



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

TDK dolgozat

Egy hiszton-demetiláz enzim inhibitor (5-karboxi-8-kinolinol, IOX-1)
kölcsonhatása albuminnal és endogén fémionokkal

KÉSZÍTETTE:

Giricz Anett

Vegyész MSc

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Enyedy Éva Anna

Egyetemi docens

Dr. Dömötör Orsolya

Tudományos munkatárs

Szeged

2024

Tartalmi összefoglaló

A rákterápiában komoly gondot jelentenek a kezelésekkel járó mellékhatások, így igen indokolt az olyan új gyógyszerek fejlesztése, melyek az eddigieknél jobb farmakológiai tulajdonságokkal bírnak. A potenciális hatóanyagok között népszerű vegyületesaládot képeznek a 8-hidroxi-kinolin (HQ) származékok. Ide tartozik az általam is vizsgált 5-karboxi-8-hidroxi-kinolin (IOX-1), melyet a terápiás célpontnak számító, vastartalmú hiszton-demetiláz enzim inhibitoraként azonosítottak. Az IOX-1 vasionokkal való kölcsönhatását korábban nem tanulmányozták a szakirodalomban, holott kulcsszerepe van a hatásmechanizmusban. Összehasonlítási céllal ezen HQ származék nem kelátképző modellvegyületével, a kinolin-5-karbonsavval (Q-COOH) is végeztünk méréseket.

Az IOX-1 tisztaságát ^1H NMR és pH-potenciometriás mérésekkel ellenőriztük. UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével jellemeztük a vegyületek proton disszociációs folyamatait, majd a kapott pK_a értékeket hozzárendeltük a megfelelő donorcsoportokhoz. A meghatározott *n*-oktanol/víz megoszlási hányadosok alapján ezen ligandumok a HQ alapvegyületnél jóval hidrofílebbnek bizonyultak. Ez alapvetően az adott pH értékeken uralkodó protonáltsági formákkal volt magyarázható. A vegyületek humán szérum albuminnal (HSA) való kölcsönhatását ultraszűrés, kapilláris elektroforézis és spektrofluorimetria segítségével tanulmányoztuk. Az elválasztási módszerekkel kapott eredmények megmutatták, hogy a vizsgált vegyületek egyértelműen kötődnek a HSA-hoz. A spektrofluorimetriás mérések alapján javaslatot tettünk arra is, hogy ez mely kötőhelyeken és milyen erősséggel mehet végbe. Az IOX-1 komplexképződési egyensúlyi folyamatainak vizsgálata alapján a ligandum különféle fémionokhoz való affinitási sorrendje a következő: $\text{Fe(II)} < \text{Fe(III)} < \text{Cu(II)}$. A komplexképződést illetően mindegyik fémion esetén az (N,O) donortomok koordinációját javasoltuk. A ciklikus voltammetriás mérések is alátámasztották, hogy a ligandum a Fe(III)-ionokat preferálja a Fe(II)-ionokkal szemben.

Kulcsszavak: 8-hidroxi-kinolin, enzim inhibitor, albumin, oldategyensúly

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1. Daganatos betegségek kezelése és a rákellenes platinakomplexek.....	8
2.2. 8-hidroxi-kinolin alapvázak vegyületek	9
2.3. A humán szérum albumin	11
3. Célkitűzés.....	14
4. Kísérleti rész	15
4.1. Felhasznált vegyszerek és vizsgált ligandumok.....	15
4.2. Oldategyensúlyi vizsgálatok	16
4.2.1. pH-potenciometria	16
4.2.2. Ultraibolya-látható spektrofotometria	17
4.2.3. Lipofilitás vizsgálatok	19
4.2.4. ^1H NMR spektroszkópia.....	20
4.2.5. Spektrofluorimetria.....	21
4.3. Ciklikus voltammetria.....	23
4.4. Elválasztási módszerek	24
4.4.1. Ultraszűrés.....	24
4.4.2. Kapilláris elektroforézis	25
5. Eredmények.....	27
5.1. A ligandumok oldatkémiai tulajdonságai.....	27
5.1.1. IOX-1 tisztaságának vizsgálata	27
5.1.2. A ligandumok proton disszociációs állandói.....	28
5.1.3. Lipofilitás vizsgálatok	31

5.2. A ligandumok humán szérum albuminnal való kölcsönhatása	33
5.2.1. A globális kötődés vizsgálata	33
5.2.2. A kötődés helyének és erősségének vizsgálata	35
5.3. Az IOX-1 kölcsönhatása fémionokkal	37
5.3.1. Komplexképződési egyensúlyi folyamatok.....	37
5.3.2. Redoxi tulajdonságok	41
6. Összefoglalás.....	44
Irodalomjegyzék.....	46
Köszönetnyilvánítás	50

Rövidítések jegyzéke

rövidítés	angol	magyar
CE	capillary electrophoresis	kapilláris elektroforézis
CT	charge transfer	töltésátvitel
CV	cyclic voltammetry	ciklikus voltammetria
<i>D</i>	distribution coefficient	megoszlási hányados
DG	dansylglycine	danzil-glicin
DMF	dimethyl formamide	dimetil-formamid
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetil-szulfoxid
DOX	doxorubicin	doxorubicin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
EOF	electroosmotic flow	elektroozmotikus áramlás
EPR	enhanced permeability and retention	fokozott permeabilitás és visszatartás
FA	frontal analysis	frontális analízis
HMM	high molecular mass	nagy molekulatömegű
HQ	8-hydroxyquinoline	8-hidroxi-kinolin
HQCII	5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline	5-klór-7-jód-8-hidroxi-kinolin
HQNO ₂	5-nitro-8-hydroxyquinoline	5-nitro-8-hidroxi-kinolin
HQS	8-hydroxyquinoline-5-sulfonate	8-hidroxi-kinolin-5-szulfonát
HSA	human serum albumin	humán szérum albumin
<i>I</i>	ionic strength	ionerősség
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry	induktív csatolású plazma tömegspektrometria
IOX-1	5-carboxy-8-hydroxyquinoline	5-karboxi-8-hidroxi-kinolin, 5-karboxi-8-kinolinol
<i>K_w</i>	water ionization constant	vízionszorzat

rövidítés	angol	magyar
LMM	low molecular mass	kis molekulatömegű
ML324	N-(3-(dimethylamino)propyl-4-(8-hydroxyquinolin-6-yl)benzamide	N-(3-(dimetil-amino)propil-4-(8-hidroxi-kinolin-6-il)benzamid
NMR	nuclear magnetic resonance	mágneses magrezonancia
PBS	phosphate-buffered saline	foszfáttal pufferelt sóoldat
PBS*	modified phosphate-buffered saline	módosított foszfáttal pufferelt sóoldat
Phe	phenylalanine	fenilalanin
Q-COOH	quinoline-5-carboxylic acid	kinolin-5-karbonsav
ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigén származékok
Trp	tryptophan	triptofán
Tyr	tyrosine	tirozin
UV-Vis	ultraviolet-visible	ultraibolya-látható
WF	warfarin	warfarin
λ_{EM}	emission wavelength	emissziós hullámhossz
λ_{EX}	excitation wavelength	gerjesztő hullámhossz

1. Bevezetés

A daganatos megbetegedések jelentik napjaink egyik globális méretű problémáját, hiszen az embereknek sajnos igen nagy hányadát érintik. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) 2020-ban nagyjából 19,3 millióra becsülte a rákos megbetegedések számát, az ezzel kapcsolatos halálesetek száma pedig egészen a 10 milliót is elérte világszerte.¹ Az Európai Unióra vonatkozóan már született olyan 2024-es tanulmány is, mely szerint idén körülbelül 1,3 millió haláleset lesz rosszindulatú daganathoz köthető.² Manapság már természetesen többféle kezelés (1. ábra) is elérhető a betegek számára, mint pl. a sugárterápia, a kemoterápia, a hormonterápia, az immunterápia, valamint a sebészeti beavatkozások.³



1. ábra: A daganatos betegségek kezelési lehetőségei.

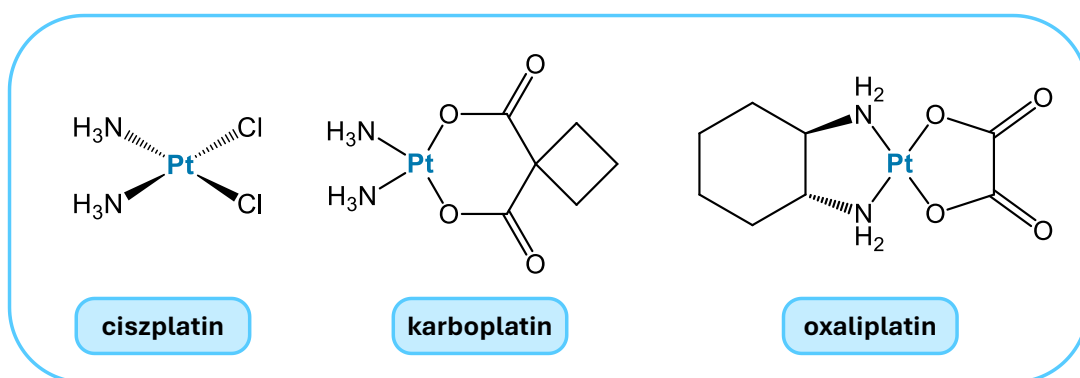
A jelenleg rendelkezésre álló gyógymódok azonban számos mellékhatással járnak, így a betegek sok esetben elutasítják, vagy idő előtt abbahagyják a kezelést. Ez olyan gyógyszerek fejlesztését indokolja, melyek jobb farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Emellett elengedhetetlen, hogy a már meglévő hatóanyagok hatásmechanizmusát és farmakokinetikai tulajdonságait oldatkémiai vizsgálatok segítségével még alaposabban megismerjük. A használatban lévő hatóanyagok palettája igen széles. Egy igen népszerű vegyületcsaládot képeznek a 8-hidroxi-kinolin (HQ) származékok, melyek alkalmazási lehetőségei a gyógyászatban is túlmutatnak. Ezek között megtalálhatók például enziminhibícióra alapuló vegyületek is. Dolgozatomban is egy ilyen HQ származék részletesebb vizsgálatát foglalja magában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Daganatos betegségek kezelése és a rákellenes platínakomplexek

Ahogy az az előző fejezetben is hangsúlyoztuk, a rákos megbetegedések napjaink egyik globális méretű problémáját jelentik. Ma már számos kezelés elérhető a betegek számára, a kezelőorvos többek között választhat a sugárterápia, a kemoterápia, a hormonterápia, az immunterápia, valamint a sebészeti beavatkozás közül is.³ Előbbiek azonban számos mellékhatással járnak, a kezelést kísérheti például hányás, hasmenés, hajhullás vagy akár vese- és halláskárosodás, emiatt a betegek sok esetben elutasítanak bizonyos kezeléseket. Eleve a kór igen nehezen gyógyítható, mivel a ráknak számos különböző típusa van, ráadásul minden egyes eset eltérő módon zajlik le a betegség státuszától és az azt kísérő betegségektől függően.

Az említett kemoterápiás kezelés olyan citotoxikus vagy citosztatikus gyógyszerek alkalmazását jelenti, melyek célja a rákos sejtek elpusztítása. A kemoterápiás szereknek többféle típusa is forgalomban van, melyeket csoportosíthatunk kémiai szerkezetük vagy hatásmechanizmusuk szerint. Utóbbiak alapján léteznek többek között alkilezőszerek, antimetabolitok, citotoxikus antibiotikumok, topoizomeráz gátlók, mitózis gátlók és hormon származékok.⁴ E népes vegyületcsaládba tartoznak a jelenleg is élvonalba tartozó platina(II)-tartalmú fémkomplexek is, melyek a 2. ábrán láthatók. Ezek legrégebbi, több mint 45 éve klinikai használatban lévő képviselője a ciszplatin.



2. ábra: Rákellenes platina(II)-komplexek szerkezeti képlete.

A ciszplatin rákellenes szerként való alkalmazása nagy áttörést jelentett a rákterápiában, ezért még több energiát fektettek a platina-tartalmú szerek fejlesztésére. A későbbiekben így került még forgalomba például a karboplatin és az oxaliplatin is, melyeket szintén széles körben alkalmaznak a rosszindulatú daganatok felszámolására.⁵ Azonban, ahogy

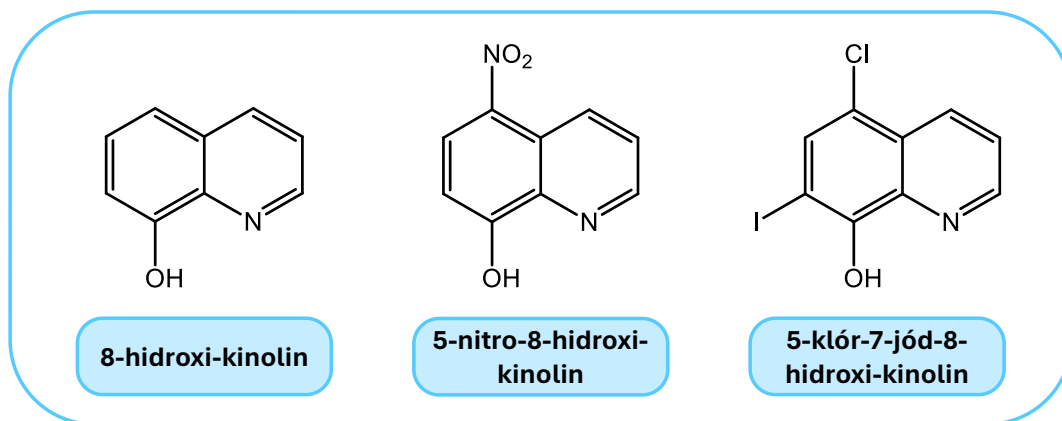
több kezelési módszernek is, ezeknek a komplexeknek is vannak mellékhatásaik. A platinakomplexeket emellett a szelektivitás hiánya és a magas szisztémás toxicitás jellemzi, melyeken felül még a terápia során kialakuló rezisztencia is limitálja alkalmazhatóságukat.⁶ Ezekből adódóan újabb szerves hatóanyagok és fémtartalmú gyógyszerek előállítására a mai napig intenzíven folynak kutatások.

2.2. 8-hidroxi-kinolin alapvázak vegyületek

A számottevő élettani hatással rendelkező 8-hidroxi-kinolint (HQ, 3. ábra), valamint annak származékait már igen sokan vették górcső alá. A 8-hidroxi-kinolin alapvegyület alkalmazhatósága igen sokoldalú, eleinte gombaellenes szerként használták a mezőgazdaságban, emellett textil-, papír-, valamint faiparban elterjedten alkalmazták tartósítószerként.⁷ Ismert továbbá baktériumölő és sejtosztódást gátló tulajdonsága is.⁷ Egy kétfogú kelátképző vegyületről van szó, mely az oxigén- és nitrogénatomot tartalmazó donorkészletének köszönhetően nagy affinitással képes különféle (átmeneti) fémionokhoz koordinálódni.⁸

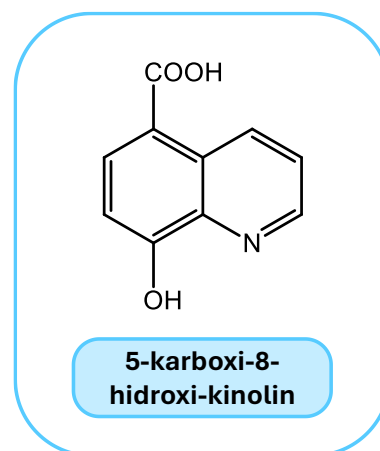
Bizonyos HQ származékok esetén beszámoltak már idegsejtvédő, illetve rákellenes hatásról is.^{7,9} Ilyen rákellenes hatással bír az 5-nitro-8-hidroxi-kinolin (HQNO₂, 3. ábra), mely kiválóan alkalmazható antimikrobiális szerként is.¹⁰ Ez a származék alapvetően a katepszin B endopeptidáz reverzibilis inhibitoraként ismert. Az említett enzim az extracelluláris mátrix lebontásával elősegíti a rosszindulatú daganatok kialakulását és az áttétek képződését, azonban a HQNO₂ képes mindezt meggátolni; ezt *in vitro* és *in vivo* kísérletek is alátámasztják.^{11,12} A katepszin B endopeptidáz inhibíciójára más HQNO₂ származékok is alkalmasak.

A halogénezett HQ származékok közül az 5-klór-7-jód-8-hidroxi-kinolin (kliokinol, HQClI, 3. ábra) a legismertebb. Ezt a vegyületet alapvetően antiszeptikus szerként, illetve húgyúti fertőzések ellen használják.¹³ Kelátképző és ionofór tulajdonságát kihasználva neurodegeneratív betegségek is gyógyíthatók. Az Alzheimer-kórban szenvedő betegekkel végzett vizsgálatok egészen a II-es klinikai fázisig jutottak.⁸ Ugyanis ionofór ligandumok használatával a szervezetben keletkező reaktív oxigén származékok (*reactive oxygen species*, ROS) mennyisége csökkenthető.¹⁴ Az oxidatív stresszt, vagyis ezen részecskék létrejöttét a redoxaktív fémionok (pl. vas, réz) katalizálják ún. Fenton-típusú reakción keresztül. A folyamat gátlása igen fontos, ugyanis az emelkedett ROS szint sejthalálhoz vezet.¹⁴



3. ábra: A 8-hidroxi-kinolin, valamint ismert származékainak szerkezeti képlete.

