fenolos hidroxilcsoport deprotonálódásával kell számolni fiziológiai pH-n ($\text{pH} = 7,40$ -en már teljesnek tekinthető a kinolin nitrogénjének deprotonálódása, valamint az alifás nitrogén deprotonálódása még nem kezdődött meg). A proton disszociációs állandó ismeretében meghatározható $\text{pH} = 7,40$ -en a különböző formák között való megoszlás. A 7. ábra a HQCl-pyr koncentrációeloszlását ábrázolja $\text{pH} 5$ és 10 között, míg a 3. táblázat $\text{pH} = 7,40$ -en mutatja a ligandumok különböző formáinak megoszlását.

3. táblázat – A ligandumok százalékos eloszlása (UV-látható spektrofotometriás titrálás alapján) $\{\text{pH} = 7,40; T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}; I = 0,20\text{ M (KNO}_3)\}$

Ligandum	+1 töltésű	semleges (+/-)
HQCl-pyr	58%	42%
HQCl-pip	51%	49%



7. ábra – A HQCl-pyr ligandum koncentrációeloszlása százalékos formában kifejezve: a piros vonal a még protonált (HL^+), a kék vonal a már deprotonált hidroxil-csoporttal rendelkező ($\text{L}^{+/-}$) formát jelöli (UV-látható spektrofotometriás titrálás alapján) $\{T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}; I = 0,20\text{ M (KNO}_3)\}$

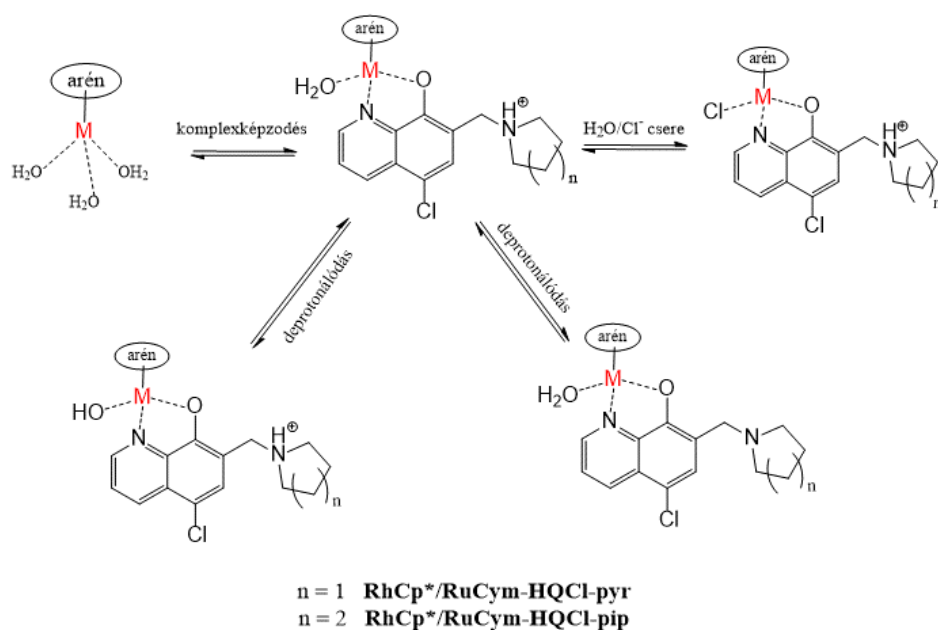
A gyógyászatban használt vegyületek esetén nem utolsó tényező a vízben való oldhatóság, illetve a lipofilitás. A kutatócsoport korábbi cikkében bemutatásra kerültek olyan ligandumok, amelyben az alifás gyűrű alfa-szénatomja karboxilezett formában van (HQCl-hPro, HQCl-Pro), melyek meglehetősen hidrofilnek bizonyultak [15,24]. Ahogy látható (4. táblázat), vízdoldhatóságuk rosszabb a most vizsgált 8HQ származékoknak a korábbi karboxilezett verziókhöz képest, de jelentősen jobban oldódnak a kliokinolhoz viszonyítva.

4. táblázat - 8HQ származékok vízdoldhatósága { $pH = 7,40$; $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ }

Ligandum	Oldhatóság
HQClI (kliokinol)	2,62 μM [27]
HQCl-hPro	>10 mM [15,24]
HQCl-Pro	>10 mM [15,24]
HQCl-pip	254 μM [tanszéki nem publikált eredmény]
HQCl-pyr	516 μM [tanszéki nem publikált eredmény]

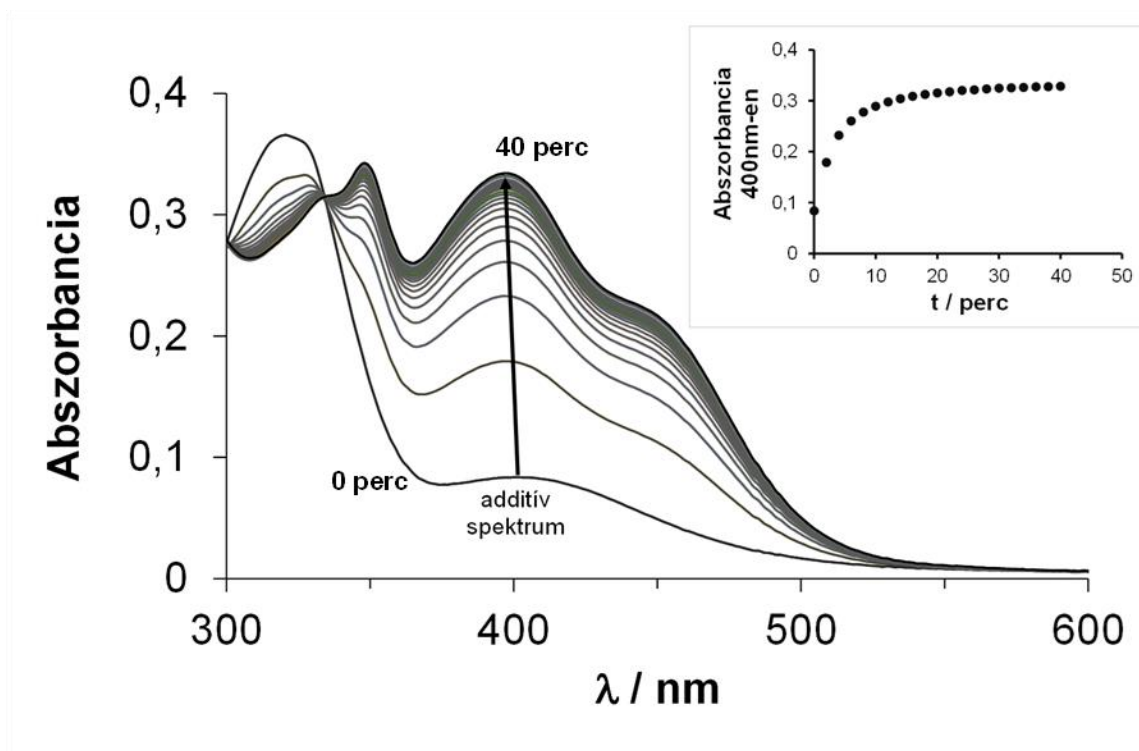
6.2 A félszendvics komplexek oldatkémiai vizsgálata

A HQCl-pyr és HQCl-pip 8HQ származékok erős kelátképző tulajdonságuk révén számos fémionhoz képesek erősen koordinálódni. Az általam vizsgált fémorganikus $[\text{Rh}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ és $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimol})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ triakva kationokkal is várhatóan nagy stabilitású komplexet képeznek [15,23,24]. A képződött félszendvics komplexek különböző oldatkémiai folyamatait (8. ábra) UV-látható spektrofotometriás módszerrel vizsgáltam.

