SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Kémia Doktori Iskola

Rákellenes gallium- és platinafém komplexek oldatkémiája, kölsönhatásuk vérsérum-fehérjékkel és DNS-sel

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

Dömötör Orsolya

Témavezető:

Dr. Enyedy Éva Anna

egyetemi adjunktus

Szeged

2014

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	1
1. BEVEZETÉS	3
2. CÉLKITŰZÉSEK	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
3.1. A vizsgált fémionok koordinációs kémiájáról általában	6
3.2. Klasszikus támadáspontú platinakomplexek.....	7
3.2.1. Pt(II)-komplexek	7
3.2.2. Pt(IV)-komplexek	8
3.3. A 8. és 9. csoport komplexei: átmenet a nem klasszikus támadáspontok felé	9
3.3.1. Klinikai tesztelés alatt álló Ru(III)-komplexek.....	9
3.3.2. Analóg szerkezetű Ru(II)- és Os(II)-nitrozil komplexek	11
3.3.3. Ru-komplexek nem klasszikus DNS-támadáspontokkal	11
3.3.4. Rh(III)-komplexek	13
3.4. Fehérje támadáspontú fémkomplexek.....	14
3.4.1. Ga(III)-tartalmú rákellenes komplexek.....	14
3.5. A szérumfehérjék szerepe	16
3.5.1. A humán szérum albumin	16
3.5.2. A humán szérum transzferrin	18
4. KÍSÉRLETI RÉSZ	20
4.1. Felhasznált anyagok	20
4.2. A vizsgálati módszerek elvi alapjai, alkalmazott kísérleti körülmények	21
4.2.1. A pH-potenciometria.....	24
4.2.2. ¹ H NMR spektroszkópia	26
4.2.3. UV-látható spektrofotometria	27
4.2.4. Spektrofluorimetria	28
4.2.4.1. Egyensúlyi, „steady-state” fluorimetria	29
4.2.4.2. Fluoreszcencia-élettartam mérések elve	31
4.2.4.3. Kísérleti körülmények.....	31
4.2.5. Ultraszűrés.....	33
4.2.6. Kapilláris zóna elektroforézis	34
4.2.7. Kiegészítő mérések	35

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	36
5.1. Az oxaliplatin és a KP1537 vizsgálata	36
5.1.1. A komplexek hidrolízise különböző körülmények között	36
5.1.2. Az oxaliplatin és a KP1537 kölcsönhatása HSA-nal	37
5.2. Maleimiddel kapcsolt Pt(IV)-komplexek kölcsönhatása HSA-nal	40
5.3. Ruténium- és ozmiumkomplexek vizsgálata.....	43
5.3.1. A KP1019 és a KP1339 kölcsönhatása HSA-nal.....	43
5.3.2. Ru(II)-, Os(II)-nitrozil komplexek kölcsönhatása HSA-nal	49
5.4. Ru(III)-szalán és Ru(II)-fenantrolin komplexek kölcsönhatása DNS-sel	52
5.5. [Rh(η^5 -Cp*)]-komplexek vizsgálata	59
5.5.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok	59
5.5.1.1. A [Rh(η^5 -Cp*)Z ₃] hidrolízise.....	59
5.5.1.2. A ligandumok savi disszociációs állandóinak meghatározása	61
5.5.1.3. Komplexképzés az (O,O) és (O,N) donor ligandumokkal	62
5.5.1.4. Komplexképzés az (O,S) donor tiomaltollal	66
5.5.2. A [Rh(η^5 -Cp*)Z ₃] és dhp-, ill. pikolinsav komplexének kölcsönhatása HSA-nal	68
5.6. Ga(III)-komplexek	72
5.6.1 A Ga(III) oxinnal, szulfoxinnal, maltollal és tiomaltollal képzett komplexeinek oldategyensúlyi jellemzése	72
5.6.2. A Ga(III)-komplexek kölcsönhatása HSA-nal és Tf-nel	78
5.7. Kumarin alapvázis redukált Schiff-bázis vegyületek kölcsönhatása HSA-nal	86
6. ÖSSZEFOGLALÁS	90
7. SUMMARY.....	94
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	98
9. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	104
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107

Rövidítések jegyzéke

allomaltol	5-hidroxi-2-metil-pirán-4(1H)-on
apoTf	humán apo-transzferrin
BGE	háttér elektrolit (<i>background electrolyte</i>)
bpy	2,2'-bipiridin
BR	bilirubin
Bu ₄ N ⁺	n-tetrabutyl-ammónium
CE	kapilláris elektroforézis
ciszplatin	<i>cisz</i> -[Pt(II)Cl ₂ (NH ₃) ₂]
CM16	[Ru(II)(phen) ₂ (2-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol)] (CF ₃ SO ₃) ₂
CM8	[Ru(II)(phen) ₂ (2-(benzo[b]tiofén-2-il)piridin)] (CF ₃ SO ₃) ₂
Cp [*]	pentametil-ciklopentadienil anion
ct-DNS	borjú csecsemőmirigy DNS
CZE	kapilláris zónaelektroforézis
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DG	danzil-glicin
dhp	1,2-dimetil-3-hidroxi-piridin-4(1H)-on
DMSO	dimetil-szulfoxid
DSS	4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav
EB	etídium-bromid
ESI-MS	elektroporlasztásos ionizációjú tömegspektrometria
Flu	spektrofluorimetria
GaM	[<i>trisz</i> -maltoláto-Ga(III)]
GSH	glutathion
HIm	imidazólium
HInd	indazólium
HMM	nagy moltömegű (<i>high molecular mass</i>)
holoTf	holo-transzferrin
HSA	humán szérum albumin
ICP-MS	induktívan csatolt plazma – tömegspektrometria
Im	imidazol
Ind	indazol
karboplatin	<i>cisz</i> -[Pt(II)(ciklobután-1,1-dikarbonsav)(NH ₃) ₂]
KP1019	HInd <i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Ind) ₂]
KP1339	Na <i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Ind) ₂]
KP1537	[Pt(II)((1R,2R,4R)-4-metil-1,2-ciklohexándiamin)oxalát]
KP2155	[Pt(IV)(etilén-diamin)Cl ₂ <i>transz</i> -(2-maleimidoetil-karbaminsav) ₂]
KP2156	[Pt(IV)(1R,2R)-1,2-ciklohexándiamin)Cl ₂ <i>transz</i> -(2-maleimidoetil-karbaminsav) ₂]
KP2157	[Pt(IV)(1R,2R)-1,2-ciklohexándiamin)Cl ₂ <i>transz</i> -(2-szukcinimidoetil-karbaminsav) ₂]
KP418	HIm <i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Im) ₂]
KP46	[<i>trisz</i> -(8-kinolinoláto)Ga(III)]
LC	foliadékkromatográfia
LMM	kis moltömegű (<i>low molecular mass</i>)
maltol	3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-on
MS	tömegspektrometria
NAMI-A	HIm <i>transz</i> -[Ru(III)Cl ₄ (Im)(DMSO)]
oxaliplatin	[Pt(II)((1R,2R)-1,2-ciklohexándiamin)oxalát]

oxin	8-kinolinol
phen	1,10-fenantrolin
pic	pikolinsav
pp	polipiridil ligandum
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia
STD NMR	<i>saturation transfer difference</i> NMR
szalán	N,N'-etilén- <i>bisz</i> -(szalicilamin)
szalén	N,N'-etilén- <i>bisz</i> -(szalicilimin)
TCSPC	<i>time correlated single photon counting</i>
Tf	humán szérum transzferrin
tiomaltol	3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-tion
UF	ultraszűrés
WF	warfarin
γ -GL	gamma-globulin
λ_{EM}	emissziós hullámhossz
λ_{EX}	gerjesztő hullámhossz
τ	fluoreszcencia-élettartam

Az aminosavakat a szabályszerű hárombetűs kódjukkal jelöljük a dolgozatban.

1. BEVEZETÉS

A XX. és a jelen század egyik legnagyobb egészségügyi kihívása kétségkívül a daganatos megbetegedések kezelése, gyógyítása. Az egyébként csak nevében egységes, de mind megjelenését, mind lefolyását tekintve változatos kórkép kezelésére többféle módszer áll rendelkezésre. Az adott tumor típusától, elhelyezkedésétől és előrehaladottságától függően sebészi eltávolítás, sugárkezelés, vagy gyógyszeres terápia, ill. ezek kombinációja jöhet szóba. Az utóbbi csoportba beletartoznak a kemoterápiás szerek, a hormonterápia és az egyre sikeresebben alkalmazott immunterápia. Közel 40 éve alkalmazzák a ciszplatint (*cisz*-[Pt(II)Cl₂(NH₃)₂]) a kemoterápiában. Igen hatékony, első vonalbeli szer az előrehaladott hererák, petefészekrák, fej- nyak-daganatok kezelésében. A ciszplatin alkalmazásának azonban határt szabnak a kezelés során szinte mindig fellépő súlyos, olykor tartós károsodást okozó mellékhatások. Másik limitáló tényező lehet a terápia során kialakuló rezisztencia. Az eddig forgalomba került két további származék, a karboplatin (*cisz*-[Pt(II)(ciklobután-1,1-dikarbonsav)(NH₃)₂]) és az oxaliplatin ([Pt(II)((1R,2R)-1,2-ciklohexándiamin)oxalát]) részben jobb mellékhatásprofilal és más hatásspektrummal rendelkezik, mint a ciszplatin, a keresztrezisztencia azonban fennáll a hatóanyagok között [1-3]. Ezért indokoltta vált további, más hatásspektrumú, enyhébb mellékhatásokkal rendelkező, rezisztenciát kivédő fémkomplexek kifejlesztése.

Az utóbbi években számos sikerrel kecsegtető ruténium-, gallium-, platina-, arany- és más központi fémionnal rendelkező komplexet állítottak elő és teszteltek *in vitro*, ill. *in vivo*. Klinikai szempontból is biztatóak a Ru(III) tartalmú KP1019 (HInd *transz*-[Ru(III)Cl₄(Ind)₂]; Ind = indazol) (ill. KP1339; az előbbi komplex Na-sója) és NAMI-A (HIm *transz*-[Ru(III)Cl₄(Im)(DMSO)]; Im = imidazol; DMSO = dimetil-szulfoxid) komplexek. Előbbi klinikai fázis I/II vizsgálatokban kolorektális daganatok kezelésében volt kiemelkedően hatásos, és a fellépő mellékhatások igen enyhék voltak [4]. A NAMI-A *in vitro* ugyan hatástalan volt, de klinikai tesztelés során áttétképződést gátló hatásának bizonyult [5,6]. A ruténiumkomplexek eredendően a ciszplatin mintájára kerültek kifejlesztésre. Sokáig elsődleges támadáspontjuként a DNS-t tartották számon. Mára egyre valószínűbb, hogy más, főként fehérje természetű támadáspontjuk is van.

A szintén klinikai tesztelés alatt álló KP46 ([*trisz*-(8-kinolinoláto)Ga(III)]) és [*trisz*-maltoláto-Ga(III)] (maltol = 3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-on) komplexeknél már tisztán fehérje támadáspontokat feltételeznek. A fő támadáspont a ribonukleotid reduktáz lehet, ami a DNS-szintéziséhez szükséges ribonukleotidok redukciójáért felel és a rákos szövetekben nagy mennyiségben van jelen a sejtekben [3,7]. A tumorszelektivitás másik okaként azonban a szérumfehérjék szerepét feltételezik, akárcsak a Ru(III)-komplexek esetében. Ez a szelektív transzport egyfelől megvalósulhat a transferrinen keresztül. A transferrin a szervezet fő vasszállító fehérjeje, azonban képes más fémionok szállítására is. A szelektivitást a sejtek felgyorsult osztódása következtében fokozottan működő transferrin receptor rendszer biztosítja [8]. Másik fontos szállító fehérje a humán szérum albumin, ami utóbbi vizsgálatok eredményei szerint szintén képes tumor szövetekben szelektíven felhalmozódni a rákos szöveteknél megfigyelhető szövetközi folyadékpangás miatt. Emellett kimutattak kifejezetten a rákos szövetekre jellemző érfalon keresztüli aktív transzport mechanizmusokat is [9]. A

transzportfehérjék továbbá elősegíthetik a hatóanyagok tartós jelenlétét a keringésben, megakadályozhatják azok idő előtti ürülését a szervezetből. Manapság sok esetben úgy módosítják egy-egy hatóanyag szerkezetét, hogy az elősegítse a szérum fehérjékhez való kötődést [10].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Ahhoz, hogy egy hatóanyag által kifejtett hatást átfogó módon megérthessünk, szükséges annak feltérképezése, hogy az adott anyag milyen formában van jelen a test egyes vizeitereiben; milyen módon és formában kerül a sejtekhez; pontosan hol és hogyan fejt ki hatását; meddig tartózkodik a szervezetben és azután milyen utakon távozik. Különös jelentősége van az ilyen jellegű vizsgálatoknak a fémkomplexek esetében, amelyek a klasszikus szerves hatóanyagoktól eltérően sokkal szélsőségesebb változásokon mehetnek keresztül akár csak a vérbe való adagolás és a támadáspontig való eljutás folyamán. A fémkomplexek esetében általában kevés és hiányos információ áll rendelkezésre a fent említett mechanizmusokat illetően. A klasszikus oldategyensúlyi vizsgálatok is igen hasznosnak bizonyulhatnak számos farmakokinetikát illető kérdésben. A vérszérum alkotókkal való kölcsönhatás vizsgálatok ugyanezen tulajdonságok szélesebb körű értelmezését segítik elő. További fontos lépés a lehetséges támadáspontok felderítése, tisztázása.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a választott fémkomplexeket jellemezzük mind klasszikus oldategyensúlyi módszerekkel, mind pedig a vérszérumban található humán szérum albuminnal, ill. transzferrinnel való kölcsönhatásuk szempontjából. Egyes esetekben a DNS-sel, mint lehetséges támadásponttal való kölcsönhatásokat is számba vettük. Vizsgálatainkat úgy választottuk meg, hogy azok illeszkedjenek az egyes komplexekkel eddig végzett kutatásokhoz, és szerves módon kiegészítsék, megmagyarázzák, esetleg megkérdőjelezzék azok eredményeit.

Ennek megfelelően készültek:

1. oldategyensúlyi vizsgálatok
 - a.) a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]^{2+}$ kation (O,O), (O,N), ill. (O,S) donoratomokkal rendelkező ligandumokkal alkotott komplexeivel;
 - b.) valamint a Ga(III)-ion oxinnal, szulfoxinnal, maltollal és tiomaltollal képzett komplexei esetében.
2. Vizsgáltuk a humán szérum albumin és
 - a.) a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]\text{-dhp}$ és -pikolinsav komplexe, ill.
 - b.) a Ga(III)-ion oxinnal és maltollal képzett komplexei, valamint
 - c.) néhány Pt(IV)/(II)-,
 - d.) néhány Ru(III)/(II)- és Os(II)-komplexek közötti kölcsönhatást; továbbá
3. a választott Ga(III)-komplexek esetében a transzferrinnel való kölcsönhatást is számba vettük.
4. A DNS-sel, mint lehetséges támadásponttal való kölcsönhatást Ru(III)-szalán és Ru(II)-fenantrolin komplexek esetében vizsgáltuk.
5. A spektrofotometriás módszer kötési állandók meghatározásához való használhatóságát citotoxikus redukált Schiff-bázis kumarin származékok és az albumin reakciójának vizsgálatával teszteltük.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A vizsgált fémionok koordinációs kémiájáról általában

Az általunk vizsgált komplexek központi fémionjai a platinafémek közé sorolhatóak, ez alól kivételt képez a földfémek közé tartozó gallium.

Platinafémek alatt a 8.-10. csoport 5., ill. 6. periódusába tartozó elemeket értjük. Közvetlenül a vas, kobalt, nikkel hármassal helyezkednek el. Ezek név szerint a ruténium, ródium, palládium, azaz a könnyű platinafémek; és a nehéz platinafémek közé tartozó ozmium, irídium és platina. Előfordulásuk nem gyakori a földkéregben, elemi állapotban igen stabilisak, a környezeti hatásoknak ellenálló fémek.

Periódusonként az első ebben a csoportban a Ru és az Os. Vegyületeikben maximum +8-as oxidációs állapotúak lehetnek, az ilyen Ru(VIII) vegyületek azonban nem stabilisak. Az Os legstabilabb oxidációs állapota a +4-es, jól ismertek az $[\text{OsX}_6]^{2-}$ ($\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) vegyületei. A Ru(IV) vegyületekben a fém könnyen Ru(III)-ionná, a stabilis formává redukálódik, ezek mind oktaéderes kis spinszámú vegyületek. A Ru +2-es oxidációs számmal is előfordulhat oktaéderes diamágneses komplexeket képezve, azonban ezek legtöbbször Ru(III)-ionná oxidálódnak. Megfelelő ligandumokkal mindkét fém stabilizálható +2-es állapotban, ehhez például π -akceptor nitrogén-monoxid (NO), vagy η^6 -arén, η^5 -arenil ligandumokra van szükség. Szintén az oxidációs állapottól és a koordinálódó ligandumok természetétől függenek az egyes komplexek kinetikai tulajdonságai. Általában a nagyobb oxidációs állapotok inertebb komplexeket képeznek, ill. az Os analógok sokkal inertebbek, mint a megfelelő Ru-komplexek. A ligandum cseresebességek igen széles skálán (másodperc-év) változhatnak [11].

A Rh- és Ir vegyületek leggyakrabban a +3-as oxidációs állapotban fordulnak elő. Lehetséges még a M(I) állapot π -akceptor ligandumokkal stabilizálva, ill. léteznek karboxilát ligandumokkal áthidalt kétmagvú Rh(II)-komplexek, és Ir(IV) vegyületek is ismeretesek. A legjellemzőbb a $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ forma, kis spinszámú, diamágneses, oktaéderes, kinetikailag igen inert komplexeket képeznek. A ligandum cseresebesség azonban nagyságrendekkel növelhető, ha $[\text{M}(\eta^5\text{-Cp}^\#)]$ ($\text{Cp}^\# =$ (szubsztituált) ciklopentadienil anion származék) komplexet vizsgálunk. Általában a „*soft*” karakterű donatoratomokkal képeznek nagyobb stabilitású komplexet [11,12].

A 10. csoportba tartozik a Pd és a Pt. Előbbi maximum +4-es oxidációs állapotú lehet, de stabilis vegyületeiben Pd(II)-ként fordul elő. A Pt mind +4, mind +2 formában stabilis. Pt(II)-ionként síknégyzetes komplexeket képez. A Pt(IV) forma további két ligandum belépését teszi lehetővé, így oktaéderes, kis spinszámú, diamágneses komplexek képződnek. Mindkét oxidációs állapotban a komplexek viszonylag inerteek. A Pt(II) preferenciát mutat a „*soft*” donatoratomok felé (S, P, CO). A Pt(IV) is kötődik ilyen ligandumokhoz, de már közbenső Lewis-sav [11].

A Ga a 13. csoportba tartozó elem, az alumínium alatt található a periódusos rendszerben. Előfordulhat Ga(I)-ionként, azonban közönséges körülmények között redoxi inaktív Ga(III)-vegyületeket képez. Kifejezett kationos kémia és sav-bázis amfotéria jellemzi, koordinációs vegyületeiben az oktaéderes geometria a legjellemzőbb. Ligandum preferenciája erőteljesen a „*hard*” donatoratomok irányába tolódott (RO^- , PO_4^{3-}). Megfelelő ligandumokkal kinetikailag labilis komplexeket képez, hidroxidokomplexei viszonylag inerteek [11].

3.2. Klasszikus támadáspontú platinakomplexek

A rákellenes terápia egyik sikertörténete a ciszplatin (3.2.1. ábra). Maga a vegyület már az 1800-as években is ismert volt Peyrone-sóként, hatását azonban csak az 1960-as években ismerte fel Rosenberg és kutatócsoportja egy véletlennek köszönhetően [13]. Ezek után 10 éven belül eljutott a terápiás alkalmazásig (FDA 1978.12.19.). Máig két további származéka, a karboplatin és az oxaliplatin kerültek forgalomba világszerte (3.2.1. ábra). Klasszikus nézet szerint elsődleges támadáspontjuk a DNS, hatástani besorolásuknak megfelelően a keresztkötő ágensek között találhatók [14].

3.2.1. Pt(II)-komplexek

A ciszplatin elsővonalbeli szer here-, petefészek-, fej-nyak daganatok kezelésében. Monoterápiában és kombinációban is használható; sugárterápiával kombinálva szinergista hatást figyeltek meg. Alkalmazhatóságát limitálja a kezelés során fellépő komoly vese-, hallás- és idegkárosodás, ill. a kízó hányinger, hányás [1,2]. Másik komoly probléma a kezelés alatt kialakuló rezisztencia. Hatásmechanizmusát tekintve a ciszplatin könnyen távozó klorido ligandumai a sejtbe kerülve víz molkeulákra cserélődnek, az így aktivált komplex a DNS purin bázisaival, elsősorban a guaninok 7-es nitrogénjével képez koordinatív kötést a vizek cseréje révén. Keresztkötések alakulnak ki láncon belül (*intrastrand*) vagy láncok között (*interstrand*), de egyfogú koordináció is lehetséges. Ez pedig magakadályozza a DNS-replikációt és -transzkripciót [14]. A komplex hidrolízise jórészt sejtben belül történik, mert a folyamat erősen függ a környezet kloridion koncentrációjától. A vészérum magas kloridkoncentrációja (~100 mM) visszaszorítja a hidrolízist, ami azonban a sejt (~24 mM), sejtmag (~4 mM) irányban egyre nagyobb mértékben játszódik le [15].

A szelektivitást a tumorsejtek fokozott osztódása és anyagcseréje biztosítja, ez azonban sok egészséges sejtre is érvényes; innen származik a mellékhatások egy része (hányás, vérképzőszervek érintettsége). Másik része a Pt(II)-ionok „*soft*” jellegéből adódik, így a DNS-en kívül a kén donortatom tartalmú fehérjékkel, peptidekkel, aminosavakkal is könnyen reakcióba lép (vese-, halláskárosodás). A mellékhatások csökkentése lehetséges gyógyszeres technológiai eljárásokkal, mint például liposzómába ültetés, polietilén-glikollal való kapcsolás [3,16]; ugyanakkor a könnyen távozó csoport kinetikai inertségének finomhangolása is lehetséges. Ez valósul meg a karboplatin és az oxaliplatin esetében. A távozó csoport inertségének kismértékű növelésével a mellékhatások csökkenthetők. Mindezek ellenére a karboplatin csontvelőkárosító és hánytató hatása továbbra is kifejezett, az oxaliplatin pedig kellemetlen, tűszúrászerű érzésvavarokat okoz [2].

A Pt(II)-komplexek vészérumbeli útja sokat vizsgált terület, mégis ellentmondásokat tartalmaz. Ciszplatinnal kezelt betegeken megfigyelték, hogy a humán szérum albumin (HSA) csökkent szintje a mellékhatások fokozódását okozta [17]. A három komplex közül a karboplatin alig kötődik szérumfehérjékhez, így jórészt változatlanul ürül a veséken keresztül [18,19]. A ciszplatin és az oxaliplatin kötődik albuminhoz, γ -globulinokhoz (γ -GL) és a vörösvértestekben található hemoglobinhoz is [20-22]. A ciszplatin plazmafehérje affinitása igen nagy, pár órán

belül több mint 90%-a már fehérjé(k)hez kötött [18]. Az albuminon a Cys34 helyett inkább a Met298 tioéter donorcsoportja az elsődleges kötőhely [20,23,24]. A kötés kvázi irreverzibilis, így a kötött komplex hatás szempontjából elvész [25,26]; ugyanakkor egyes vizsgálatok sejtvonalas kísérleteken az ílymódon kötött komplexek hatásosságát bizonyították [20,17]. *In vitro* kísérletek akár 10 platinakomplex albuminon való megkötődését is mutatták, ill. albumin dimerek kialakulása, valamint intramolekuláris cisztin hidak felszakadása is megfigyelhető volt [24,27,28]. Lehetséges kötőhelyeket jelentenek a His imidazolok is a fehérjében [24]. A γ -GL és a hemoglobin szintén kén donoratomok révén köti a ciszplatint. Az oxaliplatin megközelítőleg azonos mértékben kötődik γ -GL-hoz és HSA-hoz a ciszplatinnal megegyező kötésmódot feltételezve [22]. Kars és munkatársai folyadékkromatográfia – elektroporlasztásos ionizációjú tömegspektrometria (LC–ESI-MS) mérésekkel azt bizonyították, hogy a ciszplatint $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ vagy $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$ formában kötődik a HSA-hoz; az oxaliplatinhoz az oxalát cseréjével kétfogúan koordinálódik a fehérje. Ez utóbbi vizsgálatban valós, szérumbeli körülményekhez közeli koncentrációkat alkalmaztak és 1:1, 1:2 HSA–fémkomplex adduktumok képződését írták le [18]. Mindkét fémkomplex igen lassan, órák, napok alatt reagál szérumfehérjékkel, vagy HSA-nal [18,20,29].

3.2.1. ábra. Rákellenes Pt(II)- és Pt(IV)-komplex szerkezete.

B.K. Keppler és kutatócsoportja olyan oxaliplatin származékokat állított elő, ahol a diamino-ciklohexán gyűrű 4-es pozíciójában egy metilcsoport található [30]. Ez egy további kiralitáscentrumot eredményez a molekulán. Megfigyelték, hogy a 4R konfigurációjú KP1537 ($[\text{Pt}(\text{II})((1R,2R,4R)\text{-4-metil-1,2-ciklohexándiamin})\text{oxalát}]$) komplex *in vivo* kísérletekben nagyobb aktivitást mutat, mint a 4S konfigurációjú KP1691, és nem jelentkezik az oxaliplatin kezeléskor gyakran kialakuló hideg túlérzékenység. Az egyes komplexek sejtekbe történő felvételében is különbség mutatkozott, ennek pontos, molekuláris oka azonban egyelőre nem ismert [30].

3.2.2. Pt(IV)-komplexek

A Pt(IV)-komplexek esetében két további axiális ligandum beépítésére van lehetőség. Ezek a ligandumok gyakran maguk is farmakológiai hatással rendelkeznek [16], de segíthetik a komplex célba juttatását is [20]. További előnyük a szájon át történő adagolhatóság [16,17,31]. Jóval inertebbek, mint a Pt(II)-komplexek [16,32]. A satraplatin már túljutott egy klinikai fázis III tesztelésen (3.2.1. ábra). Egyes ciszplatin-rezisztens tumorokkal szemben is aktivitást mutatott, valószínűleg nem csak DNS-kereszt-kötések révén fejt ki hatását [24]. A további klinikai vizsgálatokat azonban megszakították vele [33]. P.J. Sadler nevéhez köthetők a fotoaktivált Pt(IV)-dijodo- és -diazidokomplexek, ezek fény hatására összetett reakciók révén alakulnak aktív

Pt(II)-komplexeiké [16,34,35]. A Pt(IV)-komplexeikre érvényes, hogy a hatás kialakulásához előbb Pt(II)-komplexeiké kell redukálódniuk [3,16,31]. A redukciónak kedvez a tumor szövetek savasabb kémhatása és a tumorsejtek által nagy mennyiségben termelt redukálószerk – mint például a glutation (GSH), az aszkorbinsav, a cisztein (Cys) tartalmú fehérjék és a metallotioneinek – jelenléte. A redukció nagyobb részt sejten belül játszódik le [16]. A redukció lejátszódásának mértékét befolyásolja az axiális ligandumok hatása a fémkomplex redoxipotenciáljára. Az alkil-karboxilát ligandumok pl. kedvező köztes redoxipotenciált alakítanak ki [36]. A visszamaradó redukált komplex legtöbbször a már klinikai gyakorlatban használt Pt(II)-komplexeikkel rokon szerkezetű. Az axiális ligandumok további – már korábban említett – funkciókkal is rendelkezhetnek. Egyik ilyen a szelektív célba juttatás transzport fehérjékhez való kapcsolással. Például a maleimid funkciós csoportot tartalmazó vegyületek könnyen nukleofil addíciós reakcióba lépnek a HSA Cys34 tiolcsoportjával. Ismertek ilyen szerves hatóanyagok és Pt(II)-komplexeik is, ezek egy alkalmas savérzékeny csoporton keresztül kapcsolódnak a maleimid részhez [3,10]. Az ilyen típusú Pt(IV)-komplexeik redukció segítségével távozhatnak a szállító fehérjéről.

3.3. A 8. és 9. csoport komplexei: átmenet a nem klasszikus támadáspontok felé

3.3.1. Klinikai tesztelés alatt álló Ru(III)-komplexeik

A Ru(III)-komplexeik eredetileg a Pt(II)-komplexeik lehetséges analógjaiként kerültek látótérbe. A *fac*-[Ru(NH₃)₃Cl₃] komplex rákellenes hatása már az 1980-as években ismert volt, a komplex rossz vízoldhatósága azonban megakadályozta a további *in vivo* kísérleteket [37]. Az ammónia ligandumok Im vagy Ind ligandumokra való szisztematikus cseréje viszont hatásos komplexeiket eredményezett. B.K. Keppler és munkatársai fejlesztették ki a KP418 (HIm *transz*-[Ru(III)Cl₄(Im)₂]) és KP1019 komplexeiket (3.3.1. ábra).

3.3.1. ábra. Ru(III)-komplexeik szerkezetik képlete.

Ezekben axiálisan egy-egy Im vagy Ind ligandum koordinálódik a központi Ru(III) ionhoz, a maradék négy koordinációs helyen pedig kloridionok találhatók. A KP418 komplexszel rokon szerkezetű az E. Alessio és G. Sava kutatócsoportjában szintetizált NAMI-A, ahol az egyik Im helyett DMSO koordinálódik a fémionhoz (3.3.1. ábra). Szerkezetileg ugyan hasonlóak, de a NAMI-A hatásmechanizmusa merőben eltér az előbbi kettőtől. Ez a komplex *in vitro* hatástalan volt, azonban *in vivo* kísérletekben kifejezett áttétképződést gátló (antimetasztatikus) aktivitást

mutatott [5]. A KP418 csak mérsékelt rákellenes hatással rendelkezik. A KP1019 viszont *in vitro* és *in vivo* tesztelés során is hatásosnak bizonyult főként ciszplatin-rezisztens kolorektális tumorok kezelésében [4]. A NAMI-A komplexnél sejten kívüli támadáspontokat feltételeznek. Röntgenfluoreszcencia mikroszkópos és röntgenabszorpciós spektroszkópiás vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a sejtekbe alig lép be, viszont a sejtközi mátrix fehérjeivel kölcsönhatásba lép, így megakadályozza a kóros sejtcsoportok leszakadását és szóródását a szervezetben [38-40]. A KP1019 ezzel szemben belép a sejtekbe, a sejtmagban lévő DNS-sel kölcsönhatásba lép, és képes keresztkötések révén megtörni a kettős hélix szerkezetet. Ezt a fajta károsodást a DNS-javító mechanizmusok kevésbé képesek felismerni, mint a ciszplatin esetében [4,39]. Hatásmechanizmusában azonban fehérje támadáspontokat is feltételeznek, bár konkrét eredmények eddig nem születtek. A KP1019 igen enyhe mellékhatásokkal rendelkezik, ezt a fokozott tumor szelektivitással lehet magyarázni. Intravénásan adagolva a komplex percekben belül a szérumban található szállítófehérjéhez, a HSA-hoz és a transferrinhez (Tf) kötődik. Mindkét fehérje nagyobb koncentrációban található meg elsősorban szolid (azaz nem vérvérképzőszervi, vagy nyirokcsomó eredetű) tumorok közelében. A felhalmozódás oka az ún. „fokozott permeabilitás és visszatartás” hatás (részletesen lásd 3.5. fejezet). A Tf további nagy mennyiségben kerül felvételre a Tf receptorokat fokozottan kihelyező tumorsejtek által [8]. A Tf-fémkomplex adduktum a sejten belül savas endoszómába kerül és disszociál miközben a Ru(III) a sokkal reaktívabb Ru(II)-komplexxé redukálódik [36]. A továbbra is oktaéderes geometriájú Ru(II)-komplex aztán ligandumcsere folyamatokban kölcsönhatásba lép a biológiai támadáspontokkal: DNS-bázisokkal és/vagy fehérje oldalláncokkal. Ez a „redukció útján történő aktiváció” hipotézis. A redukció lejátszódhat sejten kívül is. Tumoros szövetekben az érhalózat kiépülése nem tart lépést a szövetburjánzással, így az ennek következményeként létrejövő anaerob sejtműködés csökkent szöveti pH-t eredményez. Ez és a nagy mennyiségben előforduló endogén redukálószeres – ahogy azt már a 3.2.2. fejezetben is említettük – elősegítik a komplexek redukcióját [31,36,37].

A KP1019 klinikai fázis I/II tesztelésekor nem lehetett elérni a maximálisan tolerálható dózist a komplex limitált vízoldhatósága miatt, ezért ma már a jobb vízoldhatóságú nátrium-sóval, a KP1339-cel folynak klinikai fázis I vizsgálatok (3.3.1. ábra) [41]. Ismert, hogy a KP1019 vizes oldatokban hidrolizál, a kloridionok víz molekulákra cserélődnek. A hidrolízis sebessége a hőmérséklet, ill. a pH növelésével gyorsul, és a HCO_3^- jelenléte szintén fokozza a hidrolízis mértékét [42,43]. A tumor szelektivitás egyik kulcsmechanizmusa lehet a szérumfehérjéhez való kötődés. A KP1019 intravénásan beadva percek alatt > 99%-ban szérumfehérjéhez, elsősorban a Tf-hez és a HSA-hoz kötődik [4,24]. Kapilláris elektroforézis – induktívan csatolt plazma – tömegspektrometriás (CE-ICP-MS) mérések szerint a fiziológiás arányokat közelítő 10:1 arányú HSA:Tf keverékben a KP1019 98%-a HSA-hoz kötődött [44]. A HSA-hoz először másodlagos kölcsönhatások révén kötődik, majd ez később a kloridionok részleges elvesztésével koordinatív kötésbe megy át [45].

A KP1339 biológiai hatása és farmakokinetikai viselkedése a KP1019-cel gyakorlatilag megegyezik, így a vizsgálatokat ma már főként a KP1339-cel végzik [41,46,47].

3.3.2. Analóg szerkezetű Ru(II)- és Os(II)-nitrozil komplexek

A nitrogén-monoxid átmenetifémkomplexek jól ismertek érdekes elektron-transzfer tulajdonságaikról. A Ru-nitrozil komplexeket elsőként a fém–NO kötések tanulmányozására állították elő, a kötés ugyanis kellően inert és stabilis [11]. Manapság viszont gyógyászati szempontból is érdeklődésre tartanak számot a NO-ot megkötő, vagy éppen felszabadító fémkomplexek. A NO a szervezet által termelt hírvivő molekula, vérnyomás-szabályozó, ingerületátvivő anyag; gyulladásos- és sejthalál mechanizmusokban is részt vesz. Utóbbi révén kapcsolatban áll tumorképződést befolyásoló folyamatokkal. A NO emelkedett vagy csökkent szintje egyaránt lehet kóros állapotok előidézője [48,49]. A Ru/Os-nitrozil komplexekben nehezen rendelkezhető oxidációs számok az egyes atomokhoz. A legtöbb ilyen komplexben +2-es oxidációs állapotúnak vehető a fémion, ezt támasztják alá IR spektroszkópiás és röntgendiffrakciós mérések is [11]. A dolgozatban ennek megfelelően jelöljük a fémek oxidációs állapotát.

V.B. Arion és D. Luneau olyan citotoxikus Ru(II)-, ill. Os(II)-komplexeket állítottak elő, melyekben négy klorido ligandum mellett egy NO és egy azol ligandum található egymáshoz képest *cisz* vagy *transz* helyzetben (3.3.2. ábra). Az azol ligandum lehet imidazol, pirazol, benzimidazol vagy indazol, az ellenion ugyanezen ligandumok kationos formája, n-tetrabutilammónium vagy Na^+ lehet. Rákos sejtvonalakon tesztelve jelentős különbségek mutatkoztak az IC_{50} értékekben, elsősorban a kétféle központi fémion között (IC_{50} = az 50%-os gátláshoz tartozó inhibitor koncentráció). A Ru(II)-komplexek átlagosan két nagyságrenddel hatékonyabbnak bizonyultak, mint az Os(II)-komplexek, és a KP1019-nél is jóval citotoxikusabbak voltak az SW480 (vastagbélrák) és CH1 (limfóma) sejtvonalas kísérletekben. A különbségek valószínű oka az Os(II)-komplexek kifejezett inertsége lehet [48,49].

3.3.2. ábra. Ru/Os(II)-nitrozil komplexek szerkezeti képlete.

3.3.3. Ru-komplexek nem klasszikus DNS-támadáspontokkal

Napjainkban egyre nagyobb érdeklődés mutatkozik a nem klasszikus DNS-támadáspontú rákellenes hatóanyagok iránt. Klasszikusnak a kovalens, vagy koordinatív módon kötődő vegyületeket nevezzük, ezek a kötések azonban (kvázi) irreverzibilisek, tartósan megmaradhatnak és később másodlagos tumorok képződését indukálhatják [14]. A nem klasszikus kölcsönhatások másodlagos kötőerők révén jönnek létre, ennek megfelelően beszélhetünk a felületen elektrosztatikusan megkötődő, interkalálódó és a DNS kis- vagy nagy árkában kötődő vegyületekről (3.3.3.A. ábra). A DNS felülete, a cukor-foszfát gerincet jelöli. Az interkaláció a DNS-bázisok közé való beékelődést jelenti, és π – π stacking kölcsönhatások révén

jön létre. A DNS-árkokban főként H-hidas kötések alakulnak ki a bekötődő vegyület és a DNS-nukleotidok között. Az interkalálódó anyagok szintén kiválthatnak tumorképződést, mint például a fenantrén, aflatoxin B, vagy az egyébként rákterápiában használt antraciklinek (daunorubicin, doxorubicin) [14].

Ilyen nem klasszikus hatóanyagok lehetnek a Ru(II)-polipiridil és a Ru(III)-szalán komplexek (3.3.3.B/C ábra). A $[\text{Ru(II)(pp)}_3]^{2+}$ (pp = polipiridil ligandumok, pl: 2,2'-bipiridin (bpy), 1,10-fenantrolin (phen), dipirido[3,2-a:2',5'-c]fenazin) komplexek inerteek, citotoxikus hatásuk a koordinált ligandumoktól ered. Minél kiterjedtebb, és ennek megfelelően lipofilebb pp ligandumok kapcsolódnak a központi fémionhoz, a komplex annál könnyebben jut át a membránokon. Jellemzően maguk a pp ligandumok is citotoxikusak, a fokozott lipofil jelleg miatt pedig a szelektivitás csekély, így a szisztémás toxicitás igen kifejezett [12,50]. Elsődleges támadáspontjuk a DNS. A kötőmód szintén a ligandumoktól függ. A kiterjedt aromás ligandumok képesek interkalálódni, a kisebb bpy, phen komplexek általában az árkokban, vagy a felületen kötődnek [51]. Nem ritka az enantiomer pár komplexek eltérő kötőmódja a DNS-láncon [50]. Számos pp komplex fluoreszkál, és a DNS-hez kötődve ez a fluoreszcencia többszörösére nőhet, amit különböző képalkotási eljárásoknál ki is használnak [50,52].

3.3.3. ábra. Különböző másodlagos kötődési módok a DNS-láncon (A), Ru(II)-pp komplexek (B) és Ru(III)-szalán komplexek szerkezete [53] (C).

A Ru(III)-szalán komplexek viszonylag egyedülállóak. A négyfogú szalén (N,N'-etilén-*bisz*-(szalicilimin)), ill. a redukált szalén (N,N'-etilén-*bisz*-(szalicilamin)) ligandumok azonban jól ismertek. Számos Ti(IV)-, V(IV)-, Cu(II)-, Zn(II)- Al(III)-szalán/szalén komplexet állítottak elő katalitikus, antivirális, antibakteriális, vagy antitumor hatásuk miatt [54-58]. Egyes komplexek, sőt maguk a ligandumok is képesek kötődni a DNS-hez, a kölcsönhatás interkaláció vagy DNS-árkokban való kötődés lehet [54,59]. Az A.I. Tomaz és munkatársai nevéhez fűződő Ru(III)-szalán komplexek az etilén-diamin molekularész helyett egy *o*-diamino-ciklohexánt tartalmaznak, valamint az aromás gyűrűkön 4-es (S8, $[\text{Ru(III)}(2,2'-((\text{ciklohexán-1,2-diil-*bisz*-(azándiil))*bisz*-(metilén))*bisz*-(4-metoxifenol)(Cl)(\text{trifenilfoszfín})])$) vagy 5-ös (S10, $[\text{Ru(III)}(6,6'-((\text{ciklohexán-1,2-diil-*bisz*-(azándiil))*bisz*-(metilén))*bisz*-(3-metoxifenol)(Cl)(\text{trifenilfoszfín})])$) helyzetben egy-egy metoxi szubsztituens található (a szerzők rendhagyó gyűrűszámozását használva) [53]. Axiális pozícióban egy klorido és egy trifenil-foszfín ligandum kapcsolódik. A2780 és MCF7 rákos sejtvonalakon kifejezett citotoxikus aktivitást ($\text{IC}_{50} \sim 4 \mu\text{M}$ (A2780), $\sim 8 \mu\text{M}$ (MCF7)) mutattak. A vizsgált komplexek kötődnek a HSA-hoz, viszont *in vitro* sejtvonalas

kísérletekben a HSA jelenléte nem befolyásolta, vagy kis mértékben csökkentette a komplexek citotoxicitását [53].

3.3.4. Rh(III)-komplexek

A Rh-komplexek rákellenes hatásának vizsgálata szintén nem új keletű. Ismertek síknégyszetes geometriájú rákellenes hatású Rh(I)-karbonil és -ditiokarbamát komplexek. Jóval népesebb csoportot képviselnek a kétmagvú Rh(II)-karboxilátokomplexek. Itt a két Rh(II) mag kettő vagy négy karboxilát ligandummal van áthidalva. Előbbiekben a maradék 2-2 koordinációs helyet jellemzően egy pp ligandum foglalja el. Lehetséges támadáspontként a DNS-t feltételezik [60-62].

A *mer*-[RhCl₃(NH₃)₃] és a *mer,cisz*-[RhCl₃(DMSO)₂(NH₃)] *in vitro* rákellenes hatást mutattak, kinetikai inertségük miatt azonban a Rh(III)-komplexek sokáig az érdeklődés körén kívül estek [12,61]. Fokozott citotoxikus aktivitást mutattak továbbá [RhCl₃(DMSO)(pp)] komplexek. Ezek semleges töltésű komplexek és a Ru(II)-pp komplexekkel egyezően ezek is könnyen belépnek a sejtekbe. Azonban a DNS-sel való kölcsönhatásuk nem számottevő, inkább a reaktív oxigén gyökök mennyiségét növelik és így váltanak ki apoptózist. A [RhCl₂(pp)₂] komplexek némelyike kötődik a DNS-hez interkaláció útján [12].