Léteznek továbbá olyan HQ származékok is, melyek szelektív α -ketoglutarát-függő oxigenáz gátló hatást mutatnak azáltal, hogy komplexálják az enzim központi fémionját.^{15,16} Az enzim katalitikus ciklusában a vas +2-es és +3-as oxidációs állapota is megjelenik. A kezdeti Fe(II) centrumot két hisztidin-nitrogén, egy glutamát-oxigén, valamint három vízmolekula koordinálja. A Fe(II) oxidációjához az O_2 molekula és az (O,O) donorként viselkedő α -ketoglutarát egyaránt szükséges kosubsztrátként. A további enzimatis reakció során az α -ketoglutarát dekarboxileződik szukcináttá, míg a szubsztrát hiszton-N-trimetil-lizin része hidroxileződik. A hidroxilezést demetilezés követi, mely egyúttal a Fe(III) centrum redukciójához vezet.¹⁷ Ezen vasfüggő enzimek képezik a legnépesebb hiszton-lizin-demetiláz (KDM) enzim szupercsaládot, mely számos biológiailag fontos oxidációt katalizál. Az emberi szervezetben nukleinsavak, fehérjék, lipidek és kismolekulák hidroxilációját és demetilációját katalizálják.¹⁵ Az α -ketoglutarát-függő oxigenázok ugyanakkor bizonyos betegségek tekintetében terápiás célpontnak számítanak, ilyen például a veséhez köthető keringési rendellenesség, illetve a rák, ezért is olyan fontos a gátlásuk.^{18,19} Erre alkalmas inhibitoroként azonosították az (N,O) donoratommokkal rendelkező 5-karboxi-8-hidroxi-kinolint (5-karboxi-8-kinolinol, IOX-1, 4. ábra), mely a hiszton-demetilázok (KDM4E (JMJD2E)) gátlásában játszik fontos szerepet.²⁰ Bizonyos esetekben az IOX-1 kötődése indukálja az aktív centrumhoz tartozó vas transzlokációját, mely utat nyithat új inhibitorok fejlesztésében. Mindez azt valószínűsíti, hogy az



4. ábra: Az 5-karboxi-8-hidroxi-kinolin szerkezeti képlete.

inhibíció, ha nem is teljesen, de részben az α -ketoglutaráttal szemben folytatott aktív helyért való versengésből adódhat.²⁰ Egy lehetséges kemoimmunterápiát bemutató tanulmányban ugyanakkor azt találták, hogy az IOX-1 nagyban fokozza az FDA (*Food and Drug Administration*) által jóváhagyott doxorubicin (DOX) okozta immunogén (az immunrendszert aktiváló) sejthalált. Ennek eredményeként az IOX-1 és DOX terápiában való kombinációja nagymértékben elősegíti a T-sejtek megjelenését a tumor szövetben, és jelentősen csökkenti az ott jelenlévő immunszuppresszív faktorok hatását. Liposzomális kombinációjuk egérkísérletek során sikeresnek bizonyult.²¹ A HQ kelátképző tulajdonságát kihasználva további, 7-es pozícióban szubsztituált 8-hidroxi-kinolinokat állítottak elő, melyek szintén hatékony KDM4 hiszton-demetiláz és egyéb α -ketoglutarát-függő oxigenáz inhibitoroknak bizonyultak.²²

A HQ származékok jótékony terápiás hatását a legtöbb alkalmazási területen az esszenciális fémionokkal (Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II)) való komplexképzési reakciójukhoz társítják.^{8,23,24} Emellett már több olyan rákellenes hatással rendelkező fémkomplexet állítottak elő, melyek központi fémionként valamilyen ritkaföldfém²⁵, Pd(II)-ion²⁶ vagy Pt(II)-ion²⁷ tartalmazzak. Az egyik legismertebb antiproliferatív hatású komplex a jelenleg is klinikai vizsgálatok alatt álló trisz-(8-hidroxi-kinolinato)gallium(III), mely igen ígéretesnek bizonyult előrehaladott daganatos betegségek kezelése során.²⁸

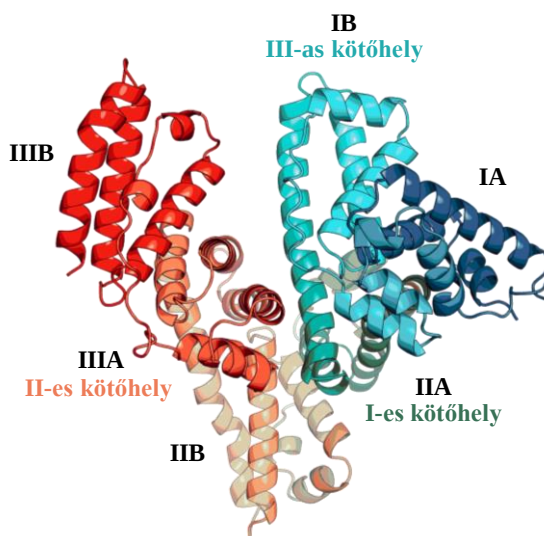
2.3. A humán szérum albumin

Az emberi vérplazmában megtalálható humán szérum albumin (*human serum albumin*, HSA) szállítófehérjeként elsősorban kisebb molekulák szállítását, valamint a pH pufferelését és az ozmózisnyomás biztosítását végzi. Az albumin koncentráció egy felnőtt ember vérplazmájában átlagosan 35-50 g/L, mely a teljes fehérje koncentrációnak (70 g/L) közel 60%-a.²⁹

Ahogy fentebb említésre került, az albumin igen fontos szerepet tölt be a kisebb molekulák megkötésében és szállításában, ugyanis megannyi kötőhelyének köszönhetően rendkívül sokféle vegyülettel képes kölcsönhatást kialakítani. Többek között zsírsavak, fémionok és egyéb szerves vegyületek is előszeretettel kötődnek a HSA-hoz. A legerősebb, nem kovalens jellegű kölcsönhatás a hidrofób tulajdonságú szerves anionokkal tud létrejönni. A ligandumok sokfélesége nem akadály, ugyanis a hidrofób

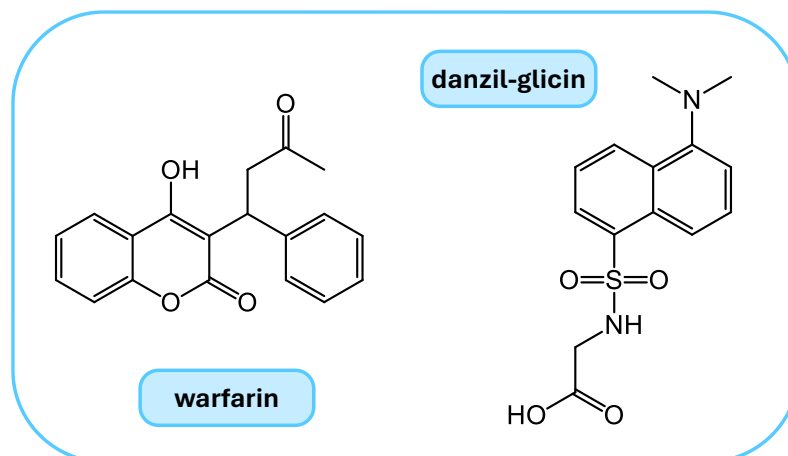
zsebek mérete és belső felülete sokféle másodlagos kölcsönhatás kialakulásának kedvez.²⁹

A HSA egyszerű, globuláris fehérje, összesen 585 aminosavból tevődik össze. Szerkezetét tekintve három nagyobb doménre osztható (I, II, III), melyek mindegyike 2-2 további aldoménre (A, B) bontható. Ezeket az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra: A humán szérum albumin (HSA) szerkezete az aldomének és a főbb kötőhelyek jelölésével.

Az I-es kötőhely, mely a IIA aldoménben található, elsősorban negatív töltésű heterociklusos vegyületeket köt meg.³⁰ A fluoreszcens markerként és véralvadástgátlóként is használatos warfarin (WF) igen nagy affinitással kötődik ehhez az I-es kötőhelyhez. Jelentősége miatt e kölcsönhatás természetéről, illetve erősségéről már számos tanulmány jelent meg.^{31,32,33} A IIIA aldoménben elhelyezkedő II-es kötőhely sokkal inkább preferálja az olyan aromás vegyületek kötődését, melyek semlegesek vagy esetleg negatív töltésűek. A II-es kötőhely jellemző ligandumai az ibuprofén, a diazepam, valamint a szintén fluoreszcens markerként használatos danzil-glicin (DG).³⁴ Az említett markerek (WF és DG) szerkezeti képlete a 6. ábrán látható. A nem is olyan rég felfedezett III-as kötőhely az IB aldoménben található. Ez a kötőhely alapvetően a zsírsavakat köti meg, de ettől függetlenül számos más vegyület is képes itt megkötődni, többek között a hemin, a metilnarancs, illetve többféle rákellenes hatóanyag is.³⁵



6. ábra: A warfarin és a dansil-glicin szerkezeti képlete.

A gyógyszerhatóanyagok többsége általában reverzibilisen kötött állapotban van jelen a vérplazmában, mindez erősen kihat az adott gyógyszer farmakokinetikájára. A lipofil hatóanyagok látszólagos oldhatósága fehérjéhez kötött állapotban fokozódik, így könnyebben célba érnek a szervezeten belül. Azonban fontos megemlíteni, hogy miután célba ért a hatóanyag, ekkor már szabad állapotban kell lennie, ugyanis csak így képes farmakológiai aktivitásának kifejtésére. A szérumfehérjéhez való kötődés a gyógyszer hasznosulásának tekintetében egyúttal jelenthet előnyt vagy akár hátrányt is, ez mindössze az adott hatóanyagtól és az elérni kívánt céltól függ.³⁶ A HSA energia- és tápanyagforrásként szolgálhat a rákos sejteknek, melyek képesek a plazmafehérjék lebontására, majd ennek köszönhetően további gyarapodásra. Az albumin emellett segít a hatóanyagok daganatos szövetekbe való eljutásában, majd felhalmozódásában. Utóbbi a daganatos szövetek érrendszerének növekvő átteresztőképessége, valamint a károsodott nyirokrendszer hiányos nyirokelvezetése miatt bekövetkező folyadék pangásnak köszönhető. Ez a jelenség az ún. fokozott permeabilitás és visszatartás (*enhanced permeability and retention*, EPR) hatás.³⁷ Mindezek miatt rendkívül fontos a HSA és a különféle hatóanyagok kölcsönhatásának alapos tanulmányozása.

3. Célkitűzés

A kismolekulás kemoterápiás gyógyszermolekulák fejlesztésekor a hagyományos platinacsoportba tartozó fémionok komplexei mellett kiemelt kutatási területet jelentenek a 8-hidroxi-kinolin származékok. E vegyületcsoport igen széles hatásspektrummal rendelkezik, valamint közülük több hatóanyagot is alkalmaznak a gyógyászatban. Sok származék mutat rákellenes hatást is, melyek akár már bizonyos fázisú klinikai vizsgálatig vagy akár a klinikai használatig is eljutottak. A meglévő, illetve új hatóanyagok hatásmechanizmusának és farmakokinetikai tulajdonságainak ismerete elengedhetetlen, ezek oldatkémiai vizsgálatok segítségével térképezhetőek fel.

Munkánk során mi is egy HQ származék, a hiszton-demetiláz enzim inhibitorként viselkedő IOX-1 oldatkémiai vizsgálatát végeztük. Emellett összehasonlítási alapként tanulmányoztuk az IOX-1 modellvegyületét, a kinolin-5-karbonsavat (Q-COOH) is, mely alapvetően nem kelátképző. Céljaink az alábbiak voltak:

- A három különféle gyártótól (MedChemExpress, Angene, Sigma-Aldrich) származó IOX-1 termékek tisztaságának ellenőrzése pH-potenciometriával és ^1H NMR spektroszkópiával.
- A vegyületekhez (beleértve a három IOX-1 terméket) tartozó proton disszociációs folyamatokat jellemző pK_a értékek meghatározása UV-látható spektrofotometria segítségével.
- A vegyületek lipofilitását jellemző megoszlási hányadosok ($\lg D_{\text{pH}}$) meghatározása *n*-oktanol/víz megoszlásos módszerrel két különböző pH-n.
- A vegyületek humán szérum albuminnal való kölcsönhatásának tanulmányozása spektrofluorimetria, ultraszűrés és kapilláris elektroforézis - frontális analízis (CE-FA) segítségével.
- Az IOX-1 ligandum vas(III)-, vas(II)- és réz(II)-komplexeinek vizsgálata UV-látható spektrofotometriás titrálásokat végrehajtva. A képződő komplexek összetételének és stabilitásának jellemzése.
- Az IOX-1 ligandum vas- és rézkomplexeihez tartozó redoxi tulajdonságok feltérképezése ciklikus voltammetriás mérések segítségével.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált vegyszerek és vizsgált ligandumok

A dolgozatom számottevő részét képező IOX-1 ligandum három különféle beszállítótól (MedChemExpress, Angene, Sigma-Aldrich) is rendelkezésünkre állt. Az utóbbi ligandumot modellező Q-COOH a Tokyo Chemical Industry terméke. A mérések során felhasznált dimetil-szulfoxid (DMSO) és deuterált változata (DMSO- d_6), dimetil-formamid (DMF), maltol, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, KCl, KNO_3 , KOH, KH-ftalát, HCl, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), CuCl_2 , elemi vas, FeCl_3 , *n*-oktanol, HSA, DG és WF a Sigma-Aldrich, VWR, Molar Chemicals vagy Reanal Kft. termékei. Ezeket további tisztítás nélkül használtuk fel. Oldószerként Milli-Q vizet, DMSO-t, illetve annak deuterált változatát használtunk. A KCl és KH-ftalát oldatok mindig frissen készültek. A fém sók vízben vagy sósavban való oldása után kapott oldatok pontos koncentrációjának meghatározása komplexometriásan, EDTA mérőoldattal (Cu(II), Fe(III)) történt. A FeCl_2 mérőoldat elemi vas sósavban való oldásával, oxigén kizárása mellett készült. Szűrést követően az oldat koncentrációját permanganometriás módszerrel határoztuk meg, a Fe(III)-ionoktól való mentességet pedig rendszeresen ellenőriztük KSCN oldat segítségével.

A vegyületek törzsoldatai névleges tisztaságukat figyelembe véve, tömeg szerinti beméréssel készültek. Azonban az IOX-1 esetén a különböző gyártók termékeinek tisztasága nem felelt meg az előírtaknak, így mindhárom esetben ^1H NMR spektroszkópiás, illetve pH-potenciometriás mérésekkel győződünk meg azok tényleges tisztaságáról. Ezek a törzsoldatok hűtőszekrényben voltak tárolva.

A pufferelt albuminos mintákat PBS* oldatban (pH = 7,40) készítettük. Ez a módosított puffer 1,5 mM KCl-ot, 100,5 mM NaCl-ot, 12 mM Na_2HPO_4 -ot és 3 mM KH_2PO_4 -ot tartalmaz. Az esetleges szennyező fémionok zavaró hatásának kiküszöbölése érdekében 2 mM EDTA is került a puffer oldatba. Az oldat pH értékét kis mennyiségű sav vagy lúg hozzáadásával állítottuk a kívánt értékre. A puffer összetétele megegyezik a vérplazmában levő K^+ , Na^+ és Cl^- koncentrációkkal. (A klasszikus PBS (*phosphate buffered saline*) pufferben 139,7 mM a kloridionok koncentrációja.)

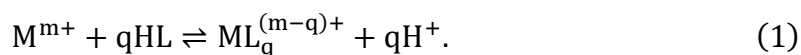
A HSA-ból minden mérési sorozat előtt friss törzsoldatot készítettünk, koncentrációját spektrofotometriásan ellenőriztük. Az oldatok készítéshez ebben az esetben a fentebb részletezett PBS* puffert használtuk. A koncentrációt minden

alkalommal a 280 nm-nél mérhető abszorbanca ($\epsilon_{280\text{ nm}} = 36850\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segítségével határoztuk meg.³⁸ A markerekből (DG és WF) 1 mM koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk, az oldódást körülbelül 1 ekvivalens lúg (KOH) hozzáadásával segítettük.

4.2. Oldategyensúlyi vizsgálatok

4.2.1. pH-potenciometria

A fémkomplexek protonálódási, illetve stabilitási állandóinak meghatározására igen gyakran alkalmazott módszer a pH-potenciometria. Ennek alapja, hogy a fémion és a H^+ verseng a ligandum kötőhelyeiért. Ez a folyamat az alábbi egyenlettel írható le:



A könnyebb áttekinthetőség érdekében a továbbiakban elhanyagoljuk a töltéseket. A teljesen deprotonált ligandumot (L), protont (H) és fémiont (M) tartalmazó rendszerek esetén az egyensúlyi egyenletek a következőképpen írhatók fel:



ahol p, q és r a sztöchiometriai együtthatókat jelölik.