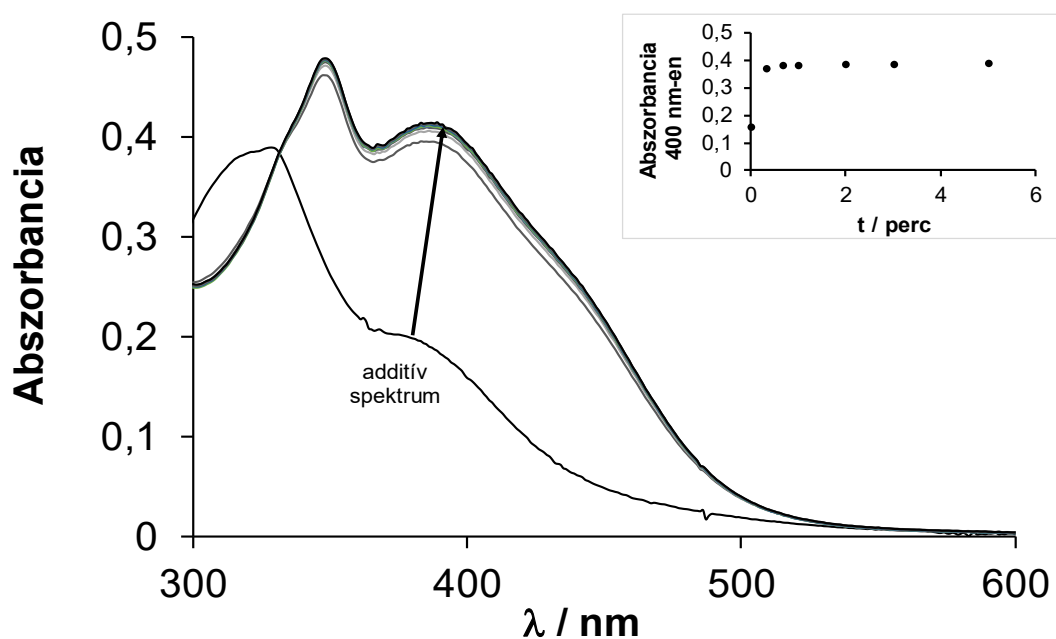


8. ábra – A ligandumok és félszendvics kationok között feltételezhető egyensúlyi folyamatok.

A komplexképződési reakció során mono-ligandumú komplex alakul ki, ahogy ezt korábban már hasonló típusú komplexeknél bizonyították [15,24]. Mind a RhCp*-, mind a RuCym-komplex esetében változott a spektrum időben, a kezdeti, additív spektrumhoz képest (a mérés során tandem küvettát használtam, melynek egyik ágában a fémprekurzor a másik ágában a ligandum oldata volt a megfelelő pH-n). A RhCp*-komplexek esetén gyors (~1 perc) egyensúlybeállítás történt, míg a RuCym-komplexeknél valamivel lassabb (~20 perc) reakcióidő volt a jellemző az adott körülmények között. Egy-egy ilyen képződési folyamatot szemléltet a 9. és 10. ábra. (Fontos megjegyezni, hogy ezeknél a vizsgálatoknál a minták 10% (v/v) DMSO-t tartalmaztak, hogy a komplexek biztosan oldatban legyenek. Későbbi vizsgálatok során kiderült, hogy erre ilyen körülmények között nincs szükség, a komplexek vízben való oldhatósága lehetővé teszi a vizes oldatokban való mérést ilyen koncentrációk mellett.)



9. ábra – A RuCym–HQCl–pyr rendszer UV-látható spektrumai időben követve. Beszúrt ábra: Az abszorbancia változása 400 nm-en az idő függvényében. $\{C_{\text{ligandum}} = C_{\text{RuCym}} = 100 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 4,0$; $I = 0,20 \text{ M (KNO}_3\text{)}$; 10% (v/v) DMSO/H₂O; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}\}$



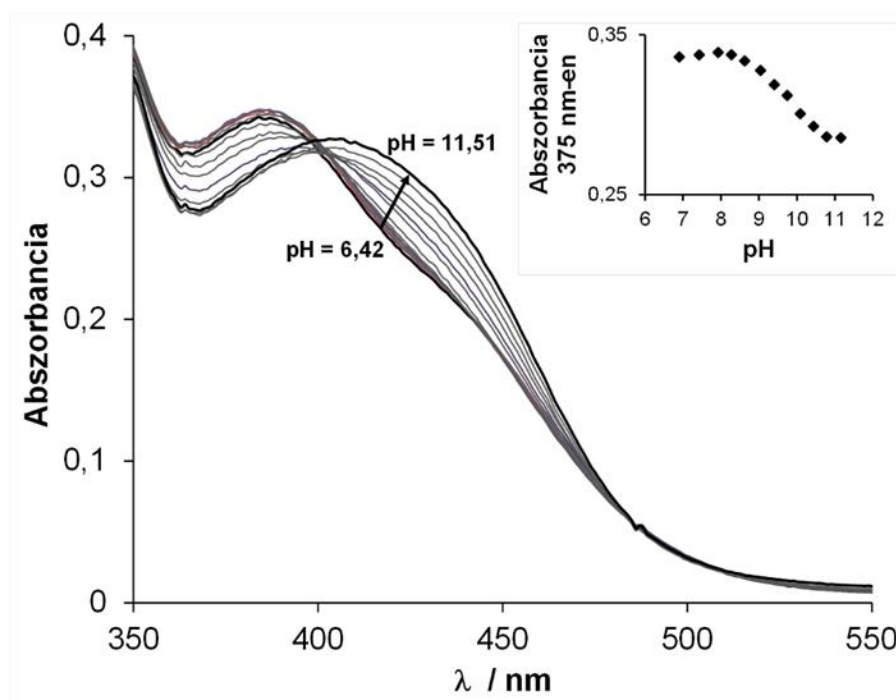
10. ábra – A RhCp*–HQCl–pip rendszer UV-látható spektrumai időben követve. Beszúrt ábra: Az abszorbancia változása 400 nm-en az idő függvényében. $\{C_{\text{ligandum}} = C_{\text{RhCp}^*} = 100 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 4,0$; $I = 0,20 \text{ M (KNO}_3\text{)}$; 10% (v/v) DMSO/H₂O; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 1 \text{ cm}\}$

A komplexeknek 2 disszociálabilis csoportja van, melyek a fémionhoz koordinálódó H₂O és a pirrolidinium/piperidinium egység nitrogénje (N_{pyr/pip}H⁺). Előbbiből, a deprotonálódás során hidroxidion lesz, mely szintén koordinálódva marad a központi fémionhoz. A pirrolidinium/piperidinium rész nitrogén deprotonálódásának következtében semleges töltésű tercier amin képződik (8. ábra). A 5. táblázat tartalmazza a savi disszociációs állandókat (HypSpec [25] programmal számolt), melyekből látható, hogy az akva ligandum az erősebb sav, míg az ammóniumion disszociációja valamelyest bázikusabb közegben megy végbe.

