

## Bevezetés és célkitűzések

Hosszú időn keresztül az alumínium(III)iont az emberi szervezet számára ártalmatlannak tekintették, hiszen a természetben rosszul oldódó hidroxidok, szilikátok, foszfátok formájában fordul elő és ennek megfelelően biológiai hozzáférhetősége korlátozott. Humán toxikusságát csak a 70-es évek közepén bizonyították egyértelműen. Nagyszámú kísérleti tapasztalat támasztja alá azt a ma már elfogadott tényt, hogy az alumínium(III)ion, például idegméreg.

Az utóbbi évtizedekben elsősorban a savas esők, az étrend, a gyógyszerek, a kozmetikumok jelentősen megnövelték az alumínium(III)ion mobilitását, ezáltal több alumínium kerülhet a szervezetbe és így nőhet az élő szervezetek Al(III) terhelése. Normális körülmények között, egy egészséges szervezet a napi 30–50 mg alumíniumterhelést jól tűri, hiszen az Al(III) nagy része felszívódás nélkül ürül ki (csak 5–10 µg szívódik fel), a szervezet hatékonyan védekezik az alumínium(III)ionnak nagymértékű felszívódása ellen.

Túlzottan nagy alumíniumterhelés vagy a vese elégtelen működése esetén a felszívódott Al(III) mennyisége azonban jelentősen megnőhet. A gyomor-bélrendszeren keresztül felszívódott alumínium(III)ion a véráram útján eljuthat a különböző szervekbe, ahol felhalmozódva kifejtheti káros hatását, így a csontrendszerben csontlágylást, a vérképzőrendszerben egy speciális vérszegénységet, az agyban pedig különböző idegrendszeri elváltozásokat idézhet elő. Ezen okok miatt nem meglepő, hogy az elmúlt 20–30 évben gyorsan nőtt az érdeklődés az alumínium(III)ion koordinációs és bioszervetlen kémiája, valamint biológiai és élettani hatásai iránt.

Az alumínium(III)ion kölcsönhatásba léphet az élő szervezetekben előforduló fehérjék építőköveivel, például a peptidekkel, amelyek a sejtek felépítésében nemcsak passzívan szerepelnek, hanem aktívan is részt vesznek a biológiai folyamatok szabályozásában. Az alumínium(III)ion toxikus hatásának egyik oka lehet az Al(III) erősebb kötődése bizonyos ligandumokhoz, így az Al(III) gyakran helyettesítheti a Mg(II)- és a Ca(II)ionokat a különböző biomolekulákkal, többek között peptidekkel és fehérjékkel képzett, biokémiai szempontból jelentős komplexeiben. Ezáltal számos Mg(II)- és Ca(II)-függő enzim és fehérje működését is megzavarja.

Ezen megfontolások alapján úgy gondoltuk, hogy az Al(III)–fehérje kölcsönhatás modellezése céljából érdekes lehet megvizsgálni az alumínium(III)ion kölcsönhatását különböző peptidekkel, illetve a peptidek egyéb modellvegyületeivel.

Al(III)–enzimrendszereken számos biológiai vizsgálatot végeztek már, de a megjelent közlemények eredményei igen ellentmondásosak. Az eltérések sok esetben abból erednek, hogy az alumínium(III)iont különböző vegyületek formájában használták a biológiai, toxikológiai vizsgálatokban (AlCl<sub>3</sub>, Al(III)-laktát, -glukonát, -citrát, -acetyl-acetonát stb.), de nem fordítottak figyelmet arra, hogy az alumínium milyen formában, milyen kémiai környezetben van jelen. Ezért is tartjuk fontosnak az alumínium(III)ion kis és nagy biomolekulákkal képzett komplexeinek egyensúlyi és szerkezetvizsgálatát.

Az Al(III)–peptidrendszerek kölcsönhatásának jellemzésére igen kevés irodalmi adatot találtunk, ez is indokolta ennek részletesebb tanulmányozását. Egyes aminosav- és peptid-analóg vegyületekre is kiterjesztettük a vizsgálatokat.