A stabilitási szorzatot (β) a 2. egyenlet alapján az alábbi képlet adja meg:

$$\beta_{pqr} = \frac{[\text{M}_p\text{L}_q\text{H}_r]}{[\text{M}]^p[\text{L}]^q[\text{H}]^r}. \quad (3)$$

Ebből adódóan, a titrálás során mért egyensúlyi pH-értékekből nagy pontossággal meghatározható a kialakuló komplexek stabilitása. Továbbá a pH-méréshez elengedhetetlen, hogy az elektródunk működése megfeleljen a Nernst-egyenletnek. A pH-potenciometriás mérések során minden esetben a H^+ az elektródaktív komponens. Ez az elméleti potenciál azonban a mért potenciáltól eltér, a kettő közötti eltérés állandó, ez az ún. Irving-faktor, mely kalibráció segítségével határozható meg.³⁹

A pH méréséhez Metrohm 6.0234.100 kombinált elektródot használtunk, melyet Orion 710A pH-mérőhöz csatlakoztattuk. Az ismert koncentrációjú karbonátmentes (0,10 M) KOH-mérőoldatot Metrohm 665 Dosimat automata bürettával adagoltuk, nagy pontossággal (0,001 cm³), számítógépes program vezérlésével ún. egyensúlyra vezető titrálásokat végeztünk.

A titrálásokat argonatmoszféra alatt hajtottuk végre, a hőmérsékletet termosztát segítségével végig $25,0 \pm 0,1$ °C-on tartottuk. A rendszer állapotát minden nap kalibrálással ellenőriztük, mely erős sav (HCl) erős bázissal (KOH) való titrálását jelenti. Az ehhez tartozó sav koncentrációt, az Irving-faktort és a víziionszorzatot (K_w) az Abu9x nevű programmal kaptuk meg, mely a Gran-módszer alapján számol.⁴⁰

A titrált minták $10,00 \text{ cm}^3$ térfogatúak voltak, $0,10 \text{ M}$ -os (KCl) ionerősség mellett, magát az IOX-1 ligandumot pedig $\sim 1,5 \text{ mM}$ -ban tartalmazták. A titrálás kezdetekor a pH ~ 2 volt és pH = 12,2-ig adagoltuk a lúg mérőoldatot, kivárva minden pontban a kémiai egyensúlyt. A mintáknál minden esetben 30% (v/v) DMSO/H₂O közeget alkalmaztunk, a víziionszorzat értéke ebben a közegben $pK_w = 14,52 \pm 0,05$ volt.

A kapott adatokat a különböző IOX-1 gyártmányok tisztaságának ellenőrzéséhez végzett kvantitatív ¹H NMR mérések eredményének alátámasztására használtuk.

4.2.2. Ultraibolya-látható spektrofotometria

Az ultraibolya-látható (UV-Vis) spektrofotometria egy igen széles körű gyakorlati felhasználással rendelkező műszeres analitikai eljárás. E módszerrel azon anyagok vizsgálhatóak, melyek a $\sim 200\text{--}800 \text{ nm}$ hullámhossztartományban fényt nyelnek el. Mindez annak tudható be, hogy ezek a vegyületek egy vagy akár több kromofór csoporttal is rendelkeznek. A mérés során az elektronok gerjesztés hatására alacsonyabb energiájú elektronpályákról magasabb energiájúakra kerülnek. Emellett fémkomplexek esetében elnyelést okozhatnak a fémion d-d átmenetei, a fémion és a ligandum közötti töltésátviteli (*charge transfer*, CT) sávok, illetve a ligandum molekulán belüli elektronátmenetei (ligandumsáv).

A mérések során az adott hullámhosszon (λ) kapott analitikai jelet, vagyis abszorbanciát (A^λ) a 4. egyenlettel definiáljuk:

$$A^\lambda = \lg \frac{I_0^\lambda}{I^\lambda}, \quad (4)$$

ahol I_0^λ a beeső fény intenzitása és I^λ a mért mintán átjutott fény intenzitása. Az abszorbancia és a minta koncentrációja közötti összefüggést adott hullámhosszon a Lambert–Beer törvény írja le:

$$A^\lambda = \varepsilon^\lambda \cdot c \cdot \ell, \quad (5)$$

ahol, ε^λ a moláris abszorbancia ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), c a mérendő anyag koncentrációja (M) és ℓ a küvetta hossza a fényút irányában (cm).

A fotometriás mérésekre az ad lehetőséget, hogy komplexképződési reakciók folyamán megváltozik a molekula elektroneloszlása és gerjeszthetősége, tehát a protonált, a deprotonált és a komplexben kötött ligandum elnyelési sávja eltérő lesz.

A vegyületek proton disszociációs állandóit (pK_a) és fémkomplexeik stabilitási szorzatait ($\lg\beta$) a HypSpec program⁴¹ segítségével határoztuk meg. A bemenő fájl tartalmazta a mért pH-értékeket, a komponenseket (M, L, H), és az ezekből felépíthető, az adott rendszerben várt asszociátumok számát és összetételét, a komponensek analitikai koncentrációit, a víziionszorzatot, illetve a mért abszorbancia spektrumokat. Az asszociátumok stabilitási szorzatai – megfelelő közelítő értékeket megadva – a 6-8. egyenletek által leírt anyagmérlegek alapján a komponensekre felírhatók és iterálhatók a megfelelő értékre. A mért spektrumok és az egyensúlyi koncentrációk között az abszorbancia additív tulajdonsága alapján a Lambert–Beer törvény (5. egyenlet) teremt kapcsolatot. A koordinált vízmolekulák nincsenek külön feltüntetve.

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

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

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (8)$$

A Fe(II)- és Fe(III)-ionok hidrolízise során keletkező hidrolízis-termékek képződési állandói irodalmi adatok alapján lettek figyelembe véve. Ezek a $\lg\beta$ értékek Fe(II) esetén rendre MH_{-1} : -9,43, MH_{-2} : -20,73, MH_{-3} : -32,68,⁴² míg Fe(III) esetén MH_{-1} : -3,22, MH_{-2} : -6,73, M_2H_{-2} : -4,09, M_3H_{-4} : -7,58.⁴³

Mindkét vegyülettel végeztünk spektrofotometriás titrálásokat, valamint az IOX-1 esetén 1 : 1, 1 : 2 és 1 : 3 fém : ligandum arányú mintákat is vizsgáltunk, pH = 2,00-11,7 tartományban, 0,10 M (KCl) ionerősség mellett, 25 °C-on. A ligandum, valamint a Cu(II)- és Fe(III)-komplexek vizsgálatához ~160 μ M koncentrációjú, 10,00 cm³ térfogatú mintákat készítettünk. A spektrumok felvételéhez egy számítógéppel vezérelt Agilent Carry 8454 típusú készüléket használtunk 190-1100 nm tartományban, az optikai úthossz 1,00 cm volt. A Fe(II)-ionokat tartalmazó minták oxigénérzékenységére való tekintettel szigorúan anaerob körülmények között dolgoztunk, mindezt a laboratóriumban

megtalálható Jacomex GP(Campus) típusú kesztyűs manipulátor (*glovebox*) ($O_2 \leq 1$ ppm) tette lehetővé. A *glovebox* egy olyan környezettől hermetikusan lezárt szekrény, melyben oxigénmentes atmoszféra hozható létre. A mérésekhez szükséges anyagok és eszközök egy zsilipkamrán keresztül juttathatók be, illetve ki az anaerob munkaállomásból. Az így bevitt, levegőre érzékeny anyagokkal való munkálatokat a szekrény egyik (átlátszó) oldalán benyúló gumikesztyűk teszik lehetővé. A minták fém : ligandum arányai, ionerősségei, a mérések pH tartománya, valamint hőmérséklete megegyezik a fentebb részletezett körülményekkel. A minták $\sim 150 \mu\text{M}$ koncentrációban tartalmazták az IOX-1 ligandumot, térfogatuk pedig $25,00 \text{ cm}^3$ volt, melyet a spektrumok felvételéhez használt Avantes száloptikás spektrofotométer bemenő mérőfeje követelt meg. A fotométer AvaLight-DHc fényforrással és AvaSpec-ULS2048XL-EVO detektorral volt felszerelve. Méréseinket 210-1100 nm hullámhossztartományon végeztük.

4.2.3. Lipofilitás vizsgálatok

A lipofilitások meghatározásához a klasszikus *n*-oktanol/víz megoszlásos módszert alkalmaztuk. A vizes fázist és az *n*-oktanol előzetesen telítettük egymással. A méréseket a gyomor pH-ján ($\text{pH} = 2,00$), illetve fiziológias pH-n ($\text{pH} = 7,40$) is elvégeztük. A $\text{pH} = 2,00$ -es értéket 20 mM-os $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ puffer alkalmazásával érték el, mely pH-értékét sósavval állítottuk. A $\text{pH} = 7,40$ -en történt méréseket a módosított PBS* pufferrel végeztük (ennek összetételét a 4.1. alfejezet tartalmazza). A pufferek mindkét esetben 2 mM EDTA-t tartalmaztak. A lipofilitás meghatározásához használt minták $\sim 80 \mu\text{M}$ ligandumot tartalmaztak, térfogatuk rendre $1,8 \text{ cm}^3$ volt, mely $0,9 \text{ cm}^3$ referencia oldatból és $0,9 \text{ cm}^3$ *n*-oktanolból tevődött össze. Mindkét vegyület esetén 2 párhuzamos mintát készítettünk. A minták 2 órán át történő rázatását követően a fázisokat centrifuga segítségével szeparáltuk, majd felvettük az abszorpciós spektrumaikat. A spektrumokat szintén egy számítógéppel vezérelt, de más típusú, Agilent Cary 3500 spektrofotométerrel rögzítettük 200-800 nm tartományban, 1,00 cm-es kivető használatával. A megoszlási hányadosokat (D_{pH}) a következő képlet alapján számoltuk:

$$D_{\text{pH}} = \left[\frac{A_{(\text{törzsoldat})}}{A_{(\text{elválasztás utáni vizes fázis})}} - 1 \right] \cdot \frac{V_{(\text{vizes fázis})}}{V_{(\text{n-oktanolos fázis})}}, \quad (9)$$

ahol D_{pH} az adott pH-hoz tartozó megoszlási hányados, $A_{(\text{törzsoldat})}$ a törzsoldat abszorbanciája, $A_{(\text{elválasztás utáni vizes fázis})}$ a vizes fázis abszorbanciája elválasztás után, $V_{(\text{vizes fázis})}$ a vizes és $V_{(n\text{-oktanolos fázis})}$ az n -oktanolos fázis térfogata.

4.2.4. ^1H NMR spektroszkópia

A mágneses magrezonancia (*nuclear magnetic resonance*, NMR) spektroszkópia, olyan atommagok vizsgálatára alkalmas, melyek spinje nullától különböző. A ^1H NMR módszer alapját az képezi, hogy mágneses térben a magspinnek rendelkező ^1H -atommagok energiája eltér egymástól: a ^1H magspinje $I=1/2$, így $2I+1=2$ energiaszint alakul ki. Ezek energiakülönbsége függ az anyagra jellemző giromágneses állandó nagyságától, illetve attól, hogy mekkora mágneses térben van a rendszerünk. Hiszen az egyre erősebb külső mágneses tér az atommagok energiafelhasadását arányosan növeli, ez az ún. Zeeman-effektus. Egy NMR-készüléknél a mágneses térerősség állandó, melynek értékét a Larmor-frekvenciával fejezik ki. A mintát ezzel a rezonanciafrekvenciával besugározva történik meg az átmenet a két energiaállapot között. Méréseink során ez 500 MHz, a készülék pedig egy Bruker Avance III HD Ascend 500 Plus típus volt.

A ^1H NMR spektroszkópia egyaránt alkalmazható kvalitatív és kvantitatív célokra is. A kvalitatív méréseket és szerkezetfelderítéseket az teszi lehetővé, hogy a vegyületek atommagjai eltérő kémiai környezetben helyezkednek el, így más és más rezonanciafrekvenciát érzékelnek, így egy ún. kémiai eltolódás skálán máshol adnak jeleket. Ez a kémiai eltolódás függ a magot körülvevő elektronok hibridállapotától, a szomszédos magok elektronvonzó képességétől, illetve egyéb, az elektronsűrűséget befolyásoló hatásoktól. Emellett a molekulában lévő atommagok között skaláris csatolás jöhet létre, melynek köszönhetően az adott jelek multiplettekké hasadhatnak. A felhasadás mértéke a szomszédos atommagok számára enged következtetni. Az így létrejött jelcsoportok intenzitásarányai pedig információt szolgáltatnak a jelt adó magok számáról. A jelek integrálásával tehát szerkezeti információkat kaphatunk a molekuláról. A módszer kvantitatív felhasználása kiterjedhet anyagok tisztaságának, illetve abszolút vagy relatív koncentrációjának meghatározására. Ehhez egy olyan, a vizsgált anyagtól eltérő kalibrációs vegyület használatos, mely a mintában kellő koncentrációban olyan jeleket produkál, melyek jó alapot adnak a szükséges kvantitatív paraméterek kiszámításához. A kalibráláshoz használt vegyülettől elvárt, hogy kémiaiilag inert és nagy

tisztaságú legyen, jól oldódjon a használt oldószerben, illetve ne rendelkezzen túl hosszú T_1 relaxációs idővel. Az általunk is vizsgálni kívánt tisztaság az alábbi képlet segítségével kapható meg:

$$P_x = \frac{I_x}{I_{kal}} \cdot \frac{N_{kal}}{N_x} \cdot \frac{M_x}{M_{kal}} \cdot \frac{m_{kal}}{m_x} \cdot P_{kal}, \quad (10)$$

ahol P a tisztaság (%), I az integrált terület, N a jelhez tartozó atommagok száma, M a moláris tömeg és m az analitikai tömeg, melyek a vizsgált anyaghoz (x) vagy a kalibrációs vegyülethez (kal) tartoznak.

Az IOX-1 ligandum tisztaságának vizsgálatához szükséges NMR spektrumok felvételéhez $0,6 \text{ cm}^3$ térfogatú mintákat készítettünk. A mintákhoz felhasznált $\sim 5 \text{ mM}$ koncentrációjú ligandum törzsoldatok deuterált DMSO felhasználásával készültek. A mérésekhez használt kalibrációs vegyület a maltol volt, melyet Milli-Q vízben oldva $\sim 20 \text{ mM}$ koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A maltol a ligandumhoz hasonlóan $\sim 2 \text{ mM}$ koncentrációban volt jelen a mintákban, melyek végső DMSO- d_6 tartalma $\sim 42\%$ (v/v) volt. A spektrumokat a MestReNova nevű programmal⁴⁴ értékeltük ki.

4.2.5. Spektrofluorimetria

Spektrofluorimetria segítségével kémiai rendszerek fluoreszcens tulajdonságú molekulái vizsgálhatók. Fluoreszcencia akkor lép fel, ha a fénnel gerjesztett molekulák fényemisszióval relaxálódnak és mindez az elektronok spinkvantumszám változása nélkül következik be. A folyamat piko-, nanoszekundumok alatt lezajlik, az elektronok pedig ismét alapállapotba kerülnek. Így a besugárzás megszüntetésével tulajdonképpen egyből megszűnik a fénykibocsátás is. Kellő intenzitású fluoreszcenciát főként a merev, sík szerkezetű és aromás vagy többszörös konjugált kettős kötést tartalmazó molekulák mutatnak. Az emittált fény spektruma elsősorban az anyagi minőségtől függ.⁴⁵

Fehérjékben három aromás jellegű aminosav rendelkezik fluoreszcens tulajdonsággal: a fenilalanin (Phe), a tirozin (Tyr) és a triptofán (Trp). Éppen ezért előszeretettel alkalmaznak fluoreszcencián alapuló technikákat a fehérjék vizsgálatakor. A HSA-t felépítő aminosavak között több Phe és Tyr található, viszont mindössze egyetlen Trp van, mely a 214-es pozícióban, a IIA aldómén I-es kötőhelyének közelében fedezhető fel.⁴⁶ Utóbbi aminosav szelektíven gerjeszthető, ha a gerjesztő fény hullámhossza 295 nm . Amennyiben az I-es kötőhely közelében megváltoznak a kötési viszonyok, úgy a Trp emissziós fényintenzitása csökken, ebből adódóan nevezik ezt a

folyamatot kioltásnak. Az így bekövetkező csökkenés mértékéből a fehérje-ligandum kölcsönhatás erősségére lehet következtetni.

Azonban léteznek olyan fehérje-ligandum kölcsönhatások is, melyek nem követhetőek közvetlenül fluorimetriás módszer segítségével. Ilyen esetekben ún. kiszorításos méréseket alkalmaznak, melyekhez olyan fluoreszcens markerek használata szükséges, amik önmagukban már eleve fluoreszcens sajátosságúak, de fehérjéhez kötődve még tovább nő az emissziós intenzitásuk. Az ilyen kísérletek azon alapszanak, hogy egy adott HSA : marker arányú mintához kompetítort adagolnak, aminek köszönhetően a kompetitor és a marker versengeni fog a fehérje kötőhelyéért. Ahogyan a kompetitor koncentrációja növekszik a mintában, úgy egyre több marker szorítható ki a kötőhelyről, mely az emissziós intenzitás csökkenését vonja maga után. Amennyiben a fehérje-kompetitor kölcsönhatás kellően erős, akkor a folyamat egyensúlyi (kiszorítási) állandója meghatározható. A különböző kötőhelyek más-más markerek segítségével vizsgálhatók, az I-es kötőhely esetében warfarint, míg a II-es kötőhelynél danzil-glicint használtunk.