5. táblázat – A komplexek proton disszociációs állandói (pK_a) UV-látható spektroszkópiás módszerrel meghatározva. {c_{komplex} = 36 μM; I = 0,20 M (KNO₃); T = 25,0 °C; l = 2 cm}

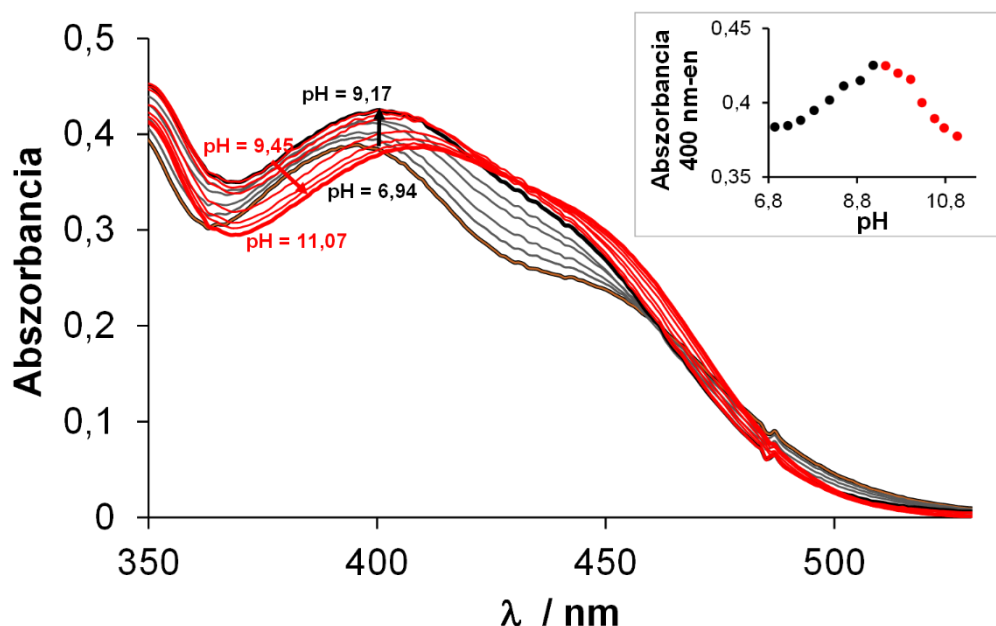
Komplex	pK _a (H ₂ O/OH)	pK _a (N _{pyr/pip} H ⁺)
RhCp*-HQCl-pyr	9,96±0,04	-
RhCp*-HQCl-pip	9,95±0,10	-
RuCym-HQCl-pyr	8,42±0,02	10,32±0,02
RuCym-HQCl-pip	8,45±0,01	10,06±0,01

A RhCp*-komplexek esetében a két deprotonálódási folyamat nagymértékben átfedésben van egymással. A szinkronban zajló folyamatok nem különíthetők el teljesen, és csak egy makroszkópikus állandót tudtam meghatározni. Ez a változás a pH = 9-11 közötti tartományban megy végbe. A 11. ábra a RhCp*-HQCl-pip komplex spektrumának változását mutatja a pH függvényében.



11. ábra – A RhCp*-pip komplex UV-látható spektrumai különböző pH-kon. Beszúrt ábra: Az abszorbancia változása 375 nm-en a pH függvényében. { $c_{\text{komplex}} = 36 \mu\text{M}$; $I = 0,20 \text{ M}$ (KNO_3); $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $l = 2 \text{ cm}$ }

A ruténium központi fémionnal rendelkező vegyületeknél a két protonvesztéssel járó folyamat csak részben volt átfedő, ezért ezeknél két disszociációs állandót is lehetett meghatározni. Az első folyamat a pH = 7 – 9,5, a második pedig a pH = 9,5 – 12 közötti tartományban zajlik le. Ez rendre a koordinálódott víz, illetve a gyűrűs, alifás nitrogén deprotonálódásához köthető. A 12. ábrán a RuCym-HQCl-pyr komplex spektrumának változását mutatja a pH függvényében.



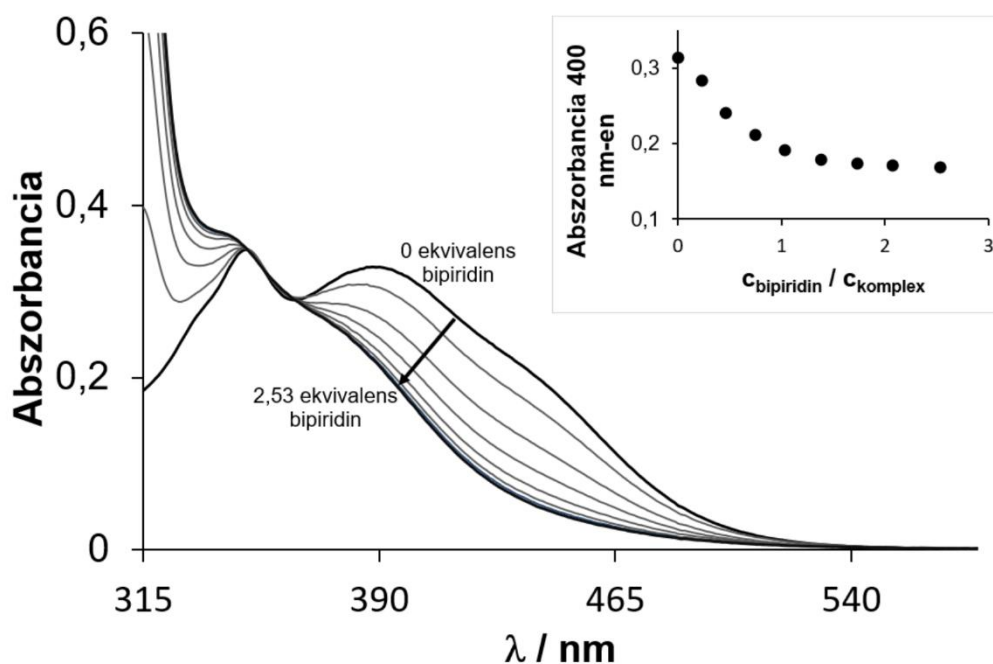
12. ábra – RuCym-HQCl-pyr komplex UV-látható spektrumai különböző pH-kon. Beszúrt ábra: Az abszorbancia változása 400 nm-en a pH függvényében. $\{C_{\text{komplex}} = 63,2 \mu\text{M}; I = 0,20 \text{ M (KNO}_3\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}; l = 2 \text{ cm}\}$

