

VÁLASZ

Dr. Bodor Andrea az MTA kémia tudományok doktorának

„Új, szelektívebb, várhatóan rákellenes hatású gyógyszerjelölt fémkomplexek kifejlesztését támogató kémiai alap kutatások” című,

az MTA doktora cím elnyerésére benyújtott értekezésem bírálatára

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani opponensemnek Dr. Bodor Andrea egyetemi tanárnak az értekezésem alapos áttekintéséért és a bírálat elkészítéséért. Köszönöm és elfogadom a bírálónak a dolgozattal kapcsolatos jobbitó szándékú kritikai észrevételeit, megjegyzéseit. Ugyancsak megköszönöm opponensemnek a dolgozatban bemutatott eredmények elismerését. A bírálatban megfogalmazott kérdésekre, megjegyzésekre az alábbi válaszokat adom:

Megjegyzések/javaslatok:

A dolgozat címében - és a szövegben is gyakran - a „várhatóan rákellenes hatású ...” megfogalmazás szerepel. Szerencsésebb volna a „potenciálisan rákellenes hatású...” megfogalmazás használata. Egy kifejezés magyarázatát egyszer elég megadni. Például: oxigénhiányos állapot (hipoxia), későbbi szövegrészekben elég a hipoxia szót használni.

Az „NMR-el tanulmányozható” helyett: „NMR spektroszkópiai módszerekkel tanulmányozható” helyesebb.

Az aminosavak jelölése egy vagy hárombetűs kóddal történik (pld: A, Ala). Érthető, hogy a jelölt mire utal az alaH jelöléssel, de nem szerencsés választás, biokémiában, szerkezeti biológiában nem alkalmazott.

A 23. ábrán bemutatott ^1H spektrum értelmezése (42. oldal) során helytelen megfogalmazások: „... pH 1,95-nél két jel figyelhető meg, a szabad fémion (1,32 ppm) mellett a másik jel a kialakuló komplexhez tartozik (...) nagyobb térerő irányába történő eltolódás.”

A „pH emelése” helyett inkább pH növelése kifejezés használata célszerű.

„ d^6 -DMSO-ban rögzített ^1H -NMR spektruma” helyett „az ^1H -NMR spektrum DMSO- d_6 oldószerben”.

A dolgozatban szereplő ligandumok többségének, így az aminosavak jelölésekor is a névrövidítések végén szereplő H-ek a 22. 40. és 52. ábrákon feltüntetett semleges szerkezetekre vonatkozóan a disszociábilis protonok számára utalnak. A komplexképződés során történő deprotonálódás mértéke így egyszerűen megadható a képletekben. Ugyanakkor az oligopeptidek esetén a felépítő aminosavak egybetűs névrövidítéseit használtam (lásd 22. ábra). A többi megjegyzést/javaslatot köszönettel elfogadom.

Kérdések:

1. A stabilitási állandók meghatározása klasszikusan 25°C-on, állandó ionerősség mellett történik. A bemutatott mérésekben főleg 0,20 M KNO₃, vagy 0,20 M KCl volt az ionerősség. Hogy alakulna a kép, ha fiziológias körülmények mellett dolgoznánk és 37 °C-on? Milyen koncentrációban kellene jelen lennie a fémionnak? Hogyan változik a speciáció egyik tanulmányozott rendszerben, ha a vér/plazma közeget utánzó összetételt is figyelembe vesszük?