A fluorimetriás mérések során kis koncentrációk (μM) használatával az önabszorpció és a belső filter hatás többnyire elkerülhető. Sok esetben azonban így is korrigálni kell a mért intenzitásokat, mely a minta abszorbanciájának felhasználásával történik az alábbi képlet szerint:

$$F_{\text{kor}} = F_{\text{mért}} \cdot 10^{\frac{(A_{\lambda(\text{EX})} + A_{\lambda(\text{EM})})}{2}}, \quad (11)$$

ahol F_{kor} és $F_{\text{mért}}$ a korrigált és a mért intenzitás, $A_{\lambda(\text{EX})}$ és $A_{\lambda(\text{EM})}$ a besugárzás és a detektálás hullámhosszán mért abszorbancia.⁴⁷

Kísérleteinket egy FluoroMax Plus (Horiba Jobin Yvon) típusú spektrofluoriméterrel végeztük, az optikai úthossz mindkét irányban 1,00 cm volt. A minták minden esetben PBS* (+ 2 mM EDTA) pufferrel készültek és a mérés során végig 25 °C-on voltak termosztálva. A kioltásos mérések esetén a minták 1 μM HSA-t tartalmaztak, míg a ligandum koncentrációja 0 és 20 μM között változott. Kiszorításos mérések esetén az előbbieket mellett a minták 1 μM markert is tartalmaztak. A rögzített HSA : marker arány esetünkben így 1 : 1 volt. A kísérlet típusától függően eltérő gerjesztési hullámhosszt és emissziós hullámhossztartományt alkalmaztunk, ezeket az 1. táblázat szerint állítottuk be. A résszélességeket (*slit*) igyekeztünk minden esetben úgy megválasztani, hogy a lehető legnagyobb érzékenység mellett, de még a készülék lineáris tartományán belül végezzük méréseinket. Ez fluoroforonként más-más értéket jelentett.

Kioltásos mérések esetén 5 nm, míg kiszorításos méréseknél 4,5 nm volt a résszélesség a gerjesztő és az emissziós oldalon is.

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

Mérés típusa	Fluorofór	Gerjesztési hullámhossz (nm)	Emissziós hullámhossztartomány (nm)
kioltás	Trp	295	305-450
kiszorítás	warfarin	310	320-500
	danzil-glicin	335	420-600

4.3. Ciklikus voltammetria

A ciklikus voltammetria (*cyclic voltammetry*, CV) egy olyan népszerű elektrokémiai módszer, melyet általánosan alkalmaznak különféle kémiai rendszerek redukációs és oxidációs folyamatainak vizsgálatára. A módszerrel olyan elektronátmenettel járó folyamatok jellemezhetők, melyek a redoxaktív fémkomplexek reakciókészsége szempontjából kulcsfontosságúak. Egy CV mérés során állandó pásztázási sebesség mellett változtatjuk a referencia- és a munkaelektrod közötti feszültséget (E), miközben a munka- és a segédelektrod között fellépő áramerősséget (i) mérjük. Amennyiben a feszültséget csökkentjük, úgy az adott vegyület oxidált formája redukálódni fog, ennek következtében pedig áram keletkezik, mely egy maximumot elérve teszi lehetővé a redukációs potenciál leolvasását. Az így képződött redukált forma a feszültség növelésével visszaoxidálódik, mely az anódos áram megjelenését vonja maga után. Az anódos és a katódos csúcs közötti feszültségkülönbség (ΔE) az alábbi képlettel számolható ki:

$$\Delta E = E_p^a - E_p^k = \frac{59}{n} (\text{mV}), \quad (12)$$

ahol E_p^a az anódos csúcspotenciált, E_p^k a katódos csúcspotenciált, n pedig az elektronátmenet számát jelöli. Egyelektronos folyamat esetén a csúcspotenciálok különbsége 59 mV ($T = 25^\circ\text{C}$).

A ciklikus voltammogramokról leolvasható katódos és anódos csúcspotenciálok, valamint csúcsáramok segítségével következtethetünk a reakcióban részt vevő elektronok számára, a folyamat reverzibilitására, illetve a formálpotenciál értékére.

A ciklikus voltammetriás méréseket egy számítógép vezérelte Autolab PGSTAT204 típusú potenciosztáttal végeztük. A méréshez három elektródra volt szükségünk: üvegszén munkaelektrodra, platina segédelektrodra, valamint Ag/AgCl (3 M KCl) referenciaelektrodra. A mérőrendszer kalibrálását $K_3[Fe(CN)_6]$ oldattal végeztük ($E_{1/2} = +0,458$ V vs. NHE) $-0,1$ és $+0,5$ V között.⁴⁸ A ciklikus voltammogramok rögzítése előtt a mintákba 10 percen keresztül argont vezettünk, melyet előtte lúgosított pirogallol oldattal oxigénmentesítettünk. A méréseket $25,0 \pm 0,1$ °C-on, állandó ionerősség (0,1 M KNO_3) mellett végeztük. A minták pH-értékét kellő mennyiségű sav vagy lúg hozzáadásával 7,40-re állítottuk. A minták a Cu(II)-komplexek esetén 1 : 2, míg a Fe(III)-komplexek esetén 1 : 3 fém : ligandum arány mellett készültek, úgy, hogy a fémionok koncentrációja minden esetben 0,5 mM volt. A minták DMF tartalma 30% (v/v) vagy 60% (v/v) volt. A pásztázási sebességeket 0,005 és 0,025 V/s tartományban változtattuk. A mért potenciál értékeket $+0,222$ V hozzáadásával számoltuk át normál hidrogén elektródra (NHE).⁴⁹

4.4. Elválasztási módszerek

4.4.1. Ultraszűrés

Az ultraszűrés segítséget nyújt a különböző kismolekulák és bizonyos makromolekulák (esetünkben HSA) között kialakuló kölcsönhatások vizsgálatában. Az ultraszűrés során egy olyan speciális membránszűrőt alkalmaznak, mely csak egy bizonyos molekulatömegnél, pl. 10 kDa-nál kisebb molekulákat enged át ($M(HSA) = 67$ kDa). A makromolekulákhoz kötött és szabad kismolekula frakció ilyen membránszűrő, illetve kellő centrifugálás segítségével elválasztható. A centrifugálás után a szűrőn fennmarad az ún. nagy molekulatömegű (*high molecular mass*, HMM) frakció, míg a szűrőn átjut az ún. kis molekulatömegű (*low molecular mass*, LMM) frakció. Ezen frakciók összetétele a megfelelő analitikai módszerek segítségével (pl. ultraibolya-látható spektrofotometria, ICP-MS, fluorimetria) tanulmányozható.

A méréseket mindkét vegyület esetén $0,80$ cm³ térfogatban és $25,0 \pm 0,1$ °C-on végeztük. A ligandumok koncentrációja állandó volt, az IOX-1 esetében ez 100 μM-t jelentett, míg a HSA koncentrációja 0 és 165 μM között változott. A Q-COOH vegyület

esetében a ligandum koncentráció 150 μM volt, a HSA pedig 1 : 1 és 1 : 0,5 ligandum : HSA arányoknak megfelelően volt hozzáadva. A minták elkészítéséhez PBS* (+ 2 mM EDTA) puffert használtunk. Minden mérés előtt meggyőződünk, hogy az adott ligandum önmagában, fehérje távollétében szűrhető-e.

Az általunk összeállított mintákat a kémiai egyensúly beállása után felvittük a membránszűrőkre, a szűrést centrifugálással végeztük. Mindezt egy Eppendorf MiniSpin Plus centrifuga használatával tettük 10-15 percen keresztül, 12000 rpm fordulatszámon, míg a mintatérfogot ~80-90%-a át nem jutott a szűrőn. A mérésekhez Millipore Amicon Ultra-0.5 (10 kDa) membránszűrőket használtunk. Mintáinkat az ultraszűrés előtt és után is vizsgáltuk Agilent Cary 3500 spektrofotométer segítségével, 1,00 cm-es küvettát használva.

4.4.2. Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis (*capillary electrophoresis*, CE) egy elterjedten használt elválasztási technika, mely kiválóan alkalmas például fehérjék és kismolekulák kölcsönhatásának tanulmányozására.⁵⁰ A módszer előnyei közé sorolható, hogy mintaigénye mindössze néhány nL és igen könnyen automatizálható. Az elektroforetikus elválasztási módszerek alapja, hogy a töltéssel rendelkező részecskék egy vezető közegben elektromos potenciálkülönbség hatására a megfelelő elektród felé vándorolnak. A CE esetében mindez egy igen kis belső átmérővel rendelkező kapilláris belsejében történik, melyet általában valamilyen puffer oldattal töltenek fel. A háttélektrolitba juttatott részecskék különböző sebességgel vándorolnak, így kialakítva egy sebességgradienst. Ehhez a sebességhez adódik hozzá magának a háttélektrolitnak a vándorlási sebessége is. Ez utóbbi az ún. elektroosmotikus áramlás (*electroosmotic flow*, EOF) alapszik, mely a folyadéknak egy töltéssel bíró felület mentén kialakuló elmozdulását jelenti elektromos behatás mellett.⁵¹

Kísérleteink célja az IOX-1 ligandum – HSA kölcsönhatás tanulmányozása volt kapilláris elektroforézis - frontális analízis (CE-FA) módszerrel. Utóbbi módszer a gyorsan beálló egyensúlyok vizsgálatára ad lehetőséget, ugyanis kapilláris zónaelektroforézis során a rendszer komponensei térben elválnak, így az egyensúly a disszociáció irányába tolódik el. A frontális analízis során elvárás, hogy a vegyületek szabad, illetve kötött formái egymással kellő mértékben átfedő platókat, avagy frontokat képezzenek. A módszer használatát az tette lehetővé, hogy a jóval nagyobb moláris

tömeggel rendelkező fehérje, illetve a hozzá kötött ligandum moláris tömege és töltése, azaz elektroforetikus mozgékonyága, eltér a szabad ligandumétól.

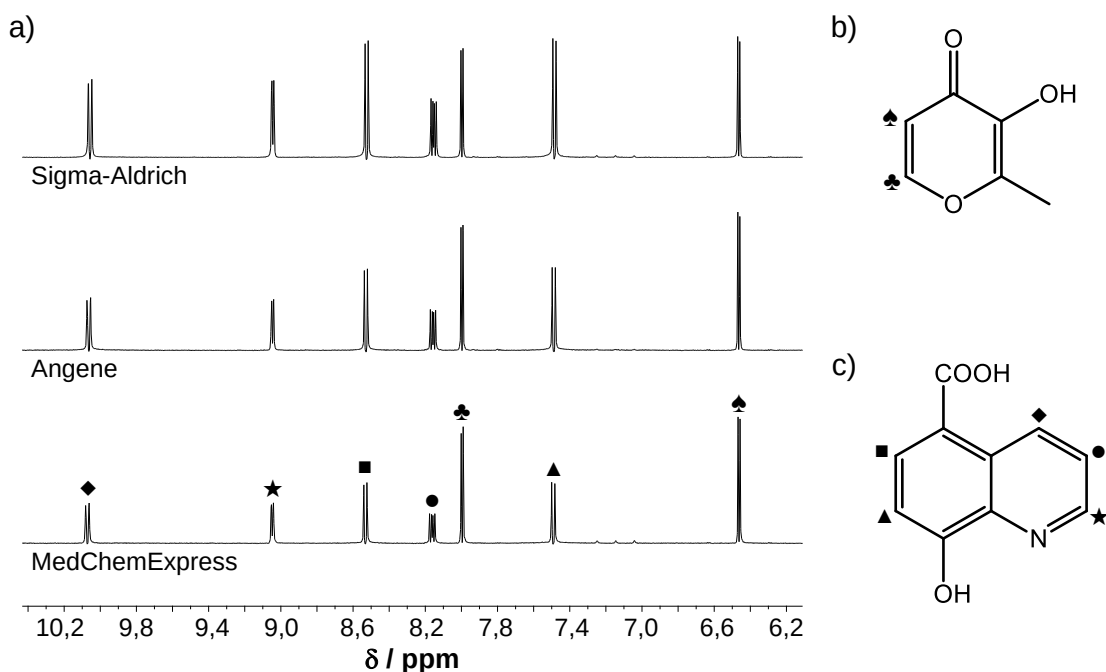
Méréseinket egy Agilent 7100 típusú műszerrel végeztük. A készülék beépített diódasoros detektorával az elválasztás teljes ideje alatt lehetőségünk volt a minták UV-Vis spektrumainak nyomon követésére. Az általunk használt belső bevonat nélküli kvarc kapilláris hossza 48 cm, belső átmérője pedig 75 μm volt. A kapillárist első használat előtt 20-20 percig mostuk a következő oldatokkal: 0,1 M HCl, víz, 0,1 M NaOH, víz, majd 40 percig PBS* (+ 2 mM EDTA) pufferrel (pH = 7,40). A mérések előtt szükséges kondicionálás során először 10 perces időintervallumokban átmostuk a kapillárist 0,1 M koncentrációjú NaOH oldattal, vízzel, majd pufferrel, ezt követően 10 percig 25 kV feszültséget alkalmaztunk, végül újabb 10 percen keresztül mostuk pufferrel a kapillárist. Az injektálások között 1 percig NaOH oldattal, 1 percig vízzel, majd 2 percig pufferrel öblítettük a kapillárist. Mintáinkban az IOX-1 ligandum koncentrációja 100 vagy 200 μM volt, a HSA koncentrációja pedig 0 és 100 μM között változott. A minták minden esetben PBS* (+ 2 mM EDTA) pufferben készültek, így biztosítva a pH = 7,40-et. Méréseink során a kapilláris tér 25 °C-on volt termosztálva. Hidrodinamikus injektálást alkalmaztunk, 40 s injektálási idővel és 50 mbar többletnyomással. Az elválasztást 10 kV feszültség és 5 mbar többletnyomás alkalmazásával végeztük, az áramerősség 75 μA volt.

5. Eredmények

5.1. A ligandumok oldatkémiai tulajdonságai

5.1.1. IOX-1 tisztaságának vizsgálata

A munkám során leggyakrabban használt IOX-1 ligandum kezdetben egy MedChemExpress termék formájában állt rendelkezésünkre, mely tisztaságát kvantitatív ^1H NMR spektroszkópiával ellenőriztük (7. ábra). A mérések során kalibrációs vegyületként maltolt alkalmaztunk, ugyanis ennek ^1H NMR spektruma egyszerű, a csúcsok jól elkülönülnek, illetve kellően nagy tisztaságban állt rendelkezésünkre.



7. ábra: Az IOX-1 ligandum három különféle gyártótól (Sigma-Aldrich, Angene, MedChemExpress) származó termékeinek tisztaságát szemléltető a) ^1H NMR spektrumok aromás régiója, valamint a kalibrációs vegyületként alkalmazott b) maltol (♠, ♣) és az c) IOX-1 (■, ▲, ◆, ●, ★) szerkezeti képlete, melyek a protonokhoz rendelt szimbólumokkal segítik a csúcsok asszignációját. {c (IOX-1) = ~2 mM; T = 25 °C; ~42% (v/v) DMSO- d_6 /H $_2$ O}

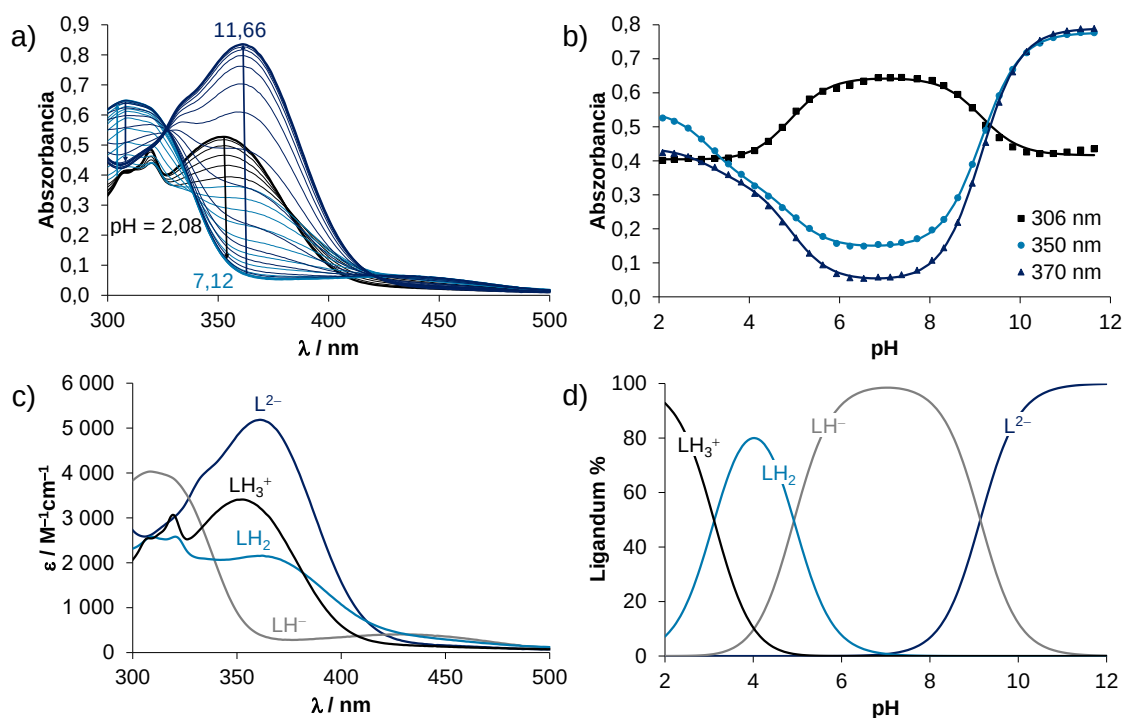
Az eredmények rávilágítottak arra, hogy a gyártó által ígért 98%-os tisztaság a valóságban mindössze 62%. Így indokolt volt egy másik termék megrendelése, melyet az Angene beszállítótól szereztünk be. A rendelkezésre álló mennyiségnek köszönhetően ennek tisztaságát először pH-potenciometria segítségével ellenőriztük, mely 79% (m/m)-nak adódott, illetve meghatároztuk a proton disszociációs állandóit is. Utóbbi értékek 30% (v/v) DMSO tartalmú közegben: pK_a = 3,35 ($\pm$ 0,02), 5,05 ($\pm$ 0,04) és 9,62 ($\pm$ 0,06).