A kimagasló stabilitású komplexek a hasonló ligandumok esetében még nagyon savas közegben ($\text{pH} < 1$) sem disszociáltak mérhető mennyiségben, így disszociálatlan formában való előfordulásuk közel 100%-os [15,23,24]. Az ilyen komplexek stabilitási állandóit hagyományos módszerekkel (pH-potenciometria, UV-látható spektrofotometria, ^1H NMR spektroszkópia) nem lehet közvetlenül meghatározni, hiszen a számolás során mérhető mennyiségben kell jelen lennie a disszociált formának is. Ilyen esetben alkalmazhatjuk a ligandum kiszorításon alapuló módszert, amely során egy olyan ligandummal szorítjuk ki az aktuális ligandumunkat a komplexből, amelyhez tartozó fémkomplex stabilitási állandója ismert. 2,2'-Bipiridinnel képzett Rh(III) és Ru(II) félszendvics komplexek stabilitási állandói jól ismertek [21], ezért kiszorító ágensként ezt a vegyületet alkalmaztam. Egy szemléletes UV-látható spektrumsorozat a 13. ábrán látható, melyben növekvő 2,2'-bipiridin koncentráció mellett vettem fel spektrumokat. RhCp*-komplexek esetén a stabilitási állandókat a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat – A RhCp*-komplexek látszólagos stabilitási állandói (K) 2,2'-bipiridin kiszorító ágens alkalmazva (UV-látható spektrofotometriai méréssel meghatározva). $\{C_{\text{komplex}} = 72 \mu\text{M}; \text{pH} = 7,40; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}; l = 1 \text{ cm}\}$

Komplex	$\lg K'$ ($\text{pH} = 7,40$)
RhCp*-HQCl-pyr	$12,06 \pm 0,01$
RhCp*-HQCl-pip	$11,89 \pm 0,03$

A RuCym-komplexek esetén ez a módszer azonban nem alkalmazható, ugyanis a kiszorító ágens nem az eredeti kétfogú ligandumot szorítja ki, hanem az arén-gyűrűt, ahogy ezt több, korábbi kutatócsoporti eredmény is bizonyította [15,24]. Ez a Ru(II) és az arén-gyűrű közötti gyengébb kötéssel lehet indokolni, összehasonlítva Rh(III) és a negatív töltéssel rendelkező Cp* arén-gyűrű közötti kötéssel. Ilyen esetben – attól függően, hogy 1 vagy 2 ekvivalens 2,2'-bipiridint használunk – 1 vagy 2 molekula 2,2'-bipiridin is elfoglalhatja a koordinációs helyeket, hagyományos oktaéderes Ru(II)/Ru(III) komplexet kialakítva. Emellett a Ru(II) oxidációja is lejátszódhat.

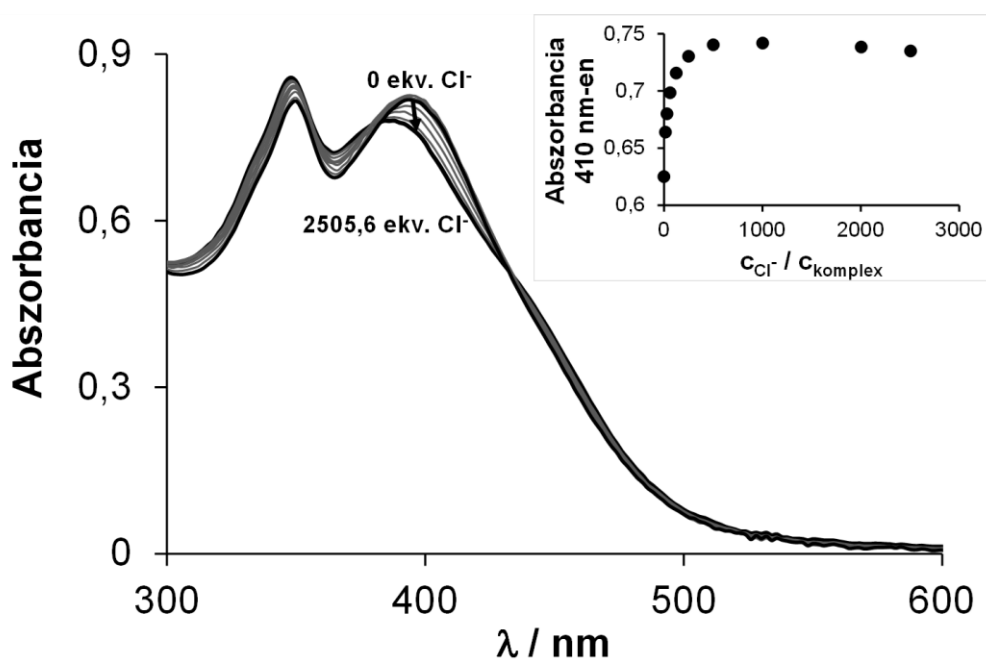


13. ábra – RhCp*-HQCl-pyr komplex UV-látható spektruma növekvő 2,2'-bipiridin koncentráció mellett. $\{C_{\text{komplex}} = 72 \mu\text{M}; \text{pH} = 7,40; I = 0,20 \text{ M (KNO}_3\text{)}; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}; l = 1 \text{ cm}\}$

A fémionhoz koordinálódott akva ligandum – egyensúlyi reakcióban – kloridionra tud cserélődni akár fiziológiás körülmények között (8. ábra). Ez a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ ligandumcsere befolyásolja a komplex össztöltését (a kloridion negatív töltésű, míg az akva ligandum töltés nélküli molekula), ezzel befolyásolva a komplex lipofilitását is [15,24]. Ezeknek a cserereakcióknak a vizsgálata fontos, hiszen a komplex ezen koordinációs helyén tud létrehozni kölcsönhatást biomolekulákkal is. A kloridokomplexek kialakulásának egyensúlyi állandói azonos központi fémionoknál nem szignifikánsan változnak a ligandum (HQCl-pyr/pip) típusának függvényében, de eltérő fémion esetén már releváns különbséget lehet észrevenni: a RhCp*-komplexek nagyobb klorid affinitását a RuCym-komplexekkel szemben. A kapott értékeket az 7. táblázat foglalja magában. A négy vegyület közül a RhCp*-HQCl-pip komplex spektrális változásait mutatja a 14. ábra, eltérő kloridion koncentrációk mellett. Az egyensúlyi állandókat ezekből a spektrális változásokból számoltuk.

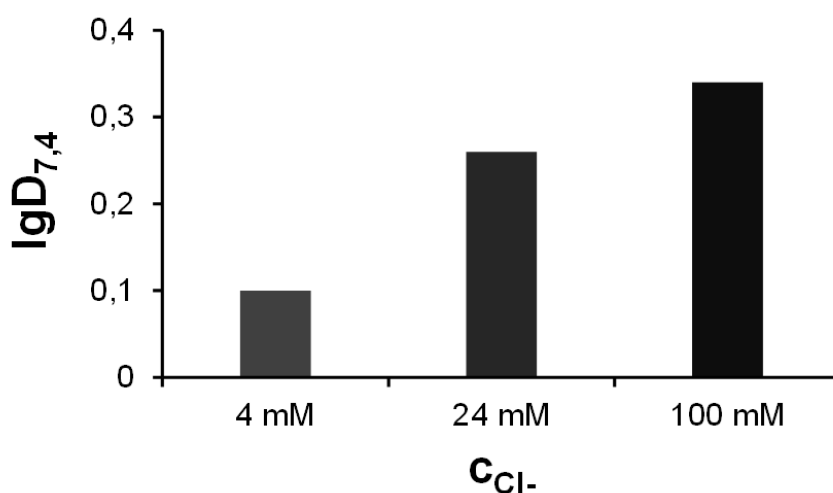
7. táblázat – A komplexek $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ ligandumcsere állandói UV-látható spektrofotometriás módszert alkalmazva. $\{C_{\text{komplex}} = 76 \mu\text{M}; \text{pH} = 7.40; T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}; l = 2 \text{ cm}\}$