Munkánk során vizsgáltuk az Al(III)–szalicilglicin (SalGly), Al(III)–diaszparaginsav (AspAsp), Al(III)–triaszparaginsav (AspAspAsp), Al(III)–AcLysSerProValValGluGly heptapeptid rendszereket, valamint az Al(III)–imino-diecetsav (IDA), Al(III)–nitrilo-triecetsav (NTA), illetve ezek részben foszfonált (IDAP, NTAP, NTA2P) és teljesen foszfonált származékainak (IDA2P, NTA3P) komplexképződését. Az aminofoszfonátokra azért esett a választásunk, mert korábban Hollósi és munkatársai kimutatták, hogy a foszforilált peptidek a foszfátcsoport bevitelével jobban növelik a peptidek fémionkötő-képességét, mint az egyszerű nemfoszforilált peptidek. A képződő intermolekuláris Al(III) komplexeknek még nagyobb szerepük lehet a peptidaggregációs folyamatok kiváltásában, ily módon az Alzheimer-kór előrehaladásában. Úgy gondoljuk, hogy az amino-polifoszfonátok foszfonátcsoportjaik révén modellezhetik a foszforilált peptidek kölcsönhatását alumínium(III)ionnal.

Munkánkat nagymértékben segítették a Debreceni Egyetem, valamint a Szegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén, már évtizedek óta elkezdett kísérletek, az alumínium(III)ionnak biológiai jelentőségű molekulákkal való kölcsönhatását és a képződő komplexek oldategyensúlyi és oldatszerkezeti viszonyait vizsgáló kutatások.

Célul tűztük ki, hogy:

1. olyan peptidet keressünk, amely az alumínium(III)iont fiziológiás körülmények között (pH = 7,4) is oldatban tartja és így modellezheti az Al(III) kölcsönhatását az élőszervezetekben;
2. meghatározzuk az alumínium(III)ion és az említett ligandumok részecskeeloszlását és a képződő komplexek stabilitási állandóit vizes oldatban;

3.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  és  $^{31}\text{P}$  NMR-spektroszkópia alkalmazásával közvetlenül is alátámasztjuk az egyensúlyi adatok alapján meghatározott részecskeeloszlást;
4. a stabilitási állandók, az NMR-spektroszkópia, valamint egyéb módszerek segítségével meghatározzuk a képződő komplexekben a ligandumok kötőhelyeit;

### **Alkalmazott vizsgálati módszerek**

A vizes oldatokban lejátszódó egyensúlyi folyamatokat pH-metriás módszerrel, a képződött komplexek szerkezetét  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  NMR-spektroszkópiai módszerekkel tanulmányoztuk. A jelek azonosítására kétdimenziós korrelációs technikákat is használtunk (COSY, HSQC, HMBC), valamint csatolási állandó-modulált (J-MOD) spektroszkópiai módszert. Az Al(III)–SalGly rendszerben kialakuló kötőmódok meghatározásához spektrofotometriás valamint dinamikus fényszórás-méréseket végeztünk.

### **Új tudományos eredmények**

#### **1. A szalicilglicin Al(III)-kötő sajátosságának jellemzése**

- (1) A szalicilglicin gyenge Al(III)-kötő molekulának bizonyult. Az Al(III) egységű 1:1 összetételű, különböző protonáltsági állapotú komplexeket (AlLH, AlL, AlLH<sub>1</sub>, AlLH<sub>2</sub>) képez pH = 2–7 tartományban. Megállapítottuk, hogy az Al(III) nem képes a vizsgálható pH-tartományban a szalicilglicin amidprotonjának deprotonálódását kiváltani.
- (2) Spektrofotometriás módszerrel kimutattuk, hogy az AlLH és AlL komplexekben a fenolos hidroxilcsoport protonált, míg a pH = 4–6 tartományban képződő AlLH<sub>1</sub> komplexben a fenolos hidroxilcsoport deprotonálódik és a ligandum (COO<sup>-</sup>, CO, O<sup>-</sup>) háromfógu koordinációt alakít ki, egy hidroxidionnal a koordinációs szférában. Nagyobb pH-n (pH > 5,5) a ligandum fenolátcsoportja újra protonálódik. Az AlLH<sub>2</sub> = Al(OH)<sub>3</sub>·HL összetételű komplex képződik, amelyben a közvetlen karboxilát-koordináció mellett a fenolos hidroxil feltételezhetően az Al(OH)<sub>3</sub>-hoz kötött hidroxidionokkal csak hidrogénkötésben vesz részt. Dinamikus fényszórás-mérésekkel igazoltuk, hogy a pH nagymértékben befolyásolja az Al(III)–SalGly rendszerben lejátszódó aggregációs folyamatokat, amely az Al(OH)<sub>3</sub> kiválásához vezet.