A Rh(III)-komplexek aktivitása növelhető megfelelő, cseresebességet növelő ligandum bevezetésével. Ilyenek a jelentős *transz*-hatással bíró η^6 -arén és η^5 -arenil ligandumok, amelyek a *transz* helyzetben lévő ligandumokat labilizálják. A [Rh(III)(H₂O)₆]³⁺ kationhoz képest 14 nagyságrenddel növelhető a víz cseresebesség egy pentametil-ciklopentadienil (Cp*) ligandum háromfogú koordinációjával (~10⁵ 1/s). Ez az izoelektronos [Ru(II)(η^6 -arén)] komplexek cseresebességét (10⁻³ – 10⁻¹ 1/s) is jóval meghaladja [12]. A Cp* ligandum növeli a komplex hidrofilitását, ugyanakkor a membránokon való átjutás lehetőségét is biztosítja.

3.3.4. ábra. Az [M(H₂O)₃]²⁺ akvakation (balra) és a [M₂(μ-OH)₂(H₂O)₂]²⁺ (középen) [M₂(μ-OH)₃]⁺ (jobbra) hidroxidokomplexek szerkezete (M²⁺ = [Rh(III)(η^5 -Cp*)]²⁺).

A szilárd formában hozzáférhető [(Rh(III)(η^5 -Cp*))₂(μ-Cl)₂Cl₂] komplexet vízben oldva savas pH-n [M(H₂O)₃]²⁺ kationként van jelen (M²⁺ = [Rh(III)(η^5 -Cp*)]²⁺). A pH-t növelve [M₂(μ-OH)₂(H₂O)₂]²⁺ és [M₂(μ-OH)₃]⁺ hidroxidohidas komplexek jelennek meg [63], ezek feltehetőleg nem rendelkeznek rákellenes aktivitással, ezért a hidrolízist megfelelő komplexképzőkkel célszerű megakadályozni (3.3.4. ábra).

Az eddig tanulmányozott $[\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{LL})\text{Cl}]^+$ komplexekben LL ligandumként főként pp, vagy etilén-diamin koordinálódik a fémionhoz. Az etilén-diamin és bpy komplexek nem citotoxikusak. A nagyobb pp ligandumú komplexek sokkal aktívabbak, ezeknél lehetséges DNS-kötődés interkaláció révén, azonban ez – a Ru(II)-arén komplexektől eltérően – nem alakul át koordinatív kötéssé [12]. A phen, vagy bpy ligandumú komplexek azonban koordinatív kölcsönhatásba léphetnek a DNS-bázisokkal [12]. A klorid ligandumnak a Ru(II)-arén analógokhoz hasonlóan itt is fontos szerepe lehet, víz molekulára való cseréje valószínűleg aktiválja a komplexet. Ezen felül a $[\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek lehetséges támadáspontjairól, oldategyensúlyi viselkedéséről, a klorid-víz csere mértékéről kevés információ áll rendelkezésre az irodalomban.

3.4. Fehérje támadáspontú fémkomplexek

A fehérjék több szempontból is kíváncsok támadáspontok lehetnek a rákterápiában. Ennek oka, hogy a tumorsejtek fehérje összetétele nagyon eltérhet az egészségestől; túlkínálhat jelentkezhet olyan fehérjékből, amelyek normálisan a sejtek integritásáért felelnek. Az ilyen fehérjék gátlása a tumorsejtek szelektív pusztulásához vezet. Továbbá a szervezet fehérjekészlete a DNS-sel ellentétben folyamatosan cserélődik, így a hosszú távú mellékhatások kialakulása kevésbé valószínű.

3.4.1 Ga(III)-tartalmú rákellenes komplexek

A Ga(III)-vegyületek a Pt(II)-komplexek után másodikként kerültek alkalmazásra a rákellenes terápiában. Megfigyelték, hogy az intravénásan adott $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ só is rendelkezik tumor növekedést gátló hatással; főleg limfómás, leukémiás betegeknél. Tényleges terápiás alkalmazást citráttal stabilizált formája (GaniteTM) nyert a rákos állapotokat gyakran kísérő hiperkalcémia kezelésében [7]. Továbbá használnak ^{67}Ga izotópokat diagnosztikai képalkotásban és ^{68}Ga radioterápiás szereket is. A $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ farmakokinetikája azonban kedvezőtlen, mert a só hidrolizál és a képződő hidroxidokomplexek gyorsan kiürülnek a szervezetből. Gyors infúzióban adva a só vesekárosító hatású, lassú infúzióban látóideg károkat okoz [3,7,64,65]. A szájon át adagolt klorid, vagy nitrát sók felszívódása nem elégséges. A leghatékonyabb a tartósan alacsony Ga(III) koncentráció fenntartása és a hidrolízis megakadályozása lenne a vérplazmában, ezt pedig alkalmas komplexekkel lehet biztosítani. Ennek megfelelően számos komplexet állítottak elő és tesztelték azokat *in vitro* és *in vivo*. Az oktaéderes *trisz*-ligandumú Ga(III)-komplexek ígéretes csoportját képezik ezen vegyületeknek; ilyen komplexek a [*trisz*-maltoláto-Ga(III)] (GaM) és a [*trisz*-(8-kinolinoláto)Ga(III)] (KP46) (3.4.1.ábra). A klinikai fázis I/II tesztelésen átesett komplexek szájon át adagolhatók, mérsékelt mellékhatásokkal rendelkeznek és $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ -ra rezisztens sejteken is hatásosnak bizonyultak [3,64,66,67]. Továbbá a tioszármazékok a diagnosztikai képalkotó eljárásoknál nyerhetnek alkalmazást [68].

Feltételezett hatásmódjuk azon alapul, hogy a Ga(III)-ion sok szempontból hasonlít a Fe(III)-ionra; például elektronegativitás, elektronegativitás, töltés, ionsugár és koordinációs kémiai sajátosságuk tekintetében [3]. A Ga(III)-ion azonban a Fe(III)/(II) rendszerrel szemben

közönséges körülmények között redox inaktív. Így képes versengeni a vas kötőhelyekért az egyes enzimekben, de azok működését gátolni fogja, mert nem tud redoxi folyamatokban részt venni. A Ga(III)-komplexek fő támadáspontjaként a ribonukleotid reduktazt tartják számon. Ez az enzim katalizálja a ribonukleotidok dezoxiribonukleotidokká történő redukcióját. A Ga(III)-ion a két alegységből álló heterodimer fehérje R2 alegységében kötődik a vaskötő helyre, ennek következtében a DNS-szintézis zavart szenved és a beinduló apoptotikus folyamatok a sejtek pusztulásához vezetnek [3,7,69]. A Ga(III)-ion továbbá képes kötődni a Tf vaskötő helyein, ami feltételezések szerint a sejtes felvételt fokozza; ugyanakkor a sejtek más úton is képesek felvenni a fémiont [70].

3.4.1. ábra. A KP46 és a GaM komplexek szerkezete.

A KP46 komplexben (N,O)-donorként három darab 8-kinolinol (triviális nevén oxin; a dolgozatban a továbbiakban így szerepel) koordinálódik a fémionhoz. A komplex semleges töltésű, lipofilitása lehetővé teszi a membránokon való átjutást ($\lg P = 0,88$), vízdoldhatósága viszont igen rossz ($\sim 36 \mu\text{M}$) [71]. Ugyanakkor az ezt jóval meghaladó *in vivo* mérhető maximális szérumkoncentrációk arra utalnak, hogy a véráramban nagyobb részt fehérjékhez kötődik [67]. CE–MS vizsgálatok szerint a fémion szinte kizárólag Tf-hez kötődött, míg a HSA szerepe igen mérsékelt volt [72]. Másrésről röntgenabszorpciós spektroszkópiás mérések szerint a fémion körüli koordinációs szféra nem változott sem Tf, sem HSA jelenlétében, ami a nem koordinatív, másodlagos kötésmódok lehetőségét veti fel [73]. A GaM oldhatósága sokkal jobb ($\sim 24 \text{ mM}$), kevésbé lipofil komplex ($\lg P = 0,41$) [65], szérumfehérjékhez való kötődéséről azonban nem sokat tudunk. Sejtkultúrák vizsgálatok a Tf receptoron keresztüli sejtfelvétel – és ezáltal a Tf-hez való kötődés – szerepét bizonyították [66].

3.5. A szérumfehérjék szerepe

3.5.1. A humán szérum albumin

A HSA a szervezet legfőbb nem specifikus szállítófehérjéje. A HSA $630 \mu\text{M}$ -os koncentrációban van jelen a vérérszékben, ezzel a vérplazma fehérjetartalmának az 55-60%-át adja. Feladata igen sokrétű: fenntartja a kolloid ozmotikus nyomást; a vér pH-ját puffereli; enzimatis és antioxidáns funkciókkal bír; és szállít: endogén és exogén anyagokat egyaránt. A szervezetben található HSA nagyobb része (65%) azonban az ér pályán kívül található, főként a hám és izomszövetekben. Az albumin képes kilépni az ér pályából passzív módon mivel a

kapillárisok fala számos szövetben fenesztrált, pórusokat tartalmaz. Ilyen módon a transzportnak közel a fele zajlik. Aktív transzportere az albondin (gp60) fehérje, ez az érpálya felőli oldalon megkötí az albumint és az endotél sejteken keresztül kb. 15 másodperc alatt a szövet felőli oldalra juttatja. Átlagosan a keringő HSA 5%-a lép ki óránként a sejtközötti térbe, ez azonban többszörösére is nőhet tumor szövetek közelében, itt ugyanis az erek fala gyakran szabálytalan, lyuggatott; másrésről egy albuminkötő fehérje a SPARC („*secreted protein acidic and rich in cysteine*”) mennyisége fokozódik a sejtközötti térben. Továbbá rákos szöveteknél rendszerint hiányzik a nyirokkeringés, ami visszajuttathatná a fehérjéket a keringésbe. A szabálytalan érrendszerből és a nyirokerek hiányából fakadó szövetközi folyadékpangást nevezik fokozott permeabilitás és visszatartás hatásnak („*enhanced permeability and retention effect*”). Normális esetben a HSA sejten belüli mennyisége elenyésző, azonban bizonyos mellrákos sejtekben emelkedett szintje figyelhető meg [9,74].

3.5.1. ábra. A HSA szerkezete: az alegységek jelölése és a főbb kötőhelyek elhelyezkedése {Protein Data Bank: 1E7I, [75,76]}.

A HSA 585 aminosavból álló, három egységre (I–III) és azokon belül két-két alegységre (A, B) tagolódó egyszerű, globuláris fehérje (3.5.1. ábra). A HSA számos kötőhellyel rendelkezik zsírsavak és egyéb szerves vegyületek, valamint fémionok számára. A zsírsavak közül a közepes és hosszú szénláncúakat szállítja a fehérje [74]. A kötött zsírsavak fontos szerepet játszanak a fehérje természetes konformációjának kialakításában, például gyorsítják az albondin-függő transzportot az endotélen át. Az apolárisabb szerves anyagok számára három hidrofób zseb található az albuminon. Az első két zseb a klasszikus Sudlow osztályozás szerint az I-es és II-es kötőhely [74,77]. Előbbi a fehérje IIA alegységében található, tipikusan nagyobb méretű centrálisan negatív töltéssel bíró heterociklusos vegyületeket köt. Az I-es kötőhelyen nagy affinitással kötődik a warfarin (WF), további ligandumok a szalicilátok, szulfonamidok, fenilbutazon és fenitoin. A II-es kötőhely a IIA alegységben helyezkedik el; itt általában aromás semleges, vagy egy perifériás csoportjukon negatív töltésű vegyületek kötődnek. Jellemző ligandumai a diazepam, ibuprofen, klofibrát [74]. A III-as kötőhely viszonylag újonnan felfedezett; az IB alegységben található, főként zsírsavak megkötésében vesz részt, azonban flexibilis szerkezetének köszönhetően igen változatos szerkezetű vegyületek képesek itt kötődni, mint például a metilnarancs, a hemin, a daunorubicin és különböző cefalosporinok [78]. A

bilirubin (BR) – egy endogén metabolit – korábbi források szerint nagy affinitással kötődik az I-es kötőhelyet átfedve, újabb irodalmak azonban a III-as kötőhelyen való kölcsönhatást feltételezik [74,78]. Utóbbi esetben a BR „versengését” az I-es kötőhely-markereivel allosztérikus okokra vezetik vissza. A kötési erősségek szemléltetése céljából néhány – a HSA-hoz specifikusan kötődő – vegyület látszólagos kötési állandóját az 3.5.1. táblázatban tüntettük fel.

3.5.1. táblázat. Néhány vegyület HSA-nal képzett komplexének látszólagos kötési állandója ($\lg K'$).

kötőhely	vegyület neve ^a	kötési állandó ($\lg K'$)
<i>I-es kötőhely</i>	WF	5,5–6,0 [79,81]
	fenilbutazon	5,8 [74]
	fenitoin	3,8 [74]
	BR ^b	6,7–8,0 [82,83]
<i>II-es kötőhely</i>	diazepam	5,6 [74]
	ibuprofen	6,4 [74]
	klofibrát	5,9 [74]
<i>III-as kötőhely</i>	metilnarancs	~ 5 [78]
	daunorubicin	~ 3 [78]
	hemin	~ 8 [78]

^a A rövidítések magyarázatát lásd Rövidítések jegyzéke;

^b a kötődés helye nem tisztázott (I vagy III).

A HSA molekulán található négy fémion-kötőhely, ezek rendre az N-terminális, az A-zseb (*site A*, *multi metal binding site*), a B-zseb (*site B*) és a Cys34 aminosav [29]. Az N-terminális egy jól konzervált Asp-Ala-His kezdőszekvenciát tartalmaz. A His imidazol, His és Ala amid nitrogének és az Asp aminocsoportja síknégyszetes koordinációs szférát kialakítva főként Cu(II) és Ni(II) megkötésére alkalmas. Az A-zseb az I-es és II-es egység felszínén helyezkedik el. Itt kötődik a Zn(II) és a Cd(II), a koordinációs szférát His, Asn és Asp aminosavak alkotják. A B-zseb helye kérdéses, képes Cd(II)- és Mn(II)-ionokat megkötni. A Cys34 adja a fehérje egyetlen szabad tiolcsoportját, a maradék 14 darab Cys intramolekuláris kénhidakat képez. A Cys34 tiolcsoport pK_a -ja az irodalomban vitatott, 5 és 8,8 között változik [29]. Fiziológias körülmények között a Cys34 az oldószertől védve az IA alegységben két hélix közötti hasadékban található. Kialakulhatnak kénhidas HSA dimerek, azonban ez a fehérje részleges denaturációját igényli. A HSA tiolcsoportja fiziológiásan közel 75%-ban szabad, a többi heterodimereket képez a szérumban található Cys-nel, homoCys-nel; kis mennyiségben NO-t kötve S-nitrosoalbuminként van jelen a keringésben. Itt kötődnek a kaptopril, penicillamin, diszulfiram hatóanyagok. A Cys34 közelében nincsenek további lehetséges koordinálódó csoportok, így csak az egyfogú kén-koordinációt kedvelő Hg(II)-, Au(I)- és Pt(II)-ionok kötődnek itt [9,29,74,84].

Meg kell említeni, hogy a HSA egyre kedveltebb hatóanyag hordozó egység. A HSA-hoz kötődő anyagok látszólagos oldhatósága javul, kiegyensúlyozott koncentrációban tovább maradnak a keringésben, mivel a metabolikus rendszer számára a fehérjéhez kötött hatóanyag

nem hozzáférhető. Lehetséges a HSA–hatóanyag adduktum előzetes kialakítása és nanorészecskékként történő adagolása. Ez valósult meg a paclitaxel tartalmú rákellenes szer, az Abraxane® esetében [10]. De lehetséges az is, hogy a szervezeten belül alakuljon ki a hordozó rendszer, ilyenkor gyakran valamilyen HSA-hoz jól kötődő molekularészt kapcsolnak a hatóanyaghoz, mint például a (6-maleimidokaproil)-hidrazonnal kapcsolt doxorubicin (INNO-206). Itt a maleimid funkció az albumin Cys34-es tiolcsoportjához kovalensen kötődik (tioéter keletkezik), majd a rákos szövetekre jellemző savas környezetben a hidrazon funkciós csoportnak köszönhetően a hatóanyag disszociál a fehérjéről [10].

3.5.2. A humán szérum transferrin

A Tf a szervezet specifikus vasszállító fehérjéje a vérben, szérumkoncentrációja $\sim 37 \mu\text{M}$. Két homológ egységből (C, N) épül fel, összesen 678 aminosav alkotja. Mindkét alegységében 1-1 vaskötő hely található; ahol két Tyr egy His és egy Asp aminosav O-, ill. N- donoratomjai koordinálódnak a fémionhoz, az 5. és 6. kötési helyen egyetlen szinergista CO_3^{2-} kétfogúan koordinálódik (3.5.2. ábra) [70,85]. A Fe(III)-ionnal telített formát holo-transzferrinnek (holoTf), a fémion-mentes formát apo-transzferrinnek (apoTf) nevezik. A kötőhely Fe(III)-ionra igen szelektív, de más, hasonló töltésű és méretű iont is képes megkötni (pl. Al(III), Ga(III), Ru(III), Ti(IV), V(IV)O, Cr(III)) [70,85].

3.5.2. ábra. A holoTf szerkezete: a C- (kék) és N-egység (zöld); jobb oldalon a Fe(III) koordinációs szférája a C-egységben {Protein Data Bank: 3QYT, [75,76]}.

A vérben keringő Tf átlagosan 30%-ban telített Fe(III)-ionokkal. A Fe(III) tartalmú Tf-t a sejtfelszíni Tf receptorok felismerik, belép a sejtbe, ott savas endoszómában disszociál a fehérje komplex és a fémion megfelelő rendeltetési helyére kerül. A holoTf-ből egyik fent említett fémion sem képes kiszorítani a Fe(III)-iont. A fehérjéhez kötődő első és második Fe(III) két látszólagos makroállandóval jellemezhető komplexet képez: $\lg K_1 = 21,91$, $\lg K_2 = 20,62$ (25 mM HCO_3^- jelenlétében) [86]. Ugyanezek a kötési állandók Al(III) esetén ~ 13 és $\sim 12,3$; valamint Ga(III) esetében 20,3 és 19,3 [87]. A Ga(III) esetében a kötési állandókat segéd-komplekxképzők jelenlétében határozták meg, mert a fémion önmagában inert hidroxidokomplekxet képezne a vizsgált pH-n. A Ga(III)-citrát reagál az apoTf-nel, mindkét kötőhelyre bekötődik a fémion és a Tyr-ok koordinációja mellett a kölcsönhatás kialakulásához ebben az esetben is karbonát jelenléte szükséges. A reakció viszonylag gyors, 10-40 perc alatt lezajlik. A Ga(III)-ionokkal

telített Tf-t felismerik a receptorok és felveszik a sejtek [70]. A Tf transzporter szerepe azonban nem kizárólagos, más mechanizmus szerint is a sejtekbe kerülhet a Ga(III) [88].

A KP1019 affinitása a Tf-hez ugyan nem elegendő ahhoz, hogy kiszorítsa a kompetítorként alkalmazott Al(III)-iont annak Tf-komplexéből, de megfigyelték, hogy a KP1019 szintén képes kötődni az apoTf-hez [4,24,44]. A reakció percek alatt lezajlik, koordinatív kötés azonban csak a His aminosavval alakul ki egy ligandum lecserélődése révén. Az ílymódon két Ru(III)-kompleksszel telített Tf-t azonban nem veszik fel a sejtek. Hasonló módon, valószínűleg a fémionok Fe(III)-tól eltérő mérete miatt az Al(III) és In(III) Tf komplexei sem képesek belépni a sejtekbe [70].

4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. Felhasznált anyagok

A felhasznált vegyszerek (ligandumok, markerek, fémtörzsoldatok lúg- és sav mérőoldatok, oldószerek, puffer alapanyagok stb.) nagy része Sigma-Aldrich, Fluka, VWR vagy Reanal termék. Sigma-Aldrich termék a $[(\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*))_2(\mu\text{-Cl})_2\text{Cl}_2]$ dimer, a zsírsavat is tartalmazó HSA (A1653 és A8763), az apoTf (T2036), a humán vérszérum (H4522) és a borjú csecsemőmirigy DNS (ct-DNS; D1501). Minden oldat készítéséhez ioncserélt majd kétszer desztillált vizet használtunk.

Az oxaliplatint; a KP1537, KP2155, KP2156, KP2157, KP1019 KP1339, KP46; a Ru(II)- és Os(II)-nitrozil komplexeket (**1-5**); valamint az allomaltolt (5-hidroxi-2-metil-pirán-4(1H)-on) és a tiomaltolt (3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-tion) a Bécsi Egyetem Szervetlen Kémiai Intézetében (Institute of Inorganic Chemistry, University of Vienna, Bécs, Ausztria) szintetizálták Bernhard K. Keppler kutatócsoportjában. KP2155 = $[\text{Pt(IV)}(\text{etilén-diamin})\text{Cl}_2 \text{ transz-(2-maleimidoetil-karbaminsav)}_2]$; KP2156 = $[\text{Pt(IV)}(1\text{R},2\text{R})\text{-1,2-ciklohexándiamin})\text{Cl}_2 \text{ transz-(2-maleimidoetil-karbaminsav)}_2]$; KP2157 = $[\text{Pt(IV)}(1\text{R},2\text{R})\text{-1,2-ciklohexándiamin})\text{Cl}_2 \text{ transz-(2-szukcinimidoetil-karbaminsav)}_2]$.

A Ru(III)-szalán- (S8, S10), valamint a Ru(II)-phen- (CM8, CM16) komplexek a Lisszaboni Egyetemen a Kémiai és Biokémiai Tanszéken Maria H. Garcia és Ana Isabel Tomaz vezetésével készültek (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Lisbon, Lisszabon, Portugália). CM8 = $[\text{Ru(II)}(\text{phen})_2(2\text{-(benzo[b]tiofén-2-il)piridin})] (\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$; CM16 = $[\text{Ru(II)}(\text{phen})_2(2\text{-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol})] (\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

A redukált Schiff-bázis kumarin származékokat (továbbiakban kumarin ligandumok) Bernadette S. Creaven kutatócsoportjában állították elő (Department of Science, Institute of Technology Tallaght, Dublin, Írország).

A fehérje és ct-DNS törzsoldatok mindig adott választott pufferben készültek (ld. 4.1.1. táblázat). A fehérje törzsoldatokat 24 órán belül felhasználtuk. A HSA, és az apoTf törzsoldatok pontos koncentrációját minden esetben UV-látható fotometriásan határoztuk meg az irodalmi moláris abszorbanciák alapján: $\varepsilon_{280\text{nm}}(\text{HSA}) = 36850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [89]; $\varepsilon_{280\text{nm}}(\text{apoTf}) = 92300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [90]. Az apoTf-nel végzett kísérleteknél a puffer rendszerint 25 mM NaHCO_3 -ot is tartalmazott, ez a fiziológiás szérum HCO_3^- koncentrációjának felel meg. A humán szérummal a jobb kezelhetőség érdekében 4-szeres hígításban dolgoztunk. A ct-DNS-ből 1 mg/cm^3 közelítő pontosságú oldatot készítettünk és egy éjjelen át kevertettük 4°C -on, a ct-DNS törzsoldatok ennek további hígításával készültek, az előbbi oldatot maximum 4 napig használtuk. A ct-DNS törzsoldatok koncentrációját szintén UV-látható fotometriásan határoztuk meg, $\varepsilon(\text{nukleotid})_{260\text{nm}} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [91]. A ct-DNS törzsoldatok fehérjementességét a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciák arányával ellenőriztük, az oldatok megfeleltek a $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ követelménynek [91].

A kloridion-mentes $[\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ törzsoldatok előállításához előzetesen a $[(\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*))_2(\mu\text{-Cl})_2\text{Cl}_2]$ dimerből készítettünk törzsoldatot, ennek pontos koncentrációját pH-potenciometriás titrálásokkal határoztuk meg. Ehhez adtunk a kloridion-tartalommal

ekvivalens (a $[\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ mennyiséghez mért kétszeres) mennyiségű pontos koncentrációjú AgNO_3 -mérőoldatot. Az elegyet sötét helyen kevertettük 1 órán keresztül, majd a csapadékot többszörös centrifugálással és papíron való szűréssel távolítottuk el. Az így kloridion-mentesített oldat koncentrációját pH-potenciometriásan határoztuk meg. (A klorid- ill. ezüstion-mentességet mindig ellenőriztük.) A továbbiakban az egyszerűség kedvéért a $[\text{Rh(III)}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexekben a fémion +3-as oxidációs állapotát nem jelöljük.

A GaCl_3 -törzsoldatot vízmentes GaCl_3 0,025 M HCl-ban való feloldásával készítettük. A Ga(III)-tartalmat EDTA-val, közvetlen komplexometriás titrálással határoztuk meg. Az oldat savtartalmát pH-potenciometriás titrálással, ill. ismert mennyiségű extra savat tartalmazó minták pH-jának közvetlen mérésével határoztuk meg.

A 0,10, ill. 0,20 M-os lúg mérőoldat a következőképpen készült: a KOH pasztillákat karbonátmentesre mostuk és argon atmoszféra alatt desztillált vízben, vagy megfelelő DMSO/víz keverékoldószer elegyben oldottunk. A kívánt ionerősséget szükség szerint KCl vagy KNO_3 sóval állítottuk be.

A dolgozatban vizsgált fémkomplexek, fém-ligandum rendszerek, ligandumok szerkezeti képletét és jelölését a 4.1.1. ábra tartalmazza.

4.2. A vizsgálati módszerek elvi alapjai, alkalmazott kísérleti körülmények

Klasszikus oldategyensúlyi méréseket a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ - és a Ga(III)-komplexek, valamint a kumarin ligandumok esetén végeztünk.

A fehérje, vagy DNS kölcsönhatások vizsgálatakor a mérési körülményeket az adott rendszertől függően választottuk meg. A jobb átláthatóság érdekében ezt táblázatos formában közöljük a vizsgált vegyületcsoportok szerint csoportosítva (4.1.1. táblázat). A módosított PBS („*phosphate buffered saline*”) puffer (PBS*) összetétele a táblázat aláírásban található.

A makromolekulákkal való kölcsönhatások vizsgálatakor minden esetben minimum két párhuzamos kísérletet végeztünk. A mérésekhez egyedi mintákat készítettünk, a „titrálások” tehát önálló minták sorozataiból álltak össze.

Pt(II)-komplexek

R = Me: KP1537

H: oxaliplatin

Pt(IV)-komplexek

Y=

(1a): KP2155

(2a): KP2156

(2b): KP2157

bisz-indazol-Ru(III)-komplexek

ellenion:

Na⁺

KP1019 KP1339

Ru/Os(II)-nitrozil komplexek

1: Na *cisz*-[OsCl₄NO(Ind)]

2: Na *transz*-[OsCl₄NO(Ind)]

3: Na *transz*-[RuCl₄NO(Ind)]

4: (HInd) *transz*-[OsCl₄NO(Ind)]

5: (HInd) *transz*-[RuCl₄NO(Ind)]

az általános képlet *transz* konfigurációjú

Ru(III)-szalán komplexek

4-MeO: S8

5-MeO: S10

Ru(II)-phen komplexek

[CF₃SO₃]₂

CM8

CM16

[Rh(η⁵-Cp*)]-komplexek ligandumai

kumarin ligandumok

	R ₁	R ₂
1a	H	H
1b	Cl	Cl
1c	Br	Br
1d	I	I
1e	H	NO ₂

Ga(III)-komplexek ligandumai

maltol, tiomaltol, allomaltol;

oxin

szulfoxin

[Ga(III)(maltolát)₃] = GaM

[Ga(III)(oxinát)₃] = KP46

4.1.1. ábra. A dolgozatban vizsgált fémkomplexek, fémkomplex-ligandum rendszerek és ligandumok szerkezeti képlete és jelölésük a dolgozatban (a Ru(III)-szalán komplexek gyűrűszámazása a szerzők rendhagyó számazása alapján történt [53]).

4.1.1. táblázat Az egyes fehérje/DNS^a–fémkomplex(/ligandum) rendszereknél alkalmazott kísérleti körülmények, mérési módszerek.

vizsgált vegyületek		T (°C)	puffer ^b	I ^c (M)	DMSO (%(V/V))	módszer ^d
vegyület csoport	jelölés					
Pt(II)-komplexek	KP1537, oxaliplatin	37	foszfát 20 mM	0; 0,10; 0,20 (NaCl)	-	Flu; UF–ICP-MS; STD NMR
Pt(IV)-komplexek	KP2155, KP2156, KP2157	25	foszfát 20 mM	0,10 (NaCl)	2	UV-látható
bisz-indazol-Ru(III)-komplexek	KP1019, KP1339	25 37 ^e	foszfát 20 mM	0,15 (NaCl)	-	Flu; UF; CZE
Ru/Os-nitrozil komplexek	1-5	25	foszfát 20 mM	0,10 (NaCl)	-	Flu; UF
Ru(III)-szalán komplexek	S8, S10	25	HEPES 10 mM	-	2	Flu; TCSPC
Ru(II)-phen komplexek	CM8, CM16	25	HEPES 10 mM	-	-	Flu; TCSPC
[Rh(η^5 -Cp*)]-komplexek ^f	[Rh(η^5 -Cp*)(dhp)], [Rh(η^5 -Cp*)(pic)]	25	PBS* ^g foszfát 20 mM ^e	0,10 ^f -	-	Flu; UF; UV-látható; CZE; ¹ H NMR
Ga(III)-komplexek	KP46, GaM	25	HEPES 20 mM ^h	0,10 (KCl)	-	Flu; UF; UV-látható; ¹ H/STD NMR
kumarin ligandumok	1a-1e	25	foszfát 20 mM	-	1	Flu

^a A DNS-sel való kölcsönhatást a Ru(III)-szalán és Ru(II)-phen komplexek esetén vizsgáltunk, a többi vegyületnél a HSA-nal, vérérummal, ill. apoTf-nel való kölcsönhatást követtük;

^b pH = 7,40;

^c csak az ionerősséget állító só(ka)t számítva;

^d Flu: fluorimetria; UF: ultraszűrés (önmagában: UV-látható detektálással kombinálva); a többi rövidítést ld. *Rövidítések jegyzéke*;

^e CZE mérésekhez;

^f dhp = 1,2-dimetil-3-hidroxi-piridin-4(1H)-on (Deferiprone), pic = pikolinsav;

^g PBS*: 1,5 mM KCl; 101 mM NaCl; 12 mM Na₂HPO₄; 3 mM KH₂PO₄;

^h apoTf tartamú mintáknál 25 mM NaHCO₃-ot is tartalmazott a puffer.

4.2.1. A pH-potenciometria

A pH-potenciometria a pH-effektussal járó komplexképződési folyamatok egyik legáltalánosabb vizsgálati módszere. Alkalmazhatóságának feltétele, hogy a ligandum fémionhoz történő koordinációját mérhető pH-effektus kísérje, azaz a komplexképződés az oldat pH-jának megváltozásával járjon. A H^+ -ion koncentrációjának mérésével következtethetünk a képződő fémkomplexek stabilitására és összetételére. A komplexképződés az alábbi általános egyenlettel írható le (a töltések jelölésétől az egyszerűség kedvéért eltekintünk):

ahol M : fémion, L : ligandum, H : proton; p, q, r : sztöchiometriai együtthatók. Ez alapján a képződő részecskék stabilitási szorzata a következő:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (2)$$

A képződő komplexek összetételének és stabilitási szorzatainak meghatározásához a PSEQUAD programot használtuk [92]. Az értékelések során komponensként szerepeltek: a fémion (M); a teljesen deprotonált ligandum (L) és a proton (H). A programban bemenő adatként szerepelnek továbbá a mintához adagolt mérőoldat-térfogat-pH kísérleti adatpárok, az asszociátumok (különböző protonáltsági fokú ligandum részecskék, $M_p L_q H_r$ komplexek, és hidroxidkomplexek) száma, az asszociátumok összetétele, a komponensek kiindulási teljes koncentrációja, a minta kiindulási térfogata, az ismert és az ismeretlen (közelítő) stabilitási szorzatok és különböző állandók, pl. titráló oldat koncentrációja, vízionszorzat, Irving-féle korrekciós tényező. A program a keresett stabilitási szorzatokat az M, L és H komponensekre felírt anyagmérleg-egyenletek (3-5 egyenletek) megoldásával adja meg, ahol n a rendszerben képződő asszociátumok számát jelöli.

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (3)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (4)$$

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

A program az általunk feltételezett asszociátumok és közelítő stabilitási szorzatok figyelembevételével, Newton-Raphson iterációval végzi a közelítést egészen addig, amíg a titráló oldatra nézve a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}})^2$ érték minimumot ad, ahol V a titráló oldat térfogata. A program minden megadott pH-értéknél kiszámolja a képződő részecskék egyensúlyi koncentrációját és az adott pontokhoz tartozó standard deviációk értékét. Az iterációsorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási szorzatokat, a kísérleti és a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó illesztési paramétert, ami a $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}}|$ értékek átlaga és egy adott komponensre vonatkozóan kirajzolja az asszociátumok koncentráció eloszlási görbét a pH függvényében. *A dolgozatban közölt stabilitási állandók után zárójelben szereplő szám az állandó utolsó számjegyével azonos nagyságrend szerinti standard deviáció értékét jelöli. A*

feltételezett asszociátumok egy adott összességét nevezzük a rendszer egy modelljének. Az a modell fogadható el, mely kémiai megfontolások alapján értelmezhető, és amelynél az illesztési paraméter a legkisebb. Az elfogadott illesztési paraméter mindig kisebb volt, mint $1 \times 10^{-2} \text{ cm}^3$. A ligandumok protonálódási állandóinak meghatározására minden esetben a HYPERQUAD nevű programot használtuk [93], aminek előnye, hogy lehetőség van a ligandum- és a protonkoncentrációk finomítására is. A koncentrációeloszlási görbék számolása a komplexek összetételének, stabilitási állandójának és a komponensek teljes koncentrációjának ismeretében a MEDUSA nevű program segítségével történt [94].

A fémkomplexek stabilitásának jellemzésére gyakran hasznátunk ún. származtatott állandókat ($\lg K^*$), melyek figyelembe veszik a koordinálódó ligandumok eltérő bázicitását, így a különböző ligandumokkal képzett komplexek stabilitása közvetlenül is összehasonlítható. A dolgozatban – ahol indokolt volt – a következő egyensúly alapján számoltunk:

pH-potenciometriás vizsgálatokat a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ - és a Ga(III)-komplexek esetén végeztünk. A pH-potenciometriás mérésekhez Orion 710A pH-mérőt, Metrohm Dosimat 665 típusú automata bürettát, valamint Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrodát alkalmaztunk. A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek, valamint a Ga(III)–maltol rendszer esetében kloridion-mentes méréseket is végeztünk, ehhez Metrohm „double-junction” 6.0255.100 elektrodát használtunk, a külső töltet telített KNO_3 oldat volt. Tisztán vizes közegű méréseknél az ionerősséget 0,20 M-re állítottuk KCl-dal vagy KNO_3 -tal ($[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek, Ga(III)-(tio)maltol, -szulfoxin rendszerek). 0,10 M KCl volt az ionerősséget állító só a 30, ill. 60% (m/m) DMSO/víz keverékoldószer elegyekben, amiket a Ga(III)–maltol, –oxin és –szulfoxin rendszereknél alkalmaztunk. A mérőműszer hitelesítése 0,05 M KH-ftalát oldatra ($t = 25^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 4,008$), valamint a vízionszorzat értékére ($I = 0,20$ vagy $0,10 \text{ M}$ (KCl/KNO_3); $t = 25^\circ\text{C}$; $\text{p}K_{\text{W}} = 13,76 \pm 0,01$ [95]) történt. A DMSO/víz keverékoldószerben kivitelezett méréseknél $\text{p}K_{\text{W}} = 14,53 \pm 0,05$ (30% (m/m) DMSO) és $16,15 \pm 0,01$ (60% (m/m) DMSO) volt. A titrálásokat ismert koncentrációjú, KH-ftalát oldatra meghatározott karbonátmentes KOH mérőoldattal végeztük. A pH-mérő által mért értékek pH-értékre való alakítását az Irving és munkatársai által javasolt módszerrel végeztük [96]. Valamennyi egyensúlyi mérésnél a hőmérséklet $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ volt. A méréseket argon atmoszféra alatt végeztük, és a mintákon titrálás előtt 10 percig argont buborékkoltattunk át. A pH-potenciometriás méréseket $\text{pH} = 2\text{--}11,5$ tartományban végeztük (DMSO/víz elegyekben $\text{pH} = 2\text{--}12,5$ (30% (m/m) DMSO) valamint $2\text{--}13,8$ (60% (m/m) DMSO)). Ha csapadékképződést tapasztaltunk, akkor pH-tól függetlenül abbahagytuk a titrálást. A mérésekhez elkészített minták 5 vagy 10 cm^3 térfogatúak voltak, ezekben a ligandum koncentrációja 0,8-4 mM között változott. A ligandumok savi disszociációs állandóit és a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ hidrolízis állandóit külön titrálásokban, csak a ligandumot vagy fémiont tartalmazó mintákban határoztuk meg. A komplexképződés tanulmányozása során a fém-ligandum arány rendszertől függően 1:1 és 1:8 között változott a mintákban. Általában egy rendszer tanulmányozása során 3-5 aránynál történtek mérések.

A pH-potenciometriás mérésekkel nyert információ igen fontos, azonban, ha két részecske képződése azonos pH-effektussal jár, akkor azok nem különböztethetők meg ezzel a módszerrel. Továbbá előfordulhat, hogy az adott rendszer több, kémiaileg reális modellel is ugyanolyan jó

illesztéssel leírható. A meghatározott stabilitási állandók nem nyújtanak információt a kialakult kötésmódokról és koordinációs geometriáról. Ezekben sokszor irodalmi adatokkal való összevetés nyújt közvetett segítséget. Érdekes azonban a pH-potenciometriás méréseket valamely spektroszkópai módszerrel (pl. NMR, ESR, UV-látható) kombinálni, hogy megbízható eredményeket kapjunk a kialakuló komplexek szerkezetét és stabilitását illetően.

4.2.2. ^1H NMR spektroszkópia

Az NMR spektroszkópia a mágneses atommagok (magspin ($I \neq 0$)) és a külső mágneses tér kölcsönhatásának vizsgálatán alapul. A magok mágneses momentuma a lokális mágneses térrel lép kölcsönhatásba, amit nagyban befolyásol a mag körüli elektroneloszlás. Ezt az ún. árnyékolási tényezővel jellemezhetjük, amely különböző minőségű és kémiai környezetben levő magok esetén eltérő, vagyis azok rezonanciafrekvenciája is különböző. A ^1H NMR spektroszkópia kiválóan alkalmas a ligandumok protonálódási folyamatainak, ill. fémkomplexek képződésének követésére. Klasszikus oldategyensúlyi méréseket a már említett $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ - és Ga(III) -komplexekkel végeztünk. A HSA-nal vagy apoTf-nel való kölcsönhatást a Pt(II) -, $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -, és Ga(III) -komplexeknél vizsgáltuk ^1H - vagy STD NMR mérésekkel (ld. 4.1.1. táblázat).

Az STD („*Saturation Transfer Difference*”) NMR spektroszkópia a kis affinitású ligandum-fehérje kölcsönhatásokról ad információt. A fehérje-ligandum kölcsönhatás mértékét differencia kísérlettel határozzuk meg. Ehhez két kísérletet kell végezni: az egyikben a fehérjét szelektíven telítjük, a másikban nem (referencia spektrum). A két kísérlet eredményeként kapott spektrumok különbsége az STD spektrum. Az STD spektrumban csak akkor van jel, ha a ligandum gyengén kötődik a fehérjéhez, mert ekkor a ligandum kötött és szabad formája gyors cserében van. Az STD mérésnél a fehérje egy jól elkülönülő protonját szelektíven besugározva a ligandummal való gyenge kölcsönhatás esetén a gyors csere miatt a mágnesezettség átkerül a ligandum molekulákra, és azok proton jelének megjelenését eredményezi. Minél közelebb kerül a ligandum protonja a fehérje kötőhelyéhez, annál intenzívebb STD jelet kapunk [97].

A ^1H NMR vizsgálatokat Bruker Ultrashield 500 Plus (500 MHz) típusú készüléken végeztük. Az STD NMR spektrumokat Bruker Avance III (600 MHz) készüléssel vettük fel. Az utóbbi készülékkel mértük nagy hígítású ($\sim 10\text{-}20\ \mu\text{M}$) mintáinkat is TXI (^1H , ^{13}C , ^{15}N) krio-mérőfejet használva. A pH-függő titrálásokhoz a pH-potenciometriához hasonló koncentrációjú és fém-ligandum arányú minták készültek. Változó fém-ligandum arányú méréseket is végeztünk adott pH-kon, ilyenkor rendszerint rögzített ligandumkoncentrációkat alkalmazva dolgoztunk és a fémion mennyiségét változtattuk a mintákban. A minták 10% (V/V) D_2O -t és belső standardként 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsavat (DSS) tartalmaztak. Az ionerősség megegyezett a tisztán vizes közegű pH-potenciometriás mérések ionerősségével. Méréseinket $25,0 \pm 0,1\ ^\circ\text{C}$ -on végeztük, a Ga(III) -tiomaltol rendszerénél hőmérséklet-függő spektrumokat is rögzítettünk $25\text{-}65\ ^\circ\text{C}$ tartományban.

Az NMR spektrumok kvantitatív kiértékelése – amennyiben szükséges volt – PSEQUAD programmal történt [92], ahol bemenő adatokként a kémiai eltolódás változást vagy az egyes

részecskefeleségekhez tartozó integrálok arányai alapján számolt egyensúlyi koncentrációkat adtuk meg.

A fehérje kölcsönhatások vizsgálatakor – ahol a fémkomplexek oldhatósága megengedte – 1 mM fémkomplex és 0,5 mM fehérje koncentrációkkal dolgoztunk. A Ga(III)-komplexek közül a KP46 komplexszel híg minták készültek: 20 μ M fémkomplex és 5 μ M HSA vagy 20 μ M apoTf koncentrációkkal. Ez utóbbi mintáknál 20 mM foszfát puffert használtunk, egyébként az 4.1.1. táblázatnak megfelelő pufferrendszereket alkalmaztuk. Fehérje modelles kísérleteinknél a fémkomplexek és a modellek koncentrációja 1,5-0,75 mM között változott. A minták minden esetben 10% (V/V) D₂O-t tartalmaztak. Az STD NMR méréseket és azok kiértékelését Dr. Hetényi Anasztázia végezte. Az STD méréseknél a fehérje telítéséhez 0,6 ppm-nél 2 másodpercig szelektíven sugároztuk be a mintát 7 °C-on („*on-resonance*”). A referencia kísérletnél a besugárzás frekvenciáját 40 ppm-re („*off-resonance*”) állítottuk. A fehérje szelektív telítését Gauss impulzusok sorozatával (40 darab 50 ms-os Gauss impulzus köztük 1 ms-os várakozási idő) értük el.

Minden NMR-es mérésnél WATERGATE vízelnyomási pulzusszekvenciát használtunk.