Ebben az esetben is végeztünk kvantitatív ^1H NMR méréseket, azonban az eredmények itt sem bizonyultak megfelelőnek. A 97%-os tisztaság helyett csak 78%-os tisztaságú volt a vegyület, ami jó egyezést mutat az pH-potenciometriás mérés alapján számolt értékkel. Ezt követően egy újabb, Sigma-Aldrich termék került megrendelésre. A tisztaság ebben ez esetben sem volt tökéletes, ugyanis a várt 97%-os tisztaság csak 86%-osnak bizonyult. Viszont ezt már elfogadhatónak találtuk, így a további mérések során a Sigma-Aldrich terméket használtuk. Az IOX-1 mellett lévő szennyezőanyagnak nem volt jele a ^1H NMR spektrumban, így ez feltehetően egy szervetlen anyag (pl. NaCl, HCl), ami a további méréseinket nem zavarta.

5.1.2. A ligandumok proton disszociációs állandói

Az IOX-1 ligandum proton disszociációs állandóit alapvetően vizes közegben terveztük meghatározni. Azonban a vegyület korlátozott vízben való oldhatósága és rendelkezésre álló kicsiny mennyisége miatt a nagy koncentráció igényű pH-potenciometriás titrálás helyett UV-látható fotometriás mérésekhez kellett folyamodnunk. Ezzel a módszerrel mindhárom IOX-1 terméket vizsgáltuk. Ahhoz, hogy az esetleges szennyező fémionok zavaró hatását kiküszöböljük a minták a ligandumok vizsgálatakor EDTA-t tartalmaztak. A Sigma-Aldrich termék esetén kapott eredményeket a 8. ábra szemlélteti.

A 8. a) ábrán látható spektrumsorozatból a HypSpec program⁴¹ segítségével számítottunk pK_a értékeket, valamint egyedi moláris abszorbancia spektrumokat, melyeket a c) ábra mutat. Az utóbbi ábrán látható legnagyobb spektrális változás nagy valószínűséggel a hidroxilcsoport deprotonálódásához ($\text{LH}^- \rightarrow \text{L}^{2-}$) rendelhető. Ugyanis a folyamat során egy kiterjedtebb konjugált elektronrendszer jön létre, melynek gerjesztése már jóval kisebb energiát igényel, ezt a spektrumokon megfigyelhető batokrómm eltolódás is alátámasztja, melynél a λ_{max} ~310 nm-től eltolódik ~360 nm-ig. Ehhez a változáshoz tartozik a 326 nm-nél megjelenő izobesztikus pont. Mindez jól korrelál a HQ hidroxilcsoportja esetén tapasztaltakkal, ahol a λ_{max} ~306 nm-től ~360 nm-re tolódik az OH-csoport deprotonálódásakor.⁵² A HQ esetén a kinolínium-nitrogénhez ($pK_a(\text{N}_q\text{H}^+) = 4,99$), illetve a hidroxilcsoportéhoz ($pK_a(\text{OH}) = 9,51$) rendelhető pK_a értékek⁵² szintén jó egyezést mutatnak a 2. táblázatban található állandókkal, mely alapján a (2)-es pK_a érték az előbbihez, míg a (3)-as az utóbbihoz rendelhető. Az (1)-es állandó így kizárásos alapon, de kémiai evidenciák szerint is a karboxilcsoportéhoz tartozik.



8. ábra: Az IOX-1 ligandum a) UV-látható spektrumai különböző pH-kon, b) az eltérő hullámhosszokon felvett abszorbanca értékek változása a pH függvényében (■, ●, ▲) az illesztett görbékkel együtt (folytonos vonalak), c) az egyedi moláris abszorbanca spektrumai a különböző protonáltsági állapotú ligandum részecskéknél és azok d) koncentráció eloszlási görbéi. { c (IOX-1) = 161 μ M; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1 cm}

A 8. d) ábra szemlélteti a ligandum koncentrációeloszlási görbéit. Ez az ábra mutatja meg azt, hogy egy adott pH-n a vegyület egyes protonáltsági formái milyen arányban vannak jelen az oldatban. A diagramról leolvasható, hogy az IOX-1 pH = 2,00-n 7% LH_2 és 93% LH_3^+ , míg pH= 7,40-en 2% L^{2-} és 98% LH^- formában van jelen.

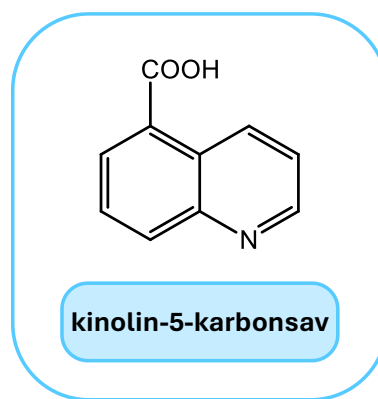
2. táblázat: Az IOX-1 ligandum három különféle gyártótól (Sigma-Aldrich, Angene, MedChemExpress) származó termékeinek UV-látható fotometriás titrálásai alapján meghatározott deprotonálódási állandók (pK_a). { T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

IOX-1	MedChem Express	Angene	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich glovebox ^a
pK_a (1)	$3,06 \pm 0,03$	$3,19 \pm 0,03$	$3,12 \pm 0,03$	$3,10 \pm 0,03$
pK_a (2)	$4,84 \pm 0,03$	$4,92 \pm 0,03$	$4,92 \pm 0,03$	$4,68 \pm 0,03$
pK_a (3)	$9,16 \pm 0,03$	$9,14 \pm 0,03$	$9,14 \pm 0,03$	$9,01 \pm 0,03$

^a Anaerob körülmények között, kesztyűs manipulátorral végzett UV-látható spektrofotometriás módszerrel kapott adatok.

A három különböző gyártótól származó termékek esetén kapott proton disszociációs állandók (2. táblázat) normál laboratóriumi körülmények között jó egyezést mutatnak. A kesztyűs manipulátorral végzett ligandum titrálásnál kapott adatokból számolt értékek valamennyivel eltérnek (főleg pK_a (2) esetében), erre a mérésre alapvetően a később említésre kerülő Fe(II)-komplexek vizsgálata miatt volt szükség. Összevetve a vizes közegben, illetve az 5.1.1. alfejezetben ismertetett 30% (v/v) DMSO tartalmú közegben kapott értékeket azt tapasztaltuk, hogy utóbbi esetben a hidroxil-, illetve karboxilcsoportokhoz rendelhető pK_a értékek nagyobbak. Ez annak tudható be, hogy a DMSO tartalom miatt a közeg relatív permittivitása csökken, így kevésbé szolvatálja ezen csoportok deprotonált formáját.

A proton disszociációs állandók, illetve más oldatkémiai tulajdonságok összehasonlítása céljából az IOX-1 modellvegyületeként szolgáló, nem kelátképző kinolin-5-karbonsavval (Q-COOH, 9. ábra) is végeztünk spektrofotometriás méréseket. A Q-COOH esetén meghatározható két pK_a számszerű értéke a 3. táblázatban van feltüntetve. Ezek már egyértelműbben csoportokhoz rendelhetők, az (1)-es állandó a karboxilcsoporthoz, míg a (2)-es a kinolinium-nitrogénhez tartozik. Ezek az értékek jó egyezést mutatnak az IOX-1 esetén számolt értékekkel és egyben alátámasztják az ott felállított deprotonálódási sorrendet.

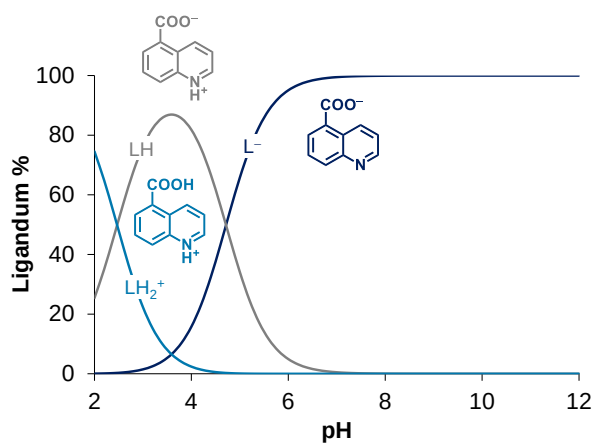


9. ábra: A kinolin-5-karbonsav szerkezeti képlete.

3. táblázat: A Q-COOH vegyület UV-látható fotometriás titrálásai alapján meghatározott deprotonálódási állandók (pK_a). { $T = 25\text{ °C}$; $I = 0,10\text{ M (KCl)}$ }

Q-COOH	
pK_a (1)	$2,47 \pm 0,03$
pK_a (2)	$4,71 \pm 0,03$
pK_a (3)	–

Végül kiszámítottuk a modellvegyület koncentrációeloszlási görbéit is, ezek a 10. ábrán láthatók. A Q-COOH pH = 2,00-n 25% LH és 75% LH₂⁺, pH = 7,40-en pedig 100% L⁻ formában van jelen.



10. ábra: A Q-COOH vegyület koncentrációeloszlási görbéi a vegyület különböző protonáltsági állapotú részecskéinek szerkezetével. { c (Q-COOH) = 150 μ M; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

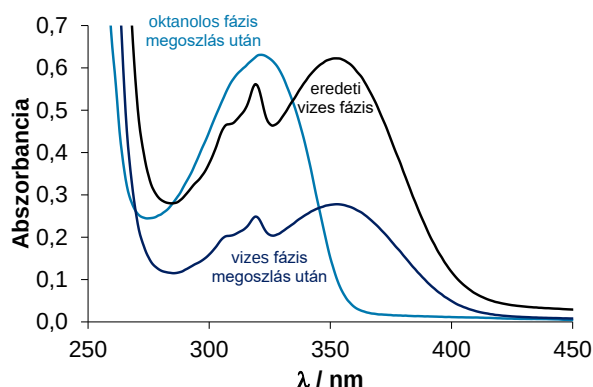
A koncentrációeloszlási görbék kapcsán említett pH értékeken lipofilitás vizsgálatokat is végeztünk mindkét vegyület esetén, ezt a következő fejezetben tárgyaljuk.

5.1.3. Lipofilitás vizsgálatok

A lipofilitás nagy szerepet játszik abban, hogy egy hatóanyag milyen mértékben képes passzív transzporttal átjutni a sejtmembránokon. Ez a fizikai-kémiai tulajdonság függ az ionizációs állapottól, így a pH-tól is, ezért több pH értéken megvizsgálva igen fontos információkat nyerhetünk. A pH = 2,00 érték nagyjából a gyomorsav pH-jának felel meg, ez elsősorban a szájon át adható gyógyszerek szempontjából lehet fontos. A pH = 7,40 pedig a citoszol, illetve a vérplazma kémhatásával egyezik meg, így szintén fontos lehet a gyógyszer szervezetbeli útját illetően.

A ligandumok lipofilitását a klasszikusnak számító *n*-oktanol/víz megoszlásos módszerrel vizsgáltuk. Kísérleteinket pH = 2,00-n és 7,40-en végeztük. A pH állandó értéken tartásához előbbi esetben 20 mM-os H₃PO₄/NaH₂PO₄, míg utóbbi esetben PBS* puffert alkalmaztunk. A pufferek minden esetben 2 mM EDTA-t tartalmaztak az esetleges szennyező fémionok zavaró hatásának kiküszöbölése érdekében. Mindkét vegyület esetén 2 párhuzamos mintát készítettünk egy adott pH-n, melyekben az oktanol : puffer arány 1 : 1 volt. A minták elegyítését követően a fázisokat centrifuga segítségével szeparáltuk, majd felvettük az abszorpciós spektrumaikat. Ilyen spektrumok láthatók a

11. ábrán, melyek jól szemléltetik, hogy például az IOX-1 ligandum anyagmennyiségének egy része biztosan átjutott az oktanolos fázisba és nem maradt a fázishatáron. Ez az alapján jelenthető ki, hogy az eredeti vizes fázishoz tartozó spektrum intenzitása csökken a megoszlást követően. Az így rendelkezésünkre álló adatsorokból számítottuk a ligandumok megoszlási hányadosait ($D_{7,4}$).



11. ábra: Az IOX-1 ligandum UV-látható spektrumai a különböző oldószer fázisokban megoszlás előtt és után. $\{c(\text{IOX-1}) = 83 \mu\text{M}; T = 25^\circ\text{C}; \text{pH} = 2,00; \ell = 1 \text{ cm}\}$

A $\lg D_{7,4}$ értékek a 4. táblázatban láthatók, minél nagyobb ez az érték annál lipofilebb vegyületről van szó. A HQ alapvegyület korábbi mérések során $\text{pH} = 7,40$ -en igen lipofilnek bizonyult ($\lg D_{7,4} = +1,81$), ugyanis ilyen körülmények között a vegyület semleges formája van döntő többségben.⁵³ Ennél az általunk vizsgált vegyületek jóval hidrofilebbnek bizonyultak. Ez annak tudható be, hogy az ezeken található disszociábilis csoportok töltöttséget adnak a molekuláknak. Ugyanakkor észrevehető az is, hogy a pH növelésével tovább nő a hidrofil jelleg, mely az előző fejezetben részletezett különböző töltöttséggel rendelkező protonáltsági formák uralkodásának köszönhető.

4. táblázat: A vizsgált ligandumok kétféle pH -n mért n -oktanol/víz megoszlási hányadosai ($\lg D_{\text{pH}}$). $\{T = 25^\circ\text{C}\}$

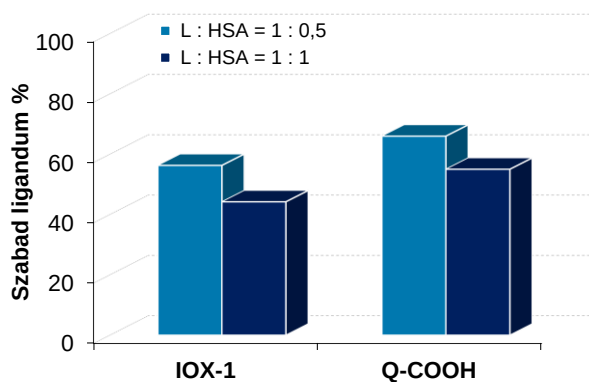
	IOX-1	Q-COOH
$\lg D_{2,0}$	$+0,1 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,1$
$\lg D_{7,4}$	$-1,3 \pm 0,1$	$-1,6 \pm 0,1$

5.2. A ligandumok humán szérum albuminnal való kölcsönhatása

A HSA nagy szerepet játszik a hatóanyagok célba juttatásában, illetve hasznosulásában. Ezért is fontos a HSA és a potenciális hatóanyagok kölcsönhatásának tanulmányozása. Továbbá a preklinikai vizsgálatok esetén is elvárás, hogy legyen előzetes információ arról, hogy a hatóanyagtól milyen mértékű szérumfehérje kötődés várható.