Komplex	$\lg K' (\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-)$
RhCp*-HQCl-pyr	2,27±0,01
RhCp*-HQCl-pip	2,22±0,01
RuCym-HQCl-pyr	1,73±0,01
RuCym-HQCl-pip	1,69±0,01



14. ábra – RhCp*-HQCl-pip komplex UV-látható spektruma növekvő kloridion koncentráció mellett. Beszúrt ábra: Abszorbancia változása 410 nm-en a kloridion koncentráció függvényében. $\{c_{komplex} = 76 \mu M; pH = 7.40; T = 25,0 \text{ } ^\circ C; l = 2 \text{ cm}\}$

A töltés mellett, közvetlenül a komplex lipofilitására is hatással van a közeg kloridion koncentrációja, melynek értéke a szervezetben változó. Az intranukleáris kloridion koncentráció 4 mM, az intracelluláris 24 mM, végül az extracelluláris – pl. vér – 100 mM. Ennek megfelelően, kloridionra nézve ilyen koncentrációjú oldatokban végeztem a lipofilitás vizsgálatot a RhCp*-HQCl-pip vegyület esetén, melynek eredménye a 15. ábrán látható. Növelve a KCl koncentrációját, a lipofilitás is növekszik, melynek az egyre nagyobb mennyiségben megjelenő semleges klorido-komplex a magyarázata.



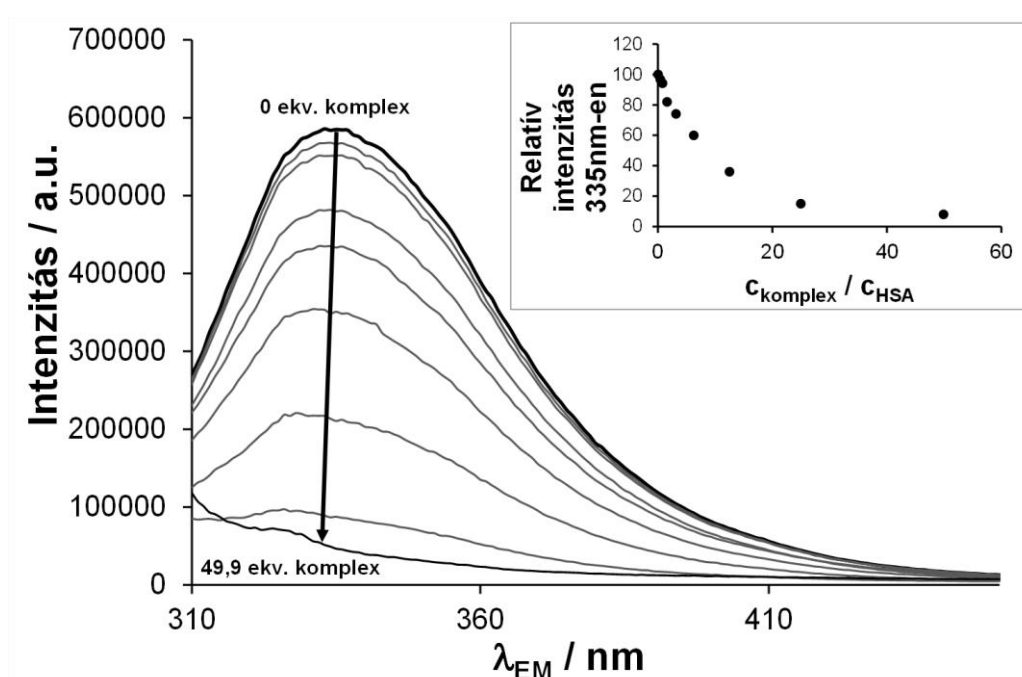
15. ábra – A RhCp*-HQCl-pip komplex *n*-oktanol/víz megoszlási hányadosai különböző Cl^- koncentrációk mellett { $C_{komplex} = 72 \mu M$; $c_{KCl} = 4, 24$ vagy 100 mM; $pH = 7,40$; $T = 25,0$ °C}

6.3 A ligandumok és a komplexek kölcsönhatása humán szérum albuminnal (HSA)

A gyógyszerjelölt vegyületek karakterizálásához az eddig tárgyalt egyensúlyi folyamatok mellett a szervezeten belüli disztribúció figyelembevétele is szükséges. Ennek részét képezi a vegyületek egy humán szállítófehérjével, a HSA-val való kölcsönhatásának vizsgálata. A kölcsönhatás meglétének bizonyításához és erősségének kvantitatív leírásához fluorimetriás méréseket alkalmaztam. Ehhez kihasználtam azt, hogy a fehérje Trp-214-es aminosavja szelektíven gerjeszthető és információt adhat elsősorban az I-es kötőhelyben való megkötődésről. Továbbá, végeztem méréseket kötőhely marker (DG) kizorításos módszert alkalmazva, ami során a II-es kötőhelyről is szerettem volna információt nyerni. Egy ilyen emissziós spektrumsorozatot szemléltet a 16. ábra, amelyben a HSA fluorimetriás intenzitását követtem növekvő komplex (RhCp*-HQCl-pip) koncentráció mellett. Látható, hogy a komplexet egyre nagyobb mennyiségben adagolva, csökken az emissziós intenzitás, amely a kötődés jelenlétére utal. (A mért intenzitások korrekciója a belső szűrőhatással és a minta önabszorpciójával a kísérleti részben leírtak szerint történt.) Hasonló eredményeket tapasztaltam mind a négy komplex esetében. Az adatokból számolt kötési állandókat a 9. táblázat tartalmazza. A komplexek nagy affinitást ($lgK' > 5$) mutattak az I-es kötőhely felé, és valamelyest nagyobb állandókat kaptam a RuCym-komplexek esetében.