Fiziológias körülmények általában foszfát pufferrel beállított 7,4-es pH-jú oldatot jelentenek, mely NaCl-ra nézve 0,16 M koncentrációjú. Az ilyen körülmények mellett meghatározott stabilitási állandók látszólagos állandók lennének, melyek értéke fémkomplexek esetén kisebb lenne a saját szokásos körülményeink között nyert értékeknél a foszfátion konkuráló hatása miatt. Foszfátion jelenlétében az összes, komplexben kötött fémion mennyisége is módosulhat: ha a foszfát részvételével vízdoldható, vegyes ligandumú komplex is képződhet, akkor a komplexált fémion mennyisége nőhet is, ha ilyen nem képződik, csak a kompetíció történik. A ligandumok savi disszociációs állandóit tekintve a hőmérséklet növelésével kisebb pK_s értékek határozhatók meg. A $\Delta G = -RT\ln K_s$ összefüggésből kiindulva, mivel egy gyenge sav pK_s értéke > 1 (vagyis K_s << 1), így az $-RT\ln K_s$ szorzat pozitív szám, vagyis a protondisszociációs folyamat endoterm (a kis pozitív entrópia tag miatt). Ilyen folyamatok esetén tehát a hőmérséklet növelésével az egyensúly a disszociáció/termékképződés irányába tolódik, ami nagyobb K_s vagyis kisebb pK_s értéket jelent. A fémkomplexek $M + L \rightleftharpoons ML$ általános komplexképződési egyensúlyra definiált állandói értékeinek hőmérsékletfüggése ugyancsak a komplexképződési folyamatok hőszínezetétől függ, azonban ezt sokkal több paraméter befolyásolja. A vérplazma kis molekulatömegű komponensei közül fontosabbak egyes aminosavak (Gly, His, Cys stb.), a GSH/GSSG és más redoxirendszerek, hidroxikarboxilátok (pl. citrát, oxalát, malát) míg a nagy molekulatömegűek közül a HSA és HTf. Előbbiek ugyancsak komplexképzői lehetnek a terápiás céllal bejuttatott komplex fémionjának, de redukálószerként is szerepelhetnek (pl. *in vivo* Ru(III) → Ru(II) vagy Pt(IV) → Pt(II) redukció). A HSA és a HTf pedig különböző kötőhelyeiken a disszociált fémionnal, ligandumával de az át nem alakult fémkomplexszel is kölcsönhatásba léphetnek. Egzakt speciáció megadása csak akkor lehetséges, ha valamennyi komponens összes kölcsönhatására vonatkozó, azonos körülmények mellett meghatározott egyensúlyi állandó ismert. Általánosan azonban az elmondható, hogy a nagy molekulatömegű szérumkomponensek, főleg a HSA, egyes esetekben a HTf döntően járulhat hozzá a bejuttatott kis(ebb) stabilitású, kevésbé inert fémkomplexekből *in vivo* képződő fémion vagy maga a komplex szállításához. Előbbi transzportja még kifejezettebb, ha fémkomplex koncentrációja kicsi (a ciszplatin terápiás dózisa például nagyjából 50-100 mg/m²).

2. A stabilitási szorzatok számszerű meghatározásánál NMR paramétereket is felhasználtak?

Igen, használtunk. Fémkomplexek összetételének és stabilitási szorzat értékeik meghatározásához az egyik legmegbízhatóbb módszer a pH-potenciometria, ugyanakkor nagyon nagy stabilitású komplexek képződésekor más módszert, pl. kompetíción alapuló reakciót szükséges alkalmazni. Természetesen az NMR paraméterek is alkalmasak lehetnek mind proton-, mind fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározására. Munkánk során a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+}$ -met és -mecys rendszerben tapasztaltuk nagy stabilitású komplexek képződését a ligandum háromfogú koordinációjával, már az erősen savas pH-tartományban. Ezekben a rendszerekben a $0,7 < -\log[\text{H}^+] < 2,0$ tartományban végeztünk NMR méréseket és a szabad ligandum vagy a fémionhoz kötődő aromás rendszer (pl. *p*-cimol) illetve a képződő $[\text{RuL}]^+$ komplex megfelelő protonjaihoz tartozó, elkülönült NMR jelek integrál arányából tudtunk egyensúlyi koncentrációkat illetve stabilitási állandót számolni.

3. Oldategyensúlyi mérésekkel leírták a félszendvics szerkezetű $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+}$ kationok részletes hidrolitikus folyamatait. Biológiai szempontból előnyt jelent-e, hogy fiziológiás pH-n túlnyomórészt a hidroxo komplex van jelen (19. ábra)? A képződő részecskék szerkezetének, illetve a különböző fémionok viselkedésének összehasonlításánál hasznosnak bizonyulhatnak a ^{13}C környezetek kémiai eltolódás értékei. Állnak-e ilyen NMR spektroszkópiai adatok rendelkezésre?