5.2.1. A globális kötődés vizsgálata

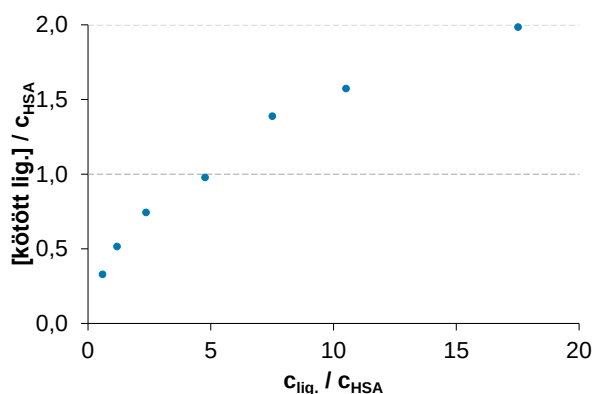
Először arról szerettünk volna meggyőződni, hogy az általunk vizsgált vegyületek egyáltalán kötődnek-e a HSA-hoz, illetve a fehérje hozzáadásával változnak-e a ligandumok UV-látható spektrumai. Utóbbi vizsgálatok azt tapasztaltuk, hogy érdemben egyik anyag spektruma sem változott, a ligandumok UV-látható elnyelése tehát nem volt érzékeny a HSA-val való kölcsönhatásra. Ezt követően a molekulák szűrhetőségét állapítottuk meg membránszűrőkkel történő ultraszűrés segítségével. A mérések során a pH-t (7,40) PBS* (+ 2 mM EDTA) puffer segítségével állítottuk be. Ezen mérések előtt arról is meg kellett győződnünk, hogy a ligandumok önmagukban, a fehérje távollétében is szűrhetők-e. Az IOX-1 szűrhetősége 90,1%-nak, míg a modellvegyületé (Q-COOH) 98,6%-nak adódott. A vizsgálatokat különböző ligandum : HSA arányok mellett folytattuk. Az ultraszűrés után felvett UV-látható spektrumokat a csak ligandumot tartalmazó, szintén megszűrt minta spektrumával vetettük össze, és ennek segítségével kiszámítottuk a szabad és a fehérjéhez kötött ligandumok arányát. A számított szabad ligandum hányadok összehasonlítását két különböző ligandum : fehérje aránynál tettük meg, ezeket a 12. ábra szemlélteti.



12. ábra: A vizsgált ligandumok ultraszűrést követően mért szabad hányada (%) különböző L : HSA arányok esetén (L = IOX-1, Q-COOH). {c (IOX-1) = 100 μ M; c (Q-COOH) = 150 μ M; T = 25 °C; pH = 7,40}

A 12. ábrán látható, hogy mindkét vegyület esetén a nagyobb fehérje mennyiség hatására csökken a szabad ligandum mennyisége. Így levonható az a következtetés, hogy mindegyik vegyület kötődik a HSA-hoz, a kötődés pedig az IOX-1 esetén bizonyult erősebbnek.

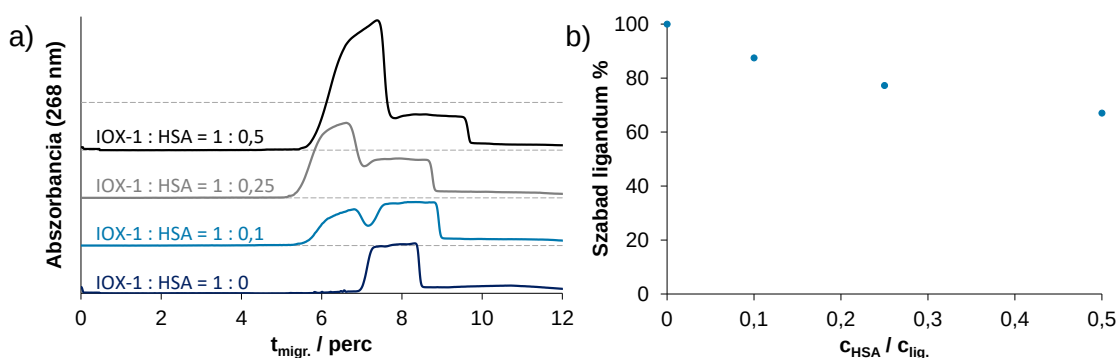
Az IOX-1 esetén az ultraszűrés kvantitatív alkalmazhatóságát is kihasználtuk, mellyel a ligandum – fehérje kölcsönhatás révén létrejövő adduktum sztöchiometriája határozható meg. Ehhez kiszámítottuk a kémiai rendszerhez tartozó képződési függvényt (13. ábra), mely a $[\text{kötött lig.}] / c_{\text{HSA}}$ hányadosok $c_{\text{lig.}} / c_{\text{HSA}}$ értékekhez való hozzárendelését jelenti. Látható, hogy a függvény telítésbe hajlása nem teljes, így konkrét sztöchiometriát nem tudtunk megállapítani, de a kötőhelyek számát illetően kijelenthető, hogy az IOX-1 biztosan egynél több kötőhelyen kötődik.



13. ábra: Az IOX-1 – HSA rendszer ultraszűrés alapján számolt képződési függvénye. $\{c(\text{IOX-1}) = 100 \mu\text{M}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40\}$

A globális kötődést kapilláris elektroforézis - frontális analízis (CE-FA) módszer segítségével is vizsgáltuk. Részletes méréseket azonban csak az IOX-1 esetén végeztünk, ugyanis a modellvegyület esetén nem sikerült olyan műszerbeállításokat találni, hogy a frontális analízis feltételeinek megfelelő elektroferogramokat kapjunk. Utóbbi feltételek alapvetően azt követelik meg, hogy zonális csúcsok helyett az analitokhoz tartozó sávok platócsúcsok (frontok) formájában jelenjenek meg és bizonyos mértékig átfedjenek. Hidrodinamikus injektálás esetén ehhez hosszú injektálási idő alkalmazása szükséges. Ennek optimalizálását 3 és 60 s között végeztük 50 mbar többletnyomást alkalmazva. Először 3-s-os injektálás esetén ellenőriztük a zonális csúcsok meglétét, a további mérésekhez pedig 40 s-os injektálási időt választottunk. Ennek következtében azonban az elválasztás ideje is megnyúlt (20-25 perc), ezt az elválasztás során alkalmazott 5 mbar többletnyomással csökkentettük. Pufferként PBS*-t használtunk. Általában nem szokás extra komplexképzőt használni a CE-FA technikánál, mivel az EDTA például 240 nm-es

hullámhossz alatt zavarja a detektorjelet. Ennek hiányában azonban az IOX-1 esetén több deformált csúcsot kaptunk, ezt valószínűleg szennyező fémionok okozták, így ebben az esetben is szükséges volt 2 mM EDTA hozzáadása. Az optimalizálást követően több ligandum : HSA arány esetén is vettünk fel elektroferogramokat (14. a) ábra). Látható, hogy az elektroferogramok megfelelnek a már említett frontális analízis feltételeknek, ugyanis az előbb érkező HSA és – a kis tömege és negatív töltése miatt lemaradó – szabad IOX-1 (pH = 7,40-en LH^- forma) sávjai kellő mértékben átfednek és a szabad ligandum platósávként jelenik meg. Megfigyelhető az is, hogy a növekvő fehérje mennyiség hatására a szabad ligandumhoz tartozó platósúcs magassága csökken, ennek szemléltetését segíti a 14. b) ábra. Ezen tapasztalatok szintén azt támasztja alá, hogy a ligandum egyértelműen kötődik a fehérjéhez.



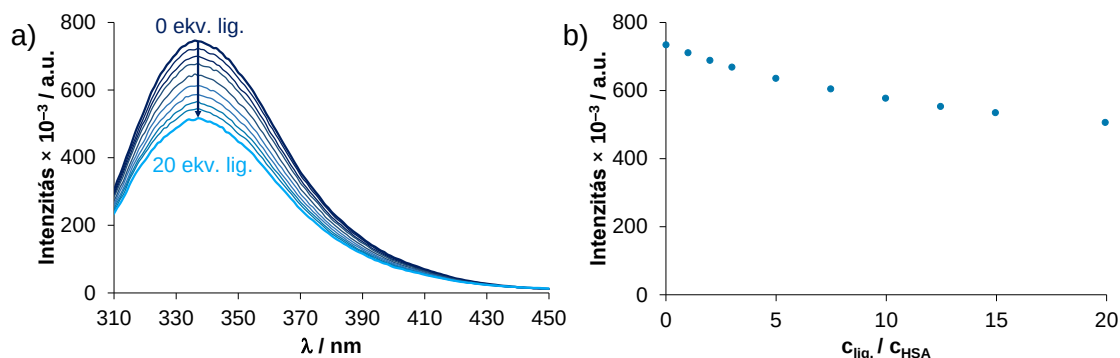
14. ábra: a) az IOX-1 elektroferogramjai állandó ligandum és növekvő HSA koncentráció mellett; b) szabad IOX-1 CE-FA módszerrel mért (●) mennyiségei különböző hozzáadott albumin koncentrációk mellett. { c (IOX-1) = 200 μM ; T = 25 $^{\circ}\text{C}$; U = 10 kV; p (elválasztás) = 5 mbar; pH = 7,40}

Amennyiben az 1 : 0,5 = IOX-1 : HSA aránynál összehasonlítjuk a két különböző technikával kapott szabad ligandum hányadokat, akkor az eltérés 10%. Ez annak tudható be, hogy egyik technika sem tökéletes, ultraszűrésnél a membránfelületen való adszorpció, elektroforézisnél pedig a részben szétváló frontok miatt újonnan beálló egyensúlyok okozhatnak bizonytalanságot.

5.2.2. A kötődés helyének és erősségének vizsgálata

Miután meggyőződünk a ligandumok globális kötődéséről, körbejártuk azt is, hogy a kölcsönhatások mely hidrofób kötőzsebekben (I-es és II-es kötőhely) és milyen erősséggel jönnek létre. Ehhez fluorimetriás technika alkalmazásával triptofán-kioltásos, illetve WF és DG kizorításos méréseket végeztünk mindkét vegyület esetén.

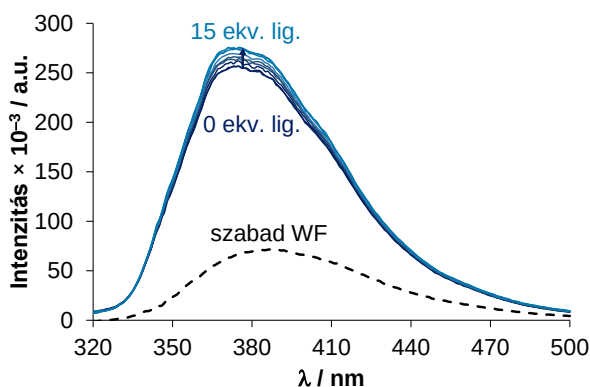
Vizsgálatainkat az I-es kötőhely tanulmányozására alkalmas kioltásos mérésekkel kezdtünk. Ezen méréseknél a 214-es pozícióban megtalálható Trp szelektív gerjesztése történik 295 nm hullámhosszú fény segítségével. Ekkor rögzített koncentrációjú HSA oldathoz adagoltunk növekvő mennyiségű ligandumot. Amennyiben a ligandum kötődik az I-es kötőhelyen, úgy annak koncentrációját növelve az emissziós spektrum intenzitása csökken, megtörténik a kioltás. A Q-COOH mérése során kapott fluorimetriás spektrumsorozat a 15. a) ábrán látható, melyen jól látszik az imént említett kioltás.



15. ábra: a) HSA fluoreszcencia spektrumai növekvő Q-COOH koncentráció jelenlétében és b) a 340 nm-en mért intenzitások a $c_{\text{lig.}} / c_{\text{HSA}}$ függvényében. $\{c(\text{HSA}) = 1 \mu\text{M}; c(\text{Q-COOH}) = 0-17 \mu\text{M}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; \lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}; \text{pH} = 7,40\}$

A 15. b) ábra is ezt a csökkenő tendenciát mutatja be, melyből HypSpec program⁴¹ segítségével kioltási állandó számolható, mely minél nagyobb, annál nagyobb a ligandum affinitása a fehérjéhez. Ez az IOX-1 esetén $\lg K' = 5,2 \pm 0,1$, a Q-COOH esetén pedig $4,5 \pm 0,1$.

Mivel a kioltásos mérés során gerjesztett Trp nem kizárólag az I. kötőhelyen bekövetkező változásokra érzékeny, így kizsorításos méréseket is végeztünk kötőhely marker vegyülettel. Ehhez az I. kötőhely fluoreszcens markerét, a warfarint használtuk.



16. ábra: A HSA – WF (1:1) rendszer fluorimetriás emissziós spektrumai növekvő Q-COOH koncentráció mellett. A szabad WF spektrumát szaggatott vonal jelzi. $\{c(\text{HSA}) = c(\text{WF}) = 1 \mu\text{M}; c(\text{Q-COOH}) = 0-17 \mu\text{M}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}; \lambda_{\text{EX}} = 310 \text{ nm}; \text{pH} = 7,40\}$

A szintén titrálós kísérleteknél ebben az esetben az adott HSA és WF koncentrációjú mintához adagoltuk a ligandumot. A HSA – WF adduktum intenzív, míg a marker szabad formája csak gyenge fluoreszcenciát mutat. Amennyiben a kompetitor (ligandum) kötődik az I-es kötőhelyen, úgy a WF kiszorul, mely intenzitás csökkenéssel jár. Teljes kiszorításkor azt várjuk, hogy a szabad markerre jellemző spektrumot kapjuk vissza. Egy ilyen WF kiszorításos spektrumsorozatot mutat be a 16. ábra. Kiszorítási állandót azonban nem tudtunk számolni, ugyanis egyik vegyület esetén sem történt kiszorítás. A vegyületek így valószínűleg a HSA valamely egyéb kötőhelyén kötődnek.

A II-es kötőhely szintén vizsgálható kiszorításos méréssel, mely markere a danzil-glicin. A mérés menete, illetve a kiszorításnál elvárt tapasztalatok a WF kiszorításos mérésekkel azonosak. Az eredmények azonban mindkét vegyület esetén azt mutatták, hogy ilyen körülmények között nincs mérhető affinitásuk ($\lg K' < 4,0$) a II-es kötőhelyhez.

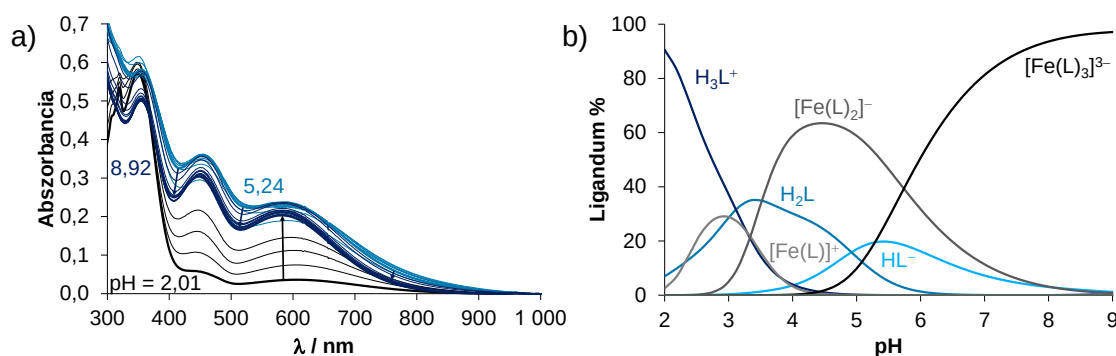
Összességében elmondható, hogy az általunk vizsgált két vegyület kötődik a HSA-hoz, így vérben történő szállításuk történhet a HSA fehérjével. A vizsgált vegyületek sem az I-es, sem a II-es kötőhelyhez nem mutatnak affinitást, így feltehetőleg az általunk nem vizsgált III-as vagy valamilyen egyéb kötőhelyen kötődhetnek.

5.3. Az IOX-1 kölcsönhatása fémionokkal

5.3.1. Komplexképződési egyensúlyi folyamatok

Az IOX-1 ligandum komplexképződési egyensúlyi folyamatait UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével vizsgáltuk. A minták abszorpciós spektrumait többféle fém : ligandum arány mellett rögzítettük különböző pH-kon.

A Fe(III) esetén egy ilyen reprezentatív spektrumsorozatot mutat be a 17. a) ábra. A ligandum titrálás esetén kapott spektrumokkal (8. a) ábra) összevetve látható, hogy itt 400 nm felett megjelentek a Fe(III)-komplexekre jellemző^{24,54}, két $\lambda_{\max}$ -mal rendelkező töltésátviteli (CT) sávok. Mivel a ligandum saját elnyelése ebben a hullámhossztartományban igen kicsi, így ez a spektrális eltérés nagyban segítette a stabilitási szorzatok (β) meghatározását (5. táblázat). A komplexképződés valószínűleg itt is az (N,O) donoratomokon keresztüli koordinációval történik, mint a rokonvegyületeknél^{24,54}, ugyanis ebben az esetben is egy kétfogú ligandumról van szó.



17. ábra: Az IOX-1 ligandum és vas(III) 3 : 1 arányú rendszer a) UV-látható spektrumai különböző pH-kon és b) a feltételezett részecskék koncentráció eloszlási görbéi. { c (IOX-1) = 161 μ M; T = 25 $^{\circ}$ C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1 cm}

A kapott képződési állandók segítségével koncentrációeloszlási görbéket számítottunk (17. b) ábra), mely megmutatja, hogy pH = 7,40-en döntően a trisz-ligandumú komplex ($[\text{Fe}(\text{L})_3]^{3-}$) van jelen az oldatban. Emellett más pH-kon természetesen képződik mono- ($[\text{Fe}(\text{L})]^+$), illetve biszkomplex ($[\text{Fe}(\text{L})_2]^-$) is.