4.2.3. UV-látható spektrofotometria

Az UV-látható fotometriás technikát a dolgozatban sokrétűen alkalmaztuk az egyes rendszerek jellemzésére. Klasszikus oldategyensúlyi mérésekhez a [Rh(η^5 -Cp*)]- és a Ga(III)-komplexek, valamint kumarin ligandumok vizsgálatához vettük igénybe. A [Rh(η^5 -Cp*)]-komplexeknél a ligandum elnyelési sávjai mellett a fém-ligandum töltésátviteli sávokat is regisztráltuk. A Ga(III)-ionnak telített 3d alhéja van, ezért itt csak ligandumsávokat vizsgálhattunk. A mérésekből komplex stabilitási állandókat és/vagy ligandum savi disszociációs állandókat számoltunk a PSEQUAD programmal [92]. Itt a pH-potenciometriánál felsoroltak mellett további bemenő adatként szerepel a rendszerben képződő színes részecskék száma, és a különböző hullámhosszakon mért abszorbancia értékek. Az eredmények között a program a koncentrációeloszlás helyett az egyes (abszorbeáló) részecskék moláris abszorbanciáit adja a vizsgált hullámhosszakon.

Fotometriásan vizsgáltuk továbbá a Pt(II)-, Pt(IV)-, *bisz*-indazol-Ru(III)- és Ru/Os(II)-nitrozil komplexek hidrolitikus stabilitását. Kinetikai paraméterek meghatározására azonban nem törekedtünk.

Bizonyos esetekben a fehérjével való kölcsönhatásról is közvetlen vagy közvetett információt kaphatunk az UV-látható fotometriából. Ilyenkor általában a fehérje elnyelési sávoknál nagyobb hullámhosszakon detektálunk változásokat. Továbbá az ultraszűrt minták vizsgálatához, ill. a fluorimetriás spektrumok korrekciójához is vettünk fel UV-látható spektrumokat.

Az UV-látható spektrofotometriás méréseket Hewlett Packard 8452A diódasoros spektrofotométeren végeztük. Az optikai úthossz (*l*) rendszertől függően 0,5-4,0 cm között változott, annak érdekében, hogy értékelhető spektrumokat kapjunk. A klasszikus

oldategyensúlyi mérések a ^1H NMR-hez hasonlóan változó pH-n, ill. változó fém-ligandum arányok mellett készültek, általában μM -os koncentrációtartományban. Bizonyos esetekben $\text{pH} = 0,7\text{--}2,0$ minták is szükségesek voltak a stabilitási állandók meghatározásához, ekkor a pH -t a hozzáadott erős sav koncentrációja alapján számoltuk, az ionerősséget a megfelelő KCl/KNO_3 sóval egészítettük ki a kívánt értékre.

A fehérjékkel (HSA, apoTf) a Pt(IV) - és Ga(III) -komplexek esetében készültek UV-látható spektrofotometriás mérések. A Pt(IV) -komplexeknél a HSA Cys34-hez való kötődést vizsgáltuk közvetett módon 2,2'-ditiodipiridin (DTDP) segítségével. A módszer teszteléséhez és optimalizálásához ismert tiolvegyületeket: Cys-t és GSH-t is felhasználtunk. Ekkor a tiolvegyületek koncentrációját rögzítettük (Cys, GSH: $50\ \mu\text{M}$; HSA: $100\ \mu\text{M}$), és a DTDP mennyisége változott 0 és $100\ \mu\text{M}$ között. A Pt(IV) -komplexekkel való kölcsönhatás követéséhez a HSA szabad SH-csoportjához képest $4,0$ ekvivalens DTDP-t alkalmaztunk. A mérések elve és kivitelezése részletesen az 5.2. fejezetben található. A Ga(III) -komplexeikkel való vizsgálatoknál a fehérje koncentráció rendszerint $10\ \mu\text{M}$ nagyságrendbe esett, ehhez képest változtattuk a fémkomplexek koncentrációját $4\text{--}5$ -szörös feleslegig.

4.2.4. Spektrofluorimetria

A spektrofluorimetria napjaink közkedvelt vizsgálati módszere. Népszerűségét elsősorban nagyfokú érzékenységének (μM koncentrációtartománybeli mérések) és sokrétű felhasználhatóságának köszönheti. Számos alkalmazási területe van, pl: diagnosztikai leképezés, sejtes folyamatok követése; léteznek fémion-, hőmérséklet-, vagy pH -érzékeny fluorofórok; továbbá alkalmas lehet molekuladinamikai, molekulaszervezeti információk kinyerésére. A szerteágazó felhasználások két módszertanilag eltérő típusa az ún. egyensúlyi („*steady-state*”) és a fluoreszcencia-élettartam mérések. A belőlük nyerhető információ eltérő, azonban hasznos kiegészítői egymásnak. Mindkét módszerrel részletesen foglalkozik ez a fejezet.

A fluorimetria elméleti háttere a következő: bizonyos vegyületek az UV-látható sugárzás abszorpciója révén kialakuló gerjesztett állapotból fénykibocsátás útján jutnak vissza alapállapotba. Amennyiben a fénykibocsátást nem előzi meg spinátfordulás (külső konverzió, „*intersystem crossing*”), azaz szingulett állapotból sugároz az adott vegyület, úgy fluoreszcenciáról beszélünk. Ellenkező esetben triplett állapotból sugározva foszforeszcenciát tapasztalunk. A fluoreszkáló funkciós csoportokat egy molekulán belül fluorofóroknak nevezzük, jellemző módon piko-, nanoszekundumos fluoreszcencia-élettartammal bírnak. Oldat fázisban, kifejezetten vizes oldatokban szinte kizárólag fluoreszcenciával találkozhatunk, ugyanis ezek élettartama kellően rövid ahhoz, hogy ez alatt egyéb folyamatok (pl. ütközések) ne relaxálják a gerjesztett molekulát. A fluorofórok jellemzően kiterjedt delokalizált elektronrendszerrel bírnak és planáris szerkezetűek. Ilyen fluoreszcens vegyületek például az aromás aminosavak a fenilalanin (Phe), a tirozin (Tyr) és a triptofán (Trp) [52]. A Phe emissziója általában elhanyagolható, az utóbbi két aminosavat viszont gyakran használják valamilyen fluoreszcens technikához, hogy információt szerezzenek egy fehérje szerkezetéről, kölcsönhatásairól.

Az általunk tanulmányozott két fehérje, a HSA és a Tf is tartalmaz Tyr és Trp aminosavakat. A HSA-ban egyetlen Trp van a 214-es pozícióban, ez az I-es hidrofób kötőhely közelében található. A Trp szelektíven gerjeszthető 295 nm-en. Tehát, ha az I-es kötőhelyhez kötődik egy vegyület, akkor ott megváltoznak a hidrofób-hidrofil viszonyok, ami hatással van a Trp emissziójának intenzitására. Az ilyen típusú vizsgálatok az ún. fluoreszcencia kioltás („*quenching*”, kvencselés) jelenségén alapulnak: a HSA kezdeti emissziós intenzitása valamely vegyület hozzáadásával folyamatosan csökken, a csökkenés mértékéből pedig a fehérje-ligandum kölcsönhatásról, a kötés erősségéről nyerhetünk információt. Hasonlóképpen a Tyr-nal való kölcsönhatás is tanulmányozható, ekkor a gerjesztő hullámhossz 280 nm. Az ilyen típusú kísérleteket a továbbiakban kioltásos mérésekként említjük a dolgozatban.

Néhány esetben a vizsgálni kívánt kismolekula (ligandum, fémkomplex) maga is fluorescens. Ekkor bizonyos esetekben követhetők a ligandumok deprotonálódási folyamatai vagy maga a komplexképződés (pK_a , ill. $\lg\beta$ meghatározása is lehetséges), de a nagymolekulákkal való kölcsönhatások közvetlen követése is lehetővé válik.

Legtöbb esetben a molekulák közötti kölcsönhatások közvetlenül nem követhetők fluorimetrián, ekkor alkalmazhatóak a fluoreszcens markerek. A dolgozatban fehérje és DNS-markerekkel is dolgoztunk. Az albumin hidrofób zsebeinek markerei a WF és BR (I-es kötőhely), valamint a danzil-glicin (DG) (II-es kötőhely). DNS-markerekként etídium-bromidot (EB) és 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) használtunk, ezek kötéstípus markerek. Az EB interkalálódó vegyület, míg a DAPI a DNS kis árkában kötődik. Az általunk használt markerekre mind érvényes, hogy önmagukban alig vagy egyáltalán nem emittálnak; a fehérjéhez, vagy DNS-hez való kötődéssel azonban többszörösére nő fluoreszcens intenzitásuk és általában az emissziós maximumuk pozíciója is megváltozik. Ha a marker-makromolekula rendszert alkalmas kompetítorral titráljuk, akkor a marker kiszorul kötőhelyéről, így a mért intenzitás csökken.

4.2.4.1. Egyensúlyi, „*steady-state*” fluorimetria

A fluorimetriás méréseket igen híg oldatokban végezzük (μM -os koncentrációk) a jelentős belső filter hatás és az önabszorpció elkerülése érdekében. A belső filter hatás a gerjesztő fény elnyelését, míg az önabszorpció az emittált fény elnyelését jelenti. Célszerű tehát az adott hullámhossz tartományban $A < 0,05$ elnyelésű mintákat vizsgálni. Ha ez nem lehetséges, úgy a mért intenzitás korrekciója szükséges, ehhez a következő képletet használtuk (az intenzitást a továbbiakban a szokásos I helyett F-el jelöljük) [52]:

$$F_{\text{kor}} = F_{\text{mért}} \times 10^{(A_{\text{EX}} + A_{\text{EM}})/2} ; \quad (9)$$

ahol $F_{\text{mért}}$ és F_{kor} a mért és a korrigált fluoreszcens intenzitások, A_{EX} és A_{EM} a minta gerjesztő és emissziós hullámhosszon mért abszorbanciája.

A fluorimetriás mérések kvantitatív kiértékelésére az ad lehetőséget, hogy megfelelő körülmények között a mért intenzitás egyenes arányban függ a fluorofór(ok) koncentrációjától. Méréseinket szoftveresen a PSEQUAD programmal értékeltük ki [92]. A program alkalmas teljes spektrumok analízisére, és képes egyszerre több emittáló komponens figyelembevételére. A program a 4.2.1. és 4.2.3. fejezetben már leírt bemenő adatok alapján számol, azzal a kiegészítéssel, hogy bemenő adatként intenzitásokat és az emittáló részecskék számát adjuk meg.

Ha fehérjével való kölcsönhatást vizsgálunk, akkor az (1) egyensúlyi reakcióhoz hasonlóan felírható:

$$\beta_{pq}' = [(\text{ligandum})_p(\text{fehérje})_q] / ([\text{ligandum}]^p [\text{fehérje}]^q) ; \quad (11)$$

ahol β_{pq}' – látszólagos stabilitási szorzat fehérje–ligandum komplexre

$[x]$ – x komponens egyensúlyi koncentrációja

q, p – sztöchiometriai együtthatók, = 1 (ha az egyes kötőhelyekkel való kölcsönhatások 1:1 arányú reakciókként értelmezhetők)

ligandum – ligandumok, ill. kötőhely-markerek, fémkomplexek

Az anyagmérlegek pedig ennek megfelelően a (3)-(5) egyenletekkel analóg módon felírhatóak. A koncentrációk és a mért emissziós intenzitás között a fenti rendszerre a következő egyenlet teremt kapcsolatot:

$$F_i = \phi_{\text{ligandum}}^i \times [\text{ligandum}] + \phi_{\text{fehérje}}^i \times [\text{fehérje}] + \phi_{\text{fehérje-ligandum}}^i \times [\text{fehérje - ligandum}] \quad (12)$$

Itt F_i az i -edik hullámhosszon mért emissziós intenzitás és ϕ_x^i az x komponens “moláris emissziója” i -edik hullámhosszon. A program az UV-látható számolásokhoz hasonlóan megadja az emittáló komponensek „egyedi spektrumát”, ennek információtartalma azonban kevesebb, mivel a számolt moláris intenzitás a műszertől és annak beállításaitól is függ. Ennek megfelelően a dolgozatban közölt intenzitásokat is önkényes egységben ($a.u.$) adtuk meg.

Hasonlóképp számolhatók kiszorítási állandók egy makromolekula–marker–kompetítor rendszerre. Itt a marker kötési állandóját előzetesen meghatározzuk, majd rögzített marker:makromolekula arányú mintákat titrálunk a kompetítorral.

A DNS-sel való kölcsönhatás PSEQUAD programmal való kiértékelése hasonló módon történik, de valamivel bonyolultabb, ezzel az 5.4. fejezet foglalkozik részletesen.

A Ga(III)–oxin rendszer esetében a pH-függő komplexképződés követésére is használtunk fluorimetriát, a méréseket a 4.2.3. fejezetben tárgyalthoz hasonlóan értékeltük ki.

A fluorimetriás méréseket hagyományosan szokás linearizációs módszerekkel kiértékelni. Ezek közül leggyakrabban használt a Stern-Volmer-féle egyenesillesztés, ill. további módszerek a Lineweaver-Burk- és Scatchard-illesztés [52,98,99]. A dolgozatban példaképpen a Stern-Volmer módszerrel végeztünk számolásokat. Az összefüggés kioltásos mérések kiértékelésére használható:

$$F_0 / F = 1 + [Q] \times K_{SV}; \quad (13)$$

ahol F_0 és F a „kioltó” vegyület távol-, majd jelenlétében mért emisszió és $[Q]$ a „kioltó” egyensúlyi koncentrációja, K_{SV} a Stern-Volmer állandó, amit szokás kötési állandóként értelmezni. A $[Q] - F_0/F$ függvény pontjai ideális esetben egyenest adnak, és annak meredeksége adja a kötési állandót. Az előbbi összefüggés feltételezi a teljes – $\emptyset$ mért intenzitásra való – kioltást. Amennyiben csak részleges kioltás van, úgy a (13) képlet a következőképpen módosul:

$$F_0 / (F_0 - F) = 1/(f_a \times K_{SV} \times [Q]) + 1/f_a \quad (14)$$

Itt a kötési állandó az y-tengelymetszet és a meredekség hányadosa. Az f_a tag a fluorofór hozzáférhető hányadát jelöli. Részleges kioltást tapasztalhatunk, ha a jelenlévő fluorofórok nem egyformán hozzáférhetőek a kioltó számára. A Stern-Volmer-illesztés egyenestől felfelé való elhajlását szinte mindig a statikus és dinamikus kioltás egyidejű meglétére vezetik vissza. A statikus kioltás jelenti a nem emittáló komplex kialakulását, míg a dinamikus kioltás csupán a gerjesztett állapot élettartama alatti ütközésekből fakad, így nem is jelenti a valós kötődés kialakulását. Az elterjedten használatos grafikus módszerek azonban csak egy hullámhosszon való kiértékelést tesznek lehetővé, az egyensúlyi koncentrációk helyett analitikai koncentrációkat használnak, és egyszerre csak egy emittáló részecske figyelembevételére alkalmasak.

4.2.4.2. Fluoreszcencia-élettartam mérések elve

A fluoreszcencia-élettartam mérések önálló módszerként is közkedveltek. Mi a dolgozatban egyensúlyi méréseink hasznos kiegészítéseként alkalmaztuk. Egy fluorofór élettartama (τ) alatt azt az átlagos időt értjük, amit gerjesztett állapotban tölt el, mielőtt visszatérne alapállapotba.

$$F(t) = F_0 \times e^{-t/\tau}; \quad (15)$$

ahol F_0 és $F(t)$ a nulla és t időpillanatban mért intenzitás. Ez egy exponenciális lecsengési görbének felel meg. Ha a mintában egyidejűleg több fluorofór van, akkor azok egy-egy élettartam (τ) és amplitúdó (α) taggal járulnak hozzá az adott t időpontban mérhető intenzitáshoz (F):

$$F(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \times e^{-t/\tau_i} \quad (16)$$

A τ -értékek minőségi információt hordoznak, változatlan értékük a fluorofór részecskék változatlan minőségére utalnak. Az α -tag az egyes fluorofórok mennyiségi hozzájárulását mutatja a mért intenzitáshoz, de nem alakítható közvetlenül koncentrációvá. Ez általában egy normált szám ($\sum \alpha_i = 1$). A mérésekből tehát nyerhető mennyiségi információ is. Elsődleges célunk azonban a fluoreszcens részecskék számának és minőségének követése volt. Ha egy titrálás során egy fluorofór élettartam értéke folyamatosan csökken, az dinamikus kioltásra utal, ami nem jelent adduktumképződést tartós kölcsönhatást.

Az élettartam méréseket „*time correlated single photon counting*” (TCSPC) üzemmódban végeztük. Az elrendezés azon alapul, hogy a lecsengés közvetlenül nem mérhető annak rövidecsége (ps- μ s) miatt. Ezért egy nagy intenzitású fényforrásból rövid pulzusokban juttatnak fényt a mintára. A gerjesztő sugár egy, az idővel lineárisan növekvő feszültségjelet generál, amit a rákövetkező első emittált foton detektálása fog megállítani. A folyamat több milliószor megismétlődik, amíg megkapjuk a jellemző lecsengési görbét.

4.2.4.3. Kísérleti körülmények

A fluorimetriás méréseket Hitachi F-4500, termosztálható mintatartóval ellátott spektrofluoriméteren végeztük. A minták összetételétől és a vizsgálni kívánt fluorofórtól függően változó kísérleti paramétereket alkalmazva dolgoztunk, amit az 4.2.1. táblázat foglal össze. A gerjesztő hullámhosszat rendszerint gerjesztési maximumoknál választottuk ki, kivéve a Trp

esetében, ahol a Tyr-októl származó emisszió kizárása érdekében használtuk a 295 nm-es gerjesztést. A gerjesztő és emissziós oldali résszélességet (*slit*) úgy választottuk meg, hogy jól detektálható jeleket kapjunk. A fluorofór koncentrációkat kellően hígra terveztük, hogy minél ritkábban kelljen a belső filter hatással és az önabszorpcióval korrigálni a mintákat. Méréseinket 1,0 cm × 1,0 cm-es fluorimetriás kvarcküvetében végeztük. A 3-dimenziós spektrumokat 200-500 nm gerjesztő és 210-650 nm emissziós hullámhossz tartományban vettük fel. A felhasznált fluoreszcens markerek szerkezeti képletét a 4.2.1. ábrán tüntettük fel.

4.2.1. táblázat A főbb fluorimetriás mérési paraméterek fluorofórok szerint csoportosítva.

kísérlet típus	Fluorofór	λ_{EX} (nm)	λ_{EM} (nm)	$slit_{EM/EX}$ (nm/nm)	$c_{fluorofór}$ (μM)
HSA kioltás	Trp	295	305-450	5 / 5	1
Tf kioltás	Tyr	280	290-450	5 / 10	0,2
fehérje marker	WF	310	320-500	5 / 5	1-15
	DG	335	420-600	5 / 5	1-15
	BR	487	500-600	5 / 5	10-30
DNS-marker ^a	EB	510	530-650	5 / 5	0,3-26
	DAPI	365	380-550	1,5 / 1,5	0,2-15
Fémkomplex	CM8 ^a	445	500-650	4 / 4	0,1-6
	CM16 ^a	450	500-650	4 / 4	0,1-5
	KP46	367	450-650	10 / 10	16

^a Horiba Fluorolog fluoriméteren mérve.

4.2.1. ábra. A fluoreszcens markerek szerkezeti képlete.

A DNS-sel való kölcsönhatást a Ru(III)-szalán és Ru(II)-phen komplexek esetében fluoreszcencia-élettartam mérések kivitelezésére is alkalmas Horiba Fluorolog 3-22 Tau-3 Lifetime System készülékkel vizsgáltuk Lisszabonban (Univesity of Lisbon). A mérésekhez félmikro küvetát (1,0 cm × 0,41 cm) használtunk, a küvetta geometriáját figyelembe vettük az abszorpcióval való korrekciónál. Az élettartam méréshez szükséges fényforrások szintén a Horiba-tól származtak: nanoLED N-460 és N-370. TCSPC üzemmódban Ludox[®] (szuszpendált

szilícium-dioxid) fényszóró közegre kalibráltuk a készülék válaszjelét. A mért minták háttérkorrekcióját elvégeztük. Az egyes fluorofórok esetén használt mérési paramétereket az 4.2.2. táblázat tartalmazza. A mérések felbontását a várható élettartamoknak megfelelően választottuk meg, azaz, hogy az 1024 detektáló csatornára jutó időkeret 4-5-ször nagyobb legyen a várható legnagyobb élettartam (τ) értékénél. A csúcsmaximum ideálisan 10000 beütés, a mérési idők rövidítése érdekében azonban 5000-es és 2000-es beütésszámmal is dolgoztunk. Az élettartam mérésekhez az egyensúlyi mérésekhez készült mintákat használtuk. A kapott élettartam görbéket multiexponenciális illesztéssel értékeltük ki a TRFA Data Processor 1.4 program segítségével. A módszer elég érzékeny ahhoz, hogy különbséget tegyen két emittáló részecske között, akkor is, ha az egyik hozzájárulása a mért intenzitáshoz kisebb, mint 10%.

4.2.2. táblázat Az élettartam mérések paraméterei.

kísérlet típus	EB	DAPI	CM(X) ^a
λ_{EX} (nm)	460	370	460
λ_{EM} (nm)	590	450	610
slit _{EM} (nm)	15	2	15
felbontás (ns/csatorna)	0,22312 0,11141 0,05552	0,05552	1,9094
frekvencia (MHz) ^c	1,00	1,00	0,50
csúcsmaximum (beütés szám)	5000	10000	2000

^a Ru(II)-phen komplexek: CM8 vagy CM16;

^b ns/csatorna = az egy csatornára jutó időkeret (ns); 1024 detektáló csatorna van a készüléken;

^c a fényforrásból jövő pulzusok ismétlési frekvenciája.

4.2.5. Ultraszűrés

Az ultraszűrés [100] segítségével kismolekulák makromolekulákkal való kölcsönhatása vizsgálható oly módon, hogy a makromolekulákhoz kötött és a szabad kismolekula frakciót megfelelő inkubálást követően membránszűrő segítségével elválasztjuk. Az elválasztás centrifugálással történik. Ezután két frakciót kapunk: a szűrőn átjutó rész az ún. LMM („*low molecular mass*”), míg a szűrőn fennmaradó rész a HMM („*high molecular mass*”) frakció. A nem kötődő kismolekulák tehát szabadon átjutnak a szűrőn. Mindkét frakció összetétele vizsgálható alkalmas analitikai módszerrel, pl. UV-látható spektrofotometria, fluorimetria, ICP-MS stb. A kötési állandók számolásához, ahol releváns volt a PSEQUAD programot használtuk. Bemelő adatként abszorbanciák helyett a spektrumok kiértékeléséből nyert komplex egyensúlyi koncentrációk negatív logaritmusát adtuk meg.

Az ultraszűréshez egyszer használatos Millipore Amicon Ultra-0.5 (10 kDa) membránszűrőt használtunk. A mintákat Eppendorf MiniSpin Plus vagy Sanyo Harrier 18/80

termosztálható centrifugával centrifugáltuk 10000 rpm fordulatszámon 5-15 percig, addig, amíg a mintatérfogat 80-85%-a átjutott a szűrőn (a minta teljes leszűrése az egyensúly eltolódásához vezethet). Minden esetben ellenőriztük, hogy a vizsgált fémkomplexek önmagukban átjutnak-e a szűrőn, csak a $\geq 95\%$ -ban átjutó komplexekkel dolgoztunk a továbbiakban. A minták $0,50 \text{ cm}^3$ térfogatban készültek és változó mennyiségű HSA-t ($50\text{-}630 \text{ }\mu\text{M}$) vagy 4-szeres hígítású vérszérumot és fémkomplexet (μM nagyságrend) tartalmaztak. A szétválasztott mintáknak a fehérjementes LMM frakcióját vizsgáltuk Hewlett Packard 8452A spektrofotométerrel, Hitachi F-4500 típusú spektrofluoriméterrel, vagy ICP-MS készülékkel (ld. 4.2.7. Kiegészítő mérések). Mindhárom detektálási módszer esetén előzetes kalibrációt végeztünk a fémkomplexekkel. A *bisz*-indazol-Ru(III)-komplexek esetén HSA– kötőhely-marker–fémkomplex háromkomponensű rendszereket is vizsgáltunk, itt elsősorban a szabad marker mennyiségét követtük.

4.2.6. Kapilláris zóna elektroforézis

A kapilláris zóna elektroforézis (CZE) technikát elterjedten használják fehérje-kismolekula – akár fémkomplex – kölcsönhatások követésére [101-103].

Az elektroforetikus elválasztási módszerek azon alapulnak, hogy elektromos potenciálkülönbség hatására az ionok a töltésüknek megfelelő elektród felé vándorolnak. Kapilláris elektroforézisnél az elválasztás egy vékony, pufferoldattal töltött kapillárisban történik. A minta kapillárisba való juttatása többféleképpen történhet, legelterjedtebb a viszonylag nagy nyomás alkalmazása. Ezt követően a kapilláris mindkét vége „futtató” puffert tartalmazó edényekbe merül, és nagyfeszültséget kapcsolnak rá. A töltött részecskék sebességéhez hozzáadódik a mozgó oldószer (háttér elektrolit; BGE) vándorlási sebességéhez. A közeget az elektroosmózis jelensége mozgatja (EOF, „*electroosmotic flow*”) [104]. Az elektroosmózis a kromatográfiás elválasztástól eltérően frontszerű áramlási profilt biztosít, a megjelenő csúcsok élesek. Az egyes anyagok futási sebességét a méretük és a töltésük is befolyásolja. A detektálás történhet közvetlenül a kapillárisfalon keresztül (pl. UV-látható fotometria) vagy kapcsolt technikákkal (pl. ICP-MS).

Kísérleteink során a HSA és a *bisz*-indazol-Ru(III)- és $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek kölcsönhatását vizsgáltuk abból kiindulva, hogy a nagy móltömegű fehérje és a hozzá kötött fémkomplex elektroforetikus mozgékonyasága eltér a szabad fémkomplexétől (vagy három komponensű rendszerek esetén a kötőhely-markerétől).

A CZE méréseket Agilent HP^{3D} CZE System és Agilent G7100 készülékeken végeztük a Bécsi Egyetemen, detektáláshoz UV-látható online detektort használtunk. A műszer vezérlése és az elektroferogramok kiértékelése a ChemStation programmal történt. Az elválasztáshoz BGB Analytik 48 cm hosszú, $50 \text{ }\mu\text{m}$ belső átmérőjű kvarc kapillárist használtunk. A kapillárist első használat előtt (a) és naponta (b) is kondicionáltuk: (a): mosás 10-10 percig $0,1 \text{ M HCl}$ – víz – $0,1 \text{ M NaOH}$ – víz – 20 perc BGE sorrendben 1 bar nyomáson; (b): 10-10 perc $0,1 \text{ M NaOH}$ – víz – 20 perc BGE 1 bar nyomáson – 10 perc 25 kV feszültség. Az injektálások között 1-2 perces (HCl – víz –) NaOH – víz – BGE mosási programot alkalmaztunk. A minták injektálása 30-50 mbar nyomáson 5-15 s alatt történt, a minták futtatásakor 28-30 kV feszültséget alkalmaztunk. A

BGE minden esetben foszfát puffer volt ($\text{pH} = 7,40$). A minták az 4.1.1. táblázat szerinti pufferben készültek. A mintákat, a mintatartót és a kapillárist rendszertől függően 25 vagy 37 °C-on termosztáltuk. A mintákban a HSA koncentráció rendszerint 5-100 μM között változott. A szabad fémkomplex, ligandum vagy marker csúcsmagasságát, ill. a csúcs alatti területét követtük méréseink kiértékeléséhez.

4.2.7 Kiegészítő mérések

A Pt(II)-komplexek albuminnal és vérérummal való kölcsönhatását ultraszűréssel vizsgáltuk, ezt követően az LMM frakcióban a Pt-koncentrációt ICP-MS technikával detektáltuk. A méréseket a Bécsi Egyetemen Sarah Theiner végezte egy CETAC ASX-520 automata mintaadagolóval felszerelt Agilent 7500ce ICP-MS készüléken MicroMist porlasztást használva. A mennyiségi meghatározás a ^{195}Pt izotópra történt.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Az eredményeket az *Irodalmi áttekintés*ben használt sorrendnek megfelelően, azaz központi fémionok szerinti felosztásban tárgyaljuk.

5.1. Az oxaliplatin és a KP1537 vizsgálata

Az irodalmi bevezetőben már említettük, hogy az oxaliplatin 4R-metil származékának (KP1537; 4.1.1. ábra) hatásossága az alapvegyületéhez hasonló, azonban mentes annak hideg túlérzékenységet okozó mellékhatásától. Fontos feladat volt annak tisztázása, hogy az eltérő mellékhatásprofil magyarázható-e a komplexek különböző vizes oldatbeli viselkedésével vagy a vérérszám-fehérje komponenseihez való affinitásbeli különbséggel. A szérumfehérjék közül elsősorban a HSA-nal való kölcsönhatást tanulmányoztuk, mivel irodalmi előzmények szerint az oxaliplatin szállításában főként ezen fehérjének lehet kiemelkedő szerepe [18,20-22].

5.1.1. A komplexek hidrolízise különböző körülmények között

A KP1537 és az oxaliplatin Pt(II)-komplexek vizsgálatát a hidrolitikus viselkedésük tanulmányozásával kezdtük. A komplexek hidrolízisét pH = 7,40-n vizes oldatban különböző körülmények között spektrofotometriásan követtük (5.1.1. ábra). A minták kloridkoncentrációját változtattuk: 0, 23 és 100 mM NaCl-ot alkalmaztunk. Az utóbbi két kloridkoncentráció rendre a sejtplazmában és a vérérszám-ban található kloridion mennyiségnek felel meg. Elvégeztük a méréseket 25 és 37 °C-on is. A regisztrált spektrumok alapján a 250 nm-en lévő abszorpciós maximum az idő előrehaladtával mindkét komplexnél csökken. A hidrolízis tisztán vizes közegben meglehetősen lassú folyamat. Az oxaliplatin tartalmú minták a mérések időtartama alatt az alkalmazott körülményektől függetlenül homogének maradtak, erre utal az izobesztikus pont változatlansága is. A KP1537 esetében 24 óra elteltével sárga tűs kristályok jelentek meg az oldatban 100 mM NaCl jelenlétében, ezt követően a spektrumok a 224 nm-nél lévő izobesztikus ponton már nem haladnak át. Csapadékképződést csak a NaCl-ot is tartalmazó mintáknál figyeltünk meg (23 mM NaCl jelenlétében 56 óra múlva). Feltehetőleg a metilcsoport jelenléte miatt a molekula lipofilebb karakterű lesz, és a sárga csapadék az oxalát ligandum cseréjével képződő *dikloridokomplex* [105,106].

Az oxaliplatin hidrolízise irodalmakból ismert, bonyolult folyamat. Tisztán vizes közegben a komplex két lépésben veszíti el oxalát ligandumát, először *monoakva*-, majd *diakvakomplexet* képezve. A gyűrűnyitó első lépést követően az újonnan komplexbe lépő vízmolekula pH = 7,4-n részben deprotonálódik ($pK_a = 7,23$). A folyamat leírását tovább bonyolítja, hogy a *monoakvakomplex* gyűrűzárást követően visszaalakulhat oxaliplatinná, a visszaalakulás mértéke fiziológiás pH-n jelentős [107,108]. Kloridion jelenlétében a köztitermék deprotonálódását leszámítva ugyanezek a lépések játszódnak le, egy gyors előegyensúly beállását követően viszonylag lassan képződik a *dikloridokomplex* végtermék [109,110]. A kloridion-mentes közegben lúgos pH-n ($pH \geq 12$) meghatározott felezési idők irodalmi adatai ($t_{1/2}(\text{gyűrűnyitás}) = 16$ perc, $t_{1/2}(\text{2. lépés}) = 92$ perc) [108] azonban nagyságrendileg sem egyeztethetők össze a mi eredményeinkkel: a méréseink ennél lassabb folyamatokat mutattak. A két fémkomplex vizes közegű bomlásának kinetikai paraméterekkel való leírására a folyamat bonyolultsága miatt nem

vállalkoztunk. A két komplex hidrolitikus viselkedését az 5.1.1. ábrán látható mért abszorbanciák időbeli változása alapján hasonlítottuk össze. Látható, hogy, a hidrolízis lejátszódása a tanulmányozott időintervallumban nem minden alkalmazott körülmény mellett volt teljes. Az 5.1.1. ábra alapján elmondható, hogy a hőmérséklet növelése jelentősen gyorsítja a komplexek hidrolízisét. A kloridkoncentráció növelésével a hidrolízis sebessége nő, ez az oxaliplatinról fellelhető irodalmi adatoknak megfelel [109,110]. Kloridion jelenlétében mi is tapasztaltuk a viszonylag gyors előegyensúlyi folyamat lejátszódását az első órában (ld. 5.5.1. beszúrt ábra). Vizsgáltuk a HCO_3^- -ion hatását is a komplexek hidrolízisére, azonban jelentős hatása nincs a folyamatra. Továbbá végeztünk méréseket 100 mM KNO_3 és NaClO_4 jelenlétében is, mindkét esetben a kloridion-mentes méréseknek megfelelő lefutású görbéket kaptunk.

5.1.1. ábra. A KP1537 és az oxaliplatin hidrolízise, normált abszorbancia változások 250 nm-en az idő függvényében különböző körülmények között: 0 mM NaCl, 37 °C (▲); 23 mM NaCl, 37 °C (□); 100 mM NaCl, 25 °C (●); 100 mM NaCl, 37 °C (◇); 100 mM NaCl, 13 mM NaHCO_3 , 37 °C (×), beszúrt ábra: a kezdeti szakasz ábrázolása (●,◇) $\{c_{\text{komplex}} = 400 \mu\text{M}$; pH = 7,40 (foszfát)}.

A két komplex hidrolitikus viselkedése (a csapadékképződést leszámítva) gyakorlatilag megegyezett az alkalmazott körülmények között. Kloridionok jelenlétében a bomlás gyorsabb, *diakvakomplexek* helyett *dikloridokomplexek* képződnek. Azonban a kloridionok jelenlétében lejátszódó bomlás is viszonylag lassú folyamat, 100 mM kloridion koncentráció alkalmazásakor a teljes bomlás több mint 4 napig tart.

5.1.2. Az oxaliplatin és a KP1537 kölcsönhatása HSA-nal

Vizsgálatainkat a HSA-nal és humán szérummal való kölcsönhatás tanulmányozásával folytattuk. A vérszérum a vér sejttes elemektől és véralvadási faktoroktól mentes frakciója. A komplexek és a HSA közötti kölcsönhatás vizsgálatát STD-NMR mérésekkel kezdtük. A 250 μM HSA-t és 500 μM fémkomplexet tartalmazó minták 24 órás inkubációját követően az STD-NMR spektrumokon megjelentek a (4-metil)ciklohexán-1,2-diamin protonok jelei, amely egyértelműen a fehérjéhez való kötődésre utal. A komplexek jeleinek pozíciója nem változott meg a fehérjéhez kötődéskor, ugyanakkor ^1H NMR mérésekből tudjuk, hogy az oxalát-víz, ill. oxalát-klorid cserét sem követi a (4-metil)ciklohexán-1,2-diamin gyűrűben lévő protonok jeleinek megváltozása. Így a vizsgálatokból a kötődés koordinatív jellegére nem lehetett

következtetni, az viszont megállapítható, hogy a [Pt(II)((4-metil)ciklohexán-1,2-diamin)] egység a fehérjéhez kötve is megmarad.

A HSA–oxaliplatin kölcsönhatás lejátszódásának időfüggését ultraszűrési vizsgálatokkal követtük. 50 μM HSA és 200 μM oxaliplatin tartalmú minták fehérjéhez nem kötött Pt(II) tartalmát vizsgáltuk ICP-MS detektálással 1, 5, 8, 25 és 48 órás inkubálást követően. Azt tapasztaltuk, hogy a fehérjéhez való kötődés igen lassú, az egyensúly két nap alatt sem áll be, ami korábbi közlemények alapján is várható volt [18,20,29]. Itt meg kell jegyezni, hogy a HSA tartalmú rendszerek 1-2 napnál tovább tartó vizsgálata nem célszerű; a fehérje harmadlagos szerkezete sérülhet, és fiziológiás szempontból sem releváns a további követés. A számolt HSA-hoz kötött Pt(II)-tartalom változásának trendjéből 1 vagy 2 ekvivalens Pt(II)-komplex kötődése feltételezhető a fehérjén, ez megfelel a Kars és munkatársai által közölt eredményeknek [18].

5.1.2. ábra. A fehérjéhez kötött Pt(II)-komplex százalékos mennyisége ultraszűrési-ICP-MS módszerrel követve KP1537-HSA/szérum (A) és az oxaliplatin-HSA/szérum (B) rendszerekben 1 h és 24 h inkubációt követően {37 °C; pH = 7,40 (foszfát)}.

Ezt követően különböző kloridion-koncentrációkat alkalmazva vizsgáltuk ultraszűrési technikával mindkét komplex kölcsönhatását a HSA-nal és a humán szérummal. A minták 160 μM Pt(II)-kompleket és 160 μM HSA-t (vagy annak megfelelő hígítású szérumot) tartalmaztak, ezek fehérjéhez nem kötött fémion tartalmát vizsgáltuk 1 és 24 órás inkubációt követően ICP-MS detektálással. A kísérletek során egyik mintában sem tapasztaltunk csapadékképződést. Az 5.1.2. ábrán jól látható, hogy 1 óra után a körülményektől és a fémkomplextől függetlenül átlagosan az összes Pt(II)-tartalom 15%-a kötődik a fehérjé(k)hez. Az egyes minták közti eltérések a mérési módszer pontatlanságán ($\pm 5\%$) belül vannak. 24 óra múlva a kloridion-mentes mintákban mindkét komplex esetében a kötött Pt(II) mennyiség $\sim 55\%$ volt. Ezzel szemben a 100 mM kloridot is tartalmazó mintákban 73-76%-volt HSA-hoz kötve. A kloridkoncentráció további 200 mM-ra való növelése már nem okoz számottevő változást a kötődés mértékében illetve sebességében. Annak vizsgálatához, hogy a HSA részvétele a komplexek szállításában mennyire számottevő a többi HMM komponenshez képest a vérben, humán szérumot tartalmazó mintákat is összeállítottunk. A minták könnyebb kezelhetősége és a tisztán HSA tartalmú mérésekkel való jobb összevethetőség érdekében a vészérumot 4-szeresére hígítottuk, így HSA

tartalma 160 μM körüli volt. A kloridion-mentességet itt nem tudtuk biztosítani, mert a szérum ~ 100 mM kloridot tartalmaz, ami a hígítás után ~ 25 mM körüli kloridkoncentrációt jelent. A szérummal végzett kísérleteknél szintén megfigyelhető a kloridkoncentráció növelésével párhuzamosan növekszik a kötött Pt(II) mennyisége. Továbbá a (b) és (e) minták összehasonlításából látszik, hogy a teljes szérum egyéb HMM komponensei további $\sim 15\%$ Pt(II)-komplexet képesek megkötni az oxaliplatin és a KP1537 esetében. Ezek a fehérjék lehetnek például a már említett γ -GL-ok [20,22].

Egyes irodalmak szerint az oxaliplatin és más Pt(II)-komplexek kötődnek a HSA I-es kötőhelyén. Ezek a közlemények főként fluorimetriás méréseken alapulnak, azonban az alkalmazott HSA és/vagy Pt(II)-komplex koncentrációk igen nagyok, így a mért effektus oka inkább a minták jelentős fényelnyelése lehet [111-113]. Az ellentmondásos eredmények miatt fontos volt az I-es kötőhelyen való kölcsönhatás lehetőségének tisztázása. Elsősorban fluorimetriás vizsgálatokat végeztünk az oxaliplatinnal igen híg, néhány μM -os koncentrációtartományban, ahol a minták abszorbanciája a gerjesztő és az emissziós hullámhosszakon elenyésző (erről UV-látható spektrofotometriás mérésekkel győződünk meg). A Trp kioltási mérések során 24 órán keresztül követtük az 1 μM HSA és 0 vagy 20 μM oxaliplatin tartalmú minták emisszióját. A kétféle minta intenzitása ez idő alatt nem tért el egymástól, a fémkomplex nem oltotta ki a Trp emisszióját. A kioltásos eredmény megerősítésére WF-kiszorításos méréseket végeztünk, az esetleges kiszorítást fluorimetriásan és ultraszűrés-UV-látható fotometriás/fluorimetriás technikával is vizsgáltuk. Egyik detektálási módszerrel sem volt mérhető kiszorítás, ami megerősíti a kioltásos eredményeket, miszerint az I-es hidrofób zsebben nem kötődik az oxaliplatin.

Vizsgálatainkat kiterjesztettük a II-es kötőhelyre is. A DG-kiszorításos spektrofluorimetriás mérések nem mutattak kölcsönhatást a II-es kötőhelyen sem. Irodalmi források szerint az I-es és II-es kötőhelytől is távolabb eső Met298 tioétercsoportjához kötődhetnek a fémkomplexek [20,23,24].

Méréseink alapján elmondható, hogy a két fémkomplex igen hasonló mértékben kötődik a HSA-hoz. A kloridion jelenléte fokozza az oxaliplatin fehérjéhez való kötődését, ezt korábban mások is tapasztalták [18]. Irodalmi eredmények alapján feltételezhető az oxalát cseréjével járó koordinatív kötődés a fehérjén [18], így lehetséges, hogy a klorid a hidrolízis sebességét növelve a HSA-hoz való kötődést is gyorsítja. A HSA-nal való reakció lassúsága miatt azonban ez nem dönthető el egyértelműen. Ennek megfelelően az ultraszűréses eredmények alapján csak a 24 órás állapotra érvényes „pillanatnyi” látszólagos kötési állandókat ($\lg K_{24\text{h}}$) tudtunk számolni, ezek a KP1537-re és az oxaliplatindra rendre 4,9(1) és 4,8(1). Ezek mérsékelt fehérje affinitásra utalnak és egymástól alig térnek el. A humán szérummal végzett kísérletek más HMM komponensek részvételét is kimutatták a Pt(II)-komplexek kötésében. Eredményeink rámutattak, hogy az eltérő mellékhatásprofil nem magyarázható a – farmakokinetikai paraméterekre közvetlenül kiható – hidrolízisbeli vagy szérumfehérjéhez való kötésbeli különbségekkel.

5.2. Maleimiddel kapcsolt Pt(IV)-komplexek kölcsönhatása HSA-nal

Az 4.1.1. ábrán látható KP2155 és KP2156 komplexek a hatóanyagok olyan csoportjába tartoznak, amelyeknél a célbajuttatás tervezett módon az albuminhoz való kapcsoláson keresztül valósulhat meg. Erre alkalmas egység a molekulához kapcsolt maleimid funkciós csoport, ami nukleofil addíciós reakcióban kovalens kötést létesít tiolcsoportot tartalmazó molekulákkal, elsősorban a szérumban legnagyobb mennyiségben előforduló HSA Cys34 tiolcsoportjával. Ennek a reakciónak a közvetlen kvantitatív követése nehézkes, ezért a kölcsönhatást közvetett módon követtük. Egy további feladat volt a HSA „szabad” SH-tartalmának meghatározása, a fehérje egyetlen SH-csoportja ugyanis fiziológiásan és *in vitro* körülmények között is részben oxidált formában (elsősorban Cys-, homoCys-HSA heterodimerekként) fordul elő [84].