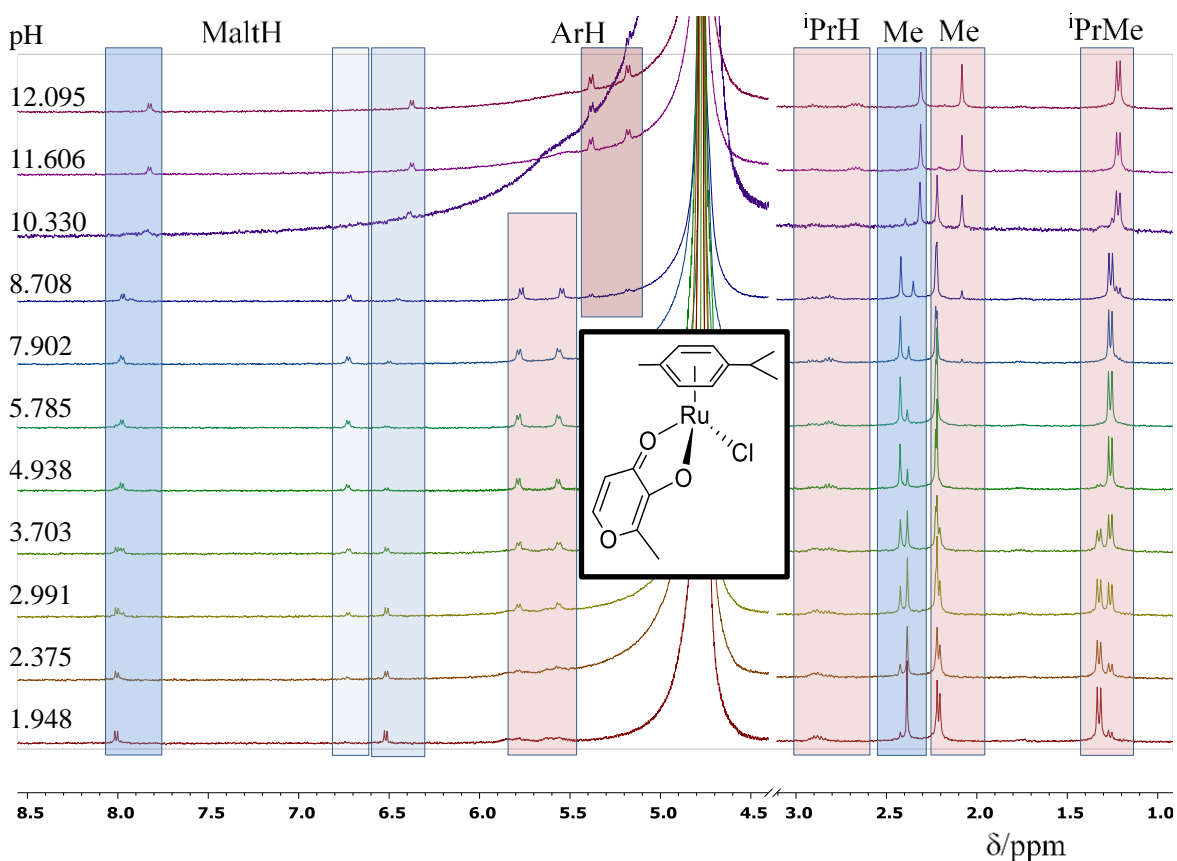
Szakirodalmi adatok [1] alapján az inert $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]_2(\mu^2\text{-OH})_3\}^+$ biológiai szempontból inaktív, így valamely organoruténium komplex szerkezetbeli disszociációjával való képződése az *in vitro* rákellenes hatás csökkenését eredményezi. A vizsgált félszendvics szerkezetű platinafém (Ru, Os, Ir) kationok hidrolízisét pH-potenciometriás, UV-Vis és ^1H NMR módszerekkel vizsgáltuk. Utóbbi módszer kapcsán a koordinálódó aromások viszonylag jelszegény ^1H NMR spektruma, továbbá a rendszerekben képződő kisszámú komplexféleség a hidrolitikus folyamatok adekvát feltérképezését tette lehetővé, így itt a ^{13}C környezetek kémiai eltolódás értékeit nem vizsgáltuk.

[1] Bruijninx and Sadler, *Adv. Inorg. Chem.*, 2009, 61, 1.

4. A 23. ábrához tartozó pH függő részecske eloszlás ábrázolása nagymértékben segítené az Olvasót. Hogy alakul például a malt $-\text{CH}_3$ szingulett jelének változása a pH függvényében? Így az 1:1 arányú oldatösszetételnél az „M” és L részéről is követhetők volnának a változások és a levont következtetések helytállósága sem kérdőjelezhető meg.