A ligandum jelenléte késlelteti az  $\text{Al}(\text{OH})_3$  csapadék leválását és az  $\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot \text{HL}$  komplex képződése révén gátolja az  $\text{Al}(\text{OH})_3$  nanorészecskék aggregációját.

## 2. Az $\text{Al}(\text{III})$ kölcsönhatása aszparaginsav-tartalmú peptidekkel

- (3) Azt találtuk, hogy a AspAsp és a AspAspAsp ligandumok vizes közegben hasonlóan viselkednek, egymagvú 1:1 összetételű komplexeket képeznek különböző protonált-sági állapotban ( $\text{AILH}_2$ ,  $\text{AILH}$ ,  $\text{AIL}$ ,  $\text{AILH}_1$ ). A karboxilátcsoportok számának növekedésével nő a képződő  $\text{Al}(\text{III})$ -komplexek stabilitása. Így az AspAspAsp  $\text{Al}(\text{III})$  komplexei stabilabbak, mint a AspAsp ligandum megfelelő  $\text{Al}(\text{III})$  komplexei.
- (4) Megállapítottuk, hogy a AspAsp és AspAspAsp ligandumok koordinációja az alumínium(III)ionhoz feltehetően abban különbözik, hogy a AspAsp ligandumnál kétfogú koordináció a meghatározó, míg az AspAspAsp ligandumnál részleges háromfogú koordináció is megvalósulhat. A korai ( $\text{pH} = 5\text{--}6$ ) csapadékkiválás azt bizonyítja, hogy az Asp karboxilátcsoportjai ilyen kis peptidekben nem képesek elég erősen megkötni a fémiont, így nem tudják megakadályozni az  $\text{Al}(\text{OH})_3$  kiválását semleges pH-n. Ehhez feltehetően több, kedvezőbb elrendeződésben levő oldallánc donoratomokra van szükség.

## 3. Az AcLysSerProValValGluGly heptapeptid $\text{Al}(\text{III})$ -kötő sajátosságának jellemzése

- (5) Az  $\text{Al}(\text{III})$  és AcLysSerProValValGluGly peptid között savas közegben gyenge kölcsönhatás mutatható ki, a komplexképződés csak semleges pH-tartományban lesz meghatározó, amikor az  $\text{AILH}_2$  az uralkodó komplex. A rendszerben csak egymagvú 1:1 összetételű komplexek képződnek ( $\text{AILH}_2$ ,  $\text{AILH}$ ,  $\text{AIL}$ ,  $\text{AILH}_1$ ,  $\text{AILH}_2$ ). Az NMR-mérések igazolták, hogy gyengén savas közegben a heptapeptid C-terminális Gly, az oldallánc Glu karboxilátcsoport, valamint a peptid karbonilcsoportja kötik az alumínium(III)iont.
- (6) Közel fiziológiás körülmények között a heptapeptid oldatban tartja az alumínium(III)-iont. Hasonlóan, mint a szalicilglicin esetén az  $\text{Al}(\text{OH})_3$  nanorészecskékhez jórészt külszférasan kapcsolódó peptidmolekulák akadályozzák meg az  $\text{Al}(\text{OH})_3$  makroszkópikus kiválását.

Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy méréseink megerősítik a korábbi eredményeket, melyek szerint a peptidek alumínium(III)ionnal való intra- és intermolekuláris kölcsönhatásának szerepe lehet az Alzheimer-kórt kísérő plakkok és fonadékok képződésében, és így, ha nem is a betegség kiváltásában, de a fokozásában mindenféleképpen.

#### **4. Az imino-diecetsav, a nitrilo-triecetsav, valamint a részben és teljesen foszfonált származékok koordinációs sajátosságai alumínium(III)ionnal**

- (7) Azt találtuk, hogy a részben és teljesen foszfonált származékok az IDA- és NTA-hoz hasonlóan hatékony Al(III)-kötő molekulák, a fémion hidrolízisét és az Al(OH)<sub>3</sub> csapadék kiválását pH > 8-ig képesek megakadályozni. Kimutattuk, hogy nagy stabilitású, döntően 1:1 összetételű komplexek képződnek alumínium(III)ionnal, több donorcsoportjukkal koordinálnak a fémionhoz, csatolt kelátokat alakítva ki. A vegyes karboxilát-foszfonát rendszerekre jellemző a kötési izomerek képződése. Az Al(III)–NTA, valamint az NTA részben és teljesen foszfonált származékok Al(III)-komplexeinél azt találtuk, hogy 1:2 összetételű komplexek nem képződnek, feltehetően a foszfonátligandumok nagy térigénye és a ligandumkarok között fellépő taszító hatás következtében.
- (8) A pAl értékek alapján arra következtettünk, hogy a foszfonátszármazékok erősebb Al(III)-kötő képességűek, mint a megfelelő karboxilátszármazékok. A karboxilát-csoportok foszfonát-csoportokra történő kicserélése növeli a pAl értékeket, azaz csökkenti a szabad Al(III) koncentrációt.
- (9) Az NMR-mérések alapján kiderült, hogy az IDA, NTA és foszfonátszármazékaik oldatbeli szerkezeteinek belső dinamikája különböző. NTA esetén gyors intramolekuláris mozgások léteznek, szimmetrikus szerkezetű komplexek alakulnak ki, míg az IDA esetén képződő komplexek nem szimmetrikusak, a vizsgált magok sem kémiai, sem mágnesesen nem egyenértékűek. Az NTA<sub>3</sub>P ligandum AlLH<sub>1</sub> komplexe ugyanakkor a metilén foszfonátkarok gyors belső mozgása következtében fluxionális molekula.

- (10) Figyelemre méltó, hogy az oldatbeli részecskeeloszlás ellenére, szilárd fázisban egymagvú 1:1 komplexeket nem sikerült előállítani IDA-val, csupán 1:2 összetételű komplexet. Ennek szerkezetét meg is határoztuk.

#### Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények

1. T. Kiss, T. Jakusch, **M. Kilyén**, E. Kiss, A. Lakatos, Solution speciation of bioactive Al(III) and VO(IV) complexes, *Polyhedron*, **19**, 2389–2401 (2000) If: 1,414
2. Kiss T., Jakusch T., **Kilyén M.**, Kiss E., Lakatos A., Élettani hatású Al(III) és VO(IV) komplexek speciációja biológiai rendszerekben, *Acta Pharm. Hung.*, **70**, 175–186 (2000)
3. T. Kiss, **M. Kilyén**, A. Lakatos, F. Evanics, T. Körtvélyesi, Gy. Dombi, Zs. Majer, M. Hollósi, Interactions of Al(III) with a neurofilament heptapeptide fragment: AcLysSerProValValGluGly, *Coord. Chem. Rev.*, **228** (2), 227–236 (2002) If: 5,853
4. **M. Kilyén**, A. Lakatos, R. Latajka, I. Labádi, A. Salifoglou, C.P. Raptopoulou, H. Kozłowski, T. Kiss, Al(III)-binding properties of iminodiacetic acid, nitrilotriacetic acid and its mixed carboxylic–phosphonic derivatives, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3578–3586, (2002) If: 3,023
5. **M. Kilyén**, P. Forgó, A. Lakatos, Gy. Dombi, T. Kiss, N. Kotsakis, A. Salifoglou, Interaction of Al(III) with the peptides AspAsp and AspAspAsp, *J. Inorg. Biochem.*, **94**, 207–213, (2003) If: 2,204
6. **M. Kilyén**, I. Labádi and T. Kiss, Complex formation between Ca(II), Mg(II), Al(III) ions and Salicylglycine, *Bioinorg. Chem. Apl.*, **1**, 321–332 (2003)