9. táblázat – A vizsgált ligandumok, komplexek kötési állandói ($\lg K'$) a HSA kötőhelyein {pH = 7,4; $T = 25,0$ °C}

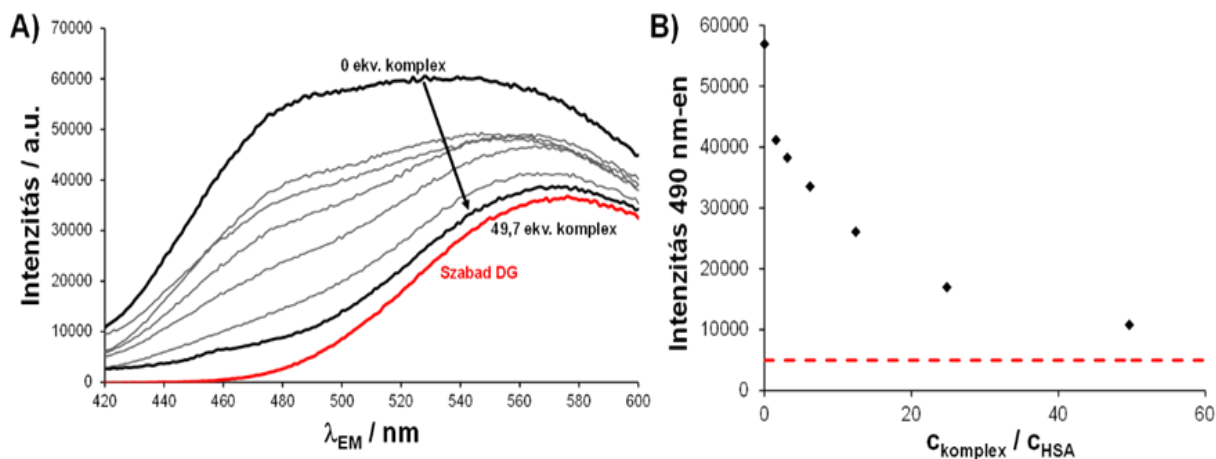
$\lg K'$	HQCl-pyr	HQCl-pip	RhCp*- HQCl-pyr	RhCp*- HQCl-pip	RuCym- HQCl-pyr	RuCym- HQCl-pip
Trp-214	4,59±0,01	5,11±0,01	5,17±0,01	5,17±0,01	5,49±0,01	5,54±0,01
DG	nincs mérhető kölsönhatás		5,13±0,01	5,16±0,01	5,70±0,03	5,64±0,02



16. ábra – A HSA emissziós spektrumjai növekvő komplex (RhCp*-HQCl-pip) koncentráció mellett. Beszúrt ábra: Relatív intenzitás változás 335 nm-en növekvő komplex koncentráció mellett. { $C_{\text{HSA}} = 1 \mu\text{M}$; $C_{\text{komplex}} = 0\text{--}51,2 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$; pH = 7,40; $T = 25,0$ °C; $l = 1 \text{ cm}$ }

A II-es kötőhely vizsgálata kötőhely marker segítségével történt, melyhez a danzil-glicin (DG) marker volt a megfelelő választás. A DG önmagában is fluoreszkál, albuminhoz kötve azonban változik az emissziós spektrum jellege: növekszik az intenzitás, illetve az emissziós maximum is eltolódik. Egyre nagyobb koncentrációban adagolva a komplexet a HSA-t és a DG-t 1:1 arányban tartalmazó mintához az emissziós spektrum a szabad (nem kötött) DG spektruma felé változik. Egy ilyen spektrumsorozat látható a 17. ábrán, mely során látható a komplex hatására egyre nagyobb mennyiségben felszabaduló DG. A mérésekből származó kiszorítási állandókat szintén a 9. táblázat tartalmazza. Ligandumok esetében nem mérhető a

kötődés ezen a kötőhelyen, míg a komplexek esetében az állandók nagyon hasonlóak az I-es kötőhely állandóival, ami hasonló mértékű kötődésre utal mindkét kötőzsebbe.



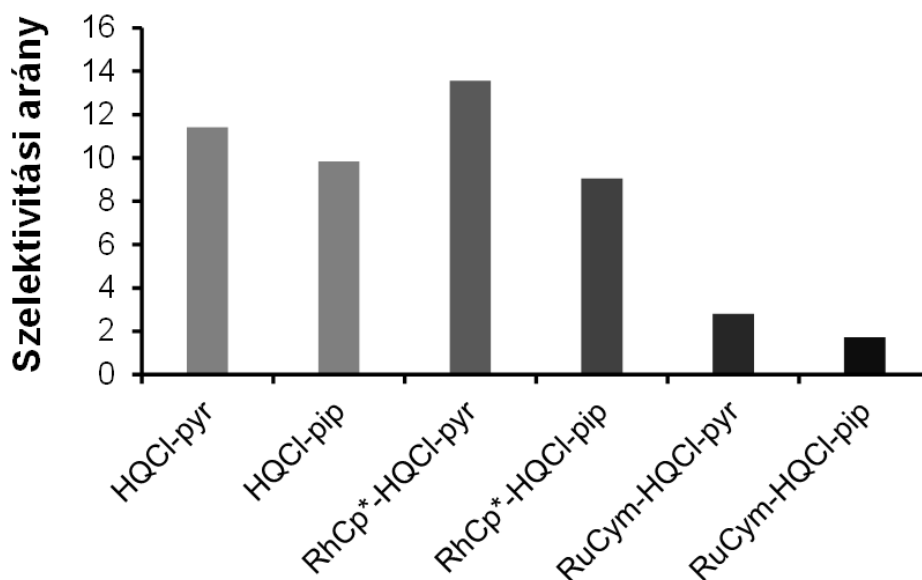
17. ábra – A) A HSA:DG (1:1) rendszer emissziós spektrumjai növekvő komplex (RhCp*-HQCl-pip) koncentrációk mellett. A szabad DG spektruma pirossal jelzett. B) Emissziós intenzitás változása 490 nm-en a komplex koncentrációjának növelésével. $\{c_{HSA} = 1 \mu M; c_{DG} = 1 \mu M; c_{komplex} = 0-51,2 \mu M; \lambda_{EX} = 335 \text{ nm}; pH = 7,40; T = 25,0 \text{ } ^\circ C; l = 1 \text{ cm}\}$

6.4 A vegyületek citotoxicitása

Mind a ligandumok, mind pedig komplexeik bioaktivitását együttműködő partnereink humán rákos sejtvonalakon tesztelték. Ehhez négy sejtvonalat használtak: kemoszenzitív (Colo205) sejteket és annak doxorubicin-rezisztens párját (Colo320), illetve humán méh szarkóma (MES-SA) és MDR párját (MES-SA/Dx5). A vegyületek citotoxikusságát IC_{50} (μM) paraméterrel szokás jellemezni. Ez jelöli azt a koncentrációt, ami hatására a sejtek 50%-a elpusztul az inkubáció alatt. 10. táblázat tartalmazza a MES-SA és MES-SA/Dx5 sejtvonalakkal szemben elért bioaktivitást. A ligandumok és a komplexek is szignifikáns citotoxicitást ($IC_{50} < 10 \mu M$) mutattak mindkét sejtvonalon, emellett a ligandumok és RhCp*-komplexeik jelentős MDR szelektivitást (szelektivitási arány (SR): az érzékeny és a rezisztens sejtvonalon mért IC_{50} értékek hányadosa > 9) is mutattak (18. ábra).