Az 1. ábrán az organoruténium-maltol 1:1,1 molarányú minták pH-függő ^1H -NMR spektrumait tüntettem fel. Kék háttérrel a ligandum jelei (gyűrűprotonok: 6,2-8,0 ppm; metil: 2,25-2,6 ppm), barnás háttérrel a fémionhoz kötött *p*-cimol hidrogénjeinek jelei (gyűrűhidrogének: 5,0-6,0 ppm; ^iPr -metin: 2,6-3,0 ppm; metil: 2,0-2,2 ppm; ^iPr -metil: 1,15-1,30 ppm) láthatók. Példaképpen a maltol metilcsoportjának szingulett jelét vizsgálva (2,25-2,6 ppm), a pH-metriás eredményekkel összhangban, már erősen savas körülmények között megindul a komplexképződés. pH ~ 2 körül a komplexben nem kötött ligandum jele (2,38

ppm) mellett egy kis, új jel jelenik meg 2,42 ppm-nél, ami a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{malt})]^+$ összetételű komplexhez rendelhető. A pH növelésével az (O,O)-kelátos komplex mennyisége nő, ezzel párhuzamosan a szabad ligandumé csökken. pH ~ 5 fölött a szabad maltol jelentős része eltűnik a rendszerből, miközben a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{malt})]^+$ koncentrációja eléri maximumát. pH = 10,3-nál mind a ligandum Me jelénél, mind a *p*-cimol izopropil-metil jelénél megfigyelhető, hogy a komplexált részecskéhez tartozó jelek a kisebb δ értékek irányába tolódtak, ami a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}(\text{malt})(\text{OH})]$ vegyes hidroxido komplex képződését támasztja alá. A 11,61 pH-jú minta esetében komplexben kötött maltolhoz tartozó jel már nem detektálható, a szabad ligandum jelének kisebb δ értékek irányába való tolódása a szabad ligandum deprotonálódásának következménye. Ezzel összhangban, a pH > 8,0 tartományban pl. 2,08 ppm-nél, valamint 5,18 és 5,38 ppm-nél megjelenő újabb jeleknek a pH emelésével való intenzitás növekedése a kétmagvú $\{[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]_2(\mu^2\text{-OH})_3\}^+$ hidroxido komplex képződését mutatja.



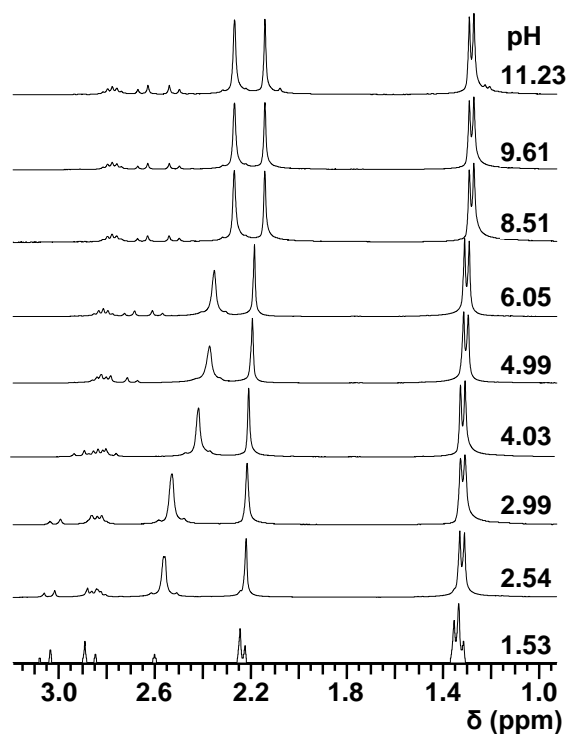
1. ábra Az $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+}$ -maltol rendszer 1:1,1 összetételű mintáinak különböző pH értékeken regisztrált ¹H-NMR spektrumai.

5. Az eredmények ismertetése során többször találkozunk a „feltételezett szerkezet” kifejezéssel. Az organoruténium(II)-citr rendszer tanulmányozásánál (49. oldal) az $[\text{ML}]^-$ komplex feltételezett szerkezetében (B) intramolekuláris H-kötés kialakulását valószínűsítik. Az intramolekuláris

hídban levő H egyik jellegzetessége a nagy ^1H kémiai eltolódás érték. A Jelölt utal részletes NMR spektrum vizsgálatokra, de ezeket sajnos nem találtam. Milyen spektrális bizonyítékok támasztják alá a felrajzolt szerkezeti modelleket?

Az oldatban képződő komplexek szerkezetére vonatkozóan általában nincsenek olyan egyértelmű kísérleti bizonyítékok, mint a szilárd kristályok esetén a röntgendiffrakciós méréseken alapuló szerkezet. Kísérleti körülményeink között (D_2O oldószer) a gyors csere folyamatokban résztvevő protonok, így a kérdésben szereplő H jelei sem voltak detektálhatók a spektrumban. Aprotikus oldószerben mért ^1H NMR spektrumok adhatnának közvetlen választ a megfogalmazott kérdésre.