5.2.1. ábra. (A): A DTDP kétlépéses reakciója a tiolvegyületekkel; (B): tiolvegyület–DTDP UV-látható titrálások kezdeti szakaszai, ahol még szubsztrát felesleg van, tiolvegyület: Cys ($\square$), GSH ($\diamond$), HSA (Δ) $\{c_{\text{Cys}} = 52,7 \mu\text{M}$, $c_{\text{GSH}} = 51,6 \mu\text{M}$, $c_{\text{HSA}} = 99,2 \mu\text{M}$; 25 °C; pH = 7,00 (foszfát)}; (C): A HSA–DTDP titrálás abszorbancia értékei, a kezdeti és a telítési szakaszokra illesztett egyenesek metszéspontja adja a HSA tiol tartalmát {körülmények: ua. mint (B) ábra}.

Elsőként, tehát a HSA nem oxidált Cys34 tartalmát határoztuk meg. Ehhez DTDP reagenst alkalmaztunk. A DTDP-t és a vele rokon 4,4'-ditiopiridint eddig főként protokollszerűen alkalmazták, viszont a reakció sztöchiometriája, lejátsszódásának időbelisége és a megfelelő pH megválasztása ellentmondásos volt az irodalomban [114-116]. Ezért munkánkat a körülmények optimalizálásával kezdtük, a HSA mellett tiol-modellekként Cys-t és GSH-t is használtunk a

reakció megbízhatóságának tesztelésére. Az irodalomban leírt egy pontos (egyféle aránynál mért) meghatározások [117-119] helyett a mólarány módszert alkalmaztuk. Az 5.2.1./A ábrának megfelelően a DTDP + R-SH nukleofil szubsztitúciós reakció kétlépéses; minden lépésnél egy ditioéter termék és egy nagy moláris abszorbanciájú 2-tiopiridon (2-TP; $\epsilon_{340\text{nm}} \approx 7900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) keletkezik, ezt detektáltuk UV-látható spektroszkópián. A szabad tiolcsoportot tartalmazó vegyületeket DTDP-vel titráltuk; az 5.2.1./B ábra a titrálás kezdeti szakaszán mért abszorbanciákat mutatja, ahol a tiolcsoportok mennyisége még feleslegben van, így a képződő 2-TP mennyiségét a hozzáadott DTDP mennyiség szabja meg. Az illesztett egyenesek meredeksége a Cys és a GSH esetén közel kétszerese a HSA-os mintákénak. Ez arra utal, hogy a Cys-nel és a GSH-nal reakcióba lépve minden elreagált DTDP molekulára két darab 2-TP keletkezik, ami a kétlépéses reakció teljes lejátszódását jelenti; a másik végtermék kénhidiaszisztin vagy GSSG homodimer. A HSA-nal reagálva viszont csak egy ekvivalens 2-TP keletkezik, a 2. lépés nem játszódik le. Ez nem meglepő, figyelembe véve, hogy a homodimer termék kialakulása sztérikusan gátolt [29,74].

A reakciók időbeliségéről és pH-függéséről elmondható, hogy pH = 7,00-n a Cys-nel 10 perc, míg a GSH-nal 30 perc alatt teljes mértékben lejátszódik a reakció. pH = 4,00-n a reakcióidő 8-10-szeresére nő. Ez a trend az S_N2 reakciómechanizmussal magyarázható, a pH = 7,00-n már kis mennyiségben jelen lévő deprotonált tiolat könnyebben támad nukleofílen a DTDP kénatomokon. A HSA-nal pH függést csak szűkebb tartományban, pH = 7,00 és 7,40-n vizsgáltunk, mivel a pH nagyobb mértékű változtatásával a fehérje konformációja is jelentősen változik [74,120]. Mindkét pH-n hasonló sebességgel ~40 perc alatt játszódott le a reakció. Ezt követően a HSA nem oxidált Cys34 tartalmát mólarány módszerrel $24,2 \pm 2\%$ -nak határoztuk meg (5.2.1./C ábra).

A módszer alkalmas volt arra, hogy közvetett módon spektrofotometrián követhessük a Pt(IV)-maleimid komplexek kötődését a Cys34 tiolcsoportokhoz. Előzetesen spektrofotometrián meggyőződöttünk a komplexek vizes oldatbeli stabilitásáról. A komplexek korlátozott vízoldhatósága miatt vizsgálatainkat 2% (V/V) DMSO-os közegben végeztük. A maleimid komplexek (KP2155, KP2156) viszonylag lassan hidrolizálnak, míg a szukcinimid származék KP2157 abszorpciós spektruma 24 óra elteltével sem mutatott változást. A hidrolízis nem mutatott függést a minták kloridion tartalmától. A Bécsi Egyetemen párhuzamosan folyó RP-HPLC vizsgálatok szintén kizárólag a maleimid komplexek viszonylag lassú hidrolízisét mutatták, óránként ~1% komplex hidrolizált.

A HSA-nal való kölcsönhatást különböző HSA:fémkomplex arányok mellett vizsgáltuk. A mintákat 4 órán át inkubáltuk, majd a fehérje el nem reagált Cys tartalmát feleslegben hozzáadott DTDP-vel detektáltuk megfelelő (további 1 órás) inkubációt követően. Az 5.2.2. ábra tanúsága szerint a KP2155 és KP2156 kötődik a Cys34-hez; 30 μM -os komplex koncentráció felett több mint 80% kötődik ezen a helyen. A mintákban eredetileg 24 μM szabad Cys34 volt, és a titrálási görbék 25-30 μM komplex hozzáadásával telítésbe hajlanak; ez 1:1 sztöchiometriájú HSA-fémkomplex adduktumok képződésére utal. A KP2157 nem lép kölcsönhatásba a Cys34-el, a várakozásoknak megfelelően. A Bécsi Egyetemen szintén kimutatták a két maleimid komplex kötődését a HSA-on RP-HPLC technikával; 3,5 óra alatt a KP2156 több mint 90%-ban a

fehérjéhez kötődött. Az albuminhoz kötött KP2156-nak állatkísérletes modellben kifejezett rákellenes hatása volt, és jól tolerálhatónak bizonyult.

5.2.2. ábra. A HSA szabad tiol tartalma különböző Pt(IV)-komplex/HSA arányoknál 4 órás inkubációt követően, KP2155 ($\circ$), KP2156 ($\blacktriangle$) KP2157 ($\square$) $\{c_{HSA} = 99,2 \mu M$ ($c_{SH} = 24,0 \mu M$); $25^\circ C$; $pH = 7,40$, (foszfát, 100 mM NaCl, 2% (V/V) DMSO)}.

Munkánk során sikerült megbízható módszert kidolgozni a HSA szabad tiolcsoportjának mennyiségi meghatározására, az eljárás az itt létrejövő kovalens kölcsönhatások követésére is alkalmas volt. Megállapítottuk, hogy a KP2155 és KP2156 maleimid komplexek közel kvantitatívan kötődnek a HSA-hoz, azzal 1:1 adduktumot képezve. Elméletileg lehetséges lenne fémkomplex áthidalású HSA dimerek létrejötte, ezt azonban nem tapasztaltuk, minden bizonnyal sztérikusán gátolt a reakció. Az albuminhoz való kapcsolás a komplexek tartós jelenlétét biztosíthatja a véráramban.

5.3. Ruténium- és ozmiumkomplexek vizsgálata

5.3.1. A KP1019 és a KP1339 kölcsönhatása HSA-nal

A klinikai kísérleti fázisban lévő KP1019 és KP1339 (4.1.1. ábra) HSA-nal való kölcsönhatását részletesen vizsgáltuk különös figyelemmel a lehetséges kötőhelyek azonosítására. A kölcsönhatást a KP1019 esetén már számos kutatócsoport vizsgálta, azonban ezek a kötőhelyek hollétéről viszonylag kevés információval szolgáltak [4,45,121]. Ismert, hogy a KP1019 a HSA-hoz először másodlagos kölcsönhatások révén kötődik, majd ez órák alatt koordinatív kötésbe megy át [45]. Elsődleges célunk a gyors, másodlagos kölcsönhatások révén kialakuló kötődés tanulmányozása volt. Ehhez spektrofluorimetriás, ultraszűrés–UV-látható spektrofotometrás és CZE technikákat alkalmaztunk, valamint ezeket kötőhely-marker-kiszorításos kísérletekkel kombináltuk.

Elsőként a kísérleti körülményeket állítottuk be a komplexek hidrolízisét figyelembe véve. Vizsgálataink szerint a kloridkoncentráció növelése lassítja a komplexek bomlását, amit más klorido-fémkomplexek – pl. ciszplatin, Ru(II)-arén komplexek – esetében is megfigyeltek már [15,122-124]. Továbbá a hőmérséklet csökkentése szintén lassítja a komplexek disszociációját, így albuminos méréseink legnagyobb részét 150 mM NaCl jelenlétében 25 °C-on, pH = 7,40-n (foszfát pufferben) végeztük. A komplexek hidrolízise azonban így sem volt elhanyagolható, főleg a KP1019 esetében. A komplexnek 1 óra alatt kb. 9%-a hidrolizál el.

5.3.1. ábra. A HSA–KP1339 rendszer emissziós spektrumai (folyamatos) és a HSA spektruma (szaggatott) (A); mellette a 334 nm-en mért relatív intenzitáscsökkenés (F/F_0 %) és a Stern-Volmer-féle egyenesillesztés (beszűrt ábra) (B) $\{c_{\text{HSA}} = 1 \mu\text{M}; c_{\text{KP1339}} = 0\text{--}15 \mu\text{M}; \lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}; 25 \text{ }^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40 \text{ (foszfát, 150 mM NaCl)}\}$.

Méréseinket az I-es kötőhelyen való kötődés spektrofluorimetriás vizsgálatával kezdtük. Az 5.3.1. ábrán jól látható, hogy a HSA kezdeti nagy emissziós intenzitása a hozzáadott KP1339 koncentráció növelésével folyamatosan csökken. Az egyensúly beállta igen gyorsnak bizonyult 10-20 perc inkubáció elegendő volt. Meg kell jegyezni, hogy a spektrumok belső filter hatással való korrekciója szükséges volt a komplexek abszorbanciája miatt.

A KP1019 komplexszel titrálva a HSA-t nem kaptunk kioltási görbét, mivel az indazólium ellenion igen intenzíven emittált, ami elfedte a Trp kioltást. Ez viszont nem akadályozta a PSEQUAD programmal [92] történő kiértékelést, mivel a program képes egyszerre több emittáló részecske kezelésére is. A kioltásos mérések értékelésére elterjedten használják a Stern-

Volmer-féle egyenesillesztést is, ezért a KP1339 esetében így is számoltunk kötési állandót, ami jól egyezik a szoftveresen számolt értékkel (5.3.1. táblázat). A KP1019 önmaga is emittál így ezzel a módszerrel nem volt kiértékelhető. (A Stern-Volmer módszerrel és annak korlátaival az 5.7. fejezet foglalkozik részletesebben.) L. Trynda-Lemiesz és munkatársai szintén tanulmányozták a HSA–KP1019 kölcsönhatást kioltásos módszerrel, azonban a náluk tapasztalt kioltás inkább az alkalmazott nagy koncentrációk miatt fellépő belső filter hatásból eredhetett [121]. A számolt egyensúlyi állandók alapján a KP1339 közel egy nagyságrenddel gyengébben kötődik az I-es kötőhelyhez, mint a KP1019. Mivel ezt a különbséget nehéz kémiai szempontból magyarázni, így a kötődést ultraszűrési technikával vizsgáltuk tovább.

5.3.1. táblázat. A *bisz*-indazol-Ru(III)-komplexek különböző mérési technikák alapján számolt kötési- és kizorítási állandói {25 °C, pH = 7,40 (foszfát, 150 mM NaCl)}.

		KP1019	KP1339
Fluorimetria		lgK'	
Kioltás	(PSEQUAD)	5,66(6)	4,69(6)
	(Stern-Volmer)	-	4,66(6)
WF-kizorítás		5,8(1)	5,7(1)
DG-kizorítás		5,8(2)	5,3(1)
BR-kizorítás		6,25(6)	6,01(2)
<hr/>			
Ultraszűrés			
lgK ₁ '		4,7(2)	5,0(1)
lgK ₂ '		4,6(2)	4,67(5)

5.3.2. ábra. A kötött KP1339 és a HSA összkonzentrációjának aránya az analitikai koncentrációk arányának függvényében, kísérleti pontok (két párhuzamos mérésből) és a lépcsőzetes kötési állandók alapján számolt görbe (szaggatott) { $c_{\text{HSA}} = 58 \mu\text{M}$; 25 °C; pH = 7,40 (foszfát; 150 mM NaCl)}.

Ultraszűrt mintáink LMM frakciójában UV-látható fotometriásan határoztuk meg a szabad fémkomplexek mennyiségét. Az 5.3.2. ábrán az egy HSA molekulára jutó kötött KP1339 mennyiségét ábrázoltuk az analitikai koncentrációk arányának függvényében. A kötődési

folyamat két lépcsőzetes stabilitási állandó feltételezésével volt leírható (5.3.1. táblázat), az ábrán az ezek alapján számolt görbe is látható. A HSA két ekvivalens fémkomplex megkötésére volt képes mindkét fémkomplex esetében. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy ezek az állandók makroállandóknak tekinthetők, a globális kötődési folyamatot leírják, de nem tükrözik az egyes kötőhelyekhez való affinitást. Továbbá ultraszűrési vizsgálataink nem adnak választ a kölcsönhatás másodlagos vagy koordinatív jellegére, így kötőhely-marker-kiszorításos mérésekkel folytattuk munkánkat, hogy a lehetséges kötőhelyekről is képet kaphassunk.

Az általunk használt három marker közül a WF az I-es kötőhely-markere, a BR valószínűleg ezen kötőhely közelében, azt átfedve kötődik, míg a DG a II. kötőhelyen kötődik (4.2.1. ábra) [74,77,125,126]. Az 5.3.3. ábra tanúsága szerint a WF és a DG maga is fluoreszcens, azonban emissziós intenzitásuk sokszorosára nő és az emissziós maximumuk kisebb hullámhosszak felé tolódik, ha a HSA megfelelő zsebében megkötődnek. A kiszorításos kísérletek előtt, a markerek HSA-hoz való kötési erősségét határoztuk meg a PSEQUAD program [92] segítségével. A számolt állandókat az 5.3.2. táblázat tartalmazza.

5.3.3. ábra. A kötőhely-markerek és HSA komplexeik normált egyedi spektrumai, WF, HSA-WF ($\lambda_{\text{EX}} = 310$ nm); DG, HSA-DG ($\lambda_{\text{EX}} = 335$ nm); HSA-BR ($\lambda_{\text{EX}} = 487$ nm); a normálást a legintenzívebb [HSA-DG]-re vonatkoztatva végeztük, a [HSA-marker] spektrumokat a PSEQUAD programmal számoltuk {25 °C; pH = 7,40 (foszfát, 150 mM NaCl)}.

Méréseinket 25 °C-on 150 mM NaCl jelenlétében foszfát pufferben, és 37 °C-on is elvégeztük tisztán foszfát pufferben, ill. WF esetén HEPES pufferben is készültek mérések. Az így meghatározott kötési állandókra nincs jelentős hatással a hőmérséklet és a kloridkoncentráció egyidejű változtatása, az eltérések a módszerből adódó hibán belül vannak. A HEPES pufferben mért WF állandó valamivel nagyobb, azonban az eltérés még mindig nem számottevő. A BR-nal készült pH = 8,50-n is mérés, mivel a BR oldhatósága itt jobb volt. A kétféle pH-n meghatározott állandók itt sem tértek el jelentősen, azonban későbbi méréseinkhez a fiziológiás pH = 7,40-t használtuk. Számolt állandóinkat irodalmi adatokkal összevetve jó egyezést találtunk [77,79,81,83,125-129]. A BR I-es kötőhely közelében való kötődése vitatott, ezért az I-es kötőhely érintettségét WF-kiszorításos mérésekkel magunk is igazoltuk, a kiszorításból számolt $\lg K' = 7,3(1)$ állandó igen jól egyezik a közvetlen mérésekből számolt állandóval. A további

kiszorításos mérésekhez a *bisz*-indazol-Ru(III)-komplexeknek megfelelő, már fentebb leírt körülményeket alkalmaztuk.

5.3.2. táblázat. A kötőhely-markerek fluorimetriás mérések alapján számolt kötési állandói ($\lg K'$) az egyes HSA kötőhelyeken különböző körülmények között.

kötőhely-marker	t / °C	puffer	c _{NaCl} / M	lgK'
WF	25	foszfát	0,15	5,6(1)
	37	foszfát	-	5,6(1)
	37	HEPES	-	5,8(1)
DG	25	foszfát	0,15	5,2(1)
	37	foszfát	-	5,4(1)
BR	25	foszfát	0,15	7,3(2)
	37	foszfát	-	7,3(2)
	37	foszfát (pH = 8,50)	-	7,36(6)

A kiszorításos mérések azon alapulnak, hogy egy rögzített arányú HSA–marker mintát (esetünkben 1:1) titrálunk egy kompetítorral, ami, ha kiszorítja a markert, akkor a mért intenzitás csökken, mivel a szabad marker kevésbé emittál, mint a HSA-hoz kötött. A WF-kiszorításnál az 5.3.4. ábrán jól követhető az intenzitás csökkenése; 8 ekvivalens KP1339 hozzáadásának hatására 50%-ra csökkent a kezdeti fluoreszcencia. A spektrumok maximuma emellett nagyobb hullámhosszak felé tolódott, ami a szabad WF megjelenésének köszönhető. A WF-kiszorításból nyert állandó és a kioltási állandó a KP1019 esetén jó egyezést mutat.

5.3.4. ábra. A HSA–WF 1:1 rendszer KP1339-cel való titrálásakor mért emissziós spektrumok; beszúrt ábra: a mért (♦) és a PSEQUAD program segítségével számolt (pontosított görbe) intenzitásváltozás $\lambda_{EM} = 390$ nm hullámhosszon { $c_{HSA} = c_{WF} = 1 \mu M$; $c_{KP1339} = 0-18 \mu M$; $\lambda_{EX} = 310$ nm; 25 °C; pH = 7,40 (foszfát, 150 mM NaCl)}.

A BR- és a DG-kiszorítás hasonlóképpen zajlott, mint a WF esetében. A kiszorítás alapján számolt kötési állandókat az 5.3.1. táblázat tartalmazza. Ezek alapján mindkét komplex közepes erősséggel kötődik az I-es és II-es kötőhelyeken. Az indazol kötődését is vizsgáltuk a fehérjén.

Az indazol a II-es kötőhelyen igen gyenge kötődést mutatott, míg az I-es kötőhelyen nem tapasztaltunk kölcsönhatást. A KP1339 esetében viszont a WF-kiszorítás valamint kioltás alapján számolt kötési állandói között egy nagyságrend az eltérés ($\lg K'_{WF} = 5,7(1)$; $\lg K'_{kioltás} = 4,69(6)$). Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy vizes oldatban vagy a HSA-hoz való kötődéskor a KP1339 minimális mennyiségben elveszíti egyik axiális indazol ligandumát [39,130], ami szabad formában intenzíven emittál, így a valós kioltásnál kisebb effektust mérünk. A KP1019 és a WF közötti kompetíciót fluorimetriásan L. Trynda-Lemiesz és munkatársai is követték már előttünk. Azonban kvantitatív értelmezést nem adnak és az alkalmazott koncentrációtartomány ($c_{HSA} = c_{WF} = 80 \mu M$, $c_{Ru} = 0-320 \mu M$) sem felel meg a módszer által elvártaknak. [121]. Ugyanezen közleményben a BR-kiszorítását is tapasztalták CD-spektroszkópiás technikát alkalmazva.

A fluorimetria mellett elválasztási módszerekkel is szerettünk volna az egyes kötőhelyekért való versengést követni, így a WF és a DG markerek segítségével CZE és ultraszűrési–UV-látható méréseket is végeztünk. A BR-nal rossz oldhatósága miatt sem CZE sem ultraszűrési vizsgálatok nem készültek.

5.3.5. ábra. CZE mérések alapján a HSA–WF–Ru(III)-komplex rendszerekben mért szabad WF koncentráció; Ru(III)-komplex: KP1019 (○), KP1339 (●)
 $\{c_{HSA} = c_{WF} = 100 \mu M$; $\lambda_{detekt} = 310 \text{ nm}$; $37^\circ C$; $pH = 7,40$ (foszfát, 150 mM NaCl) $\}$.

A CZE méréseknél a fluorimetriás kompetíciós mérésekhez hasonlóan rögzített HSA–marker koncentrációjú mintákban növeltük a komplexek koncentrációját. Hosszabb, 40 perces inkubációs időt használtunk, és $37^\circ C$ -on végeztük méréseinket. Előzetes kalibrációkkal meggyőződünk a szabad kötőhely-markerhez tartozó csúcsmagasság lineáris koncentrációfüggéséről, és ezek alapján számoltuk az 5.3.5. ábrán látható értékeket. Eszerint a Ru(III)-komplexek hozzáadásával a szabad WF mennyisége nő a mintákban. A marker teljes kiszorításához 7-8 ekvivalens fémkomplex elegendő. A kiszorítás itt is percek alatt megtörtént. A DG-nel nagyon hasonló viselkedést tapasztaltunk. A mérések kvantitatív kiértékelésére nem került sor, mivel előzetes HSA–marker titrálásokban a számolt kötési állandók a várt értékek alatt maradtak. Ez azzal magyarázható, hogy a CZE elválasztáson alapuló módszer, így fennáll az egyensúly eltolódásának veszélye.

Az ultraszűrési mérésekkel szintén a szabad markerkoncentrációt követtük UV-látható és fluorimetriás detektálással is. A CZE-hoz nagyon hasonló eredményeket kaptunk mindkét fémkomplexe.

Vizsgálataink során kiderítettük, hogy mindkét fémkomplex kötődik a fehérje I-es és II-es hidrofób zsebeiben. A közvetlen ultraszűrési vizsgálatok szintén 2 ekvivalens komplex megkötődését mutatták az albuminon, ami az irodalomban fellelhető 1, 4 vagy 10 ekvivalens KP1019/HSA sorba beilleszthető, bár nem egyezik egyikkel sem [24]. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a KP1019 egy része a fehérjék felületén gyengén kötődhet [39,131], az ultraszűréssel viszont ezek az adduktumok disszociálhatnak. A vizsgált komplexek kötődése a HSA-hoz gyors, percek alatt lejátszódik. A kétféle kötőhelyhez való kötődésben nincs jelentős affinitásbeli különbség, a számolt állandók közepes értékek. A két komplex viselkedésében sem találtunk lényegi eltérést, tehát az ellenionok különbözősége nem befolyásolja a HSA-hoz való kötődést. A fluorimetriás eredményeket CZE-sel és ultraszűréssel is sikerült alátámasztani. Klinikai szempontból fontos, hogy a BR és a Ru(III)-komplexek között versengés van a fehérje kötőhelyért, ezt a legjobban az 5.3.6. ábra szemlélteti, ahol egy teoretikus HSA–KP1339 1:1 rendszerhez adagolunk BR-t. A 11 μM BR normál érték, a 34 és 68 μM már kóros állapotot (pl. májelégtelenség) jelez.

5.3.6. ábra. Az I-es kötőhelyen kötött és nem kötött („szabad”) KP1339 móltört értékei egy hipotetikus HSA–BR–KP1339 rendszerben, változó BR koncentrációk alkalmazásával $\{c_{\text{HSA}} = 630 \mu\text{M}; c_{\text{KP1339}} = 630 \mu\text{M}; \text{fluorimétrás állandók } (\lg K'_{\text{BR}}, \lg K'_{\text{BR-kiszorítás}}(\text{KP1339})) \text{ alapján számolva}\}$.

A BR koncentráció növelésével az I-es kötőhelyhez kötött KP1339 mennyisége százalékosan alig változik, de az innen kiszorított fémkomplex mennyisége több mint duplájára nő, ha 11-ről 68 μM -ra emelkedik a BR koncentrációja. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy az 5.3.6. ábrán „szabad”-ként jelölt KP1339 mennyiség, csak az I-es kötőhelyről kiszorított fémkomplex mennyiséget jelöli; a KP1339 megkötődhet a II-es kötőhelyen is. Továbbá a fiziológiás viszonyok ennél sokkal bonyolultabbak lehetnek; az ábra azonban jól szemlélteti, egy erős kompetitor (BR) potenciális hatását az adott hatóanyag (KP1339) kötődésére a HSA-on. Ha nő a szabad fémkomplex mennyisége, az fokozott mellékhatásokhoz vagy gyorsabb kiürüléshez vezethet [9,74]. Eredményeink magyarázatul szolgálhatnak az emelkedett bilirubin szintű (hiperbilirubinémiás) betegek KP1019 kezelésekor tapasztalt rossz válaszreakciókra [132].

5.3.2. Ru(II)-, Os(II)-nitrozil komplexek kölcsönhatása HSA-nal

Az előbbi Ru(III)-komplexekhez hasonló szerkezetűek a V.B. Arion és munkatársai által előállított Ru(II)- és Os(II)-nitrozil-indazol komplexek (3.3.2. ábra) [48]. Ezek közül a vizsgált komplexeket úgy választottuk meg, hogy legyenek köztük cisz-transz, ill. ellenionjaikban vagy központi fémionban különböző vegyületepárok (4.1.1. ábra). Célul tűztük ki, hogy ezen komplexek hidrolízisét és humán szérumban való kötődését vizsgáljuk, hogy képet kapjunk a szerkezeti változtatások esetleges kötési állandót befolyásoló hatásáról.

Ismert, hogy a szerkezetileg hasonló NAMI-A, KP1019 és KP1339 komplexek vizes oldatban hidrolizálnak: pH-tól, kloridion- és HCO_3^- koncentrációtól függően [42,43]. A komplexek vizes oldatbeli stabilitását pH = 7,40-n 0,10 M NaCl jelenlétében vizsgáltuk UV-látható fotometrián. A vizsgált minták 1% (V/V) DMSO-t is tartalmaztak, ez azonban a későbbi albuminos kísérletekhez már nem volt szükséges. A komplexek 24 órán keresztül stabilnak mutatkoztak vizes oldatban, a koordinált kloridok feltehetően nem cserélődtek vízmolekulákra. Ru(II)-nitrozil-aminosav komplexek esetében is hasonló mértékű inertséget tapasztaltunk korábban.

A HSA-nal való kölcsönhatást először ultraszűrőssel tanulmányoztuk. A cisz-konfigurációjú **1** megtapadt a szűrő felületén, így csak a **2-5** komplexeket vizsgáltuk ezzel a módszerrel. A komplexek nagy száma miatt nem titrálást végeztünk, hanem csak néhány kitüntetett HSA:komplex koncentrációnál vizsgáltuk a rendszereket. Az 5.3.3. táblázatban látható, hogy az albumin koncentrációt a fiziológiás körülményeknek megfelelő 630 μM -nak, a hígított szérumban mintával összehasonlítható 160 μM -nak, és a hígított körülményeket tükröző 50 μM -nak választottuk.

5.3.3. táblázat. A komplexek kötődése a HSA-hoz (vagy szérumban); ultraszűrő alapján számolt HSA-hoz kötött komplex mennyiségek és a fluorimetriás mérésekből számolt látszólagos kötési és kiszorítási állandók ($\lg K'$) {pH = 7,40 (20 mM foszfát); 0,10 M NaCl; 25 °C}.

	1	2	3	4	5	KP1019
Ultraszűrés:	kötött komplex (%) ^a					
HSA/komplex ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$) 630/320	-	93	92	94	92	97 ^b
160/80	-	88	92	83	81	90 ^b
50/50	-	70	79	77	64	72 ^b
Szérumban/komplex (-/ μM) -/80 ^c	-	-	86	-	81	-
Spektrofluorimetria:	$\lg K'$					
Kioltás	5,1(1)	5,1(1)	-	5,0(1)	4,9(1)	ld. 5.3.1. táblázat
WF-kiszorítás	5,0(1)	5,0(1)	-	5,0(1)	4,9(1)	
DG-kiszorítás	4,7(1)	4,6(1)	4,7(1)	4,6(1)	4,4(1)	

^a Két párhuzamos mérésből, hiba: $\pm 3-4\%$;

^b a HSA-KP1019 rendszer ultraszűrő mérések alapján számolt lépcsőzetes stabilitási állandói alapján számolt értékek;

^c 4-szeres hígítású vérérszérumban, $c_{\text{HSA}} \approx 160 \mu\text{M}$.

A fémkomplexekből az első két esetben ($c_{\text{HSA}} = 630, 320 \mu\text{M}$) 0,5 ekvivalens, míg a harmadik esetben ($c_{\text{HSA}} = 50 \mu\text{M}$) 1 ekvivalens található a fehérje mellett. Előzetes UV-látható fotometriás mérésekből megállapítottuk, hogy 2 óra inkubációs idő elegendő az egyensúly beálltához. A minták LMM frakciójában detektáltuk a szabad fémkomplex mennyiségét UV-látható fotometriával. Az 5.3.3. táblázatban látható, hogy a fiziológiás koncentrációjú HSA-hoz a fémkomplexek igen nagy mennyiségben, 92-94%-ban kötődnek. Az egyes származékok affinitása között nem találtunk eltérést. A 4-szeres hígítású mintáknál már valamivel kevesebb fémkomplex kötődik a HSA-hoz, ami a hígulás miatti fokozott disszociációs készséggel magyarázható. Az egyes komplexek kötésbeli viselkedésében is tapasztalható némi különbség: a **4** és **5** komplexek valamivel kisebb mértékben kötődtek a fehérjéhez, ez azonban nem tendenciaszerű, a még hígabb 50 μM -os HSA koncentrációjú mintáknál az **5** és **2** komplexek mutatnak kisebb affinitást a fehérje iránt. Az is látható, hogy még az 50-50 μM -os arányoknál is a komplexek döntően (64-79%) a fehérjéhez kötődnek. A KP1019 ultraszűrés alapján számolt kötési affinitásától (ld. 5.3.1. táblázat) a nitrozil komplexek sem maradnak el jelentősen. A vérszérummal végzett kísérletek a **3** és **5** komplexek esetében a tisztán HSA-t tartalmazó mintákkal közel egyező fémkomplex megkötést mutattak, azaz a vizsgált fémkomplexek szállításáért elsősorban a HSA felelős a véráramban.

Vizsgáltuk DTDP segítségével a Cys34-el való kölcsönhatást is a **2** és **3** komplexek esetében. 2,5 óra inkubációt követően nem találtunk kölcsönhatást a szabad tiolcsoporttal. Ez nem meglepő, ugyanis a komplexek igen inerteek. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a módszer reverzibilis koordinatív kötődés követésére valószínűleg nem is alkalmas.

5.3.7. ábra. A **4** komplex (A) és a HSA (B) 3-dimenziós fluoreszcens spektruma
 $\{c_{\text{komplex}} = 10 \mu\text{M}; c_{\text{HSA}} = 1 \mu\text{M}; 25 \text{ }^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40 \text{ (foszfát, } 0,10 \text{ M NaCl)}\}$.

Mivel ezek a komplexek a *bisz*-indazol-Ru(III)-komplexekkel rokon szerkezetűek, így indokoltnak tűnt – az utóbbiaknál már bizonyított hidrofób zsebekben való kötődést vizsgálni. A komplexeknél tapasztalt nagyfokú hidrolitikus stabilitás is a másodlagos kölcsönhatások lehetőségét erősíti a koordinatív kötődéssel szemben. Az indazólium sók, azaz a **4** és **5** komplexek intenzíven emittáltak (5.3.7. ábra), akár csak a KP1019. Ezt a kioltásos ($\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$) mérések értékelésekor figyelembe kellett venni, azonban a WF és a DG gerjesztési hullámhosszán ez már nem okozott problémát. A számolt kioltási és WF-kiszorítási állandók komplexenként jól egyeznek egymással (5.3.3. táblázat). A II-es kötőhelyen valamivel gyengébb

kiszorítás tapasztalható. Az egyes komplexek között nem figyelhető meg számottevő eltérés a kötőhelyekhez való affinitásban, egyedül az **5**-ös komplex marad el kis mértékben a többi komplex állandóitól, ami az ultraszűrés eredményével összhangban van. A fluorimetriás állandókat összevetve a KP1019 állandóival azt látjuk, hogy az előbbiek közel egy nagyságrenddel elmaradnak a KP1019 I-es és II-es kötőhelyen mért kiszorítási állandóitól. Az ultraszűrés viszont nem mutatott ilyen különbségeket, így feltételezhető, hogy további kötőhelyek is rendelkezésre állnak a fehérjén a nitrozil komplexek számára.

5.4. Ru(III)-szalán és Ru(II)-fenantrolin komplexek kölcsönhatása DNS-sel

Számos fémkomplex mellett, hogy fehérje támadáspontokkal rendelkezik kölcsönhatásba lép a DNS-bázisokkal is. Továbbá az utóbbi időben egyre elfogadottabb olyan hatóanyagok keresése, melyek a ciszplatín mintájától eltérően a DNS-sel „csak” másodlagos kölcsönhatásba lépnek. Azt természetesen meg kell jegyezni, hogy a pusztán kettős szálú DNS-sel vagy oligonukleotidokkal végzett *in vitro* kísérletek alapján nem kaphatunk teljes körű képet a valós, sejtes környezetben lejátszódó reakciókról. Azonban a kötődés lehetséges típusára, erősségére ilyen vizsgálatok alapján is következtethetünk. A DNS-sel való kölcsönhatás számos technikával követhető, ilyen például a viszkozimetria, UV-látható fotometria, spektrofotometria vagy a gélelektroforézis [133]. Mi ezek közül a fluorimetriát választottuk. Ez a technika közvetlen, ill. közvetett kölcsönhatás vizsgálatokat tesz lehetővé. Kötéstípus markerek használatával információt kaphatunk az adott komplex kötési típusáról a polinukleotid láncon. Méréseink során mindkétféle módszerrel igyekeztünk képet alkotni a tanulmányozott komplexek DNS-kötési sajátságairól. Továbbá fluoreszcencia-élettartam méréseket is végeztünk.

5.4.1. ábra. A kötéstípus-markerek és DNS-adduktumaik fluoreszcens spektrumai, DAPI, [DNS-DAPI] ($\lambda_{EX} = 365$ nm); EB, [DNS-EB] ($\lambda_{EX} = 510$ nm); a [DNS-marker] spektrumok a DNS-sel való titrálás telítési szakaszáról származnak $\{c_{DAPI} = 3 \mu M; c_{EB} = 5 \mu M; 25^\circ C; pH = 7,40$ (HEPES, 2% (V/V) DMSO) $\}$.

Az S8 és S10 szalán komplexek (4.1.1. ábra) egyik feltételezhető támadáspontja a DNS. A komplexek vízzoldhatósága igen rossz, így a kölcsönhatás tanulmányozására csak a fluorimetria jöhetett szóba. Maguk a komplexek nem fluoreszcensek és a DNS is csak nagyon gyengén emittál, ezért fluoreszcens markerek – az interkalálódó EB és a kis árokban kötődő DAPI – bevonásával vizsgáltuk a kölcsönhatást (4.2.1. ábra). Ezek a markerek önmagukban is fluoreszcensek, azonban kettős szálú DNS-hez kötődve emissziójuk több mint egy nagyságrenddel nő, és emissziós maximumuk rövidebb hullámhosszak felé tolódik (5.4.1. ábra).

Elsőként tehát a DNS és a markerek kölcsönhatását tanulmányoztuk fluorimetrián a vizsgálati körülményeink között. A kötődés kvantitatív leírása is céljaink között szerepelt. Ezzel kapcsolatban vetődött fel a DNS-kötőhelyek számának és méretének problémája. A DNS oldatok koncentrációját nukleotidokban (vagy elterjedtebben bázispárokból) kifejezve adják meg. A markerek azonban nem egyetlen nukleotiddal (bázispárral) lépnek kölcsönhatásba és a DNS-

láncon nem feltétlenül a tényleges helyigényüknek megfelelő sűrűséggel helyezkednek el. Ennek lehetséges oka a markerek egyes szekvenciákhoz való eltérő affinitása [134]. Az átlagos kötőhely-méret jól közelíthető, ha kétféle titrálást tervezünk: egyikben a marker koncentrációját rögzítjük és DNS-sel titráljuk (titrálás I), majd a rögzített koncentrációjú DNS-t titráljuk a markerrel (titrálás II). A szabad marker emissziójával korrigált telítési szakaszokból 1-1 „moláris intenzitás” érték számolható melyek hányadosa ($F_{\text{mol}}(\text{titrálás II})/F_{\text{mol}}(\text{titrálás I})$) jó közelítést ad a kötőhely nukleotidokban kifejezett méretéről. Ilyen módon az EB kötőhely-mérete 4,8-5,1 nukleotid közötti értéknek adódott.

5.4.2. ábra. A DNS DAPI-val való titrálásakor mért fluoreszcens intenzitások (●) és a DAPI kalibrációja (◆) $\lambda_{\text{EM}} = 454 \text{ nm}$ -en és a spektrumok változása különböző DAPI:nukleotid arányoknál (beszúrt ábra) $\{c_{\text{DNS}} = 29,3 \mu\text{M (nukl.)}; c_{\text{DAPI}} = 0\text{--}15 \mu\text{M}; \lambda_{\text{EX}} = 365 \text{ nm}; 25 \text{ }^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40, (\text{HEPES}, 2\% (\text{V/V}) \text{ DMSO})\}$.

A DAPI DNS-sel való kölcsönhatása bonyolultabb. Az 5.4.2. ábra szerint a markerrel való titráláskor telítés helyett maximum görbe szerint változik az intenzitás és a spektrumok emissziós maximuma nagyobb hullámhosszak felé tolódik. Ez az I-es típusú titrálás kezdeti szakaszán is megfigyelhető volt. A jelenség legalább kétféle kötés mód meglétét feltételezi a DNS-en, amit mások is tapasztaltak változatos mérési módszereket alkalmazva (fluorimetria, CD-, UV-látható spektroszkópia, DNS-hasításos gélelektroforézis) [134-137]. A nagy DAPI:nukleotid arányoknál feltételezhetően interkaláció játszódik le [136,137]. A DNS-DAPI rendszerre a II-es típusú titrálás maximumát és az I-es típusú titrálás telítési szakaszát felhasználva körülbelül 26 nukleotid nagyságú kötőhely-méretet valószínűsítettünk.

Ezt követően a PSEQUAD programmal [92] számoltunk kötési állandókat a kétféle titrálás és a markerek kalibráló spektrumait megadva (a DAPI esetén a nagy hullámhosszak felé tolódott spektrumokat kihagytuk a számolásokból). A DNS koncentrációját a kötőhely-mérettel osztottuk, így megkaptuk a kötőhelyek koncentrációját, és ezt adtuk meg a programnak bemenő adatként. Többféle DNS-kötőhely-méret feltételezésével (s_{EB} : 1-10 nukleotid, s_{DAPI} : 1-40 nukleotid) is elvégeztük a számolásokat. Az 5.4.3. ábrán az EB-DNS titrálásra a számolt állandók és „moláris intenzitás” értékek alapján 4, 5 és 6 nukleotid méretű kötőhelyeket feltételezve számoltunk intenzitásokat. Az ábrán jól látható, hogy a mért pontokra az 5 nukleotidos kötőhely-mérettel számolt görbe ad a legjobb illesztést, és itt volt a legkisebb a számolt állandó hibája és az illesztési paramétere is. Ez jó egyezést mutat irodalmi adatokkal

[138-140]. Ugyanakkor ez látszólag ellentmond annak az elképzelésnek, hogy a kötőhely-méretnek bázispárokból kifejezve egész számnak kell lennie. Praktikus megfontolásokat követve belátható, hogy a valós kötőhely-méret nem egy jól meghatározott érték, bizonyos határok között változhat. Így spektroszkópiai módszerekkel csak egy átlagos érték számolható, amivel azonban a kötődés jól leírható. A tisztán vizes és 2% (V/V) DMSO tartalmú közegben számolt kötési állandókat az 5.4.1. táblázat tartalmazza.

5.4.3. ábra. Az EB-DNS rendszerre mért (●) és a PSEQUAD programmal számolt intenzitások (F) különböző kötőhely-méreteket: s/(nukleotid) = 4 (pontozott); 5 (folytonos); 6 (szaggatott) feltételezésével $\lambda_{EM} = 610$ nm-en. (az alsó ábra a számolt és a mért intenzitások közötti különbségek ($\Delta F / F_{mért}$) a mért értékekre vonatkoztatva %-ban kifejezve) { $c_{EB} = 3,0 \mu M$; $c_{DNS} = 0-60 \mu M$ (nukl.); $\lambda_{EX} = 510$ nm; pH = 7,40, (HEPES); 25 °C}.

A DAPI esetében csak határértékeket tudunk megadni mind a kötőhely-méretre, mind pedig a kötési állandókra. A táblázatban található határértékek párban értelmezendők, azaz például vizes közegben 25 nukleotidos kötőhely-mérethez a $\lg K' = 6,69$ állandó tartozik. A DAPI kötőhely-méretét illetően az irodalomban 10 nukleotidnyi értéket találtuk, azonban fontos különbség a mi mérési körülményeinktől, hogy az előbbi érték mesterséges poli[d(A-T)₂] oligonukleotid szekvenciához való kötődésre vonatkozik [141]. A kis árokban kötődő vegyületeknél a spektroszkópiai módszerekkel meghatározható kötőhely-méret attól is függ, hogy a marker által preferált DNS-szakaszok milyen sűrűséggel találhatók meg a DNS-láncon. A DAPI az A-T gazdag DNS-szakaszokhoz kötődik [134]. Így esetünkben a számolt kötőhely-méret a preferált bázis szakaszok előfordulási sűrűségét is kifejezi a DNS-láncon, és nem azonos a marker valós helyigényével.

Sajnos az irodalomban fellelhető kötési állandók legnagyobbbrészt grafikus kiértékelésből (Lineweaver-Burk-, Stern-Volmer-, Hildebrand-Benesi-illesztés [52,99,142,143]) származnak, így nem hasonlíthatóak össze a mi eredményeinkkel, mivel ezek a módszerek nem veszik figyelembe az aktuális kötőhely-méretet, és nincs is lehetőség azt illeszteni, finomítani. A módszerek további hiányosságait az 5.7. fejezetben tárgyaljuk részletesen. Továbbá az eltérő mérési körülmények is számottevő különbségekhez vezethetnek a kísérleti eredmények között.