5. táblázat: Az IOX-1 ligandum Cu(II), Fe(II) és Fe(III) ionokkal képzett komplexeinek stabilitási szorzatai ($\lg\beta$), $\text{pM}_{7,4}$ ($-\lg[\text{M}]$) értékei, valamint egyéb HQ származékok komplexeinek $\text{pM}_{7,4}$ értékei összehasonlítás céljából. Utóbbi adatok számításakor a ligandum koncentrációja 10 μ M, a fémion koncentrációja 1 μ M és a pH értéke 7,40 volt. { T = 25 $^{\circ}$ C; I = 0,10 M (KCl)}

$\lg\beta$	Cu(II) ^a	Fe(II) ^a	Fe(III) ^b
$[\text{M}(\text{L})]^c$	$14,78 \pm 0,03$	$7,88 \pm 0,02$	$13,95 \pm 0,02$
$[\text{M}(\text{L})_2]^c$	$21,35 \pm 0,05$	$15,40 \pm 0,02$	$25,28 \pm 0,02$
$[\text{M}(\text{L})_3]^c$	–	$21,56 \pm 0,02$	$33,03 \pm 0,03$
$\text{pM}_{7,4}$ / IOX-1	14,2	7,9	10,3 (18,4) ^a
$\text{pM}_{7,4}$ / HQS ^d	15,0	7,9	11,6 (19,6) ^a
$\text{pM}_{7,4}$ / HQ ^d	15,1	–	13,0 (21,1) ^a
$\text{pM}_{7,4}$ / ML324 ^d	11,1	7,3	13,8 (21,9) ^a

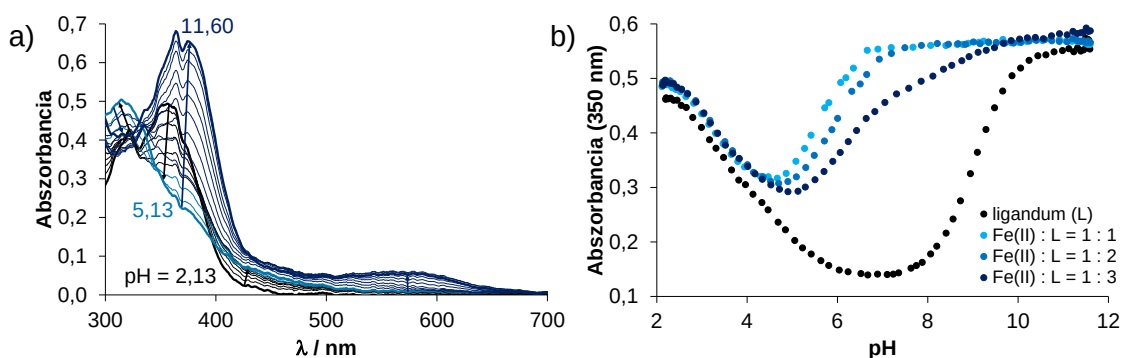
^a A zárójelben feltüntetett adatok esetén a Fe(III)-ion hidrolízisével képződő részecskéket figyelmen kívül hagytuk mint ligandumhoz nem kötött frakció. A többi fémionnak ilyen körülmények között nem képződnek hidrolízis részecskéi számottevő mértékben, így ott nincs különbség a kétféle számítással kapott adat között.

^b Az adatok kiértékeléséhez a pH < 8 tartományt használtuk.

^c A komplexek töltéseit az egyszerűség kedvéért elhagytuk.

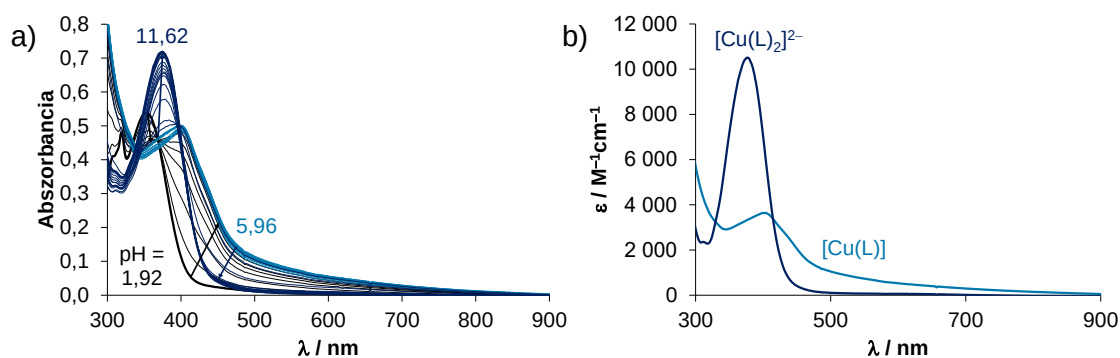
^d Az adatok a 54-es jelzésű irodalomból származnak.

A Fe(II)-tartalmú minták oxigénérzékenysége miatt az UV-látható fotometriás mérések technikailag jóval nehezebben kivitelezhetők, így szigorúan oxigénmentes ($O_2 \leq 1$ ppm) környezetben, *glovebox* használatával végeztük a méréseket. Az így felvett spektrumokat a 18. a) ábra szemlélteti. Itt is szembetűnő a CT sávok megjelenése, viszont ezek moláris abszorbanciája kisebb és karakterük is teljesen más, mint Fe(III) esetén. A 18. b) ábra mutatja be az abszorbanciák pH-függését, ahol látható, hogy a ligandumhoz képest a Fe(II)-tartalmú minták abszorbanciái másképp változtak a komplexképződés miatt. A spektrumokból nyert képződési állandók (5. táblázat) felhasználásával ebben az esetben is arra a következtetésekre jutottunk, mint Fe(III) esetén. Vagyis itt is az (N,O) donoratomok koordinációja, illetve mono- ($[Fe(L)]$), bisz- ($[Fe(L)_2]^{2-}$) és triszkomplex ($[Fe(L)_3]^{4-}$) képződése valószínűsíthető. Továbbá a ligandum pH = 7,40-en 21% LH^- , 1% $[Fe(L)]$, 34% $[Fe(L)_2]^{2-}$ és 44% $[Fe(L)_3]^{4-}$ formában van jelen 1 : 3 fém : ligandum arányú mintában, 153 μM ligandum koncentráció mellett.



18. ábra: Az IOX-1 ligandum és vas(II) 3 : 1 arányú rendszer a) UV-látható spektrumai különböző pH-kon és b) a 350 nm-en mért abszorbancia változása a pH függvényében. $\{c(\text{IOX-1}) = 153 \mu M; T = 25^\circ C; I = 0,10 M (\text{KCl}); \ell = 1 \text{ cm}\}$

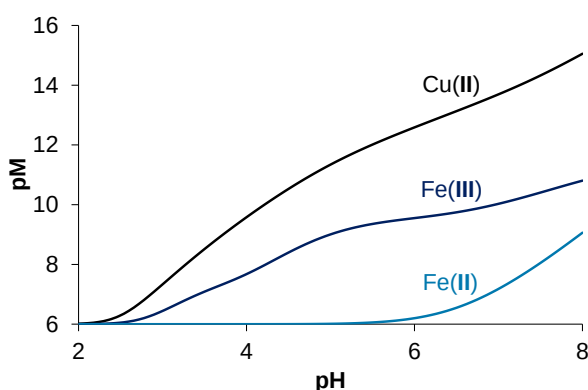
A Cu(II) esetén is megjelennek a jellemző CT sávok, melyek a 19. a) ábrán figyelhetők meg, ezek a Fe(III)-hoz képest szintén kisebb moláris abszorbanciájúak, de ettől függetlenül egyértelműen különböznek a ligandum saját sávjaitól (8. a) ábra). Az eddigi fémionokkal ellentétben itt csak mono- ($[Cu(L)]$) és biszkomplexek ($[Cu(L)_2]^{2-}$) képződését tudtuk leírni, ezek moláris abszorbancia spektrumait a 19. b) ábra szemlélteti. A koordináció típusát itt is (N,O) donoratomokon keresztül képzeljük el. A ligandum itt pH = 7,40-en 36% LH^- , 7% $[Cu(L)]$ és 57% $[Cu(L)_2]^{2-}$ formában van jelen 1 : 3 fém : ligandum arányú mintában, 161 μM ligandum koncentráció mellett.



19. ábra: Az IOX-1 és Cu(II) 3 : 1 arányú rendszer a) UV-látható spektrumai különböző pH-kon és b) a feltételezett komplexek moláris abszorbanca spektrumai. { c (IOX-1) = 161 μ M; T = 25 $^{\circ}$ C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1 cm}

A stabilitási szorzatok ($\lg\beta$, 5. táblázat) segítségével inkább csak egy trend állapítható meg a komplexek stabilitását illetően, ugyanis a fémionok eltérő hidrolízise, valamint a komplexek eltérő sztöchiometriája miatt nem szolgálnak jó összehasonlítási alapként. Alapvetően kimondható, hogy a Fe(II)-ionhoz tartozó stabilitási állandók több nagyságrenddel is kisebbek, mint Fe(III) esetén. Amennyiben pedig a kétértékű fémionokhoz tartozó $\lg\beta$ értékeket tekintjük, azok a Cu(II) esetén jelentősen nagyobbak. A ligandum fémionokhoz való affinitása a fémionok hidrolízisét is figyelembe vevő látszólagos állandók vagy $\text{pM}_{7,4}$ értékek segítségével hasonlítható össze, mi az utóbbit választottuk, ugyanis vaskelátorok esetén ez a megszokottabb.⁵⁵ A számított $\text{pM}_{7,4}$ értékek szintén az 5. táblázatban találhatók, ezen értékek a ligandumhoz nem kötött fémionmennyiséget adják meg az adott körülmények között. A szakirodalomban az összehasonlíthatóság végett ezeket a $\text{pM}_{7,4}$ értékeket 10 μ M ligandum, illetve 1 μ M fémion koncentráció mellett, 7,40-es pH értéken számítják.⁵⁵ Az IOX-1 esetén ezek az értékek a hidrolízis figyelembevétele nélkül is kisebbnek bizonyultak a klasszikus vaskelátorok (pl. transferrin (pFe = 22,3), deferoxamin (pFe = 26,6), deferipron (pFe = 19,3)) értékeihez képest.⁵⁶ A β -thalassemiás betegeken alkalmazott deferoxamin például csak oxigén donoratomokat tartalmaz, így a Pearson-féle hard-soft elmélet értelmében nagyon kedveli a Fe(III)-ionokat, így érthető a magas pFe értéke. Az IOX-1 ligandum (N,O) donoratomjai más típusú koordinációs szférát jelentenek, ebből adódóan kevésbé is kötik a Fe(III)-ionokat, ezt tükrözik a számított $\text{pM}_{7,4}$ értékek is. A hidrolízis figyelembevételével is a Fe(III)-iont köti jobban a Fe(II)-ionnal szemben. A ligandum Cu(II)-ionok felé mutatott affinitása azonban még ennél is jelentősebb. Az így felállított affinitásbeli sorrend megegyezik a 8-hidroxi-kinolin-5-szulfonáttal (szulfoxin, HQS) tapasztaltakkal. Ez valószínűleg annak tudható be, hogy a HQS az 5-ös pozícióban szintén

egy negatív töltéssel rendelkező funkciós csoportot (szulfonátcsoport) tartalmaz. Az Fe(III)- és Cu(II)-komplexek $pM_{7,4}$ értékeinek viszonya a HQ esetén is megegyezik az előbbiekkal. A pM értékeket egy olyan ligandummal is összehasonlítottuk, ahol a vegyület egy pozitív töltésű funkciós csoportot tartalmaz $pH = 7,40$ -en, ez a vegyület név szerint a N-(3-(dimetilamino)propil-4-(8-hidroxi-kinolin-6-il)-benzamid (ML324).⁵⁴ Az itt látható tendencia szerint is a Fe(III)-ionokhoz való kötődés a legerősebb, viszont a Cu(II)-ionok felé mutatott affinitás itt az előbbiekhöz képest valamivel elmarad. Összességében kimondható tehát, hogy az említett ligandumok a kétféle vasion közül a Fe(III)-ionokhoz nagyobb affinitással kötődnek, de jelentős mértékben képesek kötni a Fe(II)-ionokat is.



20. ábra: Az M – IOX-1 (1:10) rendszerek esetén a meghatározott stabilitási állandók (5. táblázat) alapján kalkulált pM értékek ábrázolva a pH függvényében ($M = Fe(III), Fe(II), Cu(II)$). $pM = -\log ([M] + i[M_i(OH)_j])$ ($Fe(III)$: $i, j = 1, 1; i, j = 1, 2; i, j = 2, 2; i, j = 3, 4$; $Fe(II)$: $i, j = 1, 1; i, j = 1, 2; i, j = 1, 3$), mely a szabad fémionmennyiséget mutatja meg az adott körülmények esetén. $\{c (IOX-1) = 10 \mu M; c (M) = 1 \mu M; T = 25 \text{ }^\circ C; I = 0,10 \text{ M (KCl)}\}$

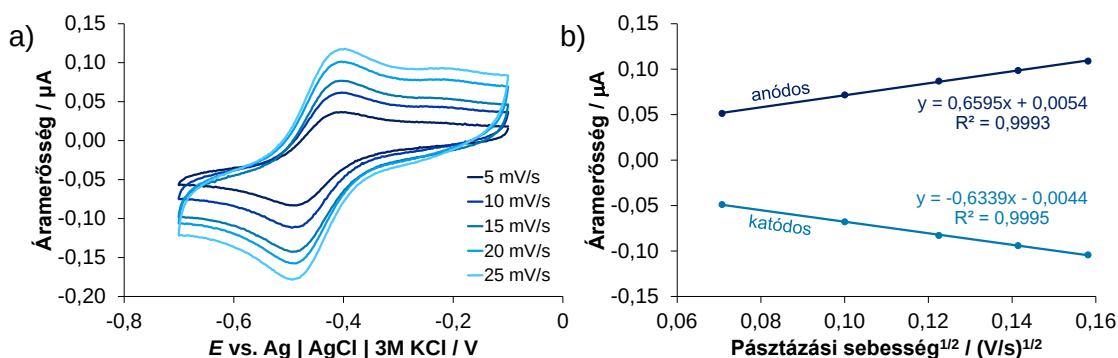
Az IOX-1 esetén felállított tendencia azonban nem csak $pH = 7,40$ -en, hanem a 20. ábrán látható teljes pH tartományra igaz. Az ábra ugyanakkor jól szemlélteti a komplexképződések eltérő pH tartományait is az egyes fémionok esetén.

5.3.2. Redoxi tulajdonságok

A sejten belül a vas- és rézionok oxidációs állapotot válthatnak, a vaskomplexek pedig gyakran részt vesznek Fenton-típusú reakciókban. Továbbá az IOX-1 ligandum által inhibált vastartalmú enzimben is oxidációs állapot váltás megy végbe az enzimreakció következtében. Ezek a fémionok döntően mégis inkább redukált formában vannak jelen a sejtekben, emiatt lehet érdekes a redoxi tulajdonságok vizsgálata. Erre alkalmas módszer a ciklikus voltammetria, mellyel egyszerűen vizsgálható egy adott rendszer redoxipotenciálja.

Az általunk végzett mérések a ligandum rossz oldhatósága miatt nem voltak kivitelezhetőek vizes közegben, így a minták DMF tartalma 30% vagy 60% (v/v) volt. Ezen vegyület használata azért indokolt ilyen mérések esetén, mert a DMF gyengébben koordinálódik a fémionokhoz, mint a DMSO.

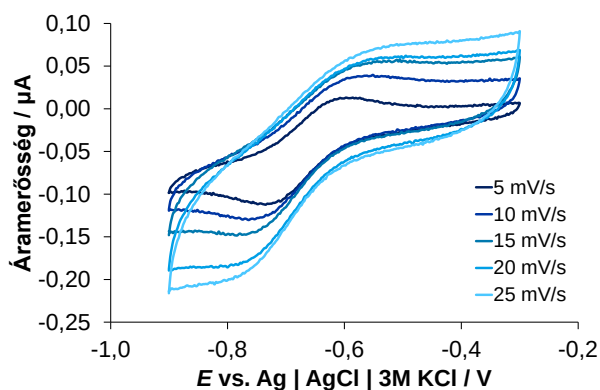
Az IOX-1 ligandum vaskomplexei esetén rögzített voltammogramon (21. a) ábra) jól látható az anódos-katódos csúcspár, ezek adatait a 6. táblázat tartalmazza. A csúcspotenciálok különbsége egy elektronátmenetnek felel meg és arra utal, hogy ez a folyamat gyakorlatilag reverzibilis.



21. ábra: a) az IOX-1 ligandum vaskomplexének ($M : L = 1 : 3$) voltammogramja különböző pásztázási sebességek mellett Ag | AgCl | 3M KCl referencia elektróddal szemben mérve és b) az áramerősség pásztázási sebesség gyökétől való függése. $\{c(\text{IOX-1}) = 1,5 \text{ mM}; c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mM}; T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}; I = 0,10 \text{ M (KCl)}; \text{pH} = 7,40; 60\% \text{ (v/v) DMF/H}_2\text{O}\}$

A 21. b) ábrán látható az áramerősség pásztázási sebesség gyökétől való függése, ez az anódos, illetve katódos folyamat esetén is egyhez közeli R^2 értékkel rendelkező egyeneseket ad, melyek meredekségeinek abszolútértéke is nagyon hasonló. Utóbbi paraméterek arra utalnak, hogy a folyamat egyértelműen diffúzió kontrollált. A reverzibilitás a vas kétféle oxidációs állapotával kialakított komplexek kellően nagy stabilitására, illetve a Fe(III)- és a Fe(II)-komplex hasonló (oktaéderes) geometriájára utal. Ilyen esetekben csak a központi fémion oxidációs állapota változik meg a redoxi folyamat során.