Az organoruténium-citrát rendszerben azonosított $[\text{RuHL}]$ szerkezetére közvetlen bizonyíték volt a vizes és metanolos oldatból kinyert kristályok molekulászerkezete. Az $[\text{RuL}]^-$ vonatkozásában közvetett bizonyítékot jelentenek a megfelelő állandók: a $\text{p}K_{\text{RuHL}} = 2,77$ érték, mely az $[\text{RuHL}]$ deprotonálódásának pH-tartományára utal, jelentősen kisebb, mint a szabad ligandumra meghatározott $\log K_{\text{HL}} = 5,53$ érték, ami azt támasztja alá, hogy a fémkomplexben kedvezményezett a nem koordinálódó harmadik karboxilcsoport



2. ábra A Ru^{2+} -citrát 1:1,1 arányú rendszer pH-függő ^1H NMR spektrumainak alifás tartománya

protonvesztése, ez pedig a fenti intramolekuláris kölcsönhatással értelmezhető.

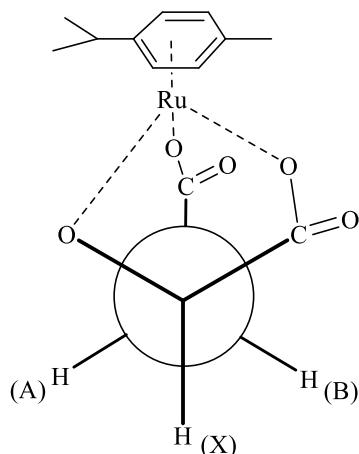
A Ru^{2+} -citrát 1:1,1 arányú rendszer ^1H NMR spektruma (2. ábra) alapján már erősen savas körülmények között is kétféle Ru-tartalmú részecske van jelen. A nem komplexált $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+} \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ hidrogénjeinek 1,34 ppm-nél megjelenő dublettje, valamint a metilcsoportjának 2,24 ppm-nél látható szingulettje mellett látható jelek 1,32 és 2,22 ppm-nél a citrát kötődésével komplex képződésére utalnak. pH = 2,54-nél már nincs jelen szabad fémion, a Ru^{2+} teljes mennyisége citrát komplex formájában van jelen. A képződő részecskék széles pH-tartományban dominánsak, a kétmagvú hidroxidokomplex képződése még erősen lúgos körülmények között sem számottevő. A jelek kisebb kémiai eltolódás irányába történő folyamatos tolodása a komplexek deprotonálódási folyamataival értelmezhető. pH = 1,53-nál a szabad citromsav jelei látszanak ~ 2,9 ppm-nél egy AB dublett formájában. A pH növelésével a jelek folyamatos eltolódása és intenzitásuk csökkenése a

szabad citromsav deprotonálódásával és mennyiségének csökkenésével magyarázható. Az alifás tartományban ~ 2,60 ppm-nél egy további, kiszélesedett jel is látszik, ami a Ru komplexben kötött citráthoz rendelhető. A pH növelésével történő folyamatos jeltolódás összhangban van a [RuHL]-ből előbb a [RuL]⁻ majd [RuLH₋₁]²⁻ képződésével. A komplexben kötött citrát NMR jele kiszélesedésének és multiplicitás-változásának egy lehetséges magyarázata a koordinált donoratombok közötti belső csere vagy a komplex fluxionalitása lehet, hasonlóan az Al(III)-citrát rendszerhez [1].

[1] Bodor et al., *Coord. Chem. Rev.*, 2002, 228, 175.

6. Az organoruténium(II)-mal komplex esetében (51. oldal) meghatározza a mal ligandumban a ³J_{AX} és ³J_{BX} csatolási állandó értékeit (7. táblázat). Ezen mért ³J_{HH} csatolási állandók értékes információt szolgáltatnak a torziós szög nagyságáról a Karplus összefüggés alapján. Ezt figyelembe véve kísérletesen is igazolható volna a kristályszerkezet és oldatszerkezet közötti összefüggés (példa hivatkozások: Minch, M. J. (1994). "Orientational Dependence of Vicinal Proton-Proton NMR Coupling Constants: The Karplus Relationship". *Concepts in Magnetic Resonance* 6, 41-46.; Wang, A. C., and Bax, A. (1996) Determination of the Backbone Dihedral Angles in Human Ubiquitin from Reparameterized Empirical Karplus Equations. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2483-2494.)