5.4.1. táblázat A DNS–EB és a DNS–DAPI rendszerek kötési állandói ($\lg K'$) kétféle közegben meghatározva, valamint az egyes Ru-komplexek kötési és/vagy kiszorítási állandói {25 °C, pH = 7,40 (HEPES)}.

		kötőhely-méret (nukleotid)	$\lg K'$
EB ^a	vizes közeg	5	6,89(1)
	2% (V/V) DMSO	5	6,76(1)
DAPI ^a	vizes közeg	25-28	6,69(2)-7,01(2)
	2% (V/V) DMSO	23-26	6,20(2)-6,63(2)
<i>Ru(III)-szalán komplexek: kiszorítás vizsgálatok^b</i>			
S8 (EB)		5	5,05 (2)
S10 (EB)		5	4,79 (2)
<i>Ru(II)-phen komplexek: közvetlen kölcsönhatás vizsgálatok^c</i>			
CM8		8-15	5,85-6,83
CM16		-	-
<i>kötőhely-marker-kiszorítás vizsgálatok^d</i>			
CM8 (DAPI)		27	6,86 (5)
CM16 (DAPI)		27	6,85 (1)

^a Titrálás I, titrálás II és marker kalibrálás alapján, $\lambda_{\text{EX}} = 510$ nm (EB) vagy $\lambda_{\text{EX}} = 365$ nm (DAPI);

^b $c_{\text{EB}} = 5,0$ μM ; $c_{\text{DNS}} = 19,5$ μM (nukl.); $c_{\text{komplex}} = 0-64$ μM ; $\lambda_{\text{EX}} = 510$ nm; 2% (V/V) DMSO;

^c titrálás I, titrálás II és komplex kalibrálás alapján, $\lambda_{\text{EX}} = 445$ nm (CM8) vagy $\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm (CM16);

^d $c_{\text{DAPI}} = 1,6$ μM ; $c_{\text{DNS}} = 40$ μM (nukl.); $c_{\text{komplex}} = 0-24$ μM ; $\lambda_{\text{EX}} = 365$ nm.

Fentebb már említettük, hogy a Ru-szalán komplexek nem fluoreszcensek, így a DNS-sel való kölcsönhatásukat markerkiszorításos kísérletekkel követtük. Annak eldöntésére, hogy valós kiszorításról van-e szó fluoreszcencia-élettartam méréseket is végeztünk. A DNS és a marker koncentrációját rögzítettük és a hozzáadott komplex mennyiségét növeltük. A DNS:marker arányt úgy választottuk meg, hogy a markerek 70-75%-a legyen DNS-hez kötött. Az egyensúly viszonylag gyorsan beállt a mintákban, 1 órás inkubációt követően mértük meg a minták emissziós spektrumait. Az EB kiszorításos méréseknél a kezdeti intenzitás csökkenését tapasztaltuk növekvő S8, ill. S10 komplex koncentrációk hatására. A kioltás ténye önmagában azonban nem bizonyítja a kiszorítást, elképzelhető dinamikus kioltás vagy vegyes DNS–EB–fémkomplex adduktum kialakulása is. Ennek eldöntésére fluoreszcencia-élettartam méréseket is végeztünk a mintákkal. A kísérleti részben leírtuk, hogy a módszer segítségével megállapítható a fluoreszkáló részecskék száma, azok fluoreszcencia-élettartama (τ), ill. mennyiségi hozzájárulásuk (α , amplitúdó tag) a mért emisszióhoz. Eredményeink szerint két fluoreszcens részecske található a mintákban, ezek τ -értékeik alapján az EB ($\tau = 1,8$ ns) és a [DNS–EB] adduktum ($\tau = 21,2$ ns), melyek jó egyezést mutatnak az irodalmi értékekkel [52]. Az 5.4.4. ábra táblázatában jól látható, hogy a két fluoreszcens részecske τ -értéke (élettartama) alig változik az S8 komplex hozzáadásának hatására, az EB α -értéke – azaz a mennyisége – viszont növekszik,

míg ezzel párhuzamosan a [DNS–EB] adduktumé csökken. Továbbá nem jelent meg új fluoreszcens részecske a rendszerben. Ezek mind a tényleges kiszorítás meglétét támasztják alá.

5.4.4. ábra. A DNS–EB–S8 rendszer fluoreszcencia-élettartam görbéi és az emittáló részecskékre számolt τ - és α -értékek ($\lambda_{\text{EX}} = 460 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 610 \text{ nm}$; felbontás = 0,05552 ns/csatorna (EB), vagy 0,11141 ns/csatorna (DNS-tartalmú minták); 25 °C; pH = 7,40 (HEPES, 2% (V/V) DMSO)}.

Ezután kiszorítási állandókat számoltunk. Az S8 komplex valamivel nagyobb mértékben szorította ki az EB-ot, mint az S10 (5.4.1. táblázat). Az állandók az EB-hoz hasonlítva mérsékelt DNS-affinitást mutatnak. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a számolt állandó az EB kötőhely-méretét veszi alapul, amivel a szalán-komplexek kötőhely-mérete (vagy kötési sűrűsége) a DNS-en valószínűleg nem egyezik. A kérdés megválaszolásához a kiszorítások telítésbe hajló szakaszára lenne szükség, ami viszont oldhatósági problémák miatt nem volt elérhető.

A DAPI esetében nem tapasztaltunk kioltást egyik szalán komplex részéről sem. A fluoreszcencia-élettartam mérések szerint a DAPI ($\tau = 1,6 \text{ ns}$) és a [DNS–DAPI] adduktum ($\tau = 3,6 \text{ ns}$) τ - és α -értékei közel változatlanok voltak a Ru-komplexek hozzáadásának hatására. Tehát a DAPI-hoz képest 12-szeres mennyiségű fémkomplex-felesleg nem képes kiszorítani a markert kötőhelyéről. A szalán-komplexek DAPI-val egyidejű kötődése a DNS-en nem bizonyítható, de nem is zárható ki, bizonyos fémkomplexek képesek a nagy árok felől interkalálódni a DNS-láncba [144,145].

Portugál partnereink vizsgálták a két fémkomplex A2780 (petefészekrák-) sejtekre gyakorolt hatását. Mindkét fémkomplex apoptózist váltott ki a sejtekben, azonban a korábbi citotoxicitás-vizsgálatoknak megfelelően az S10 hatékonyabbnak bizonyult, mint az S8 [53]. Sejtciklus-analízissel megállapítható volt, hogy S10 hatására a sejtek fejlődése megakadt a DNS-szintézist igénylő és a mitózist megelőző (G2/M) fázisban. Ez a DNS-szintézis érintettségét mutatja. Az S8 kevésbé befolyásolta a sejtciklust. A két komplex hatáserőssége közötti eltérést nem magyarázzák a DNS-kötési vizsgálataink, azonban a szerkezeti különbségből adódó lipofilitásbeli eltérés okozhat eltérő mértékű felvételt a sejtekbe.

A Ru(II)-phen komplexek közé tartozik a CM8 és CM16 komplex. A Ru(II)-hoz két 1,10-fenantrolin ligandum és egy (N,S) donor 2-(benzo[b]tiofen-2-il)piridin (CM8) vagy egy (N,N)

donor 2-(piridin-2-il)-1H-benzo[d]imidazol (CM16) koordinálódik (4.1.1. ábra). A komplexek előzetes vizsgálatok szerint rákos sejtvonalakon citotoxikus hatásúak, a DNS-támadáspont pedig szerkezetükből adódóan feltételezhető [50], ezért vizsgáltuk a DNS-sel való kölcsönhatásukat. A komplexek jó vízdoldhatóságúak ($c_{\max} \sim \text{mM}$), minimum 24 órán keresztül stabilisak vizes oldatban, továbbá maguk is emittálnak. Gerjesztési maximumuk $\sim 300\text{-}310 \text{ nm}$ és $445\text{-}450 \text{ nm}$ értékeknél volt. A kisebb hullámhosszú maximum ligandumsáv lehet, míg a nagyobb hullámhosszú maximum a fém-ligandum töltésátviteli sávra jellemző [52], így méréseinkhez ez utóbbit választottuk, és $500\text{-}650 \text{ nm}$ tartományban vettük fel az emissziós spektrumokat ($\lambda_{\text{EM}}(\text{max}) = 600 \text{ nm}$ (CM8), 620 nm (CM16)). Hasonlóképpen a DNS–marker rendszerekhez a fémkomplexeket titráltuk DNS-sel, ill. fordítva, a DNS-t titráltuk a fémkomplexekkel. A markerektől eltérően a CM8 intenzitása csak 2,5-szeresére nőtt a DNS-hez való kötődéssel, ugyanez a növekmény a CM16 esetén ~ 6 -szoros volt. Így a titrálások telítési szakaszából számolt moláris intenzitás arányok bizonytalansága is megnőtt, 10-20 nukleotid közötti kötőhely-méreteket valószínűsítettünk ezek alapján mindkét komplex esetében. Ahogy azt a markereknél is láthattuk a kötési állandó csökkenésével és a kötőhely-méret növekedésével az előbbi értékek meghatározhatóságának pontossága romlik (vö. EB, DAPI). A CM8 esetén csak igen tág határok között tudtuk megadni a kötődési paramétereket; $\lg K' = 5,85$ (8 nukl.), ill. $\lg K' = 6,83$ (15 nukl.) között az illesztések hasonló hibával terheltek. A PSEQUAD program [92] által számolt illesztési paraméternek 12 nukleotidos kötőhely-méretnél van minimuma, a számolt állandó hibája azonban 8 nukleotidnyi méret fölött már meredeken emelkedik. A CM16 komplexnél a titrálások még elnyújtottabb profilt mutattak (5.4.5. ábra), így nem tudtunk $\lg K'$ -t és kötőhely-méretet becsülni.

5.4.5. ábra. A CM8 ($\blacktriangle, \triangle$) és a CM16 ($\bullet, \circ$) DNS-sel való titrálásakor mért intenzitások két-két párhuzamos mérésből ($\{c_{\text{CM8}} = c_{\text{CM16}} = 3,0 \mu\text{M}; c_{\text{DNS}} = 0\text{-}180 \mu\text{M}$ (nukl.); $\lambda_{\text{EX}} = 445$ (CM8) vagy 450 (CM16) nm; $\lambda_{\text{EM}} = 600 \text{ nm}$ (CM8) vagy 610 nm (CM16); 25°C ; pH = 7,40, (HEPES)}).

A komplexek fluoreszcencia-élettartam méréseikor szokatlanul hosszú τ -értékeket kaptunk: $\tau = 400\text{-}430 \text{ ns}$ (CM8), $\tau = 430\text{-}470 \text{ ns}$ (CM16), amelyek a DNS-hez való kötődéssel határozott növekedést mutattak. Ez azonban jellemző a Ru(II)- (és Os(II)-) -pp komplexekre [52,146]. Ezek a komplexek nagyjából külső konverzió révén triplett állapotból emittálnak fényt, így tulajdonképpen foszforeszcenciáról beszélhetünk [52]. Ugyanakkor a mérések

meglehetősen sok időt vettek igénybe a megfelelő beütésszám eléréséhez, és a kvantitatív kiértékelés lehetőségét sem láttuk, így eltekintettünk a további részletes vizsgálatoktól.

A komplexek DNS-en való kötődésének lehetséges mechanizmusát is vizsgálni szeretnénk volna, hiszen az irodalomban mind árokban való kötődést, mind pedig interkalációt leírtak Ru(II)-pp komplexekre [50]. Az EB kizorításos kísérleteknél a komplexek hasonló mértékben kioltották a DNS–EB rendszer emisszióját. A fluoreszcencia-élettartam mérések kiértékelését nagyban nehezítette, hogy az EB és [DNS–EB] mellett a komplexek emissziója is megjelent. Az élettartamok közötti nagy különbség ($\sim 2 \text{ ns} < \sim 20 \text{ ns} \ll \sim 400 \text{ ns}$) azonban nem teszi lehetővé hogy adott felbontás mellett mindegyik emittáló részecske τ - és α -értékeit egyszerre közelítsük, így a DNS–EB rendszerhez optimális mérési körülményeket választottunk (felbontás = 0,11141 vagy 0,222312 ns/csatorna) és a fémkomplexek τ -értékét a fentebb már leírt értékekre rögzítettük. A [DNS–EB] részecske élettartam-értékei határozott függést mutattak a komplexek koncentrációjától, annak növelésével $\tau_{\text{[DNS-EB]}}$ csökkent, ez dinamikus kioltásra utal.

A DAPI-val versengést tapasztaltunk a DNS-kötőhelyekért, az élettartam mérések egyértelműen kizorításra utalnak. A kioltási görbék teljes kioltást mutattak, azaz a DAPI-t teljesen kizorítják a fémkomplexek. A számolt kizorítási állandók gyakorlatilag egyformák a CM8-ra és a CM16-ra, és összemérhetők a DAPI kötési állandójával. Azonban igen valószínű, hogy a megkötött komplexek kötőhelymérete nem egyezik a DAPI-ével, amit a CM8-ra meghatározott 8-15 nukleotidnyi érték jól mutat, így a kizorítási állandók itt sem értelmezhetők közvetlen kötési állandókként.

Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált CM8 és CM10 komplexek a kis árokban viszonylag nagy sűrűséggel és nagy affinitással kötődnek a DNS-lánchoz. Kis árok felőli kötődést figyeltek meg $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ és $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ komplexek esetében is, ezek azonban a dppz ligandum révén részlegesen interkalálódnak [147,148]. Az általunk vizsgált komplexek ligandumai valószínűleg nem elég kiterjedtek ahhoz, hogy ténylegesen interkalálódjanak, ahogy ezt M. Eriksson és munkatársai a $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ komplexeknél ki is mutatták [51]. Ez utóbbi komplexek a kis árokban kötődnek, a kötődés hasonló lehet a dppz-komplexekhez, azaz két phen ligandum extrahelikális „*stacking*” révén a kis árokba simul [51,147]. A harmadik ligandum a bázispárok közti rés felé orientálódhat [147], és az EB-ot ugyan nem szorítja ki, de a körülötte lévő hidrofób-hidrofil viszonyokat megváltoztatja, és emiatt csökken a DNS-hez kötött marker fluoreszcencia-élettartama.

5.5. [Rh(η^5 -Cp*)]-komplexek vizsgálata

A [Rh(η^5 -Cp*)]-komplexek oldategyensúlyi viselkedéséről kevés információ áll rendelkezésre az irodalomban, pedig számos pp komplexének citotoxikus aktivitása ismert [12,61]. Ezen komplexek izoelektronos az intenzíven vizsgált és bizonyítottan rákellenes hatású Ru(II)(η^6 -arén) komplexekkel [32,149]. Ezért elsődleges célunk volt, hogy a [Rh(η^5 -Cp*)] vizes oldatbeli viselkedését és különböző (O,O), (O,N) és (O,S) donorokkal való komplexképzését leírjuk. Ezek után a szérumbeli viselkedésük feltérképezésének első lépéseként a HSA-nal való reakciójukról is képet szerettünk volna alkotni. (A [Rh(η^5 -Cp*)(H₂O)₃]²⁺ és a ligandumok szerkezeti képlete a 3.3.4, ill. a 4.1.1 ábrán található.)

5.5.1. Oldategyensúlyi vizsgálatok

5.5.1.1. A [Rh(η^5 -Cp*)Z₃] hidrolízise

A [Rh(η^5 -Cp*)Z₃] (Z = H₂O vagy Cl⁻) félszendvics komplex (3.3.4. ábra), hidrolízisét pH-potenciometriás és ¹H NMR technikákkal követtük, 0,10 és 0,20 M KCl-os, valamint a kloridion kizárásával 0,20 M KNO₃-os közegben. Az egyszerűség kedvéért a [Rh(η^5 -Cp*)]²⁺-iont a dolgozatban M²⁺-mel jelöljük, és fémionként utalunk rá. A fémion hidrolízise gyors és reverzibilis volt a tanulmányozott pH-tartományban. A hidrolitikus folyamat kétmagvú hidroxidokomplexek feltételezésével volt leírható, a meghatározott stabilitási szorzatokat az 5.5.1. táblázat tartalmazza.

5.5.1. táblázat Az [MZ₃] hidroxidokomplexeinek stabilitási szorzatai és a Cp*-metil protonok ¹H NMR jeleinek kémiai eltolódásai az egyes komplexekben különböző ionerőségeket alkalmazva {25 °C}.

	0,20 M KCl ^a	0,10 M KCl ^a	0,20 M KNO ₃
lgβ[M ₂ H ₂]	- 11,12(1)	- 10,48(2)	- 8,53(7)
lgβ [M ₂ H ₃]	- 19,01(1)	- 18,07(3)	- 14,26(4)
kémiai eltolódás, δ (ppm)			
[MZ ₃]	1,62	-	1,67
[M ₂ H ₂]	1,60	-	1,59
[M ₂ H ₃]	1,58	-	1,58

^a A megadott kloridion-koncentráció alkalmazásakor érvényes látszólagos állandók.

A fémion savas pH-n kloridion-mentes közegben [M(H₂O)₃]²⁺ kationként van jelen, a komplex pszeudooktaéderes, ún. zongoraszék geometriájú, amit röntgen-krisztallográfiásan is bizonyítottak [63]. A koordinált víz molekulák az [M(H₂O)₃]²⁺ komplexben kloridionok jelenlétében részlegesen vagy teljesen kloridionokra cserélődhetnek, amire a Cp*-metil-protonok ¹H NMR jelének kisebb kémiai eltolódások felé való elmozdulása is utal a savas pH-tartományban (5.5.1. táblázat). Az egyes kloridokomplexek azonban a [Ru(II)(η^6 -p-cimol)Z₃] komplexszel ellentétben [150] nem adnak különálló NMR-csúcsokat, és a kloridion-függő UV-látható titrálások is csupán egy burkológörbét adtak, így a folyamatot nem tudtuk

termodinamikai állandókkal jellemezni. Ennek következtében a kloridionokat tartalmazó közegben meghatározott állandók, csak az adott kloridion-koncentráció alkalmazásakor érvényes látszólagos állandók.

Az 5.5.1. ábrán látható ^1H NMR spektrumokon megfigyelhető, hogy kloridion-mentes közegben pH $\sim 5,3$ körül az $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ csúcs intenzitása csökken, miközben kisebb kémiai eltolódásnál megjelenik egy új csúcs. Ugyanez a folyamat kloridionokat tartalmazó közegben pH ~ 7 -nél játszódik le. Az utóbbi csúcs a pH növelésével eltolódik, majd pH ~ 8 (0,2 M KNO_3) vagy pH ~ 9 (0,2 M KCl) körül pozíciója állandósul. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy kétféle hidrolízisrészecske is képződik a rendszerben. A két hidroxidokomplex egymással gyors cserében van az NMR időskálához viszonyítva. A lúgos pH- tartományban uralkodó részecske feltehetőleg az $[\text{M}_2(\mu\text{-OH})_3]^+$ kétmagvú *trisz*-hidroxido dimer komplex (jelölése: $[\text{M}_2\text{H}_3]^+$). Ehhez a komplexhez tartozó protonok mindkét közegben azonos kémiai eltolódással vannak jelen (5.5.1. táblázat). Az $[\text{M}_2\text{H}_3]$ részecske szerkezetét röntgen-kristallográfiásan már korábban meghatározták [151], valamint Eisen és munkatársai a vizes oldatbeli képződését is leírták nagy pH-n kloridion-mentes közegben [63].

5.5.1. ábra. Az $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ ^1H NMR spektrumai a pH függvényében és a hidrolízist leíró koncentrációeloszlási görbék a pH-potenciometria alapján (folytonos és szaggatott görbék) és az NMR csúcsintegrálok ($\bullet$ $\circ$) alapján számolva 0,20 M KNO_3 közegben ($i = 2$ vagy 3) $\{\text{c}_\text{M} = 1 \text{ mM}; 25^\circ\text{C}; 10\% \text{D}_2\text{O}\}$.

A pH-potenciometriás titrálási görbék is igazolják, hogy 0,20 M KCl jelenlétében az $[\text{MZ}_3]$ hidrolízise nagyobb pH-n ($\sim 7,3$) indul, mint 0,20 M KNO_3 -os közegben (pH $\sim 5,9$). A titrálási görbéken az is látható volt, hogy a fémion hidrolízisére 1,5 ekvivalens lúg fogyott, ami ugyancsak a kétmagvú $[\text{M}_2\text{H}_3]$ részecske képződését támasztja alá pH > 8 (KNO_3) és > 9 (0,2 M KCl) felett. Ugyanakkor a számolt titrálási görbék sokkal jobban illeszkednek mind kloridionokat, mind pedig nitrátionokat tartalmazó közegben a mért pontokra, ha az $[\text{M}_2(\mu\text{-OH})_2\text{Z}_2]$ ($[\text{M}_2\text{H}_2]$) összetételű komplexet is bele vesszük a modellbe, melynek képződését az ^1H NMR mérések is alátámasztják. Ezen hidroxidokomplex képződését Eisen és munkatársai is megemlítik, bár ott az átfedő hidrolitikus folyamatokra nem tudtak megbízható állandókat közölni [63]. A meghatározott stabilitási szorzatok alapján koncentrációeloszlási görbéket készítettünk (5.5.1. ábra). A kloridion-mentes közegben rögzített ^1H NMR spektrumokon a

monomer fémion és a kétmagvú hidroxidokomplexek csúcsai kellően elválnak egymástól, így az integrálok alapján móltörtet számoltunk, amelyek igen jól egyeznek a pH-potenciometriás eredményekkel. Méréseink azt bizonyítják, hogy a kloridion koordinálódó ligandumként képes a hidrolízist a bázikusabb pH-tartomány felé tolni. Ugyanez a jelenség tapasztalható a $[\text{Ru(II)}(\eta^6\text{-p-cimol})\text{Z}_3]$ esetében is [150], ugyanakkor a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ hidrolíziskészsége jóval kisebb. 0,20 M KCl-os közegben a Ru(II)-klorido/akvakomplex hidrolízise már pH ~ 4-n megindul, míg a Rh(III)-komplexé csak két egységgel nagyobb pH-n.

5.5.1.2. A ligandumok savi disszociációs állandóinak meghatározása

Az általunk tanulmányozott ligandumok (maltol, allomaltol, dhp (1,2-dimetil-3-hidroxi-piridin-4(1H)-on), pic (pikolinsav) és tiomaltol) pK_a -i és deprotonálódási folyamatai irodalmakból legtöbbször ismertek, azonban az alkalmazott körülmények sokszor eltérnek a mieinktől, így a komplexképződés vizsgálata előtt ezeket mindig meghatároztuk pH-potenciometrián. Az 5.5.2. és 5.5.3. táblázatban feltüntetett értékek jól egyeznek az irodalmi értékekkel [68,152-157].

5.5.2. táblázat A vizsgált ligandumok savi disszociációs állandói (pK_a (lig.)) és a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]^{2+}$ -ionnal képzett komplexeik stabilitási szorzatai^a ($\lg\beta$), az azokból származtatott állandók (pK [MLZ], $\lg K^*$), valamint az [ML] komplexek $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ csere állandói ($\lg K$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$)) és a Cp*-metilcsoport protonjainak kémiai eltolódása az [MLZ] komplexekben {25 °C, $I = 0,20$ M KCl vagy KNO_3 }.

	maltol		allomaltol		dhp		pic	
	KCl	KNO ₃	KCl	KNO ₃	KCl	KNO ₃	KCl	KNO ₃
pK_1 (lig.)	8,44(1)	8,45(1)	7,97(1)	7,97(1)	3,67(1)	3,67(1)	5,26(1)	5,21(2)
pK_2 (lig.)	-	-	-	-	9,77(1)	9,66(1)	-	-
$\lg\beta$ [MLZ]	6,73(1)	8,45(1)	6,34(1)	8,01(1)	8,93(1)	10,90(1)	8,90(1)	9,18(1)
$\lg\beta$ [MLH ₋₁]	-3,87(9)	-1,06(4)	-	-1,40(7)	-2,97(7)	0,23(3)	-1,54(2)	-0,14(2)
pK [MLZ]	10,60	9,51	-	9,41	11,90	10,67	10,44	9,32
$\lg K^*$	-1,71	0,00	-1,63	0,04	-0,84	1,24	3,64	3,97
$\lg K$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$)	1,19(1)		1,38(1)		0,78(1)		2,20(1)	
δ [MLZ] /ppm	1,68	1,68	1,67	1,68	1,68	1,68	1,69	1,70

^a A 0,20 M kloridion jelenlétében számolt értékek a megadott kloridion-koncentráció alkalmazásakor érvényes látszólagos állandók.

A (tio)piron ligandumoknál feltehetően a hidroxilcsoport deprotonálódik, erre utalnak a ligandumok pH-függő UV-látható spektrumai, ahol a ligandumok deprotonálódásával a λ_{max} nagyobb hullámhosszak felé tolódott, ami kiterjedtebb konjugált π -elektron rendszer létrejöttét jelzi. Ismert, hogy a tiomaltol oxidációra hajlamos a fennálló tiol-tion tautoméria miatt, de argon atmoszféra alatt nem volt megfigyelhető oxidáció. Érdemes megjegyezni, hogy a tiomaltol pK_a -ja ~0,4 pH egységgel kisebb, mint a maltolé, mert a kénatom kisebb elektronegativitása, sokkal jobban polarizálható, így nő az elektronok delokalizációja a gyűrűben, és a konjugált bázis stabilisabb, mint a maltolnál. (Ugyanez a tendencia megfigyelhető az allomaltol-allotiomaltol

párnál is [158].) Az allomaltol és a maltol pK_a -ja közötti különbség a metilcsoportok helyzetéből adódik. A metilcsoport pozitív induktív effektusú elektronküldő csoport, aminek hatása az alloszármazékban az OH-csoporttól való nagyobb távolság miatt kevésbé érvényesül. A dhp-nak két pK_a -ja van, a savas pK_a a gyűrű-nitrogén deprotonálódását jelenti, a nagyobb pK_a pedig a hidroxilcsoportéhoz tartozik. Habár a maltolhoz hasonlítva az E_N -értékek alapján kisebb pK_2 -t várnánk a dhp-ra, a fordított trend legvalószínűbb magyarázata, hogy a semleges HL formára aromás ikerionos mezomer határszerkezet is felírható [159]. A pic esetében egy pK_a -t határoztunk meg a vizsgált pH-tartományban, ez pedig az aromás nitrogénhez tartozik. A karboxilátcsoport $pH = 0,7$ -n sem protonálódott a spektrofotometriás méréseink alapján. (Az irodalomban erre a donorcsoportra $pK_a \approx 0,9$ -1 körüli értékek találhatók [155,160].)

5.5.1.3. Komplexképzés az (O,O) és (O,N) donor ligandumokkal

A továbbiakban az $[MZ_3]$ maltol, allomaltol, dhp és pic ligandumokkal való komplexképzését vizsgáltuk pH-potenciometria, 1H NMR és UV-látható spektrofotometria segítségével $I = 0,20$ M kloridion tartalmú és kloridion-mentes közegben is. A komplexek jó vízdoldhatóságúak ($c_{max} \sim 10$ mM), ez alól a tiomaltol-komplex képez kivételt. A tiomaltol több szempontból is a többi ligandumtól eltérően viselkedett a fémionnal szemben, így a vele kapcsolatos eredményeket különálló fejezetben tárgyaljuk. Az (O,O), ill. (O,N) ligandumokkal a komplexképződés gyors volt és ugyanolyan sztöchiometriájú komplexeket képeztek a fémionnal, ezért részletesen a $[MZ_3]$ -maltol rendszer példáján mutatjuk be vizsgálataink eredményeit. Az 5.5.2. táblázatban megtalálhatóak a képződő komplexek összetételei és stabilitási szorzatai. Kizárólag $[MLZ]$ és többnyire $[MLH_{-1}]$ monokomplexek képződtek. A kloridion az $[MLZ]$ komplexekben képes versengeni a szabadon maradt egy koordinációs helyért a vízzel, továbbá az $[MZ_3]$ és $[M_2(\mu-OH)_2Z_2]$ részecskékben Z lehet klorid is, így a $0,20$ M KCl jelenlétében meghatározott stabilitási állandók csak az adott kloridion koncentrációra vonatkozó látszólagos értékek. A pH-potenciometriás titrálási görbék alapján megállapítható volt, hogy a maltollal a komplexképződés kloridion-mentes közegben már $pH \sim 2$ körül megkezdődik, míg klorid jelenlétében csak $pH \sim 4$ körül jelenik meg az $[MLZ]$ komplex. Ez egyezik a pH függvényében felvett 1H NMR spektrumok eredményével (5.5.2. ábra).

A spektrumok tanúsága szerint az NMR-időskálán lassú cserefolyamatok játszódnak le az $[M(H_2O)_3]^{2+}$ -maltol rendszerben, a szabad ligandumhoz (ill. fémionhoz) tartozó jelek a komplexben kötöttétől jól megkülönböztethetőek. A lúgos tartományban két párhuzamos folyamat figyelhető meg az NMR spektrumokon: (i) az $[ML(H_2O)]^+$ részecske jelei nagyobb térerősségek felé tolódnak, ami az $[MLH_{-1}]$ részecske képződésére utal; (ii) és nagyobb pH-kon a szabad ligandumhoz és a kétmagvú hidrolízisrészecskékhez tartozó jelek jelennek meg, azaz az $[ML(H_2O)]^+$ komplex disszociál. A csúcsintegrálok alapján móltörteket számoltunk, ugyanezt a pH-potenciometriás állandók segítségével is megtettük. Az így nyert koncentrációeloszlási görbék egymással jól egyeznek (5.5.2. ábra). Készültek UV-látható spektrofotometriás mérések is ugyanerre a rendszerre, így a töltésátviteli sávok abszorbancia változását is feltüntettük az 5.5.2. ábrán. Az $[ML(H_2O)]^+$ és $[M_2H_{-1}]$ részecskék képződésének megfelelő pH tartományban tapasztaltunk abszorbancia változást. Mind a maltol, mind pedig az allomaltol esetében kétfogú (O,O) koordináció áll fenn az $[MZ_3]$ -nal. Ezt a komplexek röntgen-krisztallográfiás vizsgálata is bizonyítja [161], az allomaltol komplex szilárdfázisú szerkezetét bécsi együttműködő

partnereink írták le. Az $[MLH_{-1}]$ általános képlettel jelölt részecske vegyes hidroxidokomplexxként értelmezhető, ami a koordinált vízmolekula deprotonálódásával vagy kloridionokat tartalmazó közegben (részben) a koordinált kloridion cseréjével képződik.

A dhp és a pikolinsav (pic) szintén $[MLZ]$ és $[MLH_{-1}]$ monokomplexeket képez az $[MZ_3]$ -ionnal. A dhp feltehetőleg (O,O) donorként koordinálódik a fémionhoz, ezt bizonyítják partnereink röntgen-kristallográfiás mérései, ill. az analóg $[Ru/Os(II)(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})]$ -dhp komplexek egykristály röntgendiffrakciós szerkezetei [47,162]. A pic komplex röntgenszerkezete irodalomból ismert [161], itt (O,N) koordináció valósul meg. Annak érdekében, hogy a pic esetében egy második ligandum piridin-nitrogénen keresztüli egyfogú koordinálódását kizárjuk változó fém-ligandum arányú (1:0 - 1:6) 1H NMR spektrumokat mértünk rögzített pH-n. A regisztrált csúcsok a monokomplexhez és a szabad ligandumhoz tartoztak, így a biszkomplex képződése kizárható volt. Kloridion-mentes közegben a dhp-vel való komplexképződés már pH = 2-n megkezdődik és pH = 5-8,5 között az $[ML(H_2O)]^+$ az uralkodó részecske a rendszerben. A pic-val a komplexképződés kloridionokat tartalmazó és kloridion-mentes közegben is már pH $\sim$ 2 körül szinte teljes volt, így pH = 0,7-2 közötti egyedi minták UV-látható spektrumainak felbontásával számoltuk az $[MLZ]$ stabilitási állandókat. A pic-val képzett $[MLZ]$ monokomplex igen széles pH-tartományban stabilis.

5.5.2. ábra. Az $[M(H_2O)_3]^{2+}$ -maltol 1:1 rendszer 1H NMR spektrumai (A) és koncentrációeloszási görbéi (B) a pH függvényében 0,20 M KNO_3 -os közegben. Jelmagyarázat mindkét ábrához: $\bullet$ = $[ML(H_2O)]^+$, $[MLH_{-1}]$; $\circ$ = $[HL]$, $[L^-]$; $\blacksquare$ = $[M(H_2O)_3]^{2+}$ $\square$ = $[M_2H_{-i}]$, $i = 2$ vagy 3 . A (B) ábrán a pH-potenciometria alapján számolt görbék (folyamatos és szaggatott), az NMR alapján számolt értékek ($\bullet, \circ$; $CH_{3, \text{maltol}}$) és ugyanezen rendszer abszorbancia változása ($\times$) látható. $\{c_M = c_L = 1 \text{ mM } (^1H \text{ NMR}), 220 \text{ } \mu\text{M (UV-látható spektrofotometria)}; 25 \text{ } ^\circ\text{C}\}$.

Ahhoz, hogy az egyes ligandumokkal képzett komplexek stabilitásait összevethessük, bázicitással korrigált származtatott állandókat ($\lg K^*$, ld. 4.2.1. fejezet) számoltunk (5.5.2. táblázat). Minél nagyobb a $\lg K^*$ értéke annál kedvezményezettebb a komplexképződés, azaz ez alapján a maltol $\approx$ allomaltol $<$ dhp $<$ pic stabilitási sorrend állítható fel mind a kloridionokat tartalmazó, mind pedig a kloridion-mentes közegben kapott állandók alapján. Ugyanez a

stabilitási trend volt megfigyelhető ezen ligandumok $[\text{Ru(II)}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})]$ komplexei esetén is [153,154,158]. Megjegyezzük, hogy a kloridionokat tartalmazó közegben számolt $\lg K^*$ állandók minden esetben kisebbek a kloridion-mentes közeghez képest, a kloridion ugyanis verseng a ligandumokkal a fémionért, tehát a komplexképződést a bázikusabb pH-tartomány felé tolja. Ugyanakkor az $[\text{MLCl}]$ komplexekben a kloridion a komplex hidrolízisét is a bázikusabb pH-k irányába tolja; ezt szemléletesen mutatják a számolt $pK_{[\text{MLZ}]}$ állandók (5.5.2. táblázat).

A vizsgált ligandumok fémkötő sajátságát különböző pH-kon pM értékek számolásával jól szemléltethetjük. Jelen esetben $pM = -\lg ([M] + [M_2H_{-2}] + [M_2H_{-3}])$, azaz a komplexben nem kötött fémion mennyisége. Az eredmények összehasonlíthatósága miatt $c_M = c_L = 1 \text{ mM}$ koncentrációknál és $I = 0,20 \text{ M}$ KCl ionerősség mellett számoltuk és ábrázoltuk a pM-görbéket a pH függvényében (5.5.3. ábra).

5.5.3. ábra. Az $[\text{MZ}_3]$ -ligandum 1:1 rendszerek pM görbéi a pH függvényében a ligandumok szerint jelölve $\{c_L = 1 \text{ mM}; 25^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl)}\}$.

5.5.4. ábra. A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ maltol-, dhp- és pic komplexének koncentrációeloszlási görbéi az analitikai c_{MLZ} függvényében; a folyamatos görbék a $[\text{MLZ}]$ komplexet, a pontozott görbék a szabad fémiont jelölik, az $[\text{M}_2\text{H}_{-i}]$ részecskék mennyisége ezen a pH-n elhanyagolható $\{M:L = 1:1; 25^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40; I = 0,20 \text{ M (KCl)}\}$.

Minél nagyobb a számolt pM érték annál stabilisabb komplex képződik az adott ligandummal. A maltol- és az allomaltol-komplexek stabilitása nagyon hasonló, és minden pH-értéken alatta marad a dhp-komplex stabilitásának. A pic-val az (O,O) ligandumokhoz hasonlítva

már sokkal savasabb pH-n megindul a komplexképződés. Érdemes megjegyezni, hogy minden esetben az [MLZ] komplexek dominálnak a fiziológiás pH = 7,40-n. Az [MLZ] komplexek móltörtje azonban természetesen függ az analitikai koncentrációktól. Az 5.5.4. ábrán megfigyelhető, hogy a maltol komplex 100 μM -os koncentráció alatt jelentős mértékben disszociál, így a biológiailag releváns koncentrációtartományban a fémionhoz valószínűleg más alkalmas szérumalkotók koordinálnak. A pic komplex a számításaink szerint rendkívül stabilis még néhány μM -os koncentrációtartományban is elhanyagolható a komplex disszociációja.

5.5.5. ábra. A kloridokomplexek százalékos megoszlása a teljes [MLZ] komplex mennyiségre vonatkoztatva különböző fiziológiás szempontból releváns klorid-koncentrációk alkalmazásakor 100 μM [MLZ] komplex koncentrációnál, L: maltol, dhp vagy pic {25 °C; Z = Cl vagy H_2O }.

Korábban már említettük, hogy kloridionok jelenlétében az [MLZ] komplexekben a harmadik koordinációs helyen (Z) a kloridionok (részben) kiszoríthatják a koordinált vizet. Ugyanez fordítva is igaz, ha szilárd kloridokomplexet oldunk fel a labilis kloridion víz molekulára cserélődhet. A $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ csere fontos lépését képezheti a komplexek aktiválódásának, ahogy ezt rokon szerkezetű $[\text{Ru}(\text{II})(\eta^6\text{-arén})]$ komplexeknél is leírták [12,32]. Ezért a komplexeknél ezt is vizsgáltuk olyan rögzített pH-n, ahol az [MLZ] forma domináns (5.5.5. ábra, 5.5.2. táblázat). A számolt látszólagos állandók ($\lg K(\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-)$) az alábbi egyensúlyon alapulnak.

A kloridion koordinációja jellegzetes UV-látható spektrumbeli változásokat okozott a komplexeknél, így a Z-ligandum cseréje jól követhető volt. A pic-komplexre számolt állandó több mint egy nagyságrenddel nagyobb, mint a dhp esetében, és az (allo)maltolátokomplexek állandóit is jóval meghaladja. Ennek a különbségnek pedig hatása lehet a bioaktivításra. Az 5.5.5. ábra diagramja fiziológiás szempontból fontos kloridkoncentrációnál mutatja a kloridokomplexek mennyiségét. Az átlagos kloridkoncentráció 100 mM a vérérszérumban, 24 mM a sejtplazmában és 4 mM a sejtmagban. Ezek alapján a maltol-komplexnek feltételezhetően 61%-a kloridokomplex, ami a sejtplazma, sejtmag irányba haladva 27%-ra, majd 5%-ra csökken. A dhp-komplexnél ez a folyamat még kifejezettebb, a pic-komplex azonban várhatóan még a sejtmagban is közel 40%-ban klorido-vegyeskomplekként van jelen.

Érdemes egy rövid összehasonlítást tenni az izoelektronos $[\text{Ru(II)}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})]$ komplexekkel. A Ru(II) -komplexek stabilitási szorzatai a maltol, allomaltol és dhp ligandumokkal nagyobbak a Rh(III) -komplexekhez hasonlítva, előbbi azonban sokkal hajlamosabb a hidrolízisre [154,158]. Összességében, tehát a Ru(II) -komplexek ugyan már savasabb pH-n kialakulnak azonban kisebb pH-n bekövetkezik a komplexek hidrolízise a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -hoz hasonlítva. Így például pH $\sim 7,4$ körül a maltol és a pic $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -hoz való koordinációja kedvezményezettebb a $[\text{Ru(II)}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})]$ -lal szemben.

Partnereink mérései alapján a vizsgált $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek citotoxicitása SW480 és A549 sejteken nem kifejezett. A legnagyobb aktivitása a dhp komplexnek van CH1 sejteken ($\text{IC}_{50} = 50(2) \mu\text{M}$), a maltol komplex ugyanezen a sejtvonalon kevésbé aktív ($\text{IC}_{50} = 120(16) \mu\text{M}$), míg a pic komplex gyakorlatilag nem citotoxikus ($\text{IC}_{50} = 258(6) \mu\text{M}$). Irodalmi adatok szerint az egyébként nagy stabilitású $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{en})\text{Cl}]^+$ és $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ komplexek sem aktívak különböző rákos sejtvonalakon [12]. Ezek alapján a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek stabilitása nincs közvetlen kapcsolatban a rákellenes aktivitással. A $[\text{Ru(II)}(\eta^6\text{-}p\text{-cimol})]$ -hidroxi-(tio)pir(id)on komplexeknél az aktivitás és a komplexek stabilitása között lehetett összefüggést találni [158], azonban valószínűleg sem a Rh(III) -, sem a Ru(II) -komplexeknél nem értelmezhetők a hatás-szerkezet összefüggések ilyen egyszerűen. Feltehetőleg a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ csere mértéke is befolyásolja a komplexek aktivitását. Az összefüggések teljesebb értelmezéséhez további, szélesebb körű vizsgálatok szükségesek.

5.5.1.4. Komplexképzés az (O,S) donor tiomaltollal

Az $[\text{MZ}_3]$ -tiomaltol rendszer pH-potenciometriás vizsgálatokor 1:3 fém-ligandum arány alatt vörösesbarna csapadék képződését tapasztaltuk; 1:2 aránynál enyhén bázikus pH-n ($\sim 8,5$), míg 1:1,5 aránynál már pH $\sim 6,5$ -n csapadék jelent meg 0,20 M KCl-os közegben. A ligandumkoncentráció csökkentésekor ($c_L = 0,5 \text{ mM}$) is csapadék képződött. A pH-potenciometriás görbék alapján azonban megállapítható, hogy az $[\text{MLZ}]$ komplexképződés kloridionokat tartalmazó és kloridion-mentes közegben pH = 2-n már gyakorlatilag teljes. A pH-függvényében 1:1 aránynál rögzített ^1H NMR spektroszkópiás mérések is erre utalnak, továbbá pH $\sim 5\text{-}6$ -n a csúcsok kiszélesedtek, és új, viszonylag éles jelek is megjelennek a rendszerben. A csapadékképződés azonban itt is gátolta a további mM-os koncentrációtartományban való méréseket. Ezért 100 μM -os ($\text{L}:\text{M} = 1:1$) minták ^1H NMR spektrumait is felvettük, ahol csapadékképződést ugyan nem tapasztaltunk, de a fő csúcsok a korábban említett módon kiszélesedtek és a nagyobb koncentrációnál már tapasztalt *kis moltörtű* komponensek is megjelentek, amelyeket azonban nem sikerült azonosítani sem 2D NMR sem ESI-MS technikával. Az $[\text{MLZ}]$ komplex stabilitási állandójának meghatározásához pH = 0,7-2 közötti egyedi mintákat készítettünk. Az UV-látható spektrumok alapján azonban az alsó pH határon már közel 100%-ban van jelen az $[\text{MLZ}]$ komplex, így stabilitási szoratzként csak határértéket tudtunk megadni (5.5.3. táblázat).

Nem tapasztaltunk csapadékképződést az 50 μM fémiont és ligandumot tartalmazó pH függvényében rögzített UV-látható spektrumokon, a spektrális változások azonban nem rendelhetőek egyértelműen az $[\text{MLZ}]$ komplex deprotonálódásához, vagy disszociációjához.

Feltehetően többmagvú vegyes hidroxidokomplexek képződnek. A szerkezetileg analóg [Ru(II)(η^6 -*p*-cimol)]–tiomaltol rendszernél korábban tapasztaltak *biszkomplex* képződést [158], így vizsgálatainkat ebben az irányban folytattuk.