10. táblázat – *A ligandumok és komplexeik citotoxicitása (IC_{50}) MES-SA (humán méh szarkóma) és az MDR MES-SA sejtvonalakon és az adatokból számolt szelektivitás arányok (SR).*

IC_{50} (μM)	HQCl-pyr	HQCl-pip	RhCp*- HQCl-pyr	RhCp*- HQCl-pip	RuCym- HQCl-pyr	RuCym- HQCl-pip
MES-SA	3,31 $\pm$ 0,60	1,18 $\pm$ 0,25	2,98 $\pm$ 1,50	1,99 $\pm$ 1,00	8,90 $\pm$ 2,50	3,28 $\pm$ 1,00
MES-SA/Dx5	0,29 $\pm$ 0,25	0,12 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,03	3,18 $\pm$ 0,70	1,91 $\pm$ 0,51
SR	11,41	9,83	13,55	9,05	2,80	1,72

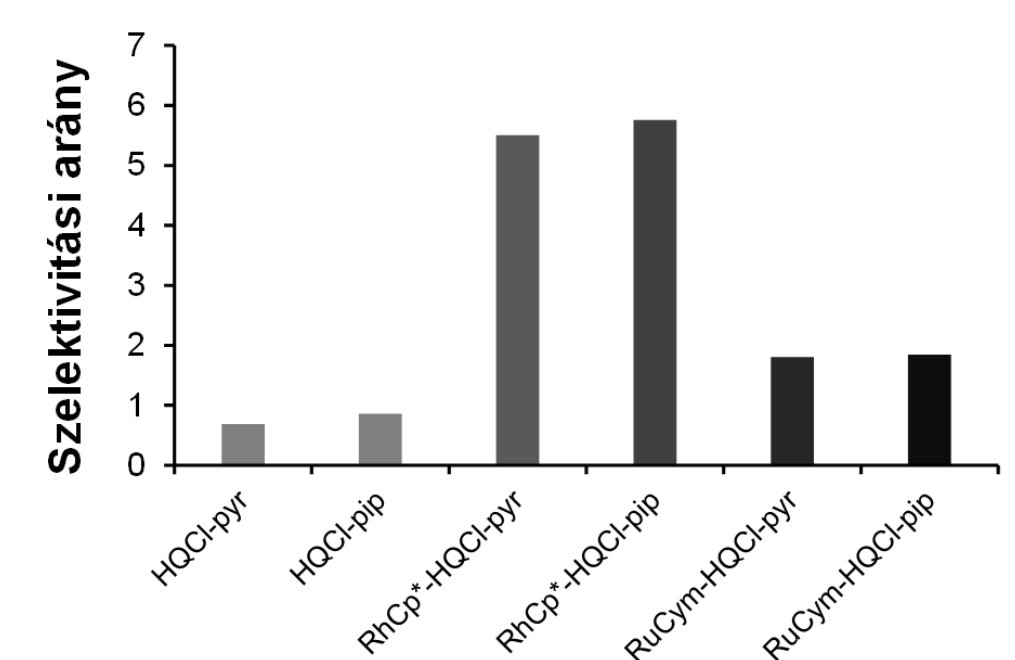


18. ábra – *A ligandumok és komplexeik MDR szelektivitási aránya ($IC_{50}(MES-SA) / IC_{50}(MES-SA/Dx5)$).*

Ahogy azt korábban említettem, vizsgálták a vegyületek rákellenes hatását az érzékeny Colo205, illetve a doxorubicin rezisztens párján, a Colo320-on is. Az ezekhez tartozó IC_{50} értékek a 11. táblázatban foglaltam össze. Látható, hogy ezeken a sejtvonalakon általánosságban nagyobb értékeket kaptak, kevésbé citotoxikusak, különösen a RuCym-komplexek esetén. Azonban a szelektivitási arány jelentősen javult a RhCp*-komplexek értékeit vizsgálva ($SR > 5$) a megfelelő ligandumhoz képest, ami részben elmondható a RuCym-komplexeiről is (19. ábra).

11. táblázat – A ligandumok és komplexeik citotoxicitása (IC_{50}) Colo205 (kemoszenzitív) és Colo320 (doxorubicin rezisztens) rákos sejtvonalakon sejtvonalakon, és az adatokból számolt szelektivitás arányok (SR).

IC_{50} (μM)	HQCl-pyr	HQCl-pip	RhCp*- HQCl-pyr	RhCp*- HQCl-pip	RuCym- HQCl-pyr	RuCym- HQCl-pip	doxorubicin
Colo205	10,14 $\pm$ 0,81	17,04 $\pm$ 0,99	15,47 $\pm$ 0,73	11,52 $\pm$ 0,29	90,53 $\pm$ 1,54	49,76 $\pm$ 0,21	-
Colo320	14,69 $\pm$ 0,05	19,83 $\pm$ 0,11	2,81 $\pm$ 0,23	2,00 $\pm$ 0,26	50,08 $\pm$ 3,50	26,9 $\pm$ 0,63	8,26 $\pm$ 0,37
SR	0,69	0,86	5,51	5,76	1,81	1,85	-



19. ábra – A ligandumok és komplexeik MDR szelektivitási aránya (Colo205/Colo320).

Konklúzióként levonható, hogy a RhCp*-komplexek citotoxicitása, illetve MDR szelektivitása szignifikánsan javul, vagy hasonló értéket vesz fel, mint a megfelelő ligandum (HQCl-pyr/pip).

7. Összefoglalás

OTDK munkám során a HQCl-pyr, HQCl-pip ligandumok és ezek félszendvics RhCp*, RuCym triakva fémorganikus kationokkal képzett komplexeinek oldatkémiai vizsgálatával foglalkoztam, melyhez UV-látható spektrofotometriás és ^1H NMR spektroszkópiás méréseket alkalmaztam. A ligandumoknak 3, a komplexeknek 2 disszociábilis csoportjuk van. A deprotonálódási folyamatokat UV-látható fotometriás titrálásokkal vizsgálva megállapítottam, hogy a HQCl-pip ligandum 51-49%-ban, míg a HQCl-pyr ligandum 58-42%-ban +1-es töltésű, illetve semleges formában van jelen oldatban. A RhCp*-komplexeknél a 2 folyamat átfed, míg a RuCym-komplexek mérése során elkülöníthető a 2 deprotonálódási folyamat, amely a fémionhoz koordinálódott víz, illetve a ligandum nem koordinálódott alifás amin nitrogénjéhez rendelhető. A komplexeknél meghatározott proton disszociációs állandók alapján fiziológiás pH-n nem kell számolnunk ezekkel a folyamatokkal. A ligandumok csekély vízdoldhatóságát a komplexképződés jelentősen képes javítani. A fémionhoz koordinálódó akva ligandum kloridionra tud cserélődni egyensúlyi folyamatban, mely a vegyület töltésére és lipofilitására egyaránt hatással van. A növekvő kloridion koncentráció a komplexek lipofilitásának növekedését eredményezte. A komplexek nagy oldatbeli stabilitása miatt a pH-függő UV-látható spektrofotometriás titrálás alapján nem tudtam stabilitási állandókat meghatározni a komplexekre, ezért ligandum kiszorításos módszert alkalmaztam 2,2'-bipiridin kiszorító ágens segítségével. A mérés bizonyította a nagy stabilitást ($\lg K' > 10$) a RhCp*-komplexek esetén. A RuCym-komplexek a kiszorító ágens hatására elvesztették az arén gyűrűt, így nem lehetett meghatározni stabilitási állandójukat.

A komplexek humán szérum albuminnal való kölcsönhatását fluorimetriai mérésekkel - triptofán-kioltás és kötőhely marker kiszorítás - vizsgáltam. A meghatározott kötési állandók ismeretében elmondható, hogy a komplexek nagy affinitást mutatnak a HSA kötőhelyei felé. A RhCp* komplexek erősebb kölcsönhatást mutattak, mint a RuCym komplexek. A ligandumok valamelyest kisebb affinitással rendelkeznek az I-es kötőhelyen, míg a II-es kötőhelyen nem volt mérhető a kölcsönhatás.