A megadott első hivatkozásban szereplő, a Karplus összefüggésben ($^3J_{HH}(\theta) = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C$) található A, B és C konstansok felhasználásával szerkesztett függvény segítségével a H-C-C-H diéderes szögek számolhatók, melyek a CH-csoport (H_X hidrogén) és a szomszédos



CH₂-csoport (H_A és H_B hidrogének) megfelelő hidrogénjeinek térállására adhatnak felvilágosítást. Az organoruténium-malát rendszerben főtermékként kialakuló [RuLH₋₁]⁻ komplexre meghatározott ³J_{AX} és ³J_{BX} csatolási állandó értékeket (5,5 és 1,8 Hz) a Karplus összefüggésbe helyettesítve a torziós szögekre 42° és 63° számolható. A Newman projekciós ábrázolás is mutatja, hogy a CH₂-csoport két hidrogénjére (H_A és H_B) vonatkozó megfelelő diéderes szög 120°, így a csatolási állandók alapján nyert fenti szögek (azok összegét is figyelembe véve) jó közelítéssel alátámasztják a feltételezett szerkezetet (lásd a beszúrt ábrát). Érdeemes azonban azt is megjegyezni, hogy a ³J_{HH} csatolási állandókat molekulaszervezeti sajátosságok,

például nagy elektronegativitású atomok közelsége és térállása is befolyásolja. A „B” jelű hidrogénnel antiperiplanárisan elhelyezkedő alkoholátcsoport például a ³J_{BX} csökkenését okozza, így a fenti számolt szögek alapján megadható szerkezet csak közelítőnek tekinthető.

7. Komplexképződés tanulmányozásához (COO⁻, NH₂) kötémódra képes ligandumként szabad aminosavakat használ, az eltérő viselkedésű alanint és szerint (55-56. oldal). Mit gondolsz, hogy

befolyásolná a fémion-ligandum kölcsönhatást, ha az alanin, vagy a szerin a peptidlánc részeként lenne jelen?

A csak (COO⁻, NH₂) kötésmódra képes alanin nem hatékony liganduma az organoruténium ionnak; a képződő [RuL]⁺ már gyengén savas pH-n hidrolizált lassú folyamatokban. Ezzel ellentétben a szerin már ekvimoláris oldatban is képes volt visszaszorítani a fémion hidrolízisét, ami pH 6 alatt az OH⁻, afelett az alkoholátcsoport részvételt támasztja alá a [RuL]⁺ illetve [RuH₋₁L] részecskékben. Abban az esetben, ha ezek az aminosavak peptidlánc részei lennének, a szerin OH-csoportjának lehet komplexstabilitást növelő szerepe, de alapvetően csak más, erős fémionmegkötő csoportok (terminális aminocsoport, deprotonált peptid-N, illetve His imidazolcsoportja vagy Cys tiolátcsoportja) által kialakított kelát jelenléte esetén lenne várható esetleges stabilitásnövekedés egy megfelelő szekvenciájú Ala egység Ser-re történő cseréjével.

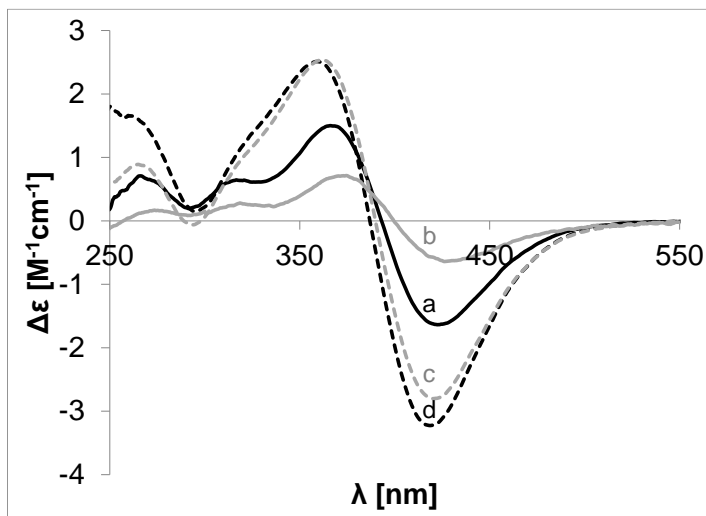
8. Az idaP ligandumokkal történő kölcsönhatás vizsgálatok esetében a ³¹P NMR mérések jelenthetnek jó támpontot. A kis koncentrációjú minták esetében is jó minőségű a spektrum, és a mérési idő is rövid. A foszfor rezonanciajel kémiai eltolódása a protonáltságról és a komplexképződésről is információt szolgáltat. Próbálkoztak-e ilyen megközelítésekkel?