5.5.3. táblázat Az [MZ₃] tiomaltollal képzett komplexeinek stabilitási szorzatai^a és a tiomaltol savi disszociációs állandója kloridion tartalmú és kloridion-mentes közegben {25 °C}.

	0,20 M KNO ₃	0,20 M KCl
pK _a	8,16(1)	8,06(1)
lgβ [ML]	> 15,0 ^b	> 15,0 ^b
lgβ [ML ₂]	> 21,6(1) ^c > 21,7(1) ^d	> 21,8(1) ^c > 21,7(1) ^d
lgβ [ML ₂ H]	> 28,1(1) ^d	> 28,0(1) ^d
pK [ML ₂ H]	6,42(6) ^c 6,37(1) ^d	6,19(5) ^c 6,33(4) ^d
lgK ^{ML+HL} _{ML₂H}	4,9(1) ^d	4,9(1) ^d

^a A kloridionokat tartalmazó közegben számolt értékek a megadott kloridion koncentrációra vonatkozó látszólagos állandók;

^b határérték az UV-látható egyedi minták (pH = 0,7-2) alapján;

^c pH-potenciometria, rögzített lgβ [ML₂H] (¹H NMR) felhasználásával;

^d ¹H NMR.

5.5.6. ábra. A tiomaltol és a ligandum fémionnal való titrálásának ¹H NMR spektrumai, a ligandum CH(6) proton kémiai eltolódásának tartományban, az [ML₂H] komplex kialakulásának vizsgálatához. A jelek hozzárendelése és a rendszerben lejátszódó cserefolyamatok jobb oldalt láthatóak {c_L = 1 mM; 25 °C; pH = 3,85; I = 0,20 (KCl)}.

Az 5.5.6. ábra ^1H NMR spektrumai a tiomaltol titrálását mutatja a fémionnal $\text{pH} = 3,85$ -n. A fémion hozzáadásával két jelcsoport jelent meg a spektrumokon, és a fémion arányának növelésével mindkét csúcs eltolódott, majd 1:1 fém-ligandum aránynál egyetlen csúcs marad, melynek pozíciója további fémion hozzáadására sem változik. A két jelcsoport és azok vándorlása három folyamatot jelöl: (i) a szabad ligandum gyors cserében van az egyfogúan koordinálódó formával, (ii) az egyfogú ligandum pedig a kétfogúan koordinálttal van gyors cserében, (iii) míg ez utóbbi és a szabad ligandum között lassú cserefolyamat áll fenn (5.5.6. ábra). (A cserefolyamatok gyorsasága az NMR időskálához viszonyítva értendő.) A kémiai eltolódások változásai alapján kiszámolható az egyes részecskék egyensúlyi koncentrációja és az $[\text{MLZ}] + [\text{HL}] \rightleftharpoons [\text{ML}_2\text{H}] + [\text{Z}]$ egyensúlyra felírható állandó ($\lg K_{\text{ML}_2\text{H}}^{\text{ML}+\text{HL}}$), amelyből a $\lg \beta [\text{ML}_2\text{H}]$ számolható ($\lg \beta [\text{ML}_2\text{H}] = \text{p}K_{\text{a}}(\text{lig}) + \lg \beta [\text{MLZ}] + \lg K_{\text{ML}_2\text{H}}^{\text{ML}+\text{HL}}$) (5.5.3. táblázat). A protonált biszkomplex ($[\text{ML}_2\text{H}]$) deprotonálódását a pH-potenciometriás görbék és pH-függő ^1H NMR mérések alapján is meghatároztuk. A kétféle módszerrel kapott eredmények igen jó egyezést mutatnak mindkétféle közegben.

A tiomaltollal képzett $[\text{MLZ}]$ komplex esetében is vizsgáltuk a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ csere mértékét. A számolt állandó $\lg K(\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-) = 0,95(1)$ ($\text{pH} = 3,1$) a maltol és dhp komplexekre számolt értékek közé esik.

A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ (O,O), (O,N) és (O,S) donor ligandumokkal képzett komplexeinek kloridionokat tartalmazó és kloridion-mentes közegben végzett vizsgálata alapján elmondható, hogy a tiomaltol kivételével kizárólag $[\text{MLZ}]$ és $[\text{MLH}_{-1}]$ monokomplexek képződnek. A tiomaltollal biszkomplexek ($[\text{ML}_2]$, $[\text{ML}_2\text{H}]$) is képződnek ligandumfelesleg hatására. A vegyes hidroxidokomplexek $\text{p}K_{\text{a}}$ -ja általában nagy (9,32-11,90). Az $[\text{MLZ}]$ komplexekre az (O,O) < (O,N) < (O,S) általános stabilitási trend állapítható meg. Az (O,O) és (O,N) donor ligandumok esetében a mM-os koncentrációtartományban fiziológiás pH-n az $[\text{MLZ}]$ komplex az uralkodó részecske, a koncentráció csökkentésével a néhány μM -os tartományban azonban a maltol és allomaltol komplexek nagymértékben disszociálnak. A tiomaltollal képzett monokomplex csak savas pH-n stabilis, fiziológiás pH-n vegyes hidrido oligomer részecskék képződése feltételezhető. A kloridion koordináló ligandumként nagyobb pH-tartomány felé tolja el a fémion hidrolízisét és a komplexképződést. A $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ csere mértéke az egyes komplexeknél igen eltérő, ami nagymértékben hozzájárulhat a biológiai aktivitásbeli különbségekhez. További, HSA-nal való vizsgálatainkhoz a viszonylag nagy stabilitással rendelkező dhp és pic komplexeket használtuk.

5.5.2. A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ és dhp-, ill. pikolinsav komplexének kölcsönhatása HSA-nal

Mivel a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek HSA-nal való kölcsönhatásáról nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok, így célszerűnek láttuk először a fehérjén való globális kötődést vizsgálni. Elsőként tehát ultraszűrési, CZE és ^1H NMR méréseket végeztünk. Az előző fejezetben leírtuk, hogy a kloridion koordinálódó liganduma a fémionnak és az $[\text{MLZ}]$ komplexeknek is, így vizsgálatainkat PBS* pufferben végeztük, amely a fiziológiás szérumbeli ionkoncentrációknak megfelelő összetételű, benne a kloridkoncentráció 102 mM. A Z-ligandum jelölésétől és a komplexek töltésének jelölésétől a továbbiakban eltekintünk. Az ultraszűrés eredményei azt

mutatták, hogy a HSA > 98%-ban képes megkötni a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ (önállóan, ligandum nélkül) 8,6-szoros feleslegét is. (A fémion és a komplexek önmagukban ~95%-ban átjutottak a szűrőn.) Hasonlóképpen a dhp komplexnél az átszűrt mintákban szabad komplex alig volt detektálható, ellenben szabad ligandum nagy mennyiségben jelent meg és a komplex/HSA arány növelésével mennyisége nőtt. 8,6-szoros komplex feleslegnél a spektrumfelbontás alapján az eredeti $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{dhp})]$ komplex 9%-a volt változatlan formában szabadon és 51%-a disszociált formában a szabad dhp mennyisége alapján számolva. A pic komplexnél hasonló 8,4-szeres komplex feleslegnél 22% szabad komplex megjelenését és 13%-os komplex-disszociációt tapasztaltunk. A HSA donoratomjai tehát valószínűleg versengeni képesek a ligandumokkal a fémionért, így a komplex disszociál, és emiatt jelenik meg a szabad ligandum az ultraszűrt mintákban. A kiszorítás mértéke a két komplex esetében eltérő volt, a dhp-t könnyebben szorította le a HSA, mint a pic-at. A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -vel készült mérések alapján akár 9 kötőhely is lehet a HSA-on a fémion számára, ugyanakkor a komplexek számottevő mértékben disszociálatlan formában is képesek kötődni a HSA-hoz. A fenti arányoknál a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{dhp})]$ ~40%-a a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pic})]$ ~65%-a kötődik a fehérjéhez.

Feltevésünk helyességét szeretnénk volna más technikával is alátámasztani, így CZE méréseket végeztünk. A minták rendhagyó módon kloridion-mentes foszfát pufferben készültek, mivel a kloridiont tartalmazó mintáknál a kloridokomplexek megjelenése miatt a detektált csúcsok megtöbbszöröződtek és kiszélesedtek az elektroferogramokon. A HSA- $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ rendszer vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy az 5-szörös feleslegben hozzáadott fémion gyakorlatilag maradéktalanul a HSA-hoz kötődött, szabad fémion nem volt detektálható, viszont a HSA csúcs kiszélesedett. Nagyobb fémion-felesleget az előbb tapasztalt csúcskiszélesedés miatt nem alkalmaztunk.

5.5.7. ábra A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{dhp})]$ HSA-nal való titrálásának és a dhp-nak az elektroferogramjai; jelölések: ▲ = $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{dhp})]$; ● = $[\text{dhp}]$; ■ = $[\text{HSA}]$, $[\text{HSA}-[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{dhp})]]$, $[\text{HSA}-[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]]$ { $c_{\text{fémkomplex}} = 200 \mu\text{M}$; $c_{\text{dhp}} = 200 \mu\text{M}$; 25°C ; $\text{pH} = 7,40$ (foszfát)}.

A dhp komplexszel való kölcsönhatást jól szemlélteti az 5.5.7. ábra. Az elektroferogramokon látható, hogy rögzített koncentrációjú fémkomplexhez adagoltuk a HSA-t. A fehérje (■) mennyiségének növelésével a szabad fémkomplex (▲) mennyisége csökkent, míg ezzel párhuzamosan szabad dhp (●) jelent meg a rendszerben. Kevesebb, mint 0,5 ekvivalens

HSA hozzáadásával a szabad komplex jele már nem detektálható. Az elektroferogramok kvantitatív kiértékelését az aszimmetrikus, elnyújtott csúcsok akadályozták, a tendencia azonban egyértelmű, a HSA képes kiszorítani a dhp-t komplexéből és a Rh(III) nagyobb részt $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -ként kötődik a fehérjéhez. ^1H NMR-es kísérleteink szintén ezt a tendenciát mutatták. A pic-komplexszel sokkal szabályosabb csúcsokat detektáltunk, és a csúcsmagasságok, ill. csúcsintegrálok alapján számolt koncentrációk egymással, sőt az ultraszűrési eredményekkel is jól egyeztek, így azokat együttesen ábrázoltuk az 5.5.8. ábrán. Megfigyelhető, hogy HSA hozzáadása nélkül is ~5% pic szabadon van az oldatban, valószínűleg a komplex összemérésekor a ligandum kis mennyiségben feleslegben volt. A HSA hozzáadásával a szabad fémkomplex mennyisége rohamosan csökkent, és a szabad ligandum mennyisége nőtt a rendszerben, azonban ez a növekmény elmarad a dhp-komplexnél tapasztalthoz képest. Az ábra alapján az is elmondható, hogy 0,5 ekv. HSA jelenlétében a pic-komplexnek ~65%-a eredeti formában kötődik a fehérjéhez. Az eddigi vizsgálatok azt mutatták, hogy a HSA-on több kötőhely áll rendelkezésre mind a fémion, mind pedig komplexei számára. Ez indokoltá tette a lehetséges kötőhelyek számbavételét. Ilyen mértékű kötődés, és annak ténye, hogy a fémion koordinációs szférájában egy könnyen cserélődő klorido- vagy víz ligandum is van, és ezen felül a kétfogú ligandumok részlegesen kiszorultak komplexükből, mind a koordinatív kölcsönhatások szerepére hívja fel a figyelmet. Ugyanakkor a hidrofób kötőhelyeken, vagy azok közelében való kötődés is lehetséges. Ez utóbbi másodlagos vagy koordinatív kötések révén is megvalósulhat ugyanis potenciális N-, O- és S-donorok az I-es és II-es kötőhelyen is vannak [74].

5.5.8. ábra Különböző arányú HSA– $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pic})]$ minták pic móltört értékei CZE csúcsintegrálok (●,○) és ultraszűrés (■,□) alapján számolva; üres jelölők: $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pic})]$, teli jelölők: [pic] {CZE: $c_{\text{fémkomplex}} = 200 \mu\text{M}$, $c_{\text{HSA}} = 0\text{-}100 \mu\text{M}$, pH = 7,40 (foszfát); ultraszűrés–UV-látható: $c_{\text{fémkomplex}} = 0\text{-}430 \mu\text{M}$, $c_{\text{HSA}} = 50 \mu\text{M}$, pH = 7,40 (PBS*); 25 °C}.

Az I-es és II-es kötőhelyen való kötődést spektrofluorimetriásan követtük. Kioltásos és kötőhely-marker-kiszorításos méréseket végeztünk. A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ és a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{dhp})]$ mind az I-es, mind pedig a II-es kötőhelyen nagyon hasonló kötési affinitást mutatott, ezt jól szemléltetik az 5.5.4. táblázatban számolt állandók. A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pic})]$ kötési erőssége ezeken a helyeken jóval elmaradt az előbbi kettőtől. Meg kell jegyeznünk, hogy a megkötődött formát (fémion vagy komplex) nem tudjuk a mérésekből megállapítani, és a számolt állandók sem

nyújtanak egyértelmű támpontot. Ugyanis a fémion és a dhp-komplex kötődése közt különbséget várnánk, ha az utóbbi disszociációjával járna a folyamat, mert ez versengést jelent a HSA és a dhp közt a fémionért. De a disszociálatlan komplex fémionével azonos mértékű kötődése is szokatlan.

5.5.4. táblázat A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ és dhp-, ill. pic komplexének HSA kötőhelyekhez való kötési és kiszorítási állandói fluorimetriás mérések alapján számolva $\{c_{\text{HSA}} = 1 \mu\text{M}; 25^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40 (\text{PBS}^*)\}$.

	$[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$	$[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{dhp})]$	$[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)(\text{pic})]$
Kioltás	5,9(1)	5,9(1)	5,1(1)
WF-kiszorítás	6,1(1)	6,2(1)	5,6(1)
DG-kiszorítás	5,8(1)	5,8(1)	4,7(1)

Vizsgálatainkból kiderült, hogy mind a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -fémion, mind pedig a dhp- és pic komplexek jelentős mértékben kötődnek a HSA-hoz. A komplexek kötődése részben a koordinált ligandumok kiszorításával jár, a fémkomplex disszociációja a kisebb stabilitású dhp komplex esetében kifejezettebb, mint a pic komplexnél. A kötődés valószínűleg nagyobb részt koordinatív jellegű, ugyanakkor az I-es és II-es kötőhelyen a fémion és a dhp komplex viszonylag nagy affinitással kötődnek, ettől a pic komplex kötése erőssége mindkét helyen elmaradt. Ezeken a kötőhelyeken is lehetőség van koordinatív kötődésre, így további terveink között szerepel, hogy a His-, Cys- és Met oldallánc modellekkel való kölcsönhatást részletesen tanulmányozzuk. Előzetes kísérleteink szerint a His nitrogén potenciális egyfogú liganduma lehet a fémkomplexeknek.

5.6. Ga(III)-komplexek

A KP46 és GaM fémkomplexek klinikai tesztelése igen előrehaladott, ennek ellenére vizes oldatbeli stabilitásukról, a vérplazmában feltételezhető formájukról, ill. a szérumalkotókkal kialakított esetleges kölcsönhatásokról kevés és hiányos információ található az irodalomban. Ebben a fejezetben ezekre a kérdésekre igyekszünk választ adni.

5.6.1 A Ga(III) oxinnal, szulfoxinnal, maltollal és tiomaltollal képzett komplexeinek oldategyensúlyi jellemzése

Az oldategyensúlyi vizsgálatokat a ligandumok protondiszociációs állandóinak meghatározásával kezdtük. A maltol és a tiomaltol vizes oldatbeli deprotonálódási folyamatait az 5.5.1.2 fejezetben írtuk le részletesen, a vonatkozó pK_a értékeket az 5.5.2. és 5.5.3. táblázatok tartalmazzák.

Az oxin vízdoldhatósága viszonylag rossz, de a savi disszociációs állandók meghatározhatók tisztán vizes oldatban pH-potenciometrián. A Ga(III)-ionnal képzett triszkomplexének maximális vízdoldhatósága azonban 36 μM körüli érték [71], így a komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometrián 30 és 60% (m/m) DMSO-víz oldószer elegyben határoztuk meg; ehhez pedig szükséges volt a ligandum pK_a -kat ilyen közegekben is megmérni. Továbbá az oxin jobb vízdoldhatóságú analógjaként a szulfoxint (4.1.1. ábra) és annak Ga(III)-ionnal való komplexképzését is bevontuk vizsgálatainkba összehasonlításként. A szulfoxin szulfonátcsoportja a vizsgált pH-tartományban mindvégig deprotonált, így a negatív töltés révén sokkal jobb vízdoldhatóságú, mint az oxin. Az oxin és a szulfoxin pH-potenciometrián különböző körülmények között meghatározott protondiszociációs állandóit az 5.6.1. táblázat tartalmazza. A pK_1 feltehetőleg a kinolin NH^+ deprotonálódásához tartozik, míg a második lépcsőzetes deprotonálódási folyamat a fenolos hidroxilcsoportéhoz köthető. Az általunk vizes közegben meghatározott állandók jó egyezést mutatnak az irodalomban található más körülmények között mért állandókkal [163-165]. Az oxin pK_a -i valamivel nagyobbak, mint a szulfoxiné mivel a szulfonát elektronszívó csoport. Megfigyelhető, hogy a DMSO mennyiség növelésével a pK_1 értékek csökkennek, míg a pK_2 értékek növekednek. A relatív permittivitás (dielektromos állandó, ϵ_r) reciprokanak függvényében ábrázolva a pK_a -kat lineáris összefüggést kapunk, ahol a már előbb említett módon a pK_1 értékekre illeszthető egyenes meredeksége negatív, míg a pK_2 értékek pozitív meredekséget adnak. Ez jól magyarázható a Born-féle elektrosztatikus oldószer modellel [166]. A kationos savak (kinolin NH^+) pK_a -ja csökken, míg az anionos bázisok (fenolát, ill. savi formája: fenolos OH) pK_a -ja növekszik a DMSO koncentrációját növelve. Az oxin deprotonálódását UV-látható spektrofotometrián és fluorimetrián is követtük tisztán vizes közegben. A spektrofotometrián meghatározott pK_1 jól egyezik a pH-potenciometriával, a pK_2 valamivel nagyobb (5.6.1. táblázat).

5.6.1. táblázat A Ga(III)-(szulf)oxin és -(tio)maltol komplexek pH-potenciometria alapján meghatározott stabilitási szorzatai, valamint a ligandumok savi disszociációs állandói különböző DMSO/víz oldószerkelegyekben {25 °C, $I = 0,20$ M (KCl) vízben, $I = 0,10$ M (KCl) 30 és 60% (m/m) DMSO/H₂O}.

		0% (m/m)	30% (m/m)	60% (m/m)
oxin	pK_1^a	4,99(2)	4,42(1)	3,64(1)
	pK_2^a	9,51(1)	10,15(1)	11,14(1)
	$\lg\beta[\text{GaL}]^{2+}$	13,13(8) ^b	13,64(6) ^d	14,50(5) ^d
		13,04 ^c		
	$\lg\beta[\text{GaL}_2]^+$	25,54(5) ^c	26,60(3)	30,15(2)
		25,58(3) ^b		
		25,73 ^c		
szulfoxin	$\lg\beta[\text{GaL}_3]$	36,79(1) ^c	37,87(2)	41,93(3)
		36,41(1) ^b		
		36,61 ^c		
szulfoxin	pK_1	3,90(2)	3,43(2)	2,91(1)
	pK_2	8,37(1)	8,91(1)	9,95(1)
	$\lg\beta[\text{GaL}]^{2+}$	11,99(1) ^d	12,63(3) ^d	14,13(5) ^d
	$\lg\beta[\text{GaL}_2]^+$	23,25(2)	25,01(2)	27,14(9)
	$\lg\beta[\text{GaL}_3]$	33,17(1)	35,06(1)	38,36(9)
maltol ^f	pK_a	8,45(1)	9,00(1)	9,87(1)
	$\lg\beta[\text{GaL}]^{2+}$	10,63(2) ^d	11,33(1) ^d	12,15(2) ^d
	$\lg\beta[\text{GaL}_2]^+$	21,07(4)	22,24(3)	24,74(6)
		20,66(6) ^b		
	$\lg\beta[\text{GaL}_3]$	28,77(2)	30,64(1)	34,08(4)
tiomaltol		28,76(4) ^b		
	pK_a	8,06(1)	-	-
	$\lg\beta[\text{GaL}]^{2+}$	10,37(6)	-	-
	$\lg\beta[\text{GaL}_2]^+$	19,05(6)	-	-
	$\lg\beta[\text{GaL}_3]$	25,52(2)	-	-

^a UV-látható titrálások: $pK_1 = 4,95(1)$, $pK_2 = 9,75(5)$, fluorimetria: $pK_1 = 4,96(1)$; tisztán vizes oldatban, $I = 0,20$ M KCl;

^b UV-látható titrálások alapján ($\text{pH} > 2$);

^c extrapolált adatok a 30 és 60% (m/m) DMSO/H₂O mérések $\lg\beta$ értékei alapján;

^d UV-látható spektroszkópia, egyedi minták ($\text{pH} = 1-2$);

^e fluorimetriás titrálások ($\text{pH} > 2$);

^f pH-potenciometria 0,20 M KNO₃ közegben: $pK_a = 8,46(1)$; $\lg\beta[\text{GaL}]^{2+} = 10,53(5)$; $\lg\beta[\text{GaL}_2]^+ = 21,03(3)$; $\lg\beta[\text{GaL}_3] = 28,73(2)$.

Az oxin gyengén fluoreszcens vegyület így 367 nm-en gerjesztve vettünk fel emissziós spektrumokat a pH függvényében. A protonált ligandum pH ~ 4 alatt nem emittál, de a pH növelésével növekvő fluoreszcenciát mutatott, ez alkalmas volt pK_1 számolására. A továbbiakban a feltételezett második lépcsőzetes deprotonálódási folyamatnál csökkenni kezdett a mért intenzitás, azonban ezt egy intenzitás növekedés követte, ami csak pH $> \sim 11$ -n kezdett újra csökkenni, emiatt nem tudtunk pK_2 -t számolni (5.6.1. táblázat). A jelenség irodalmak szerint azzal magyarázható, hogy gerjesztett állapotban a semleges oxin részben ikerionos (NH^+ , és O^-) formában van jelen, és inter/intramolekuláris H-hidak alakulhatnak ki, ami megakadályozza az alapállapotú molekula deprotonálódási állandójának fluorimetriás meghatározását. [167,168].

A Ga(III) és a (tio)maltol közötti komplexképzési folyamatokat elsősorban pH-potenciometriásan követtük, a meghatározott komplex stabilitási szorzatokat ($\lg\beta$) az 5.6.1. táblázat tartalmazza. A pH 2-11,5 tartományban $[GaL]^{2+}$, $[GaL_2]^+$, valamint $[GaL_3]$ sztöchiometriájú komplexek képződése figyelhető meg vizes oldatban. A maltol esetében a monokomplex stabilitásának meghatározásához pH = 1-2 közötti UV-látható egyedi minták voltak szükségesek. Majd az így kapott állandó konstans értéken tartásával számoltuk a bisz- és triszkomplexek stabilitási szorzatait. Feltehetőleg kétfogú koordináció valósul meg mindhárom komplexnél. A komplexképződést UV-látható spektrofotometriásan is követtük a pH = 2-11,5 tartományban. A maltolkomplexekre ez alapján is számoltunk komplex stabilitási állandókat, melyek viszonylag jól egyeznek a pH-potenciometriás értékekkel. A fotometriás mérések szintén jól alátámasztják a feltételezett speciációt.

5.6.1. ábra. A Ga(III)–maltol 1:3 rendszer 1H NMR spektrumai a pH függvényében; a részecskék jelölése: $[HL]$, $[L]^-$ (Δ); $[GaL]^{2+}$ ($\blacklozenge$); $[GaL_2]^+$ ($\circ$); $[GaL_3]$ ($\blacksquare$) (A); és a csúcsintegrálok ($\times$; $\bullet$), valamint a pH-potenciometria alapján számolt koncentrációeloszlási görbék (B) $\{c_L = 3 \text{ mM}; c_M:c_L = 1:3; 25,0^\circ\text{C}; I = 0,20 \text{ M (KCl)}; 10\% \text{ D}_2\text{O}\}$.

Ismert, hogy a Ga(III)-ion kis stabilitású kloridkomplexeket képez vizes oldatokban [169]. Az ebből származó esetleges hibák kiszűrésére kloridion-mentes közegben is meghatároztuk a Ga(III)–maltol rendszer stabilitási szorzatait, amelyek a kloridiont tartalmazó közegben számolt állandóktól alig térnek el, tehát utóbbinak gyakorlatilag nincs hatása a komplexképződésre.

A speciáció megerősítésére pH-függő ^1H NMR méréseket végeztünk. Az 5.6.1. ábrán a Ga(III)–maltol 1:3 rendszer NMR spektrumai láthatók. Az egyes komplexekhez és a ligandumhoz tartozó jelcsoportok külön csúcsokként jelennek meg, az NMR időskálán lassú cserefolyamatok játszódnak le. A *trisz*komplex az uralkodó részecske pH = 6-8 között mM-os koncentrációtartományban, pH = 10 felett viszont a komplex teljes mértékben disszociál. Az NMR-es csúcsok integráljaiból számolt móltört értékek jól illeszkednek a pH-potenciometria alapján számolt koncentrációeloszlási görbékre (5.6.1./B ábra).

A *trisz*komplexek oktaéderes geometriájúak, és fennáll a faciális-meridionális izoméria lehetősége. A maltol *trisz*komplexe szilárd fázisban röntgendiffrakciós mérések szerint *mer* izomerként van jelen [65], vizes fázisban ismert, hogy gyorsan izomerizálódik [170], azonban az ^1H NMR spektrumokon tapasztalt éles csúcsok és egyetlen csúcskészlet egyféle izomer meglétére utalnak vizes fázisban. (A dolgozatban nem tárgyalt allomaltol komplex esetében is ugyanezt tapasztaltuk.) A tiomaltol $[\text{GaL}_3]$ komplexét kizárólag *fac* izomerként kristályosították ki, d_6 -DMSO-ban oldva a komplexnek éles jelei vannak az NMR spektrumon, ami a *fac* izomer jelenlétét valószínűsíti [68]. Vízben oldva a szabad ligandum jele mellett azonban két csúcskészlet jut a *trisz*komplexre. A hőmérséklet 25 °C-ról 65 °C-ra való emelése a csúcsok kiszélesedéséhez vezet. Ezek együttvéve arra utalnak, hogy vizes oldatban két izomer van jelen és ezek egymással lassú cserefolyamatban vannak szobahőmérsékleten. (Ugyanez a viselkedés tapasztalható a dolgozatban nem tárgyalt Ga(III)–tioallomaltol *trisz*komplexénél is.). Megállapítható, hogy a Ga(III)-maltolato- és -tiomaltolatokomplexek stabilitása a Fe(III)-komplexekével összevethető [170,171], és mindkét fémion – „hard” Lewis-sav jellegénél fogva – stabilisabb komplexeket képez az (O,O) donor maltollal [172].

A Ga(III) oxinátokomplexének rossz vízdoldhatósága miatt pH-potenciometriás méréseinket 30, ill. 60% (m/m) DMSO/víz elegyben végeztük, az ionerősség 0,10 M (KCl) volt. A monokomplexek stabilitási szorzatát olyan egyedi minták segítségével határoztuk meg UV-látható spektrofotometriásan, melyek a pH = 1-2 tartományban voltak. A számolt stabilitási állandókat az 5.6.1. táblázatban mutatjuk be. A rendszert korábban vizsgálták 50% (m/m) dioxán/víz elegyben [173]; de ezek az állandók valamivel kisebbek, mint az általunk 60% DMSO/víz elegyben meghatározott állandók. Az oxinnal párhuzamosan a szulfoxin és a maltol komplexek stabilitási állandóit is meghatároztuk a fentebb írt közegekben; valamint a szulfoxin komplexek jó oldhatósága miatt itt lehetőség volt tisztán vizes közegben is meghatározni a stabilitási szorzatokat (5.6.1. táblázat).

Az 5.6.2. ábra trendje alapján jól látható, hogy a DMSO koncentráció (azaz az $1/\epsilon_r$ értékének) növelésével a stabilitási szorzatok is nőnek. A különböző közegekben meghatározott állandók lineáris összefüggést mutattak az oldószer(elegyek) relatív permittivitásának reciprokával, így az oxin Ga(III) komplexeinek stabilitási állandóit a DMSO tartalmú mérések, valamint a szulfoxinra számolt értékek meredeksége alapján extrapoláltuk. (5.6.1. táblázat). Az oxin és szulfoxin ligandumok kétfogúan (N,O) donorként koordinálódnak a fémionhoz [64,164].

A Ga(III)–oxin rendszert UV-látható spektrofotometriásan is vizsgáltuk vizes közegben. A mérésekhez híg oldatokat és nagy optikai úthosszú küvettát ($l = 4$ cm) használtunk. A számolt állandók az 5.6.1. táblázatban találhatók.

Ismert, hogy a Ga(III)-, ill. az Al(III)-ion *trisz*-oxinátokomplexe erősen fluorescens [174]. Az oxin önmagában kevésbé emisszív (ld. fent), de fluorogén ligandumként Ga(III)-hoz koordinálódva intenzitása közel tízszeresére növekszik. A fluorimetria stabilitási állandók meghatározásához való felhasználása igen ritka az irodalomban [95], ugyanakkor rossz vízdoldhatóságú fluoreszcens vegyületek esetében kifejezetten hasznos lehet. A [*trisz*-oxinát-Ga(III)] komplex (KP46) 3-dimenziós fluorimetriás spektruma az 5.6.3./A ábrán látható. Ezek alapján a komplex gerjesztési maximuma $\lambda_{EX} = 367$ nm-nél van, az emissziós spektrumot pedig 450-650 nm tartományban érdemes követni.

5.6.2. ábra. Korrelációs diagram a különböző DMSO koncentrációknál mért $\lg\beta[\text{GaL}_q]$ értékek és az oldószer(elegyek) számolt relatív permittivitásának reciproka ($1/\epsilon_r$) között; L: maltol ($\times$), oxin ($\bullet$) és szulfoxin ($\blacktriangle$) {25,0 °C, $I = 0,2$ M (KCl) vízben, $I = 0,10$ M (KCl) 30 és 60% (m/m) DMSO/H₂O elegyben}.

5.6.3. ábra. A Ga(III)-oxin (1:3) rendszer 3-dimenziós fluoreszcens spektruma pH = 7,40-n (A) és az 530 nm-en mért emissziós intenzitások a pH függvényében 1:5 ($\diamond$); 1:3 ($\bullet$); 1:2 (Δ) és 1:1 ($\circ$) fém-ligandum arányoknál és az oxin ($\times$) titrálási görbéje (B) { $c_L = 50$ μM ; $\lambda_{EX} = 367$ nm; 25 °C; $I = 0,20$ M (KCl)}.

Az 5.6.3./B ábrán különböző fém-ligandum arányok mellett mért fluoreszcens intenzitások láthatók az emissziós maximumon ábrázolva. Ezen mérések alapján a PSEQUAD program [92] segítségével számoltuk a *bisz*- és *trisz*komplexe stabilitási szorzatait (5.6.1. táblázat). A kétféle

spektroszkópiás módszerrel meghatározott stabilitási szorzatok jól egyeznek egymással és nem térnek el jelentősen a DMSO/víz elegyek titrálási alapján extrapolált értékektől sem.

Az adatok alapján elmondható, hogy az oxin és a szulfoxin Ga(III) megkötő képessége közel egyező, ezt mutatják a $\text{pH} = 7,40$ -n $1 \mu\text{M}$ Ga és $10 \mu\text{M}$ ligandum esetén számolt pM értékek is: $\text{pM} = 7,86$ (oxin); $7,92$ (szulfoxin) ($\text{pM} = -\lg \Sigma [\text{Ga}(\text{OH})_n]^{(3-n)+}$; $n = 0-4$). Ezen a pH-n a *trisz*komplex az uralkodó részecske mind a két ligandum esetén.

A *trisz*-maltolátó- és *trisz*-oxinátó-Ga(III)-komplexek (a továbbiakban GaM és KP46) már klinikai teszteleseknek alávetett rákellenes vegyületek [3,64,66,67], ennek ellenére a komplexek stabilitási állandói vizes közegben nem voltak ismertek az irodalomban korábban. A meghatározott állandók (5.6.1. táblázat) birtokában viszont már modellszámolásokat végezhetünk fiziológiás szempontból releváns körülmények között. Az 5.6.4. ábrán koncentrációeloszlási görbéket mutatunk be a *trisz*komplexekre vonatkozóan fiziológiás pH-n, vizes oldatban, a komplexek változó analitikai koncentrációja mellett. Mindkét ligandum esetén a *trisz*komplexek az uralkodó részecskék mM-os koncentrációtartományban. (Ez a koncentrációtartomány a KP46 esetében csak DMSO/víz elegyekben volt elérhető, vizes közegben nem; ld. 5.6.4. ábra szaggatott vonalak). Az oxinnal képzett *trisz*komplex stabilitási szorzata ~ 8 nagyságrenddel nagyobb, mint a maltol esetében. Ez azt vonja maga után, hogy igen híg – ugyanakkor fiziológiás szempontból releváns – koncentrációtartományban az oxin képes megakadályozni a fémkomplex disszociációját, míg a maltol csak részben (5.6.4. ábra). Az oldatban szabad maltol és $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ jelenik meg. Ennek következtében a két komplex várható vérszérumbeli eloszlása eltérő, hiszen a KP46 komplex nagy stabilitása révén kevésbé képes ligandumcsere folyamatokban részt venni, mint a *trisz*-maltolátókomplex.

5.6.4. ábra. A Ga(III) maltollal (szürke görbék) és oxinnal (fekete görbék) képzett *trisz*komplexének koncentrációeloszlási görbéi a komplex analitikai koncentrációjának függvényében 7,4-es pH-n. A szaggatott vonalak a komplex vízzoldhatatlan koncentrációtartományát jelölik. $\{t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}, I = 0,20 \text{ M (KCl)}\}$.

A KP46 intenzív fluoreszcens tulajdonságát kihasználva javaslatunkra a Bécsi Egyetemen fluoreszcencia mikroszkópos technikával sikerült a komplex sejtekbe jutását is követni (5.6.5. ábra). Az SW480 vastagbélrák sejteken végzett vizsgálatok tanúsága szerint a fémkomplex több órán keresztül stabilis maradt sejtes környezetben. Az is megfigyelhető volt, hogy a komplex

percek alatt felhalmozódott a sejtekben, majd idővel a sejtmag körüli lemezes képletekben, feltehetően az endoplazmás retikulumban, ill. annak fehérje összetevőiben dúsult fel.

5.6.5. ábra. Fluoreszcencia mikroszkópos felvételek a KP46 élő SW480 vastagbélrák sejtekbe való bejutásáról 5 perces, ill. 3 órás inkubációt követően $\{c_{\text{KP46}} = 150 \mu\text{M}, \text{ a méréseket Robert Trondl végezte}\}$.

5.6.2. A Ga(III)-komplexek kölcsönhatása HSA-nal és Tf-nel

A klasszikus oldategyensúlyi vizsgálatok szerint a GaM stabilitása jóval kisebb a KP46-hoz viszonyítva (ld. 5.6.4. ábra). Emiatt feltételezhető, hogy a vérérszérumban LMM és HMM komponenseivel eltérő mértékben vagy módon lépnek kölcsönhatásba. A vérérszérumban számos „hard” Lewis-sav található, mint például a citrát, oxalát, foszfát vagy a hidroxidionok. Ezek akár versenghetnek a Ga(III) ionért hasonlóan az Al(III)-ionhoz [175], és a fémion kis ligandumokkal való reakciója feltehetően gyorsabb a makromolekulákhoz hasonlóan. Elsőként tehát a potenciális kompetitor citrát-, oxalát- és foszfát ligandumok hatását vizsgáltuk a fémkomplexek stabilitására. Méréseinkhez $20 \mu\text{M}$ KP46-ot vagy $80 \mu\text{M}$ GaM komplexet használtunk, ami a terápiás szérumkoncentrációknak felelnek meg, a kompetitor ligandumok koncentrációja pedig a vérérszérumban koncentrációjuknak megfelelően rendre $c_{\text{citrát}} = 98 \mu\text{M}$; $c_{\text{oxalát}} = 9,2 \mu\text{M}$; $c_{\text{foszfát}} = 1,1 \text{ mM}$, ill. ezen értékek tízszerese volt. (A KP46 esetében 20 mM foszfát koncentrációt is alkalmaztunk, mivel későbbi ^1H NMR-es kísérleteinkhez a HEPES / foszfát puffer cseréjére volt szükség.) A mintákat UV-látható spektrofotometriásan vizsgáltuk és nem találtunk mérhető változást a komplexek spektrumában a hozzáadott LMM vegyület hatására, még a tízszeres koncentrációk esetén sem. Tehát nem áll fent versengés az eredeti ligandumok és a választott LMM potenciális kompetitorok között a fémionért.

Vizsgálatainkat a nagy molekulatömegű reakciópartnerek számbavételével folytattuk. A Tf szerepe a Ga(III)-ion szállításában köztudott, a fémion a Fe(III)-kötőhelyeken koordinálódik a fehérjéhez [87,176]. A Ga(III)-komplexek HSA-nal való kölcsönhatását szintén tanulmányozták, és általában elhanyagolhatónak találták [72]. Viszont a HSA nagy szérumbeli mennyiségénél fogva egy viszonylag gyenge kölcsönhatás is jelentős átrendeződéshez vezethet a vérérszérumban. A HSA számos fémion-kötőhelyet tartalmaz, azonban ezek elsősorban kétértékű közbelső és/vagy „soft” Lewis-sav karakterű fémionok megkötésére alkalmasak (pl. Zn(II), Cu(II), Pt(II), Cd(II)), és a kötőhelyek által biztosított koordinációs geometria sem kedvező a Ga(III)ion számára. A fehérjén található hidrofób zsebek (I-, II-, III-as kötőhely) azonban ideálisak lehetnek

a fémkomplexek megkötésére, ahogy azt már az ezt megelőző fejezetekben is láhattuk. Elsőként tehát a komplexek albuminnal való kölcsönhatását tanulmányoztuk.

A HSA–GaM rendszerre elsőként ^1H NMR spektrumokat vettünk fel ($c_{\text{GaM}} = 1,00 \text{ mM}$; $c_{\text{HSA}} = 0,50 \text{ mM}$). Ezek alapján a csak GaM-ot tartalmazó mintában a ligandumnak kb. 5%-a szabadon volt, ez megfelelt a stabilitási állandók alapján vártaknak. A HSA jelenlétében a fémionhoz kötött és nem kötött maltol aránya alig változott, a nem kötött maltol csúcsa elmozdult kisebb kémiai eltolódások felé. A komplexben kötött ligandumhoz tartozó jel azonban változatlan maradt. Ez alapján valószínű, hogy a HSA és a GaM között nincs mérhető kölcsönhatás. A maltol és a fehérje között viszont gyenge kölcsönhatás van, ezt a Tanszékünkön készült korábbi mérések is alátámasztják, ahol a maltol II-es kötőhelyen való kötődését mutatták ki [129]. A lehetséges reakciót a GaM és a szérumfehérje között ultraszűrési technikával is követtük. A fehérjementes és a fehérjét is tartalmazó ultraszűrt minták UV spektrumai kevésbé tértek el egymástól, a kis eltérés valószínűleg itt is a maltol kötődésének volt köszönhető.

A KP46-tal annak rossz oldhatósága miatt ultraszűrési mérések nem készülhettek, azonban a fémkomplex fluoreszcens tulajdonsága lehetővé tette a HSA-nal való kölcsönhatás követését. Az 5.6.6. ábrán látható, hogy a KP46 emissziós intenzitása nagymértékben nő, ha HSA-t adunk hozzá. A HSA maga is emittált ezen a gerjesztő hullámhosszon, de a mért effektus nem tisztán additív jellegű, ami egyértelműen a kölcsönhatásra utal. A mérések kvantitatív kiértékelése alapján a komplex kötési állandója $\lg K' = 4,04(8)$, ami a fehérjével való viszonylag gyenge kölcsönhatásra utal. Groessl és munkatársai kismértékű kötődést írtak el egy $50 \mu\text{M}$ HSA-t és $20 \mu\text{M}$ KP46-ot tartalmazó rendszerben [72], habár számításaink szerint a komplex 30%-ának a fehérjéhez kellene kötődnie.

5.6.6. ábra. A KP46–HSA rendszer ($\Delta, \blacklozenge$: két párhuzamos mérés) és a HSA ($\circ$) emissziós intenzitása a változó HSA koncentráció függvényében ($c_{\text{KP46}} = 16 \mu\text{M}$; $c_{\text{HSA}} = 3\text{--}95 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{EX}} = 367 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 532 \text{ nm}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,40$ (HEPES, $0,10 \text{ M KCl}$) $\}.$

A korlátozott oldhatóság ellenére sikerült STD NMR spektrumokat felvennünk híg oldatban. Ez a módszer kifejezetten alkalmas viszonylag gyenge, másodlagos kölcsönhatások követésére. A mérések 600 MHz -es készüléken krio-mérőfej alkalmazásával készültek. A KP46 ^1H NMR spektrumán (5.6.7. ábra) nem ekvivalens ligandum protonok láthatók, ami különböző szerkezeti izomerek meglétére utal. Az STD NMR spektrumon megjelennek a komplex jelei,

ami arra utal, hogy kötődik a fehérjéhez. Az is megállapítható, hogy a fémkomplex nem disszociál a kötődés során. A KP46 változatlan koordinációs szféráját a HSA jelenlétében mások is kimutatták röntgenabszorpciós spektroszkópiával [73].

5.6.7. ábra. A KP46 ^1H NMR spektruma (a) és a KP46–HSA rendszer STD NMR spektruma (b) $\{c_{\text{KP46}} = 20 \mu\text{M}$; $c_{\text{HSA}} = 50 \mu\text{M}$; 7°C ; $\text{pH} = 7,40$ (foszfát, $0,10 \text{ M KCl}$); 10% (V/V) $\text{D}_2\text{O}\}$.

UV-látható és fluorimetriás különbségspektrumok alapján az oxin kötődése is kimutatható a HSA-hoz, a mérések azonban nem voltak alkalmasak kvantitatív kiértékelésre. A HSA–oxin kölcsönhatás azonban nem valószínű, hogy befolyásolja a komplex kötődését a fehérjén, ha figyelembe vesszük a KP46 igen nagy stabilitását.

5.6.8. ábra. A KP46 elhelyezkedése a HSA IB alegységének hidrofób zsebében (III-as kötőhely); a felület színezése a Kyte-Doolittle hidrofobitási skálának megfelelően sötétkék az erősen hidrofób és világoskék a kisebb hidrofobitítású helyeken.