A réztartalmú rendszer esetén rögzített voltammogramokat a 22. ábra mutatja be. Ebben az esetben a kis pásztázási sebesség esetén tapasztalható reverzibilitás annak növelésével fokozatosan megszűnik. A katódos és anódos csúcspotenciálok különbsége itt jóval nagyobb, mint a vaskomplex esetén, ez is azt támasztja alá, hogy nem reverzibilis folyamatról van szó. A Cu(I) forma kialakulásával a komplex geometriája valószínűleg átrendeződik, a koordinációs szám csökken. Ez is arra utal, hogy a folyamat nem reverzibilis.



22. ábra: Az IOX-1 ligandum rézkomplexének ($M : L = 1 : 2$) voltammogramja különböző pásztázási sebességek mellett Ag | AgCl | 3M KCl referencia elektróddal szemben mérve. { c (IOX-1) = 1,0 mM; c (Cu) = 0,5 mM; $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,10\text{ M}$ (KCl); pH = 7,40; 60% (v/v) DMF/ H_2O }

A fémkomplexekre jellemző redoxi paramétereket a 6. táblázat tartalmazza. Az eltérő DMF tartalmú közegek esetén is látható változás az értékekben, de számunkra leginkább a formálpotenciál értékek ($E_{1/2}$) a mérvadóak. Ezen értékek 30% (v/v) DMF esetén, mind a vas, mind a réz esetén jóval negatívabbak, mint a már említett HQS, illetve ML324 vegyületeknél.⁵⁴ Minél negatívabb ez az érték annál inkább a magasabb oxidációs állapotú fémion a preferált. Tehát a korábban részletezett $\text{pM}_{7,4}$ értékeken felül ez is igazolja azt, hogy Az IOX-1 ligandum jobban kedveli a Fe(III)-ionokat, mint a Fe(II)-ionokat.

6. táblázat: Az anódos és katódos csúcspotenciálok, a hozzájuk tartozó áramerősség értékek és a számított formálpotenciál értékek (vs. Ag | AgCl | 3M KCl) 10 mV/s-os pásztázási sebesség mellett mérve az IOX-1 fémkomplexeinek esetén. { $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0,10\text{ M}$ (KCl); pH = 7,40}

	vas		réz	
	30% (v/v) DMF	60% (v/v) DMF	30% (v/v) DMF	60% (v/v) DMF
E_p^k (mV)	-444	-486	-681	-734
E_p^a (mV)	-366	-412	-559	-595
ΔE (mV)	78	73	122	139
$E_{1/2}$ (mV)	-405	-449	-620	-665
$E_{1/2}$ vs. NHE (mV)	-183	-227	-398	-443
$ i_a / i_k $	1,08	0,95	0,99	0,86

6. Összefoglalás

Kutatómunkám során elsősorban a vastartalmú hiszton-demetiláz enzim inhibitoraként azonosított IOX-1 humán szérum albuminnal, illetve endogén fémionokkal való kölcsönhatását tanulmányoztuk. Továbbá vizsgáltuk ennek nem kelátképző Q-COOH modellvegyületét is.

Munkánkat oldatkémiai vizsgálatokkal kezdtük, melyet az IOX-1 tisztaságának vizsgálata előzött meg, ugyanis tisztasága nem felelt meg a gyártók által jelzettnek. A tisztaságot kvantitatív ^1H NMR és pH-potenciometriás mérésekkel ellenőriztük. Ezek alapján a további méréseknél a Sigma-Aldrich terméket használtuk, melynek tisztasága 97% helyett 86% volt, viszont ezt a másik két termékhez képest már elfogadhatónak ítéltük. Ezt követően UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével felvett spektrumsorozatokból meghatároztuk a két vegyület (IOX-1, Q-COOH) proton disszociációs állandóit, majd hozzárendeltük azokat a megfelelő donorcsoportokhoz. A koncentrációeloszlási görbék alapján megállapítottuk, hogy a ligandumok milyen protonáltsági formában vannak jelen pH = 2,00-n, illetve 7,40-en. Utóbbi körülmények közt az IOX-1 döntően LH^- , a Q-COOH pedig L^- formában van jelen, míg a HQ alapvegyület semleges. Ezzel magyarázható, hogy a ligandumok a már említett pH-kon az *n*-oktanol/víz megoszlásos mérések során jóval hidrofilebbnek bizonyultak a HQ-val szemben.

Az albuminnal való kölcsönhatás vizsgálatánál először arra voltunk kíváncsiak, hogy az általunk vizsgált vegyületek kötődnek-e a HSA-hoz. A kötődés meglétéről ultraszűrés, illetve CE-FA módszer segítségével győződünk meg. Az ultraszűrés során kapott eredmények azt mutatták, hogy nagyobb fehérjemennyiség hatására mindkét esetben csökken a szabad ligandum mennyisége, a kötődés pedig az IOX-1 esetén bizonyult erősebbnek. Az IOX-1 esetén próbát tettünk a ligandum – fehérje kölcsönhatás sztöchiometriájának meghatározására is, melyből azt a következtetést vontuk le, hogy a ligandum biztosan egynél több kötőhelyen kötődik. A vizsgálódást CE-FA technikával folytattuk, azonban csak az IOX-1 esetén tudtuk megfelelően optimalizálni a mérési körülményeket. A kapott elektroferogramok alátámasztották az ultraszűrésnél tapasztaltakat, miszerint az IOX-1 egyértelműen kötődik a fehérjéhez. A továbbiakban ezen kölcsönhatások helyét és erősségét tanulmányoztuk, melyhez spektrofluorimetria segítségével Trp-kioltásos, illetve marker kiszorításos méréseket végeztünk. A Trp-kioltásos mérések során azt tapasztaltuk, hogy az IOX-1 ligandum esetén nagyobb

a kioltás mértéke, mint Q-COOH esetén, azonban egyik sem kötődik meg egyértelműen az I-es kötőhelyen. Az I-es és a II-es kötőhely vizsgálatához alkalmazott marker kizsorításos kísérletek azt mutatták, hogy egyik ligandumnak sincs affinitása a kötőhelyekhez, így feltehetőleg az általunk nem vizsgált III-as vagy valamelyik egyéb kötőhelyez kötődhetnek.

A komplexképződési egyensúlyi folyamatokat a terápiás hatással rendelkező IOX-1 esetén tanulmányoztuk UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével. Fe(III) és Fe(II) esetén mono-, bisz- és triszkomplex, míg Cu(II) esetén csak bisz- és monokomplex képződését tapasztaltuk. Mindhárom fémion esetén az (N,O) donoratomok koordinációját valószínűsítettük. A spektrumsorozatok alapján meghatározott stabilitási szorzatok segítségével $pM_{7,4}$ értékeket is számítottunk. Ezen értékek azt mutatták, hogy az IOX-1 Fe(III)-ionokhoz való affinitása nagyobb, mint Fe(II) esetén. Cu(II)-ionok felé mutatott affinitása viszont még ennél is nagyobbak bizonyult. A fémionokkal való kölcsönhatás tanulmányozását ciklikus voltammetriás mérésekkel folytattuk. A voltammogramok elemzése során megállapítottuk, hogy az IOX-1 vaskomplexe esetén reverzibilis, míg rézkomplexe esetén nem reverzibilis folyamatról van szó. A kapott eredmények szintén alátámasztották azt, hogy más HQ származékokhoz képest az IOX-1 a fémionok magasabb oxidációs állapotait részesíti előnyben, így vas esetén a Fe(III)-ionokat kedveli jobban.

Az IOX-1 Fe(II)- és Fe(III)-ionok felé mutatott affinitásának szerepe lehet abban, hogy ez a vegyület hiszton-demetiláz enzim inhibitoraként tud viselkedni. Ez nagy valószínűséggel annak köszönhető, hogy az enzim természetes koszubsztrátja, az α -ketoglutarát (O,O), míg a szóban forgó IOX-1 ligandum (N,O) donoratomokkal rendelkezik. Kutatócsoportunk további céljai közé tartozik az α -ketoglutarát Fe(II)- és Fe(III)-ionokkal való kölcsönhatának vizsgálata, ugyanis ezt még nem tanulmányozták a szakirodalomban.

Irodalomjegyzék

- ¹ H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, **71**, 209.
- ² C. Santucci, S. Mignozzi, M. Malvezzi, P. Boffetta, G. Collatuzzo, F. Levi, C. La Vecchia, E. Negri, *Annals of Oncology*, 2024, **35**, 308.
- ³ Bastien Boff, *PhD disszertáció*, Université de Strasbourg, 2012
- ⁴ C. Huang, D. Ju, C. Chang, P. M. Reddy, B. K. Velmurugan, *BioMedicine*, 2017, **7**, 12.
- ⁵ T. C. Johnstone, K. Suntharalingham, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 3436.
- ⁶ C. Zhang, C. Xu, X. Gao, Q. Yao, *Theranostics*, 2022, **12**, 2115.
- ⁷ Y. Song, H. Xu, W. Chen, P. Zhan, X. Liu, *MedChemComm*, 2015, **6**, 61.
- ⁸ V. Prachayasittikul, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, *Drug Design, Development and Therapy*, 2013, **7**, 1157.
- ⁹ V. Oliveri, G. Vecchio, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **120**, 252.
- ¹⁰ H. Jiang, J. E. Taggart, X. Zhang, D. M. Benbrook, S. E. Lind, W.-Q. Ding, *Cancer Lett.*, 2011, **312**, 11.
- ¹¹ B. Mirković, M. Renko, S. Turk, I. Sosič, Z. Jevnikar, N. Obermajer, D. Turk, S. Gobec, J. Kos, *ChemMedChem*, 2011, **6**, 1351.
- ¹² B. Mirković, B. Markelc, M. Butinar, A. Mitrović, I. Sosič, S. Gobec, O. Vasiljeva, B. Turk, M. Čemažar, G. Serša, J. Kos, *Oncotarget*, 2015, **6**, 19027.
- ¹³ K. G. Naber, H. Niggemann, G. Stein, G. Stein, *BMC Infect. Dis.*, 2014, **14**, 628.
- ¹⁴ M. E. Helsel, K. J. Franz, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 8760.
- ¹⁵ R. J. Hopkinson, A. Tumber, C. Yapp, R. Chowdhury, W. Aik, K. H. Che, X. S. Li, J. B. L. Kristensen, O. N. F. King, M. C. Chan, K. K. Yeoh, H. Choi, L. J. Walport, C. C. Thinnes, J. T. Bush, C. Lejeune, A. M. Rydzik, N. R. Rose, E. A. Bagg, M. A. McDonough, T. J. Krojer, W. W. Yue, S. S. Ng, L. Olsen, P. E. Brennan, U. Oppermann, S. Müller, R. J. Klose, P. J. Ratcliffe, C. J. Schofield, A. Kawamura, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 3110.

- ¹⁶ R. Schiller, G. Scozzafava, A. Tumber, J. R. Wickens, J. T. Bush, G. Rai, C. Lejeune, H. Choi, T.-L. Yeh, M. C. Chan, B. T. Mott, J. S. O. McCullagh, D. J. Maloney, C. J. Schofield, A. Kawamura, *ChemMedChem*, 2014, **9**, 566.
- ¹⁷ Q. Wu, B. Young, Y. Wang, A. M. Davidoff, Z. Rankovic, J. Yang, *J. Med. Chem.*, 2022, **65**, 9564.
- ¹⁸ P. Hill, D. Shukla, M. G. B. Tran, J. Aragones, H. T. Cook, P. Carmeliet, P. H. Maxwell, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008, **19**, 39.
- ¹⁹ S. C. Kampranis, P. N. Tsiichlis, *Adv. Cancer Res.*, 2009, **102**, 103.
- ²⁰ O. N. F. King, X. S. Li, M. Sakurai, A. Kawamura, N. R. Rose, S. S. Ng, A. M. Quinn, G. Rai, B. T. Mott, P. Beswick, R. J. Klose, U. Oppermann, A. Jadhav, T. D. Heightman, D. J. Maloney, C. J. Schofield, A. Simeonov, *PLoS One*, 2010, **5**, e15535.
- ²¹ J. Liu, Z. Zhao, N. Qiu, Q. Zhou, G. Wang, H. Jiang, Y. Piao, Z. Zhou, J. Tang, Y. Shen, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 2425.
- ²² C. C. Thinnes, A. Tumber, C. Yapp, G. Scozzafava, T. Yeh, M. C. Chan, T. A. Tran, K. Hsu, H. Tarhonskaya, L. J. Walport, S. E. Wilkins, E. D. Martinez, S. Müller, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, P. E. Brennan, A. Kawamura, C. J. Schofield, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 15458.
- ²³ S. Zhai, L. Yang, Q. C. Cui, Y. Sun, Q. P. Dou, B. J. Yan, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2010, **15**, 259.
- ²⁴ V. F. S. Pape, N. V. May, G. T. Gál, I. Szatmári, F. Szeri, F. Fülöp, G. Szakács, É. A. Enyedy, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 17032.
- ²⁵ Q.-Y. Yang, Q.-Q. Cao, Y.-L. Zhang, X.-F. Xu, C.-X. Deng, R. Kumar, X.-M. Zhu, X.-J. Wang, H. Liang, Z.-F. Chen, *J. Inorg. Biochem.*, 2020, **211**, 111175.
- ²⁶ F. Mohammadi, H. Torshizi-Mansouri, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2019, **38**, 3059.
- ²⁷ T. Meng, S.-F. Tang, Q.-P. Qin, Y.-L. Liang, C.-X. Wu, C.-Y. Wang, H.-T. Yan, J.-X. Dong, Y.-C. Liu, *MedChemComm*, 2016, **7**, 1802.
- ²⁸ A. R. Timerbaev, *Metallomics*, 2009, **1**, 193.

- ²⁹ T. Peters Jr., *All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic press, San Diego, 1995
- ³⁰ G. Sudlow, D. J Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.*, 1975, **11**, 824.
- ³¹ T. C. Pinkerton, K. A. Koeplinger, *Anal. Chem*, 1990, **62**, 2114.
- ³² D. E. Epps, T. J. Raub, F. J. Kézdy A General, *Anal. Biochem.*, 1995, **227**, 342.
- ³³ É. A. Enyedy, L. Horváth, A. Hetényi, T. Tuccinardi, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, T. Kiss, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2011, **19**, 4202.
- ³⁴ N. Muller, F. Lapique, E. Drelon, P. Netter, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, **46**, 300.
- ³⁵ F. Zsila, *Mol. Pharmaceutics*, 2013, **10**, 1668.
- ³⁶ G. Fanali, A. di Masi. V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol. Aspects Med.*, 2012, **33**, 209.
- ³⁷ F. Kratz, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 171.
- ³⁸ G. H. Beaven, S.-H. Chen, A. D'Albis, W. B. Gratzer, *Eur. J. Biochem.*, 1974, **41**, 539.
- ³⁹ H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, 1967, **38**, 475.
- ⁴⁰ G. Gran, *Acta Chem. Scand.*, 1950, **4**, 559.
- ⁴¹ P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739.
- ⁴² P. L. Brown, C. Ekberg, *Hydrolysis of Metal Ions*, Wiley, 2016.
- ⁴³ C. F. Baes, R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, 1976.
- ⁴⁴ M. R. Willcott, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 13180.
- ⁴⁵ K. Burger, *Az analitikai kémia alapjai*, Alliter kiadó, Budapest, 2002
- ⁴⁶ J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, New York, 2006
- ⁴⁷ S. K. Panigrahi, A. K. Mishra, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2019, **41**, 100318.

- ⁴⁸ T. Pivarcsik, V. Pósa, H. Kovács, N. V. May, G. Spengler, Sz. P. Pósa, Sz. Tóth, Z. N. Yazdi, Cs. Özvegy-Laczka, I. Ugrai, I. Szatmári, G. Szakács, É. A. Enyedy, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, **24**, 593.
- ⁴⁹ A.J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, 2000
- ⁵⁰ H. Holtkamp, C.G. Hartinger, *Drug Discovery Today Technologies*, 2015, **16**, 16.
- ⁵¹ M. L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2005, **45**, 1.
- ⁵² É. A. Enyedy, O. Dömötör, E. Varga, T. Kiss, R. Trondl, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **117**, 189.
- ⁵³ O. Dömötör, V. F. S. Pape, N. V. May, G. Szakács, É. A. Enyedy, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 4382.
- ⁵⁴ H. Kovács, T. Jakusch, N. V. May, Sz. Tóth, G. Szakács, É. A. Enyedy, *J. Inorg. Biochem.*, 2024, **255**, 112540.
- ⁵⁵ W. R. Harris, C. J. Carrano, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 2722.
- ⁵⁶ Y.-S. Sohn, W. Breuer, A. Munnich, Z. I. Cabantchik, *Blood*, 2008, **111**, 1690.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Enyedy Éva Annának és Dr. Dömötör Orsolyának a segítséget és az építő ötleteket, valamint hogy megírhattam ezt a dolgozatot a Szegedi Tudományegyetem Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszékén.

Köszönettel tartozom még Kovács Hilda PhD hallgatónak, a rengeteg segítségért és támogatásért, hogy végig türelemmel segítette munkámat. Az ő útmutatásának köszönhetően számos laboratóriumi módszert ismerhettem meg és sajátíthattam el.