Köszönöm a javaslatot. Valóban felmerült ilyen mérések kivitelezése is, de végül nem éltünk ezzel a lehetőséggel, mert a potenciometriás és a ¹H NMR információk kombinált alkalmazása, továbbá a másik két rokon ligandummal nyert adatokkal való összehasonlítás egyértelmű leírását adta ennek a rendszernek.

9. Az organoruténium His aminosavval való komplexképződését több ligandummal is vizsgálta. Az eltérő CD görbék (38. ábra) magyarázata: „koordinációs módok eltérése”. Az említett NMR spektroszkópiai mérések ezt milyen módon támasztják alá? Mit jelent a lassú folyamat a heptapeptiddel történő komplex képződésénél? Vizsgálták-e bármely - a dolgozatban bemutatott - komplex és a humánszérum albumin (HSA) kölcsönhatását CD vagy NMR spektroszkópiai módszerekkel? Esetleg milyen irodalmi adatok állnak rendelkezésre? A HSA Cu²⁺ és Zn²⁺ fémionok fiziológiasz transzportere. A Zn²⁺ kötő motívumok a His oldalláncok. Hogyan befolyásolja a tanulmányozott komplexképződést a Zn²⁺ jelenléte?

Az organoruténium ion kölcsönhatását az N-és C-terminuson is védett (Ac-HHH-NH₂, Ac-HAHH-NH₂, Ac-HAHAH-NH₂) valamint szabad terminális aminocsoportot tartalmazó peptidekkel (H-HA-OH, H-HAVAHHH-NH₂) is vizsgáltuk. A három hisztidint tartalmazó védett oligopeptidek esetén a három imidazolilcsoport koordinációja valószínűsíthető, de a Ru(II)-Ac-HAHH-NH₂ és a Ru(II)-Ac-HAHAH-NH₂ 1:1 molarányú minták CD spektrumainak eltérése a lúgos pH-tartományban azt sugallja, hogy itt a koordinációs mód már nem egyforma. Az előbbi rendszerben HR-ESI-MS módszerrel detektált [RuH₋₁L]⁺ összetételű kation nagy intenzitású jele valamelyik peptidcsoport fémion indukált deprotonálódására utalhat, erre azonban nincs közvetlen bizonyítékunk. A dolgozatban

szereplő, a 3. ábrán bemutatott CD spektrumok ugyanakkor azt támasztják alá, hogy a szabad terminális aminocsoportú két ligandummal ((*H*-HA-OH, *H*-HAVAHHH-NH₂) azonos, hisztaminszerű kötőmód valósulhat meg.



3. ábra A $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+}$ -HAVAHHH-NH₂ 1:1 arányú minta (pH = 2,65) (a), a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+}$ -HAVAHHH-NH₂ 2:1 arányú minta (pH = 3,07) (b), a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+}$ -HisAla 1:1 arányú minta (pH = 2,15) (c) és a $[(\eta^6\text{-}p\text{-cym})\text{Ru}]^{2+}$ -HisHis 1:1 arányú minta (pH = 2,59) (d) CD görbéi

COSY, NOESY és ¹H-¹³C korrelációs mérésekkel a szabad valamint a fémiont is tartalmazó mintákban beazonosítottuk az összetartozó imidazolgyűrű protonok jeleit illetve például az organoruténium-Ac-HAHAH-NH₂ rendszerben a NOESY spektrumban az imidazol és a hexahapto kötőmódú *p*-cimol hidrogének közötti téren keresztüli kölcsönhatásra utaló keresztcsúcsok igazolták mindhárom His egység koordinálódását.

A His-tartalmú oligopeptidekkel a komplexképződési egyensúly beállításához több óra, néha több, mint egy nap volt szükséges, a folyamatot NMR mérésekkel követtük.

A dolgozatban bemutatott komplexek közül, együttműködés keretében, csak a kinizarin kétmagú Co(III) komplexeinek és a ligandumnak a kölcsönhatását vizsgáltuk HSA-val, de UV-látható spektrofotometriát és spektrofluorimetriát használtunk, a kölcsönhatásra vonatkozóan NMR mérések tehát nem készültek [1].