#### A szerző egyéb közleményei

1. E. Forizs, L. David, O. Cozar, C. Craciun, M. Venter, **M. Kilyén**, IR and ESR study of Cu(II) nitrazepam complexes, *J. Mol. Struct.*, 408/409, 195 (1997) If: 1,122

2. I. Labádi, **M. Kilyén**, S. Kertész, A. Pécsváradi, T. Kiss, Effect of different complexes of aluminium on activity of magnesium-glutamine synthetase system, *Magn. Res.*, **14**, 316 (2001) If: 0,994
3. P. Zatta, M. Ibn-Lkhatat-Idrissi, P. Zambenedetti, **M. Kilyén**, T. Kiss, In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase, *Brain Res. Bul.*, **59**, 41 (2002) If: 1,284
4. Á. Dörnyei, **M. Kilyén**, T. Kiss, B. Gyurcsik, I. Laczkó, A. Pécsváradi, L. M. Simon, The effects of Al(III) speciation on the activity of trypsin, *J. Inorg. Biochem.*, **97**, 118 (2003) If: 2,204
5. V. Di Marco, **M. Kilyén**, T. Jakusch, P. Forgó, Gy. Dombi, T. Kiss: Complexation properties of ethylenediaminetetramethylenephosphonic acid (EDTMP) with Al<sup>III</sup> and V<sup>IV</sup>O, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (közlésre elfogadva).

#### **Az értekezés anyagához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek**

1. T. Kiss, **M. Kilyén**, A. Lakatos Speciation of aluminium(III) with small bioligands, *5<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, 13-17 April 1999, Corfu, Greece (előadás)
2. **M. Kilyén**, Gy. Dombi, I. Labádi, T. Kiss, Al(III) kölcsönhatása oligopeptidekkel, *XXXIV. Komplexkémiai Kollokvium*, 1999. május 19-21, Tata (előadás)
3. **M. Kilyén**, Gy. Dombi, I. Labádi, T. Kiss, Interaction of aluminium(III) with oligopeptides, *V Symposium on Inorganic Biochemistry towards molecular mechanisms of metal toxicity*, 23-27 September 1999, Wroclaw, Poland (poszter)
4. T. Kiss, A. Lakatos, **M. Kilyén**, Metal Complexes with potential involvement in Al(III) toxicity, *V Symposium on Inorganic Biochemistry towards molecular mechanisms of metal toxicity*, 23-27 September 1999, Wroclaw, Poland (előadás)