Mindkét vizsgált fémkomplex semleges töltésű, azonban csak a KP46 mutatott mérhető kölcsönhatást az albuminnal, ez részben a GaM komplexhez viszonyított nagyobb lipofilitásának tulajdonítható ($\lg P_{\text{KP46}} = 0,88$ [71]; $\lg P_{\text{GaM}} = 0,41$ [65]). Valamint a KP46 aromás ligandumainak köszönhetően „ π - π stacking” kölcsönhatásba is léphet a fehérje oldalláncokkal. A KP46 esetében, annak rossz oldhatósága miatt további *in vitro* vizsgálatokat nem végeztünk, azonban lehetséges kötőhelyeinek feltérképezésére a HSA-on együttműködő partnerünk, Tiziano Tuccinardi végzett dokkolásos számításokat. Ezek alapján a KP46 legvalószínűbb kötőhelye az

IB alegységben, azaz a III-as kötőhelyen van. Az 5.6.8. ábra a komplex elhelyezkedését mutatja a kötőhelyen. Két oxin ligandum egy-egy hidrofób üregben helyezkedik el, míg a harmadik ligandum oldószernek kitett pozícióban van. A hidrofób kölcsönhatások főként Leu, Ile és Phe aminosavakon keresztül valósulnak meg. De az üregben található még Tyr is az oxin-ligandumokhoz közel. Az oldószernek kitett ligandum környezetében Arg, His és Lys aminosav oldalláncok találhatóak.

A Tf-nel való lehetséges kölcsönhatás a HSA-hoz hasonlítva más jellegű, ugyanis a Tf elsősorban a fémion koordinatív megkötésére alkalmas, így a fémkomplexek (részleges) disszociációja (azaz ligandum/fehérje csere) várható a reakcióban. Az irodalmi bevezetőben említettük, hogy az apoTf két Ga(III)-ion megkötésére képes, a folyamat a következő látszólagos állandókkal írható le $\text{pH} = 7,4$ -n, HCO_3^- jelenlétében: $\lg K_1' = 20,3$ és $\lg K_2' = 19,3$ [87]. Figyelembe véve a GaM és KP46 közötti stabilitásbeli különbséget a Tf-nel való kölcsönhatásukban is eltérést vártunk.

A GaM és az apoTf közötti kölcsönhatást UV-látható- és ^1H NMR spektroszkópiával és fluorimetriával vizsgáltuk. Annak eldöntésére, hogy fennáll-e kölcsönhatás a fehérje és a fémkomplex között elsőként UV-látható különbségspektrumokat rögzítettünk $\text{pH} = 7,40$ -n változó apoTf–GaM arányok mellett. A különbségspektrumok alapján megállapítható volt, hogy van közöttük kölcsönhatás, melynek természetéről ^1H NMR mérésekkel szereztünk további információt. Az 5.6.9. ábra spektrumai alapján látható, hogy az apoTf jelenlétében szabad maltol jelenik meg a rendszerben, azaz lejátszódik részben a ligandum/fehérje csere, és a nem kötött ligandum mennyisége a szinergista HCO_3^- jelenlétében még nagyobb. Az apoTf-nel való kölcsönhatás tehát koordinatív jellegű.

5.6.9. ábra. A GaM-apoTf rendszer ^1H NMR spektrumai: a) 25 mM HCO_3^- jelenlétében, b) HCO_3^- nélkül és c) a GaM önmagában ($c_{\text{GaM}} = 1,0$ mM; $c_{\text{apoTf}} = 0,5$ mM; 25 °C; $\text{pH} = 7,40$ (HEPES, 0,10 M KCl); 10% D_2O).

Az apoTf maga is fluoreszcens fehérje a benne lévő Tyr és Trp aminosavaknak köszönhetően. 280 nm-en gerjesztve mindkét aminosav emittál [177]. A Fe(III) kötőhelyen

található két Tyr is [85,87,178], melyek fluoreszcenciája várhatóan kioltódik, ha bekötődik egy fémion [177], így az intenzitás csökkenésén keresztül a fémionhoz való koordináció is követhető.

5.6.10. ábra. Az apoTf fluoreszcens intenzitásának változása a hozzáadott GaM (×), KP46 (◇) vagy GaCl₃ (▲) koncentráció függvényében { $c_{\text{apoTf}} = 0,2 \mu\text{M}$; $c_{\text{komplex}} = 0,2\text{-}4 \mu\text{M}$ (GaM vagy KP46); a GaCl₃ esetében: $c_{\text{apoTf}} = 2 \mu\text{M}$; $c_{\text{GaCl}_3} = 20\text{-}100 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{EX}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{EM}} = 340 \text{ nm}$; 25°C ; $\text{pH} = 7,40$ (HEPES, $0,10 \text{ M KCl}$)}.

5.6.11. ábra. A GaM-Tf (A) és a KP46-Tf (B) rendszerek koncentrációeloszlási görbéi a komplexek analitikai koncentrációjának függvényében { $c_{\text{Tf}} = 37 \mu\text{M}$ (figyelembe véve a kötőhelyek 30%-os telítettségét Fe(III)-ionokkal); $\text{pH} = 7,40$ } (A szaggatott rész a KP46 oldhatósági határán túli koncentrációkat jelöli.)

Az 5.6.10. ábrán az apoTf GaM-al és GaCl₃-dal való titrálása látható 25 mM HCO_3^- jelenlétében. Az egyensúly 15-20 perc alatt beállt a GaM esetében. A GaM koncentráció növelésével a mért intenzitás egyértelműen csökken, aminek oka az lehet, hogy a fehérje donatoromjai kiszorítják a maltolt a fémion körüli koordinációs szférából. Ugyanakkor a GaCl₃ nem befolyásolja a mért intenzitást még tízszeres feleslegben és 4 óra inkubációt követően sem. A Ga(III)-ion ugyanis koordinálódó ligandumok hiányában fiziológiás pH-n nagyrészt meglehetősen inert $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ -ionná hidrolizál [179]. Tehát a Tf és a $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ közötti reakció meglehetősen lassú, ezért ürülnek ki a (hidrolizált) Ga(III)-sók gyorsan a szervezetből a veséken keresztül [65,176]. A GaM viszont sokkal gyorsabban reagál az apoTf-nel, és az ilyen

formában adott Ga(III) Tf-receptorokon keresztül bekerülhet a sejtekbe [176]. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a „szállító” maltol ligandum kiszorításának mértéke erősen függ a GaM vérszérumbeli koncentrációjától.

Ezért koncentrációeloszlási görbéket készítettünk az általunk meghatározott Ga(III)-maltol és Ga(III)-hidroxidokomplexek stabilitási állandói, [179] és az apoTf–Ga(III) kötési állandói [87] ismeretében. Az 5.6.11./A ábrán a GaM komplex analitikai koncentrációját változtattuk. A Tf koncentrációja a fiziológiásnak megfelelő 37 μM , és feltételeztük, hogy a Tf fémkötőhelyeinek közel 30%-a Fe(III)-ionokkal telített. A modellszámolások alapján megállapítható, hogy 30 μM alatt a maltol teljesen kiszorítja a Tf, és 100 μM -os koncentrációnál is csak a maltol 50%-a marad komplexben kötve.

Hasonló modellszámolásokat végeztünk az apoTf–KP46 rendszerre is a megfelelő állandók ismeretében [87,179]. Az 5.6.11./B ábra jól mutatja, hogy az oxin sokkal nagyobb mértékben képes megőrizni a fémiont eredeti koordinációs szférájában, mint a maltol. A számításainkat jól alátámasztják a Tyr kioltásos mérések is, ahol az apoTf emissziós intenzitásának csökkenése kisebb mértékű volt a KP46 hozzáadásakor, mint a GaM esetében (5.6.10. ábra).

5.6.12. ábra. Az oxin (a) és a KP46 apoTf-nel felvett ^1H NMR spektruma (b), valamint a KP46 önálló spektrum részlete (beszűrt ábra: (c)) $\{c_{\text{oxin}} = 60 \mu\text{M}$; $c_{\text{KP46}} = 20 \mu\text{M}$; $c_{\text{apoTf}} = 20 \mu\text{M}$; $c_{\text{NaHCO}_3} = 25 \text{ mM}$; 7°C ; $\text{pH} = 7,40$; $10\% \text{ D}_2\text{O}\}$.

A KP46 apoTf-nel való kölcsönhatását ^1H NMR-rel is vizsgáltuk, kis KP46 koncentráció (20 μM) és krio-mérőfej alkalmazásával. Az apoTf jelenlétében felvett spektrum (5.6.12. ábra) egyértelműen mutatja az oxin részleges kiszorítását a Ga(III)-ion mellől. A megfelelő csúcsintegrálok arányából kiszámolható, hogy az oxin 71%-a Ga(III)-hoz kötött az adott körülmények között, ami igen jó egyezést mutat az állandók alapján számolt 70%-os értékkel. A KP46 fluoreszcens tulajdonságait az apoTf-nel való kölcsönhatás tanulmányozásakor is kihasználtuk. KP46 oldatok spektrumát vettük fel az apoTf távol- és jelenlétében 1 óra inkubációs időket alkalmazva (5.6.13./A ábra).

Fontos megjegyezni, hogy az apoTf nem emittál a $\lambda_{\text{EX}} = 367 \text{ nm}$ -es gerjesztést alkalmazva. Látható, hogy az apoTf távollétében a komplex emissziós intenzitása lineárisan nő a komplex

koncentrációjával. A fehérje jelenlétében ez a növekedés az előbb említett kalibráció alatt fut, később pedig párhuzamossá válik vele. Ez azzal magyarázható, hogy az apoTf megköti a Ga(III)-iont, a szabadon maradó oxin pedig gyengén emittál. Ebből a feltételezésből kiindulva a mérési pontok alapján kiszámoltuk a Tf-hez kötött Ga mennyiségét, ez elfogadható egyezést mutatott a termodinamikai állandók alapján vártakkal (5.6.13./B ábra).

5.6.13. ábra. A KP46–apoTf rendszer emissziós intenzitása (Δ) és a KP46 kalibráló egyenese (□) a KP46 koncentráció függvényében (A) valamint az ez alapján számolt [apoTf–Ga(III)] egyensúlyi koncentrációk (◇) együtt ábrázolva a stabilitási állandók alapján szimulált görbével (B) { $c_{apoTf} = 25$ μM; $c_{KP46} = 2,5-20$ μM; $\lambda_{EX} = 367$ nm; $\lambda_{EM} = 532$ nm; 25 °C; pH = 7,40 (HEPES, 0,10 M KCl)}.

5.6.14. ábra. A GaM– (A) és a KP46– (B) HSA–Tf vegyes rendszer koncentrációeloszlási görbéi a komplexek analitikai koncentrációjának függvényében { $c_{HSA} = 630$ μM; $c_{Tf} = 37$ μM (figyelembevéve a kötőhelyek 30%-os telítettségét Fe(III)-ionokkal); pH = 7,40} (A szaggatott rész a KP46 oldhatósági határán túli koncentrációkat jelöli.)

Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk a Ga(III)-komplexek eloszlásáról a vérérszékben további többkomponensű modellszámolásokat végeztünk (5.6.14. ábra). Ennek megfelelően a HSA koncentráció 630 μM a Tf pedig 37 μM volt a feltételezett fiziológiai pH-jú rendszerben, ahol a Ga(III)-komplexek koncentrációját változtattuk. A számolásokhoz a már említett irodalmak állandóit [87,179], a HSA–maltol rendszer kötési állandóját [129] és az általunk meghatározott stabilitási állandókat használtuk. Feltételeztük továbbá, hogy a Tf kötőhelyeinek 30%-a Fe(III)-ionokkal telített. Az ábrák alapján látható, hogy a különböző Ga(III)-részecskék aránya nagyban függ a fémkomplexek analitikai koncentrációjától. A GaM

komplex terápiás szempontból releváns koncentrációtartományában ($\leq 160 \mu\text{M}$ [176]) jelentős szerep jut a Tf-nek a Ga(III)-ion szállításában. A maltol kiszorítása $40 \mu\text{M}$ -nál kisebb komplex koncentrációnál teljes, a Ga(III)-ion Tf-hez koordinálódik. Az 5.6.11./A ábrától való kismértékű eltérést a HSA és a maltol gyenge kölcsönhatása okozza. A KP46 oldaláról nézve viszont a Tf szerepe látszik kevésbé hangsúlyosnak (5.6.14./B ábra), ami a fémkomplex nagy stabilitása miatt van. Viszont a HSA a teljes komplexet képes megkötni, így a KP46 nagy része ehhez a fehérjéhez kötődik.

A modellek természetesen nagyon leegyszerűsítettek a valós rendszerhez képest, arra azonban alkalmasak, hogy az alábbi következtetéseket levonjuk: (i) a GaM szállításában a HSA nem vesz részt, (ii) a Tf viszont jelentős mennyiségű Ga(III)-iont szállít az eredeti GaM komplex disszociációját okozva ezzel; továbbá (iii) a KP46 döntően a HSA-hoz reverzibilisen kötve változatlan formában szállítódik a vérérszumban, ami (iv) felveti a Tf-független sejtes felvétel jelentőségét.

5.7. Kumarin alapvázás redukált Schiff-bázis vegyületek kölcsönhatása HSA-nal

Az általunk vizsgált redukált Schiff-bázis kumarin származékok maguk is rendelkeznek rákellenes hatással (4.1.1. ábra) [180-182]. Munkánk során azonban elsősorban tesztrendszerként alkalmaztuk ezeket a vegyületeket. A HSA-nal való kölcsönhatásuk fluorimetriás módszerrel való követhetőségét és a mért spektrumok PSEQUAD programmal [92] való kiértékelhetőségét elsőként ezeken a vegyületeken vizsgáltuk.

A kumarinok jól ismert vegyületek az élelmiszer-, festék- és lézeriparban, valamint a gyógyászatban is alkalmazzák őket [180,181]. Származékaikat használják antibakteriális és véralvadásgátló terápiában (pl. WF); továbbá potenciális gombaellenes, fájdalomcsillapító, értágító és rákellenes szerek is találhatók köztük [182-186]. Az **1b**, **1c** és **1d** ligandumok maguk is mutattak rákellenes aktivitást HT29 (vastagbélrák) sejtvonalon ($IC_{50} = 60-80 \mu M$) [185].

A HSA számos kumarinvegyület transzportjára alkalmas, továbbá az is jól ismert, hogy a fő kötőhelyük általában az I-es hidrofób zsebben található [74,77,187-189]. Így indokoltnak tűnt a választott vegyületek albuminnal való kölcsönhatásának vizsgálata. A ligandumok vízoldhatósága kifejezetten rossz (μM koncentrációtartományba esik), ezért a fehérjével való kölcsönhatás tanulmányozása csak fluorimetriásan volt lehetséges. Az eredmények jobb értelmezhetősége érdekében a ligandumok protondiszociációs állandóit is meghatároztuk, ill. együttműködő partner (T. Tuccinardi) bevonásával az albuminhoz való kötődést dokkolásos számolásokkal is alátámasztottuk.

A ligandum pK_a -kat igen híg 0,5-2 μM -os oldatokban határoztuk meg 4 cm optikai úthosszú küvetában UV-látható spektrofotometriásan. A ligandumokat előzetesen DMSO-ban oldottuk, a titrált minták maximum 0,2% (V/V) DMSO-t tartalmaztak. Az 5.7.1. táblázatban feltüntetett pK_a -k a fenolos OH-csoport deprotonálódásához köthetők. A ligandumok deprotonálódási trendje megfelel a szubsztituensek eltérő induktív/rezonancia hatása alapján vártak. A fenolos OH-csoportokhoz viszonyított *o*- és *p*-helyzetű halogén szubsztitúció azok negatív induktív effektusa révén kisebb pK_a -t eredményez az **1a** alapvegyülethez képest [95,190]. A *p*-nitro származék tovább növeli az OH-csoport savasságát, mivel ez negatív mezomer effektusú szubsztituens. Meg kell jegyezni, hogy pH = 3 alatt (**1c** esetén pH = 5 alatt) a vegyületek UV-látható spektruma jelentősen változik, feltehetően a szekunder amin deprotonálódása miatt. Az adatokból nem tudtunk megbízható pK_a -kat számolni, viszont fiziológiás pH-n (ahol a HSA-val való kölcsönhatás vizsgálata történt) nem releváns ezen állandók ismerete.

5.7.1. táblázat. A kumarin ligandumok pK_a -ja, és a HSA-hoz való kötődési állandójuk ($\lg K'(\text{HSA})$) {25 °C}.

	1a	1b	1c	1d	1e
pK_a^a	9,63(2)	7,51(1)	7,46(1)	7,36(2)	6,80(1)
$L_{7,4}^-$ (%)	1	43	45	51	79
$HL_{7,4}$ (%)	99	57	55	49	21
$\lg K'(\text{HSA})^b$	5,68(3)	6,45(1)	7,5(1)	7,22(4)	7,09(2)

^a $I = 0,10 \text{ M (KCl)}$, vizes oldatban, $\leq 0,2\%$ (V/V) DMSO jelenlétében;

^b pH = 7,40 (foszfát, 1% (V/V) DMSO).

A ligandumok I-es kötőhelyhez való kötődését vizsgáltuk a fehérjén, elsősorban Trp kioltásos módszerrel. A minták DMSO-tartalma minden esetben 1,0% (V/V) volt. Először a kölcsönhatás időfüggését vizsgáltuk: 1 órás inkubáció elegendőnek bizonyult az egyensúly beállításához. A híg minták ellenére, a kumarin ligandumok nagy moláris abszorbanciája miatt szükséges volt a mért intenzitások korrekciója, mind a gerjesztő, mind pedig az emissziós hullámhosszakon. A látszólagos kötési állandókat és az emittáló részecskék egyedi spektrumait PSEQUAD programmal [92] számoltuk (5.7.1. táblázat). Ezek alapján számoltuk az 5.7.1. ábrán látható görbéket, amelyek jó egyezést mutattak a mérési pontokkal. Fontos megjegyezni, hogy a kioltási görbék a kezdő intenzitás ~25%-ára telítenek, azaz részleges kioltás történik, ezt a kiértékelés során figyelembe vettük. A jelenség oka lehet, hogy a fehérjében Tyr aminosavak is vannak, melyek gyengén emittálnak az alkalmazott gerjesztés használatakor [191].

5.7.1. ábra. A HSA emissziójának mért és számított kioltási görbéi a különböző HSA–ligandum rendszerekben: **1a** (○, fekete szaggatott vonal), **1b** (◆, szürke folyamatos vonal), **1c** (▲, fekete folyamatos vonal), **1d** (□, fekete pontozott vonal), relatív intenzitás = $F_{mért} / F_{kezdeti}$ ($C_{HSA} = 1 \mu M$; $\lambda_{EX} = 295 \text{ nm}$; $\lambda_{EM} = 342 \text{ nm}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,40$ (foszfát, 1% (V/V) DMSO)}.

A ligandumok a 295 nm-es gerjesztést használva maguk is intenzíven emittáltak a látható hullámhossz tartományban. Irodalmi adatokból feltételezhető, hogy a fehérjéhez való kötődés a ligandumok emissziós maximumának kisebb hullámhosszak felé való eltolódását és/vagy intenzitásnövekedését okozza [192]. Spektrumbeli változást azonban csak az **1c** ligandum esetében tapasztaltunk: a kötődés hatására a ligandum emissziós maximuma kisebb hullámhosszak felé tolódott, azonban a várt intenzitásnövekedés helyett mérsékelt intenzitásbeli csökkenést tapasztaltunk a HSA-nal való kölcsönhatásban (5.7.2. ábra). Ezért a felvett spektrumoknak elsősorban csak a 305–360 nm közötti szakaszát használtuk szoftveres kiértékeléshez, ami tisztán a Trp emissziójának változását mutatta. A számolt állandók igen nagy értékek, erős kötődésre utalnak a fehérje I-es kötőhelyén. Az **1c**, **1d**, **1e** ligandumok esetén a kötődés mértéke összemérhető a BR kötési állandójával ezen a helyen ($\lg K'(BR) = 7,3$); de még a legkevésbé kötődő **1a** is meghaladja a WF-ra hasonló mérési körülmények között számolt kötési állandónkat ($\lg K'(WF) = 5,6$).

Az **1c** ligandum kötődésre való spektrális érzékenysége alkalmassá tette arra, hogy a ligandumsávok felhasználásával is számoljunk kötési állandót. Az így számolt állandó $\lg K' = 7,54(6)$ jó egyezést mutat a Trp kioltásból számolt $\lg K' = 7,5$ -ös állandóval. Az állandók

hasonlósága erősíti azt a feltételezést, hogy a ligandumok elsődlegesen az I-es kötőhelyen kötődnek a fehérjéhez.

5.7.2. ábra. A HSA-1c rendszer fluoreszcens spektrumai (A), és a spektrumok intenzitás változása 340 nm-en (fekete pontok) és a 450 nm-en (szürke pontok), a szürke pontozott vonal az 1c független mérésből származó kalibráló egyenese (B) $\{c_{\text{HSA}} = 1 \mu\text{M}; c_{1c} = 0-4 \mu\text{M}; \lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}; 25 \text{ }^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40 \text{ (foszfát, 1\% (V/V) DMSO)}\}$.

A Trp kioltásos méréseket klasszikus módon szokás linearizációs módszerekkel kiértékelni. Az egyik ilyen eljárás a Stern-Volmer-féle egyenesillesztés [52,98]. A módszer a koncentráció-intenzitás adatpárokat teljes vagy részleges kioltás esetén különféleképpen transzformálja (ld. 4.2.4.1. fejezet). Esetünkben részleges kioltást mértünk, így a HSA-1b rendszerre az $F_0/(F_0 - F_{\text{mért}})$ hányadost ábrázolva a ligandumkoncentráció reciprokéjaként függvényében az 5.7.3. ábrán látható pontsorozatot kaptuk.

5.7.3. ábra. A HSA-1b titrálás Stern-Volmer ábrázolása $\{c_{\text{HSA}} = 1 \mu\text{M}; c_{1b} = 0-7,9 \mu\text{M}; \lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}; \lambda_{\text{EM}} = 340 \text{ nm}; 25 \text{ }^\circ\text{C}; \text{pH} = 7,40 \text{ (foszfát, 1\% (V/V) DMSO)}\}$.

Ideális esetben a pontok egy egyenesre illeszkednek, és a kioltási (K_{SV}) állandó az y-tengelymetszet és a meredekség hányadosa. Az egyenestől felfelé való elhajlást szinte mindig a statikus és dinamikus kioltás egyidejű meglétére vezetik vissza. A statikus kioltás jelenti a nem emittáló komplex kialakulását, míg a dinamikus kioltás csupán a gerjesztett állapot élettartama alatti ütközésekből ered, így nem is jelenti az adduktum kialakulását. A HSA I-es kötőhelyén való dinamikus kioltás ugyanakkor nem valószínű esemény [191]. A kétféle kioltás meglétének

bizonyítására sokkal megbízhatóbb módszer a 4.2.4.2. fejezetben említett fluoreszcencia-élettartam mérés. Ugyanis a görbe második, nagyobb meredekségű szakaszát tipikusan okozhatja a módszer legszembetűnőbb hibája, hogy az egyensúlyi ligandumkoncentrációt analitikai koncentrációval helyettesíti. Így nagyobb kötési állandók ($\lg K' > 5$) esetén a kis ligandumkoncentrációkhoz tartozó pontok (az ábrán szürkével jelölve) eltérnek az egyenestől. A görbe kezdeti szakaszára illesztett egyenesből esetünkben egy $\lg K_{SV} = 6,17(4)$ állandó számítható, amit szokás kötési állandóként értelmezni, de ez a valós állandó alulbecsléséhez vezet. A módszer további hiányossága, hogy csak egy hullámhosszon történő kiértékelést tesz lehetővé és nem képes több emittáló részecskét kezelni.

Az **1e** ligandumnál WF-kiszorításos mérésekkel is meggyőződünk az I-es kötőhelyen való kötődésről.

A T. Tuccinardi által végzett dokkolásos számolások rámutattak arra, hogy a vizsgált ligandumok a WF-tól teljesen eltérő orientációval kötődnek az I-es kötőhelyen, és a hidrofób zsebet kialakító aminosavak a WF-nál megszokott kumaringyűrű helyett [193] a ligandumok fenol(át)-gyűrűjével lépnek hidrofób kölcsönhatásba. A fenolát további dipólus-kölcsönhatást tud kialakítani a környező Arg-281-el, ezt molekuladinamikai számítások is alátámasztották. Ennek megfelelően, pH = 7,40-n a részlegesen deprotonált **1b**, **1c**, **1d** és **1e** erősebben kötődik ezen a helyen.

A kumarin ligandumokkal végzett kísérleteinkben az albuminnal való kölcsönhatást követtük fluorimetriásan. A PSEQUAD programmal [92] való kiértékeléssel számolt kötési állandók alapján jó illesztéssel nyertük vissza a kísérletileg mért intenzitásokat. A módszer nagy előnye a grafikus módszerekhez képest a teljes spektrumok használata és a több emittáló részecske kezelése. A kumarin ligandumok igen nagy affinitással kötődtek a HSA I-es kötőhelyén, és arról is meggyőződünk, hogy ez az elsődleges kötőhely. Emellett megállapítottuk, hogy azok a ligandumok (**1b**, **1c**, **1d**, **1e**) kötődnek erősebben az I-es kötőhelyen, amelyek fenolos OH-csoportja részben deprotonált pH = 7,40-n.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A rákellenes terápia egyik legszéleskörűbben alkalmazott szere a ciszplatin, mely önmagában és kombinációs kezelésként is használatos. Alkalmazhatóságát azonban korlátozzák a kezelések során fellépő súlyos mellékhatások és a gyógyszerrel szembeni rezisztencia. Ezért számos kutatóhelyen folyik más hatásspektrumú és kedvezőbb mellékhatásprofilú fémkomplexek fejlesztése. A hatóanyagok által kifejtett hatás megértéséhez szükséges azok farmakokinetikai (és hatástani) tulajdonságait feltérképezni. Egy fémkomplex a koordinált ligandumok révén a klasszikus szerves hatóanyagoktól eltérően sokkal szélsőségesebb változásokon mehet keresztül a szervezetben való útja során. Napjainkban még igen kevés információ áll rendelkezésre a fémkomplexek biotranszformációs folyamatait illetően. Ezért választott fémkomplexek (bio)speciációját vizsgáltuk klasszikus oldategyensúlyi módszerekkel és makromolekulákkal – elsősorban HSA-nal, apoTf-nel és DNS-sel – való kölcsönhatásuk szempontjából.

(I.) A Pt(II) komplexek közé tartozó oxaliplatin és KP1537 komplex esetében azt vizsgáltuk, hogy a komplexek eltérő mellékhatásprofilja magyarázható-e eltérő vizes oldatbeli viselkedésükkel, vagy a vészérum fehérjekomponenseihez való affinitásuk különbözőségével. Méréseink alapján a két fémkomplex hidrolitikus viselkedése nagyon hasonló. Kloridionok jelenlétében az eredeti komplexek bomlása gyorsabb a tiszta vizes közeghez viszonyítva, de még 100 mM kloridionkoncentráció alkalmazásakor is viszonylag lassú folyamat. Feltehetőleg a koordinált oxalát cserélődik közegtől függően víz molekulákra, vagy kloridionokra. A kétlépéses bomlás végtermékei a megfelelő *diakva*-, illetve *dikloridokomplexek*. A két fémkomplex közel azonosan viselkedett a különböző körülmények között.

A HSA-nal való kölcsönhatásvizsgálatok szerint a fehérjéhez való kötődés igen lassú folyamat, 48 óra elteltével sem állt be az egyensúly. Kloridionok jelenlétében fokozódott az oxaliplatin és a KP1537 albuminhoz való kötődése. A két fémkomplex igen hasonló mértékben, mérsékelt affinitással kötődik a HSA-hoz. Más fehérjék szerepe is valószínű a Pt(II)-komplexek kötésében a humán szérummal végzett kísérletek alapján, ezek lehetnek az irodalmakban is említett γ -GL-ok. A KP1537 oxaliplatinétól eltérő mellékhatásprofilja nem magyarázható a – farmakokinetikai paraméterekre közvetlenül kiható – hidrolízisbeli vagy szérumfehérjékhez való kötésbeli különbségekkel.

(II.) A maleimiddel kapcsolt Pt(IV) komplexek – a KP2155 és a KP2156 – a hatóanyagok olyan csoportjába tartoznak, amelyekkel a célbajuttatás tervezett módon az albuminhoz való kapcsolással valósulhat meg. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a maleimid funkciós csoport révén képesek-e ezek a fémkomplexek a Cys34-hez kötődni a HSA-on. A kölcsönhatást közvetett spektrofotometriás technikával követtük. Ehhez előzetesen megbízható módszert dolgoztunk ki a hozzáférhető Cys mennyiségének követésére. Vizsgálataink során kiderítettük, hogy a HSA a kisméretű tiolvegyletektől (GSH, Cys) eltérően a DTDP reagenssel csak egyetlen szubsztitúciós lépésben reagál, továbbá a reakció lejátszódásához szükséges időt és körülményeket is optimalizáltuk. Ezt követően közvetett módon megállapítottuk, hogy a KP2155 és KP2156 komplexek az albuminnal 1:1 adduktumot képeznek, és a kötődés mértéke közel

kvantitatív. Az albuminhoz való kapcsolás a komplexek tartós jelenlétét biztosíthatja a véráramban.

(III.) A Pt-alapú komplexek mintájára számos, más központi fémiont tartalmazó komplexet állítottak elő. Ezek közül a KP1019 és KP1339 Ru(III)-komplexek klinikai fázis I/II vizsgálatokban is hatékonynak mutatkoztak. A komplexek enyhe mellékhatásaiért részben a szérumfehérjékkel való kölcsönhatás felelhet. Célunk a komplexek albuminhoz való gyors, másodlagos kölcsönhatásokkal való kötődésének tanulmányozása volt. Eredményeink szerint mindkét fémkomplex kötődik a fehérje I-es és II-es hidrofób zsebeiben. Ezen Ru(III)-komplexek kötődése a HSA-hoz gyors volt, percek alatt lejátszódott. A kétféle kötőhelyhez való kötődésben nem találtunk jelentős affinitásbeli különbséget, a számolt állandók közepes értékek. A két komplex közel azonos mértékben kötődött az egyes kötőhelyeken, tehát az ellenionok különbözősége nem befolyásolja a HSA-hoz való kötődést. A fluorimetriás eredményeket CZE-sel és ultraszűrőssel is alátámasztottuk. A közvetlen ultraszűrőses vizsgálatok szintén 2 ekvivalens komplex megkötődését mutatták az albuminon. Kimutattuk továbbá a vizsgált Ru(III)-komplexek és a bilirubin (endogén metabolit) közti versengést az albumin I-es kötőhelyén; ennek klinikai jelentősége lehet, ugyanis a hiperbilirubinémiás betegek KP1019 komplexszel való kezelésekor a hatásosság rosszabb volt. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy a fémkomplexek a viszonylag lassan kialakuló koordinatív kötődését a fehérjén egy gyors, másodlagos kölcsönhatásokkal létrejövő kötődés előzi meg, ami már alkalmas lehet arra, hogy az idő előtti kiürüléstől megóvja a komplexeket.

(IV.) A KP1019 komplexszel szerkezetileg rokon Ru(II)- és Os(II)-nitrozil komplexek esetén szintén a HSA-nal való kölcsönhatást vizsgáltuk. A komplexek a központi fémionjukban, az ellenionban vagy a komplex konfigurációjában különböztek egymástól. Az egyes komplexek (1-5) között azonban nem találtunk számottevő eltérést az egyes kötőhelyekhez való affinitásban. Egyedül az 5-ös komplex maradt el kissé a kötés mértékét illetően a többi komplextől. A vérszérummal végzett kísérletek szerint a fő szállító fehérje a HSA. Érdekes különbség a KP1019-től, hogy az I-es és II-es kötőhelyen mért kiszorítási állandók közel egy nagyságrenddel kisebbek a nitrozil komplexek esetében, ugyanakkor az ultraszűrés nem mutatott ilyen különbségeket, így feltételezhető, hogy további – a nitrozil komplexek számára hozzáférhető – kötőhelyek is vannak a fehérjén.

(V.) Érdekes probléma volt a Ru(III)-szalán és Ru(II)-phen komplexek DNS-sel való kölcsönhatásának vizsgálata. Egyik fontos célunk volt a DNS-sel való kölcsönhatások kvantitatív jellemzése, mivel a témában közölt irodalmak gyakran helytelenül kezelik a kötési állandó fogalmát. Fluorimetriás számolási módszert dolgoztunk ki az ismert DNS-marker molekulák a DAPI és az EB kötőhely-méretigényének és kötési erősségének meghatározására. Az állandók értelmezéséhez fontos megjegyezni, hogy a számolt kötőhelyméret a preferált bázis szakaszok előfordulási sűrűségét is kifejezi a DNS-láncon, és nem azonos a marker valós helyigényével.

A Ru(III)-szalán komplexek esetében az EB mérsékelt kiszorítását tapasztaltuk, ami a DNS-láncon való interkalációt jelez. A kiszorítás tényét fluoreszcencia-élettartam mérésekkel támasztottuk alá. A kis árokokban kötődő DAPI-t nem tudták kiszorítani a fémkomplexek. A citotoxicitásbeli eltéréseket minden valószínűség szerint nem a DNS-sel való kölcsönhatásuk

különbözősége okozza. A Ru(II)-phen komplexek (CM8, CM16) esetében eredményeink arra utalnak, hogy a komplexek a kis árokban viszonylag nagy sűrűséggel és nagy affinitással kötődnek a DNS-lánchoz, a koordinálódó phen ligandumok feltehetően extrahelikális „stacking” révén a kis árokba simul, azonban a harmadik ligandum nem elég kiterjedt ahhoz, hogy ténylegesen interkalálódjon. Mind a Ru(III)-szalán, mind pedig a Ru(II)-phen komplexek esetében számoltunk kizorítási állandókat az adott markerre nézve, azt azonban meg kell jegyezni, hogy a számolt állandó minden esetben az adott marker kötőhely-méretét veszi alapul, amivel a fémkomplexek kötőhely-mérete (vagy kötési sűrűsége) a DNS-en valószínűleg nem egyezik.

(VI.) A $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -komplexek vizsgálatakor elsődleges célunk az volt, hogy leírjuk a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ vizes oldatbeli viselkedését és különböző (O,O), (O,N) és (O,S) donorokkal való komplexképzését. Ezt – mintegy a szérumbeli oldategyensúlyi viszonyok felderítésének második lépéseként – HSA-nal való kölcsönhatás vizsgálatok követték. Eredményeinkből megállapítható, hogy a kloridion koordinálódó ligandumként bázikusabb pH-tartomány felé tolja el a fémion hidrolízisét. Komplexképzés szempontjából az (O,O) donor maltollal, allomaltollal és dhp-val, valamint az (O,N) donor pic-val kizárólag $[\text{MLZ}]$ és $[\text{MLH}_{-1}]$ monokomplexek képződnek, az utóbbi vegyes hidroxidokomplex ($\text{Z} = \text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$). Az $[\text{MLZ}]$ komplexek pK_a -ja általában nagy (9,32-11,90). Az (O,S) donor tiomaltollal biszkomplexek ($[\text{ML}_2\text{H}]$, $[\text{ML}_2]$) is képződnek ligandumfelesleg jelenlétében. Az $[\text{MLZ}]$ komplexekre az $(\text{O,O}) < (\text{O,N}) < (\text{O,S})$ általános stabilitási trend állapítható meg. A tiomaltollal képzett monokomplex azonban csak savas pH-n stabilis, fiziológias pH-n valószínűleg vegyes hidroxido oligomer részecskék képződnek. Az (O,O) és (O,N) donor ligandumok esetében fiziológias pH-n a mM-os koncentrációtartományban az $[\text{MLZ}]$ komplex az uralkodó részecske, a koncentráció csökkentésével a néhány μM -os tartományban azonban csak a dhp és pic komplexek mutatnak kellő stabilitást. A kloridion koordináló ligandumként nagyobb pH-tartomány felé tolja el a komplexképződést. Az egyes komplexek esetében igen eltérő volt a $\text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$ csere mértéke, ez hozzájárulhat a biológiai aktivitásbeli különbségekhez.

A HSA-nal végzett vizsgálatainkból kiderült, hogy a $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ -fémion és a dhp-, ill. pic komplexek jelentős mértékben kötődnek a HSA-hoz. A kölcsönhatás részben a koordinált ligandumok kizorításával jár, a fémkomplex disszociációja a kisebb stabilitású dhp komplex esetében kifejezettebb, mint a pic komplexnél. Ebből következően a kölcsönhatás valószínűleg nagyobb részt koordinatív jellegű. Ugyanakkor az I-es és II-es kötőhelyen is kötődnek mind a fémion, mind pedig a fémkomplexek; a pic komplex mindkét kötőhelyen gyengébben kötődik, mint a dhp komplex vagy a fémion. Koordinatív kötődésre ezeken a kötőhelyeken is lehetőség van a jelenlévő His és Tyr oldalláncokkal, vagy cisztin-hidakkal.

(VII.) A KP46 és GaM komplexek már klinikai tesztelés alatt állnak, azonban oldategyensúlyi viselkedésüket eddig nem vizsgálták részletesen. Eredményeink szerint fiziológias pH-n a GaM mM-os míg a KP46 μM -os koncentrációtartományban stabilis. A GaM stabilitása jóval kisebb a KP46-hoz viszonyítva, így feltételezhető, hogy a vérszérum kis és nagy molekulatömegű komponenseivel eltérő mértékben vagy módon lépnek kölcsönhatásba. Ezt alátámasztották a HSA-nal és apoTf-nel végzett kísérleteink. A GaM komplex terápiás szempontból releváns koncentrációtartományában a komplex nagyjából disszociál és a Ga(III)-ion szállításában

főként a Tf vesz részt. A GaM nem kötődik a HSA-hoz, csak a szabad maltol ligandum. A KP46 esetében viszont a Tf szerepe látszik kevésbé hangsúlyosnak a fémkomplex nagy stabilitása miatt. A HSA-nal viszont a komplex a disszociálatlan, eredeti formájában lép kölcsönhatásba, és a KP46 nagy része ehhez a fehérjéhez kötődik. Tehát, míg a GaM nagyobb részt disszociál, addig a KP46 feltehetőleg változatlan formában szállítódik a vérérszékben.

(VIII.) A kumarin ligandumokkal végzett kísérleteinkben a fluorimetriás módszert és annak PSEQUAD programmal való kiértékelhetőségét teszteltük. A ligandumok albuminnal való kölcsönhatását követtük fluorimetrián. A PSEQUAD programmal való kiértékeléssel teljes spektrumok alapján több emittáló részecske figyelembevételével számolhatók kötési állandók. A meghatározott kötési állandók alapján számolt és a kísérleti adatok jó egyezést mutattak. A kumarin ligandumok igen nagy affinitással kötődtek a HSA I-es kötőhelyén, és arról is meggyőződünk, hogy ez az elsődleges kötőhely. Továbbá azok a ligandumok (**1b**, **1c**, **1d**, **1e**) kötődnek erősebben az I-es kötőhelyen, amelyek fenolos OH-csoportja részben deprotonálódott fiziológiás pH-n.

Munkánk általános célja, hogy felhívjuk a figyelmet az oldategyensúlyi vizsgálatok létjogosultságára és fontosságára a biológiai szempontból érdekes rendszerek esetében. Ennek részeként a makromolekulákkal való kölcsönhatásokat mennyiségi és minőségi szempontból is próbáltuk leírni, így a meghatározott kötési állandók birtokában képesek voltunk (az egyébként sokszor kísérletileg nehezen kivitelezhető) fiziológiás koncentrációviszonyok között modellezni a komplexek eloszlását. Az ilyen jellegű *in vitro* vizsgálatok eredményei természetesen egyelőre csak ritkán vonatkoztathatóak közvetlenül az élő rendszerekre, mégis magyarázhatják a fémkomplexek *in vivo* tapasztalt farmakokinetikai viselkedését, és lehetővé válhat, hogy általuk kedvezőbb farmakokinetikai profilú származékok előállítását javasoljuk.

7. SUMMARY

The field of metal-based anticancer drugs was initiated by the discovery of cisplatin, one of the leading agents in clinical use. Cisplatin is used for both mono- and combination therapy, however its applicability is hindered by severe dose-limiting side effects and intrinsic or acquired resistance accompanying the therapy. This has prompted chemists to employ various strategies in the development of new metal-based anticancer agents with different mechanisms of action. The knowledge of the pharmacokinetic (and pharmacodynamic) profile of a compound is a prerequisite to understand its effects. A metal complex – thanks to the coordinated ligands – can undergo more extreme changes during its path in the body compared to a classical organic compound, thus they can be regarded as prodrugs and generally limited information is available regarding to their biotransformation processes. Therefore (bio)speciation of selected metal complexes with proved or potential antitumor activity were studied in the frame of my dissertation regarding to traditional solution-equilibrium behavior and the interaction with macromolecules primarily with human serum albumin (HSA), apo-transferrin (apoTf) and DNA.

(I.) Oxaliplatin and its methyl-substituted derivative KP1537 are Pt(II) complexes. The main goal of our comparative study was to decide whether the improved therapeutic characteristics including significantly reduced side effects of the KP1537 compared to oxaliplatin might be originated from the differences between their hydrolytic behavior and albumin-binding properties. According to our results the hydrolytic behavior of the two metal complexes are rather similar. Decomposition of the original complexes in presence of chloride ions are faster than in pure aqueous media, however the total hydrolysis of samples containing 100 mM chloride is still a slow process. The exchange of oxalate to water or chloride depending on the media is presumable and the final products of the two-step decomposition are the corresponding *diaqua*- or *dichlorido* complexes. The two Pt(II) complexes displayed almost the same changes under various conditions.

The reaction of both metal complexes with HSA was found to be fairly slow since the equilibrium could not be reached during 48 hours. Binding towards HSA was increased with increasing concentration of chloride ions. The two complexes were bound to HSA in similar extent with moderate affinity. According to the experiments with human serum the role of other serum proteins referring those Pt(II) complex binding ability is feasible. One of those can be the often referred γ -globulins. The different profile of KP1537 in its effect compared to oxaliplatin can not be explained with their differing hydrolytic- or serum protein binding properties.

(II.) The maleimide-functionalized Pt(IV) complexes KP2155 and KP2156 belong to the group of selective targeting agents which can bind selectively to the albumin. The binding ability towards Cys34 on HSA of these complexes was followed using an indirect spectrophotometric technique. Prior to the measurements with HSA reliable experimental method has been developed to determine the accessible portion of Cys thiol(ate) groups on HSA. It was ascertained that HSA interacts with the DTDP reagent in only one-step reaction unlike small thiol compounds (GSH and Cys). The applied temperature and pH conditions have been also optimized. Subsequently we estimated indirectly the 1-to-1 adduct formation between KP2155 or

KP2156 and HSA, the binding took place practically in a quantitative manner. The coupling to the protein can assure a prolonged presence of these Pt(IV) complexes in the blood flow.