A vegyületek szignifikáns citotoxicitást mutattak humán rákos sejtvonalokon, emellett erős MDR szelektivitással is rendelkeznek. A RhCp*-komplexek mind citotoxikusságban, mind MDR szelektivitásban hasonló, vagy jobb értéket mutattak, mint a megfelelő ligandum. A ruténiumkomplexekről ez nem mondható el, aktivitásuk rendre csökkent a ligandumhoz képest.

8. Hivatkozások

- [1] https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wdsd008.html (2023.01.08.)
- [2] https://www.ksh.hu/stadat_files/nep/hu/nep0010.html (2023.01.08.)
- [3] Baba, A. I., & Cătoi, C. *Comparative oncology* (pp. 87-407). Bucharest: Publishing House of the Romanian Academy, **2007**.
- [4] Florea, A. M., Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), 1351-1371, **2011**.
- [5] Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3233, **2020**.
- [6] Himes, R. H. Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacology & therapeutics*, 51(2), 257-267, **1991**.
- [7] Zhu, H., Sarkar, S., Scott, L., Danelisen, I., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. Doxorubicin redox biology: redox cycling, topoisomerase inhibition, and oxidative stress. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, 1(3), 189, **2016**.
- [8] Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug discovery*, 5(3), 219-234, **2006**.
- [9] Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., & El-Halawany, A. M. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 45-62, **2015**.
- [10] Hall, M. D., Salam, N. K., Hellawell, J. L., Fales, H. M., Kensler, C. B., Ludwig, J. A., Szakács, G., Hibbs, D. E., & Gottesman, M. M. Synthesis, activity, and pharmacophore development for isatin- β -thiosemicarbazones with selective activity toward multidrug-resistant cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(10), 3191-3204, **2009**.
- [11] Pape, V. F., Gaál, A., Szatmári, I., Kucsma, N., Szoboszlai, N., Streli, C., Fülöp, F., Enyedy, É. A., & Szakács, G. Relation of Metal-Binding Property and Selective Toxicity of 8-Hydroxyquinoline Derived Mannich Bases Targeting Multidrug Resistant Cancer Cells. *Cancers*, 13(1), 154, **2021**.
- [12] Xu, H., Chen, W., Zhan, P., & Liu, X. 8-Hydroxyquinoline: A privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. *MedChemComm*, 6(1), 61-74, **2015**.
- [13] Joaquim, A. R., Gionbelli, M. P., Gosmann, G., Fuentesfria, A. M., Lopes, M. S., & Fernandes de Andrade, S. Novel antimicrobial 8-hydroxyquinoline-based agents:

- current development, structure–activity relationships, and perspectives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(22), 16349-16379, **2021**.
- [14] Kos, J., Ku, C. F., Kapustikova, I., Oravec, M., Zhang, H. J., & Jampilek, J. 8-Hydroxyquinoline-2-Carboxanilides as Antiviral Agents Against Avian Influenza Virus. *ChemistrySelect*, 4(15), 4582-4587, **2019**.
- [15] Mészáros, J. P., Poljarević, J. M., Szatmári, I., Csuvik, O., Fülöp, F., Szoboszlai, N., Spengler, G., & Enyedy, É. A. An 8-hydroxyquinoline–proline hybrid with multidrug resistance reversal activity and the solution chemistry of its half-sandwich organometallic Ru and Rh complexes. *Dalton Transactions*, 49(23), 7977-7992, **2020**.
- [16] Pape, V. F., Palkó, R., Tóth, S., Szabó, M. J., Sessler, J., Dormán, G., Enyedy, É. A., Soós, T., Szatmári, I., & Szakács, G. Structure–Activity Relationships of 8-Hydroxyquinoline-Derived Mannich Bases with Tertiary Amines Targeting Multidrug-Resistant Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(11), 7729-7745, **2022**.
- [17] Pape, V. F., May, N. V., Gál, G. T., Szatmári, I., Szeri, F., Fülöp, F., Szakács, G., & Enyedy, É. A. Impact of copper and iron binding properties on the anticancer activity of 8-hydroxyquinoline derived Mannich bases. *Dalton Transactions*, 47(47), 17032-17045, **2018**.
- [18] Valiahdi, S. M., Heffeter, P., Jakupec, M. A., Marculescu, R., Berger, W., Rappersberger, K., & Keppler, B. K. The gallium complex KP46 exerts strong activity against primary explanted melanoma cells and induces apoptosis in melanoma cell lines. *Melanoma research*, 19(5), 283, **2009**.
- [19] Jin, S., Guo, Y., Guo, Z., & Wang, X. Monofunctional platinum(II) anticancer agents. *Pharmaceuticals*, 14(2), 133, **2021**.
- [20] Alessio, E., & Messori, L. NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: a case story in medicinal inorganic chemistry. *Molecules*, 24(10), 1995, **2019**.
- [21] Mészáros, J. P., Pape, V. F., Szakács, G., Némethi, G., Dénes, M., Holczbauer, T., May, N. V., & Enyedy, É. A. Half-sandwich organometallic Ru and Rh complexes of (N, N) donor compounds: Effect of ligand methylation on solution speciation and anticancer activity. *Dalton Transactions*, 50(23), 8218-8231, **2021**.
- [22] Kubanik, M., Lam, N. Y., Holtkamp, H. U., Söhnle, T., Anderson, R. F., Jamieson, S. M., & Hartinger, C. G. Quinoline-para-quinones and metals: coordination-assisted

- formation of quinoline-ortho-quinones. *Chemical Communications*, 54(8), 992-995, **2018**.
- [23] Dömötör, O., Pape, V. F., May, N. V., Szakács, G., & Enyedy, É. A. Comparative solution equilibrium studies of antitumor ruthenium (η^6 -*p*-cymene) and rhodium (η^5 -C₅Me₅) complexes of 8-hydroxyquinolines. *Dalton Transactions*, 46(13), 4382-4396, **2017**.
- [24] Pivarcsik, T., Dömötör, O., Mészáros, J. P., May, N. V., Spengler, G., Csuvik, O., Szatmári, I., & Enyedy, É. A. 8-Hydroxyquinoline-amino acid hybrids and their half-sandwich Rh and Ru complexes: Synthesis, anticancer activities, solution chemistry and interaction with biomolecules. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11281, **2021**.
- [25] Gans, P., Sabatini, A., & Vacca, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*, 43(10), 1739-1753, **1996**.
- [26] Williams, D. R. The inductive effect in π -electron systems: II. The shift of $n\text{-}\pi^*$ bands on chloro substitution. *Molecular Physics*, 12(1), 41-48, **1967**.
- [27] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1996#section=Data-Table> (**2023.01.08.**)

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Enyedy Éva Anna egyetemi docensnek és Pivarsik Tamás PhD hallgatónak, mint témavezetőimnek az OTDK munka során nyújtott önzetlen segítségért és végtelen türelemért, támogatásért.

Köszönöm Dr. Spengler Gabriella, valamint Dr. Szakács Gergely és Dr. Tóth Szilárd kutatócsoportjának, hogy biológiai méréseikkel hozzájárultak az OTDK dolgozat elkészüléséhez.