5. T. Kiss, M. Kilyén, A. Lakatos, Zs. Majer, F. Evanics and G. Dombi, Interactions of Al(III) with oligopeptides, *Metals and Brain-First International Conference, from Neurochemistry to Neurodegeneration*, 20-23 September 2000, Padova, Italy (előadás)
6. Kilyén M., Lakatos A., Kozłowski H., Kiss T., Salifoglou A, Imino-diecetsav, nitrilo-triecetsav típusú aminofoszfónatok koordinációs sajátosságai Al(III)ionnal, *XXXVI. Komplexkémiai Kollokvium*, 2001. május 23-25, Pécs (előadás)
7. M. Kilyén, A. Lakatos, H. Kozłowski, T. Kiss, I. Labádi, A. Salifoglou, Coordination behaviour of iminodiacetic acid, nitrilotriacetic acid and its mixed phosphonic derivatives with Al(III) ion, *VII International Symposium on Inorganic Biochemistry*, 20-23 September 2001, Wrocław, Poland (poszter)
8. Kilyén M., Lakatos A., Forgó P., Kiss T., A diaszparaginsav és triaszparaginsav Al(III)-kötő sajátosságainak jellemzése, *XXXVII. Komplexkémiai Kollokvium*, 2002. május 29-31, Mátraháza (előadás)
9. M. Kilyén, A. Lakatos, R. Latajka, I. Labádi, A. Salifoglou, C.P. Raptopoulou, H. Kozłowski, T. Kiss, Characterisation of Al(III) complexes of iminodiacetic acid, nitrilotriacetic acid and its phosphonic derivatives, *Proceedings of the IVth International Symposium Young People and Multidisciplinary Research*, CD ISBN 973-8359-10-4, 2002. november 14-15, Temesvár, Románia (poszter)
10. Kilyén M., Labádi I., Salifoglou A., Kiss T., Az iminodiacetsav és nitrilo-triecetsav típusú aminofoszfónatok Al(III)-kötő képességének vizsgálata, *VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia*, ISBN 973-85809-8-6, 2002. november 15-17, Kolozsvár, Románia, 167-169 (előadás)
11. M. Kilyén, I. Labádi, T. Kiss, Complex formation of Salicylglycine with Ca(II), Mg(II) and Al(III), *International Conference on Solution Chemistry*, 23-28 August 2003, Debrecen, (poszter)

12. **M. Kilyén**, I. Labádi, T. Kiss, Complex formation of Salicylglycine with Ca(II), Mg(II) and Al(III), *IX International Symposium on Inorganic Biochemistry*, 4-7 September 2003, Szklarszka Poreba, Poland (poszter)

#### **Az értekezés anyagához nem kapcsolódó konferencia előadások és poszterek**

1. **E. Forizs**, P. Bombicz, J. Madarász, **M. Kilyén**, I. Labádi, A. Deák, A. Kálmán, Structural and thermal studies on new clathrates of nitrazepam, *XXXIII International Conference on Coordination Chemistry*, 30 August-4 September 1998, Florence, Italy (poszter)
2. **M. Kilyén**, I. Labádi, Z. Galbács, A jelenlegi és a lehetséges módszerek a szennyvizek foszfortartalmának csökkentésére, *Proceedings of the 6th Symposium on Analytical and Environmental Problems*, 30 September 1999, Szeged, 155-159 (poszter)
3. **I. Labádi**, **M. Kilyen**, A. Pécsváradi and T. Kiss, The effect of the chemical form of Al(III) on its enzyme modulatory effects, *Metals and Brain-First International Conference, from Neurochemistry to Neurodegeneration*, 20-23 September 2000, Padova, Italy (előadás)
4. **Labádi I.**, **Kilyen M.**, Kertész S., Pécsváradi A., Kiss T., Különböző alumínium(III) komplexek hatásának vizsgálata a glutamin szintetáz enzim működésében, *Magyar Magnézium Szimpózium*, 2001. június 7-9, Siófok (poszter)
5. **Á. Dörnyei**, **M. Kilyén**, T. Kiss, I. Laczkó, A. Pécsváradi, The effectes of Al(III) speciation on the activity of enzymes, *Fifth Keele Meeting on Aluminium*, 22-25 Februar 2003, Keele, UK (poszter)
6. **Kilyén M.**, Fábán A., Labádi I., Pécsváradi A., Kiss T., Alumínium(III)komplexek hatásának vizsgálata a növényi glutamin-szintetáz enzimre, *XXXVIII. Komplexkémiai Kollokvium*, 2003. május 21-23, Gyula (előadás)
7. **I. Labádi**, **M. Kilyen**, A. Fábán, A. Pécsváradi, T. Kiss, The role of Aluminium(III) complexes in the glutamine synthetase Enzyme, *Progress in Coordination and*

*Bioinorganic Chemistry*, ed. M. Melnik, A. Sairota, Slovak Technical University  
press, Bratislava, ISBN 80-227-1891-2, 2003, 363-368 (előadás)