(III.) Recently numerous complexes with non-platinum centers were synthesized as functional analogs of Pt(II) complexes. Two of those are the Ru(III) complexes KP1019 and KP1339, which showed remarkable efficacy in phase I/II clinical trials. The observed gentle side effects of these complexes can be originated from their binding ability towards serum proteins. The aim of this work was to study the fast binding of these complexes by secondary interactions towards albumin. According to our findings both KP1019 and KP1339 are able to bind to both hydrophobic sites on HSA (site I and II) with moderately strong affinity and no significant differences were found in the binding ability at these binding sites on the basis of the spectrofluorometric measurements. Hence the counter ion does not affect the binding of trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] anions to HSA. CZE–UV–vis and ultrafiltration–UV–vis measurements also confirmed the results of the spectrofluorometric experiments. Direct ultrafiltration measurements showed the binding of two equivalent metal complexes on HSA. The binding event was rather fast, it occurred in few minutes. A result of clinical relevance is the finding that KP1339 and KP1019 are able to compete with BR for its binding site under physiological conditions and may adversely affect the treatment of patients with elevated BR levels. Our investigations pointed out, that prior to the relatively slow forming of coordinative binding on the protein a fast secondary interaction occurs, that may be suitable to avoid the premature excretion of the complexes from blood serum.

(IV.) The interaction with HSA with structurally analogous Ru(II)- and Os(II)-nitrosyl complexes of KP1019 was studied as well. These complexes were different in their metal center or in their counter ion or complex configuration. No significant differences could be observed between the binding affinity of the studied metal complexes (**1-5**) to HSA. Only complex **5** showed somewhat lower affinity towards the protein. Experiments with human serum pointed out the primary role of HSA in the transport process of the complexes. Striking difference between these complexes and KP1019 was found, namely the displacement constants calculated for site I and II are about one order of magnitude lower in case of the nitrosyl complexes, at the same time ultrafiltration studies showed no such kind of differences. Therefore existence of further – for nitrosyl complexes available – binding sites on HSA is feasible.

(V.) An interesting problem was to investigate the interaction between Ru(III)-salan or Ru(II)-phenantroline complexes and DNA. One of our main goals was to characterize quantitatively the interactions with DNA, because most of the publications use often the definition of DNA binding constants improperly. A fluorometric method was elaborated to determine the binding site size (expressed in number of nucleotides) and binding affinity towards DNA of the well known DNA marker molecules such as EB and DAPI. It should be noted that calculated binding site size reflects not only the real space demand of a marker but the occurrence of the preferred base sequence within the nucleotide chain as well.

In case of Ru(III)-salan complexes (S8 and S10) EB was displaced by the complexes in moderate manner that indicates the intercalative binding of these complexes on DNA. The displacement was confirmed by fluorescence lifetime measurements. Ru(III) complexes were not

able to displace DAPI from the minor groove. Differences found in cytotoxicity does not seem to originate from the distinct mode of binding to DNA. The other group of examined complexes (CM8 and CM16) showed relatively high binding affinity and binding frequency into the minor groove of DNA. The two coordinated phenantroline ligands of the complexes fit most probably via extra helical stacking into the minor groove, but the third ligand is not sufficiently extended for actual intercalation. Displacement constants for both Ru(III)-salan and Ru(II)-phenantroline complexes were calculated, however these values are based on the site size of the given markers; and the site size (or binding frequency) of the complexes is most probably not identical with those.

(VI.) In case of $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)]$ species solution equilibria of $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ ($\text{Z} = \text{H}_2\text{O}/\text{Cl}^-$) and its complexes with (allo)maltol, deferiprone (dhp), picolinic acid (pic) and thiomaltol were studied in detail in order to determine the stoichiometry and stability of complexes formed. This was supplemented with HSA interaction studies as a second step to explore their distribution in blood serum. According to our results chloride ions as coordinating ligands are able to suppress the hydrolysis of $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ to some extent. Exclusive formation of the *mono*-ligand complexes $[\text{MLZ}]$ and $[\text{MLH}_{-1}]$ in case of (O,O) and (O,N) ligands were detected. Formation of the mixed hydroxido complex $[\text{ML}(\text{OH})]$ could be characterized by determination of relatively high pK_a values (9.32-11.90). *Bis*-ligand complex formation ($[\text{ML}_2\text{H}]$, $[\text{ML}_2]$) with the (O,S) donor thiomaltol could be observed in the presence of ligand excess. The general stability trend for $[\text{MLZ}]$ complexes is: (O,O) < (O,N) < (O,S). It is noteworthy that the *mono*-complex of thiomaltol is stable only at acidic pH values and formation of mixed hydroxido oligomer species are probable at physiological pH. In case of (O,O) and (O,N) donor ligands complexes $[\text{MLZ}]$ were observed to be predominant at physiological pH in the millimolar concentration range. Upon decrease of complex concentration to low micromolar range only dhp and pic complexes show sufficient stability. Chloride ions act as competitive ligands and are able to shift the formation of $[\text{MLZ}]$ to higher pH range. The aquation of $[\text{MLCl}]$ complexes took place to different extents which may have impact on their biological activities.

Relative high binding affinity of $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ and its dhp- and pic complexes towards HSA was found. Binding to albumin is partially followed by displacement of the coordinated ligands. Dissociation of the original metal complexes in case of dhp possessing lower stability is more pronounced compared to pic. Consequently binding on HSA has mostly coordinative nature. At the same time $[\text{Rh}(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Z}_3]$ and its dhp- and pic complexes bind to site I and site II as well, however pic complex binds to both sites with lower affinity compared to the former two species.

(VII.) Complexes KP46 and GaM are promising orally active antitumor metallodrugs currently undergoing clinical trials; however so far no stability constants of these complexes are available in the literature. Our results showed that *tris*-ligand complex GaM predominates in the millimolar concentration range, while KP46 is stable in the micromolar range at physiological pH. The stability of GaM is much lower than that of KP46, this property may lead to significantly different type of interactions with high- and low molecular mass components of human serum. This assumption was confirmed by our experiments with HSA and apoTf. In the case of GaM the role of Tf is significant and the protein is able to replace maltol completely at

concentrations lower than 30 μM . The GaM complex does not bind to HSA only the free maltol itself. On the contrary, primary binding of KP46 to HSA is predicted under physiological conditions which may be advantageous with respect to increased solubility and half-life. It is noteworthy that the binding to HSA is reversible and does not alter the original coordination mode in the complex. Thus, while GaM dissociates largely KP46 is transported in its original form in blood serum.

(VIII.) Our studies on reduced Schiff-base coumarin ligands were used to test the fluorometric method and the possibility for computational evaluation with PSEQUAD program. The interaction between these compounds (with proved *in vitro* cytotoxicity) and HSA were followed by fluorometry. The simulated curves determined from the binding constants and „molar emission intensity” values (calculated with PSEQUAD) are in a fairly good agreement to those obtained by experimental data. The computer program PSEQUAD can operate with the whole recorded spectra and more emitting compounds can be taken into consideration at the same time. Coumarin derivatives were bound with rather high affinity at site I of HSA. Furthermore derivatives with partly deprotonated phenolic OH-group (**1b**, **1c**, **1d**, **1e**) at pH 7.4 are bound to HSA at higher extent compared to the completely protonated **1a**.

The general aim of our work is to point out the necessity of solution equilibrium studies in case of biologically relevant systems. Interactions with macromolecules such as HSA, apoTf and DNA were characterized in both qualitative and quantitative manners, which allow us the mathematical and chemical modeling of the behavior of the metal complexes in the presence of bioligands at biologically relevant (but experimentally often impractical) concentrations or conditions. The results of this kind of *in vitro* investigations can be used hardly for living organisms in a direct manner, but still can explain the *in vivo* pharmacokinetic behavior of metal complexes, and it may be possible to propose the synthesis of compounds with improved pharmacokinetic parameters.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Y. Jung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* 107 (2007) 1387–1407.
- [2] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2007) 573–584.
- [3] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Dalton Trans.* (2008) 183–194.
- [4] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891–904.
- [5] G. Sava, E. Alessio, A. Bergamo, G. Mestroni, *Top. Biol. Inorg. Chem.* 1 (1999) 143–169.
- [6] G. Sava, I. Capozzi, K. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, *Clin. Exp. Metastasis* 16 (1998) 371–379.
- [7] P. Collery, B.K. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 283–296.
- [8] E.L. MacKenzie, K. Iwasaki K, Y. Tsuji, *Antioxid. Redox. Signal.* 10 (2008) 997–1030.
- [9] G. Fanali, A. Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol. Aspects. Med.* 33 (2012) 209–290.
- [10] B. Elsadek, F. Kratz, *J. Controlled Release* 157 (2012) 4–28.
- [11] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Az elemek kémiája I.-III.*, Nemzedékek Tudása Tankönyvkiadó, Budapest (2004).
- [12] Y. Geldmacher, M. Oleszak, W.S. Sheldrick, *Inorg. Chim. Acta*, 393 (2012) 84–102.
- [13] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature* 222 (1969) 385–386.
- [14] D.E. Thurston, *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, CRC Press, Boca Raton (2006) pp. 37–84.
- [15] I. Bertini, H. Gray, E. Stiefel, J. Valentine, *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*, University Science Books, Sausalito (2007).
- [16] P.C. Bruijninx, P.J. Sadler, *Curr. Op. Chem. Biol.* 12 (2008) 197–206.
- [17] B.P. Espósito, R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 137–149.
- [18] C. Brauckmann, C.A. Wehe, M. Kieshauer, C. Lanvers-Kaminsky, M. Sperling, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1855–1864.
- [19] T. Falta, G. Koellensperger, A. Sandler, W. Buchberger, R.M. Mader, S. Hann, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1336–1342.
- [20] X. Wang, Z. Guo, *Anticancer Agents Med. Chem.* 7 (2007) 19–34.
- [21] J.J. Gullo, C.L. Litterst, P.J. Maguire, B.I. Sikic, D.F. Hoth, P.V. Woolley, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 5 (1980) 21–26.
- [22] P. Allain, O. Heudi, A. Cailleux, A. Le Bouil, F. Larra, M. Boisdron-Celle, E. Gamelin, *Drug. Met. Dispos.* 28 (2000) 1379–1384.
- [23] L. Trynda-Lemiesz, M. Łuczowski, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1851–1856.
- [24] A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko, B.K. Keppler, *Chem. Rev.* 106 (2006) 2224–2248.
- [25] C. Møller, H.S. Tastesen, B. Gammelgaard, I.H. Lambert, S. Stürup, *Metallomics* 2 (2010) 811–818.
- [26] A.J. Repta, D.F. Long, in: *Cisplatin: Current Status and Developments*, A.W. Prestayko, S.T. Crooke, S.K. Carter (Eds.), Academic Press, New York (1980) pp. 285–304.
- [27] L. Trynda-Lemiesz, H. Kozłowski, B.K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 77 (1999) 141–146.
- [28] A.R. Timerbaev, S.S. Aleksenko, K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, O. Semenova, C.G. Hartinger, S. Oszwaldowski, M. Galanski, M. Jarosz, B.K. Keppler, *Electrophoresis* 25 (2004) 1988–1995.
- [29] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, *Biochim Biophys Acta* 1830 (2013) 5444–5455.

- [30] U. Jungwirth, D.N. Xanthos, J. Gojo, A.K. Bytze, W. Körner, P. Heffeter, S.A. Abramkin, M.A. Jakupec, C.G. Hartinger, U. Windberger, M. Galanski, B.K. Keppler, W. Berger, *Mol. Pharmacol.* 81 (2012) 719–728.
- [31] E. Reisner, V.B. Arion, B.K. Keppler, A.J.L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 1569–1583.
- [32] P.C. Brujininx, P.J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.* 61 (2009) 1–62.
- [33] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.* 39 (2010) 8113–8127.
- [34] P.J. Bednarski, R. Grunert, M. Zielzki, A. Wellner F.S. Mackay, P.J. Sadler, *Chem. Biol.* 13 (2006) 61–67.
- [35] L. Ronconi, P.J. Sadler, *Coord. Chem Rev.* 251 (2007) 1633–1648.
- [36] N. Graf, S.J. Lippard, *Adv. Drug Del. Rev.* 64 (2012) 993–1004.
- [37] I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrara, E. Alessio, *Chimia* 61 (2007) 692–697.
- [38] A. Bergamo G. Sava, *Dalton Trans.* (2007) 1267–1272.
- [39] A. Levina, J.B. Aitken, Y.Y. Gwee, Z.J. Lim, M. Liu, A.M. Singharay, P.F. Wong, P.A. Lay, *Chemistry* 19 (2013) 3609–3619.
- [40] J.B. Aitken, S. Antony, C.M. Weekley, B. Lai, L. Spiccia, H.H. Harris, *Metallomics* 4 (2012) 1051–1056.
- [41] R. Trondl, P. Heffeter, C.R. Kowol, M.A. Jakupec, W. Berger, B.K. Keppler, *Chem. Sci.* 5 (2014) 2925–2932.
- [42] A. Küng, T. Pieper, R. Wissiack, E. Rosenberg, B.K. Keppler, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 292–299.
- [43] T. Pieper, W. Peti, B.K. Keppler, *Met. Based. Drugs* 7 (2000) 225–232.
- [44] K. Polec-Pawlak, J.K. Abramski, O. Semenova, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, M. Jarosz, *Electrophoresis* 27 (2006) 1128–1135.
- [45] N. Cetinbas, M.I. Webb, J.A. Dubland, C.J. Walsby, *J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 131–145.
- [46] A.K. Bytze, K. Boeck, G. Hermann, S. Hann, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, G. Koellensperger, *Metallomics* 3 (2011) 1049–1055.
- [47] M.M. Henke, H. Richly, A. Drescher, M. Grubert, D. Alex, D. Thyssen, U. Jaehde, M.E. Scheulen, R.A. Hilger, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 47 (2009) 58–60.
- [48] G.E. Büchel, A. Gavriluta, M. Novak, S.M. Meier, M.A. Jakupec, O. Cuzan, C. Turta, J.B. Tommasino, E. Jeanneau, G. Novitchi, D. Luneau, V.B. Arion, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 6273–6285.
- [49] A. Gavriluta, G.E. Büchel, L. Freitag, G. Novitchi, J.B. Tommasino, E. Jeanneau, P.S. Kuhn, L. González, V.B. Arion, D. Luneau, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 6260–6272.
- [50] M.R. Gill, J.A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 3179–3192.
- [51] M. Eriksson, M. Leijon, C. Hiort, B. Nordén, A. Graslund, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 4933–4934.
- [52] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer Science, New York (2006).
- [53] C.P. Matos, A. Valente, F. Marques, P. Adão, M.P. Robalo, R.F.M. Almeida, J. Costa Pessoa, I. Santos, M.H. Garcia, A.I. Tomaz, *Inorg. Chim. Acta.* 394 (2013) 616–626.
- [54] P.J.K. Inba, B. Annaraj, S. Thalamuthu, M.A. Neelakantan, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2013 (2013) 1–11.
- [55] T.A. Immel, U. Groth, T. Huhn, P. Öhlschläger, *PLoS ONE* 6 (2011) e17869.
- [56] K.H. Thompson, C. Orvig, *Coord. Chem. Rev.* 219–221 (2001) 1033–1053.
- [57] J. Costa Pessoa, I. Cavaco, I. Correia, I. Tomaz, P. Adão, I. Vale, V. Ribeiro, M.M.C.A. Castro, C.C.F.G. Geraldes, in: *Vanadium: The Versatile Metal*, K. Kustin, et al. (Eds.) ACS Symposium Series; Am. Chem. Soc. Washington, DC, (2007) pp. 340–351.

- [58] E.D. Cross, L.E.N. Allan, A. Decken, M.P. Shaver, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 51 (2013) 1137–1146.
- [59] P.J.K. Inba, B. Annaraj, S. Thalamuthu, M.A. Neelakantan, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc* 104 (2013) 300–309.
- [60] E.R. Tiekink, M. Gielen, *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents – the use of metals in medicine*, Wiley, Chichester (2005) pp.379–398.
- [61] C.H. Leung, H.J. Zhong, D.S.H. Chan, D.L. Mab, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 1764–1776.
- [62] N. Katsaros, A. Anagnostopoulou, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 297–308.
- [63] M.S. Eisen, A. Haskel, H. Chen, M.M. Olmstead, D.P. Smith, M.F. Maestre, R.H. Fish, *Organometallics* 14 (1995) 2806–2812.
- [64] M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1575–1583.
- [65] L.R. Bernstein, T. Tanner, C. Godfrey, B. Noll, *Met. Based. Drugs* 7 (2000) 33–47.
- [66] C.R. Chitambar, D.P. Purpi, J. Woodliff, M. Young, J.P. Wereley, *J. Pharm. Exp. Ther.* 322 (2007) 1228–1236.
- [67] A.R. Timerbaev, *Metallomics* 1 (2009) 193–198.
- [68] V. Monga, B.O. Patrick, C. Orvig, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 2666–2677.
- [69] J. Narasimhan, W.E. Antholine, C.R. Chitambar, *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 2403–2408.
- [70] J.B. Vincent, S. Love, *Biochim. Biophys. Acta* 1820 (2012) 362–378.
- [71] A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M.A. Jakupec, V.B. Arion, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, *J. Inorg Biochem.* 100 (2006) 1819–1826.
- [72] M. Groessl, A. Bytze, C.G. Hartinger, *Electrophoresis* 30 (2009) 2720–2727.
- [73] A.A. Hummer, C. Bartel, V.B. Arion, M.A. Jakupec, W. Meyer-Klaucke, T. Geraki, P.D. Quinn, A. Mijovilovich, B.K. Keppler, A. Rompel, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5601–5613.
- [74] T. Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, San Diego (1996).
- [75] <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, hozzáférés: 2014.12.01.
- [76] L.L.C. Schrödinger, *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.1r1.
- [77] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, *Mol. Pharmacol.* 11 (1975) 824–832.
- [78] F. Zsila, *Mol. Pharmaceutics* 10 (2013) 1668–1682.
- [79] T.C. Pinkerton, K.A. Koeplinger, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2114–2122.
- [80] J. Wilting, W.F. Giesen, L.H.M. Janssen, M.M. Weideman, M. Otagirig, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 3032–3037.
- [81] D.E. Epps, T.J. Raub, F.J. Kézdy, *Anal. Biochem.* 227 (1995) 342–350.
- [82] R. Brodersen, *Physical chemistry of bilirubin: binding to macromolecules and membranes*, in: *Bilirubin*, K.P.M. Heirwegh, S.B. Brown, (Eds.), Vol. 1, CRC Press, Florida, Boca Raton (1982) pp. 75–123.
- [83] R.A. Weisiger, J.D. Ostrow, R.K. Koehler, C.C. Webster, P. Mukerjee, L. Pascolo, C. Tiribelli, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 29953–29960.
- [84] K. Oetli, R.E. Stauber, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 580–590.
- [85] W.R. Harris, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* 228 (2002) 237–262.
- [86] P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 1930–1936.
- [87] W.R. Harris, V.L. Pecoraro, *Biochemistry* 22 (1983) 292–299.
- [88] C.R. Chitambar, D. Sax, *Blood*, 80, (1992) 505–511.
- [89] G.H. Beaven, S. Chen, A. D’Albis, W.B. Gratzer, *Eur. J. Biochem.* 42 (1974) 539–546.
- [90] N.D. Chasteen, J.K. Grady, C.E. Holloway, *Inorg. Chem.* 25 (1986) 2754–2760.
- [91] S.R. Gallagher, *Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy*, in: *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds.), Greene and Wiley-Interscience, New York (1994).

- [92] L. Zékány, I. Nagypál, in: *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*, D.L. Leggett (Ed.), Plenum Press, New York (1985) pp. 291–353.
- [93] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* 43 (1996) 1739–1753.
- [94] G. Eriksson, *Anal. Chim. Acta* 112 (1979) 375–83.
- [95] SCQuery, The IUPAC Stability Constants Database, Academic Software (Version 5.5), Royal Society of Chemistry, 1993–2005.
- [96] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Pettit, *Anal. Chim. Acta* 38 (1967) 475–488.
- [97] A. Viegas, J. Manso, F.L. Nobrega, E.J. Cabrita, *J. Chem. Educ.* 86 (2011) 990–994.
- [98] B. Valeur, *Molecular fluorescence principles and applications*, 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim (2001).
- [99] H.X. Zhang, X. Huang, P. Mei, K.H. Li, C.N. Yan, *J. Fluoresc.* 16 (2006) 287–294.
- [100] H. Kurz, in: *Drug Protein Binding*, M.M. Reidenberg, S. Erill (Eds.), Praeger Publishers, New York, (1986) pp. 70–92.
- [101] M.A. Martínez-Gómez, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camañas, M.J. Medina-Hernández, *Electrophoresis*. 27 (2006) 3410–3419.
- [102] A.V. Rudnev, S.S. Aleksenko, O. Semenova, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 121–127.
- [103] S.S. Aleksenko, C.G. Hartinger, O. Semenova, K. Meelich, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, *J. Chromatogr. A* 1155 (2007) 218–221.
- [104] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, 1st ed. Elsevier (2005).
- [105] D. Bouvet, A. Michalowicz, S. Crauste-Manciet, E. Curis, I. Nicolis, L. Olivi, G. Vlaic, D. Brossard, K. Provost, *J. Synchrotron Radiat.* 13 (2006) 477–483.
- [106] Y. Kidani, K. Inagaki, szabadalom: *Antitumor agents*, szabadalmi szám: US4169846 A, 1979.10.02.
- [107] E. Jerremalm P. Videhult, G. Alvelius, W.J. Griffiths, T. Bergman, S. Eksborg H. Ehrsson, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 2116–2121.
- [108] E. Jerremalm, S. Eksborg, H. Ehrsson, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 436–438.
- [109] E. Jerremalm, M. Hedeland, I. Wallin, U. Bondesson, H. Ehrsson, *Pharm. Res.* 21 (2004) 891–894.
- [110] M.E. Alberto, M.F. Lucas, M. Pavelka, N. Russo, *J. Phys. Chem. B*, 112 (2008) 10765–10768.
- [111] Y. Yue, X. Chen, J. Qin, X. Yao, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 69 (2009) 51–57.
- [112] A.M. Krause-Heuer, W.S. Price, J.R. Aldrich-Wright, *J. Chem. Biol.* 5 (2012) 105–113.
- [113] T. Lemma, J. Pawliszyn, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 570–575.
- [114] C.K. Riener, G. Kada, H.J. Gruber, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 266–276.
- [115] D.R. Grasetti, J.F. Murray (Jr), *Arch. Biochem. Biophys.* 119 (1967) 41–49.
- [116] I.O.C. Egwim, H.J. Gruber, *Anal. Biochem.* 288 (2001) 188–194.
- [117] <https://www.goldbio.com/documents/2359/Ellmans+Test+Protocol.pdf>, hozzáférés: 2014.12.01.
- [118] www.fechem.uzh.ch/MT/pdf/SH_conc.pdf, hozzáférés: 2014.12.01.
- [119] <https://www.piercenet.com/instructions/2160311.pdf>, hozzáférés: 2014.12.01.
- [120] A.O. Pedersen, J. Jacobsen, *Eur. J. Biochem.* 106 (1980) 291–295.
- [121] L. Trynda-Lemiesz, A. Karaczyn, B.K. Keppler, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.* 78 (2000) 341–346.
- [122] M.J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 69–93.
- [123] W.H. Ang, A. Casini, G. Sava, P.J. Dyson, *J. Organomet. Chem.* 696 (2011) 989–998.
- [124] C. Scolaro, C.G. Hartinger, C.S. Allardyce, B.K. Keppler, P.J. Dyson, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1743–1748.
- [125] C.F. Chignell, *Mol. Pharmacol.* 5 (1969) 244–252.
- [126] N. Muller, F. Lapique, E. Drelon, P. Netter, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 300–304.

- [127] D. Buttar, N. Colclough, S. Gerhardt, P.A. MacFaul, S.D. Phillips, A. Plowright, P. Whittamore, K. Tama, K. Maskos, S. Steinbacher, H. Steuber, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 7486–7496.
- [128] J.P. Hutchinson, T.C. Oldham, T.S.H. El-Thaher, A.D. Miller, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2* (1997) 279–288.
- [129] É.A. Enyedy, L. Horváth, A. Hetényi, T. Tuccinardi, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 4202–4210.
- [130] A.R. Timerbaev, A.V. Rudnev, O. Semenova, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, *Anal. Biochem.* 341 (2005) 326–333.
- [131] C.G. Hartinger, M.A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P.J. Dyson, B.K. Keppler, *Chem. Biodiversity* 5 (2008) 2140–2155.
- [132] B.K. Keppler szóbeli közlése.
- [133] N. Hadjiliadis, E. Sletten, *Metal Complex–DNA Interactions*, 1st ed. Blackwell Publishing Ltd. (Wiley), Chippingham (2009).
- [134] B.S.P. Reddy, S.M. Sondhy, J.W. Lown, *Pharmacol. Ther.* 84 (1999) 1–111.
- [135] D. Banerjee, S.K. Pal, *J Phys. Chem. B* 112 (2008) 1016–1021.
- [136] W.D. Wilson, F.A. Tanious, H.J. Barton, R.L. Jones, K. Fox, R.L. Wydra, L. Strekowski, *Biochemistry* 29 (1990) 8452–8461.
- [137] Y. Kubota, K. Kubota, S. Taui, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 44 (2000) 53–54.
- [138] M.J. Waring, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 269–282.
- [139] J.L. Butour, J.P. Macquet, *Eur. J. Biochem.* 78 (1977) 455–463.
- [140] C. Liu, J. Zhou, H. Xu, *J. Inorg. Biochem.* 71 (1998) 1–6.
- [141] S. Eriksson, S.K. Kim, M. Kubista, B. Nordén, *Biochemistry* 32 (1993) 2987–2998.
- [142] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703–2707.
- [143] A. Wolfe, G.H. Shimer, T. Meehan, *Biochemistry* 26 (1987) 6392–6396.
- [144] B.H. Yun, J.O. Kim, B.W. Lee, P. Lincoln, B. Nordén, J.M. Kim, S.K. Kim, *J. Phys. Chem. B*, 107 (2003) 9858–9864.
- [145] R.E. Holmlin, E.D.A. Stemp, J.K. Barton, *Inorg. Chem.* 37 (1998) 29–34.
- [146] A. Ruggi, F.W.B. Leeuwen, A.H. Velders, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 2542–2554.
- [147] S. Neidle, *Nat. Chem.* 4 (2012) 594–595.
- [148] H. Song, J.T. Kaiser, J.K. Barton, *Nat. Chem.* 4 (2012) 615–620.
- [149] A. Casini, *J. Inorg. Biochem.* 109 (2012) 97–106.
- [150] L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó, *Dalton Trans.* 41 (2012) 285–291.
- [151] A. Nutton, P.M. Bailly, P.M. Maitlis, *Dalton Trans.* (1981) 1997–2002.
- [152] T. Jakusch, K. Gajda Schrantz, Y. Adachi, H. Sakurai, T. Kiss, L. Horvath, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1521–1526.
- [153] É. Sija, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T.Kiss, É.A. Enyedy, *Polyhedron* 67 (2014) 51–58.
- [154] L. Bíró, E. Farkas, P. Buglyó, *Dalton Trans.* 39 (2010) 10272–10278.
- [155] E. Kiss, K. Petrohan, D. Sanna, E. Garribba, G. Micera, T. Kiss, *Polyhedron* 19 (2000) 55–61.
- [156] É.A. Enyedy, L. Horváth, K. Gajda-Schrantz, G. Galbács, T. Kiss, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1936–1945.
- [157] B. Song, K. Saatchi, G.H. Rawji, C. Orvig, *Inorg. Chim. Acta* 339 (2002) 393–399.
- [158] É.A. Enyedy, É. Sija, T. Jakusch, C.G. Hartinger, W. Kandioller, B.K. Keppler, T. Kiss, *J. Inorg. Biochem.* 127 (2013) 161–168.
- [159] T. Jakusch, É.A. Enyedy, K. Kozma, Z. Paár, A. Bényei, T. Kiss, *Inorg. Chim. Acta* 420 (2014) 92–102.
- [160] O. Jons, E.S. Johansen, *Inorg. Chim. Acta* 151 (1988) 129–132.
- [161] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, J. Fawcett, D.R.J. Russell, *Dalton Trans.* (1995) 3709–3713.

- [162] H. Henke, W. Kandjoller, M. Hanif, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, *Chem. Biodivers.* 9 (2012) 1718–1727.
- [163] S. Tsakovski, K. Benkhedda, E. Ivanova, F.C. Adams, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 143–154.
- [164] P. Letkeman, A.E. Martell, R.J. Motekaitis, *J. Coord. Chem.* 10 (1980) 47–53.
- [165] O. Jarjays, S. Hamman, F. Sarrazin, T. Benaissa, C.G. Beguin, *New J. Chem.* 22 (1998) 361–366.
- [166] M. Born, *Z. Phys.* 1 (1920) 45–48.
- [167] E.M. Filip, I.V. Humelnicu, C.I. Ghirvu, *Acta Chem. Iasi* 17 (2009) 85–96.
- [168] M. Amati, S. Belviso, P.L. Cristinziano, C. Minichino, F. Lelj, I. Aiello, M. La Deda, M. Ghedini, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 13403–13414.
- [169] M.H. Mihalov, *Polyhedron* 36 (1974) 107–113.
- [170] M.M. Finnegan, T.G. Lutz, W.O. Nelson, A. Smith, C. Orvig, *Inorg. Chem.* 26 (1987) 2171–2176.
- [171] S. Chaves, S. Canario, M.P. Carrasco, L. Mira, M.A. Santos, *J. Inorg. Biochem.* 114 (2012) 38–46.
- [172] R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533–3539.
- [173] M. Thompson, *Anal. Chim. Acta* 98 (1976) 357–363.
- [174] F. Zhang, X. Liu, F. Huang, Z. Zhuo, L. Lu, Z. Xu, Y. Wang, X. Tao, W. Bian, W. Tang, *Chin. Sci. Bull.* 56 (2011) 479–483.
- [175] W.R. Harris, *Clin. Chem.* 38 (1992) 1809–1818.
- [176] L.R. Bernstein *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 665–682.
- [177] N.G. James, C.L. Berger, S.L. Byrne, V.C. Smith, R.T. MacGillivray, A.B. Mason, *Biochemistry* 46 (2007) 10603–10611.
- [178] H. Sun, M.C. Cox, H. Li, P.J. Sadler, *Struct. Bond.* 88 (1997) 71–102.
- [179] E. Farkas, E. Kozma, T. Kiss, I. Toth, B. Kurzak, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1995) 477–481.
- [180] U. Galm, S. Heller, S. Shapiro, M. Page, S.M. Li, L. Heide, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 1307–1311.
- [181] B.S. Creaven, E. Czeglédi, M. Devereux, É.A. Enyedy, A. Foltyn-Arfa Kia, D. Karcz, A. Kellett, S. McClean, N.V. Nagy, A. Noble, A. Rockenbauer, T. Szabó-Plánka, M. Walsh, *Dalton Trans.* 39 (2010) 10854–10865.
- [182] A. Maucher, M. Kager, E. von Angerer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119 (1993) 150–154.
- [183] J.R. Hoult, M. Payá, *Gen. Pharmacol.* 27 (1996) 713–722.
- [184] X.M. Peng, G.L. Damu, C. Zhou, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 3884–3930.
- [185] U.S. Weber, B. Steffen, C.P. Siegers, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 99 (1998) 193–206.
- [186] S.P. Pillai, S.R. Menon, L.A. Mitscher, C.A. Pillai, D.M. Shankel, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 1358–1362.
- [187] K.J. Fehske, U. Schläfer, U. Wollert, W.E. Müller, *Mol. Pharmacol.* 21 (1982) 387–393.
- [188] I. Sjöholm, B. Ekman, A. Kober, I. Ljungstedt-Pahlman, B. Seiving, T. Sjödin, *Mol. Pharmacol.* 16 (1979) 767–777.
- [189] A.M. Zatón, J.M. Ferrer, J.C. Ruiz de Gordo, M.A. Marquinez, *Chem. Biol. Interact.* 97 (1995) 169–174.
- [190] R.L. Lundblad, F.M. MacDonald, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 4th ed. CRC Press, (2010).
- [191] J.R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy Volume 6: Protein Fluorescence*, Kluwer Academic Publishers (2002).
- [192] J. Shobini, A.K. Mishra, K. Sandhya, N. Chandra, *Spectrochim. Acta A* 57 (2001) 1133–1147.
- [193] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, *J. Mol. Biol.* 353 (2005) 38–52.

9. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10033330

A dolgozat alapját képező közlemények

Σ IF: 21,66

1. É.A. Enyedy, **O. Dömötör**, E. Varga, T. Kiss, R. Trondl, C.G. Hartinger, B.K. Keppler;
Comparative solution equilibrium studies of anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and hydroxy(thio)pyrone ligands
J. Inorg. Biochem. 117 (2012) 189–197. IF: 3,197
2. **O. Dömötör**, C.G. Hartinger, A.K. Bytzek, T. Kiss, B.K. Keppler, É.A. Enyedy;
Characterization of the binding sites of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 on human serum albumin via competition studies
J. Biol. Inorg. Chem. 18 (2013) 9–17. IF: 3,164
3. V. Pichler, J. Mayr, P. Heffeter, **O. Dömötör**, É.A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Köllensperger, M. Galanski, W. Berger, B.K. Keppler, C.R. Kowol;
Maleimide-functionalised platinum(IV) complexes as a synthetic platform for targeted drug delivery
Chem. Comm. 49 (2013) 2249–2251. IF: 6,718
4. **O. Dömötör**, T. Tuccinardi, D. Karcz, M. Walsh, B.S. Creaven, É.A. Enyedy;
Interaction of anticancer reduced Schiff base coumarin derivatives with human serum albumin investigated by fluorescence quenching and molecular modeling
Bioorg. Chem. 52 (2014) 16–23. IF: 2,141
5. **O. Dömötör**, S. Aicher, M. Schmidlehner, M.S. Novak, A. Roller, M.A. Jakupiec, W. Kandioller, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, É.A. Enyedy;
Antitumor Pentamethylcyclopentadienyl Rhodium Complexes of Maltol and Allomaltol: Synthesis, Solution Speciation and Bioactivity
J. Inorg. Biochem. 134 (2014) 57–65. IF: 3,274
6. **Dömötör O.**, Bali K., Hetényi A., Enyedy É.A.;
Rákellenes gallium(III)komplexek oldategyensúlyi jellemzése és szérumfehérjékkel való kölcsönhatásuk vizsgálata
Magyar Kémiai Folyóirat 120 (2014) 127–131. IF: -
7. É.A. Enyedy, **O. Dömötör**, K. Bali, A. Hetényi, T. Tuccinardi, B.K. Keppler;
Interaction of the anticancer gallium(III) complexes of 8-hydroxyquinoline and maltol with human serum proteins
J. Biol. Inorg. Chem. doi: 10.1007/s00775-014-1211-9 IF: 3,164
8. **O. Dömötör**, L. Côte-Real, R.F. M. de Almeida, C.P. Matos, F. Marques, P. Adão, C. Real, É.A. Enyedy, M.H. Garcia, A.I. Tomaz;
On the mechanism of action of anti-tumoral aminophenolate ruthenium(III) complexes
Chem. Bio. Chem (beküldésre előkészítve; IF: 4,097)
9. É.A. Enyedy, **O. Dömötör**, C.M. Hackl, M. Novak, M.A. Jakupiec, B.K. Keppler, W. Kandioller;
Solution equilibria and antitumor activity of pentamethylcyclopentadienyl rhodium complexes of picolinic acid and deferiprone
J. Coord. Chem. (beküldött kézirat; IF: 2,212)

1. É.A. Enyedy, E. Farkas, **O. Dömötör**, M.A. Santos;
Interaction of folic acid and some matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor folate-γ-hydroxamate derivatives with Zn(II) and human serum albumin
J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 444–453. IF: 3,354
2. A. Rathgeb, A. Böhm, M.S. Novak, A. Gavriluta, **O. Dömötör**, J.B. Tommasino, É.A. Enyedy, S. Shova, S. Meier, M.A. Jakupec, D. Luneau, V.B. Arion;
Ruthenium-Nitrosyl Complexes with Glycine, L-Alanine, L-Valine, L-Proline, D-Proline, L-Serine, L-Threonine and L-Tyrosine: Synthesis, X-ray Diffraction Structures, Spectroscopic and Electrochemical Properties and Antiproliferative Activity
Inorg. Chem. 52 (2014) 2718–2729. IF: 4,794
3. F. Bacher, **O. Dömötör**, M. Kaltenbrunner, M. Mojović, A. Popović-Bijelić, A. Gräslund, G. Novitchi, A. Ozarowski, L. Filipovic, S. Radulović, É.A. Enyedy, V.B. Arion;
Effects of Terminal Dimethylation and Metal Coordination of Proline-2-Formylpyridine Thiosemicarbazone Hybrids on Lipophilicity, Anti-proliferative Activity and hR2 RNR inhibition
Inorg. Chem. 53 (2014) 12595–609. IF: 4,794

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások, posztterek

1. **Dömötör O.**, Enyedy É.A., Kiss T. (előadás)
Rákellenes [bisz-indazol-rutenát(III)]komplexek kölcsönhatásának vizsgálata humán szérumban albuminnal kötőhely markerek segítségével
XXXIII. Kémiai Előadói napok, 2010.10.25-27., Szeged.
2. **O. Dömötör**, É.A. Enyedy, T. Kiss, A.K. Bytze, C.G. Hartinger, B.K. Keppler (poszter)
Interaction of the anticancer ruthenium(III) complexes KP1019 and KP1339 with human serum albumin via competition studies
4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2011.08.31-09.03., Budapest.
3. **Dömötör O.**, Varga E., C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Kiss T., Enyedy É.A. (előadás)
Rákellenes gallium(III) komplexek oldategyensúlyi vizsgálata
46. Komplexkémiai Kollokvium, 2012.05.21-23., Mátrafüred.
4. **O. Dömötör**, E. Varga, K. Bali, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, É.A. Enyedy (poszter)
Solution studies on antitumor gallium(III) complexes and their interactions with human serum proteins
International Symposium on Metal Complexes, 2012.06.18-22. Lisszabon, Portugália.
Proceeding: Acta of the International Symposia on Metal Complexes: ISMEC Group Series, 2 (2012) 165-166, (ISSN: 2239-2459).
5. É.A. Enyedy, **O. Dömötör**, É. Sija, T. Jakusch, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, (poszter)
Comparative solution equilibrium study on [Rh(III)(η⁵-Cp*)]²⁺ and [Ru(II)(η⁶-p-cymene)]²⁺ ternary complexes formed with various bidentate ligands
11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 11, 2012.09.12-16., Granada, Spanyolország.
6. **Dömötör O.**, Bali K., Hetényi A., Enyedy É.A. (előadás)

Rákellenes Ga(III)-komplexek kölcsönhatása vészérum fehérjékkel

47. *Komplekxkémiai Kollokvium*, 2013.05.29-31., Mátraháza.

7. **O. Dömötör**, R.F.M. de Almeida, C.P. Matos, É.A. Enyedy, A.I. Tomaz (poszter)

Interaction of new polydentate Ru(III)-salan complexes with DNA using time resolved and steady state fluorescence spectroscopy

5th *European Conference of Chemistry for Life Sciences*, 2013.06.10-12., Barcelona, Spanyolország.

8. **Dömötör O.**, Kiss G., Mészáros J.P., Enyedy É.A. (előadás)

Rh(III)(η^5 -Cp*) kétfogú N/O/S-donor ligandumokkal képzett komplexeinek oldategyensúlyi jellemzése és kölcsönhatásuk albuminnal

48. *Komplekxkémia Kollokvium*, 2014.05.28-30., Siófok.

9. É.A. Enyedy, **O. Dömötör**, W. Kandioller, B.K. Keppler (poszter)

Solution equilibria of analogous Rh(III)(η^5 -Cp*) and Ru(II)(η^6 -p-cymene) complexes formed with various bidentate ligands

7th *International Symposium on Bioorganometallic Chemistry*, 2014.07.22-25., Bécs, Ausztria.

10. **O. Dömötör**, G. Kiss, J.P. Mészáros, W. Kandioller, B.K. Keppler, É.A. Enyedy (poszter)

Complexes of Rh(III)(η^5 -Cp*) with N/O-donor bidentate ligands: solution equilibrium and interaction with human serum albumin

7th *International Symposium on Bioorganometallic Chemistry*, 2014.07.22-25., Bécs, Ausztria.

11. J. Mayr, V. Pichler, P. Heffeter, **O. Dömötör**, É.A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Kollensperger, M. Galanski, W. Berger, B.K. Keppler, C.R. Kowol (poszter)

Synthesis and characterization of bis-maleimide-functionalized platinum(IV) complexes for tumor-targeted drug delivery

12th *European Biological Inorganic Chemistry Conference*, 2014.08.24-28., Zürich, Svájc.

Proceeding: J. Biol. Inorg. Chem. 19 (2014) S782-S782.

12. **Dömötör O.**, Enyedy É.A. (előadás)

Oldategyensúlyi vizsgálatok a spektrofotometria szemszögéből

Koordinációs Kémiai Munkabizottsági Ülés, 2014.11.11., Budapest.

13. **Dömötör O.** (előadás)

Rákellenes galliumkomplexek oldatkémiaja és kölcsönhatásuk szérumfehérjékkel

Bolyai Klub Tudományos Ülés, 2014.11. 21., Szeged.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Enyedy Éva Anna egyetemi adjunktusnak, aki szakmai tanácsaival és emberi támogatásával mindvégig segítette munkámat; és köszönöm, hogy töretlen lelkesedéssel vezetett be a bioszervetlen- és a koordinációs kémia világába.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Kiss Tamás és Dr. Galbács Gábor tanszékvezetőknek, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken Ph.D. munkám elkészítéséhez, és hogy ezek alatt az évek alatt kiváló kutatók között dolgozhattam.

Köszönöm Bernhard K. Kepplernek (tanszékvezető, University of Vienna, Institute of Inorganic Chemistry) és Maria H. Garcianak (docens, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Lisbon), hogy lehetővé tették számomra a munkát intézetükben.

Köszönet illeti a következő személyeket a külföldi kutatómunkám során nyújtott szakmai segítségükért: Ana Isabel Tomaz, Rodrigo F.M. de Almeida, Christian G. Hartinger, Anna K. Bytcek és Gerlinde Grabmann.

Megköszönöm Dr. Hetényi Anasztáziának az STD NMR mérések kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségét, Sarah Theinernek az ICP-MS méréseket és Tiziano Tuccinardinak a dokkolásos számolásokat.

Köszönöm Szűcsné Tóth Katalinnak a labormunka terén nyújtott technikai segítségét és kellemes társaságát.

Szeretném megköszönni a „Ph.D. szoba lakóinak” – külön kiemelve Németh Esztert, Dancs Ágnes, Szunyogh Dánielt és Matyuska Ferencet – és a velem együtt dolgozó hallgatóknak, hogy szakmai, személyes és egyéb támogatást nyújtottak az elmúlt években.

Nagyon köszönöm Hollender Dominiknek és Mészáros János Péternek, hogy időt fordítottak a dolgozat elolvasására, és hogy javító szándékú észrevételeiket megosztották velem.

Köszönöm szüleimnek és testvéreimnek, akik mindig mellettem voltak és vannak.