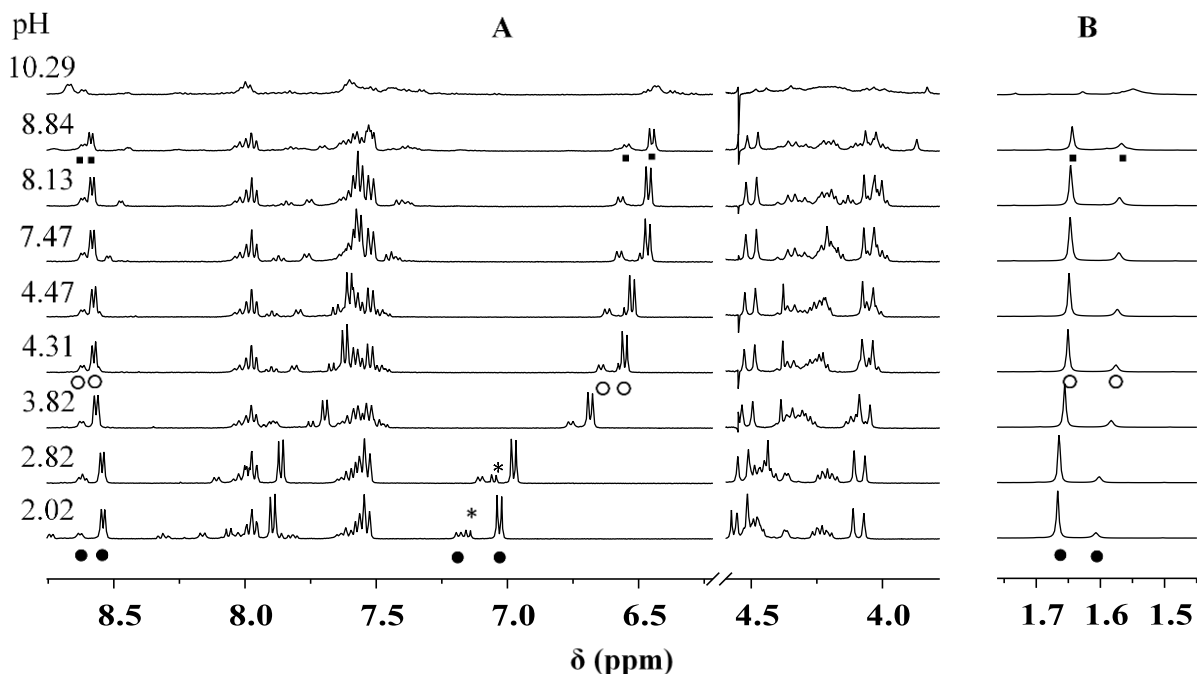
A szakirodalomban Enyedy és Dömötör vizsgálta számos organoruténium és -ródiom komplex HSA-val való kölcsönhatását, mely során döntően spektrofluorimetriás módszerrel határozták meg a HSA I-es illetve II-es kötőhelyein való komplexálódást jellemző látszólagos kötési állandókat; az NMR információkból pedig arra tudtak következtetni, hogy a kölcsönhatás során a fémkomplex disszociál-e [2]. CD technika alkalmazására csak néhány szakirodalmi eredmény található Ru komplex – HSA kölcsönhatásokra vonatkozóan. Ezekből a mérésekből arra nyertek információt, hogy a komplex kötődése milyen mértékben változtatja meg a fehérje konformációját [3,4].

Noha számos His-tartalmú oligopeptid és a Zn(II) közötti kölcsönhatást kutatócsoportunkban vizsgálták, az organoruténium(II)ionnal nincsenek számszerű adataink a lassú komplexképződés miatt, emiatt kvantitatív összehasonlítás sem lehetséges. Az általános komplexképződési trendek alapján az valószínűsíthető, hogy a Zn(II) kisebb stabilitású komplexeket képezne, mint az organoruténium ion, így feltehetően nem befolyásolná lényegesen az organoruténium ion és a ligandumok kölcsönhatását. A hisztidil egység oldalláncát modellező imidazol vagy metil-imidazol esetében az organoruténium(II)-metil-imidazol illetve a cink(II)-imidazol rendszerben képződő komplexekre található stabilitási állandók a szakirodalomban [5,6], így ezen eredményeket használva modell számításokat is végeztünk. Habár ezen modell ligandumok pK_s értékei (Im: 6,55 [5], MeIm: 7,12 [6]) és vizsgálatuk kísérleti körülményei sem teljesen azonosak, mégis fontos információ, hogy a számításoknál $1 \mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{Im})_3]^{2+}$ komplex koncentrációt és a cink(II) sérumbeli koncentrációját ($12,2 \mu\text{M}$ [7]) alkalmazva, mérhető mennyiségben nem jelennek meg Zn(II)-tartalmú komplexek.

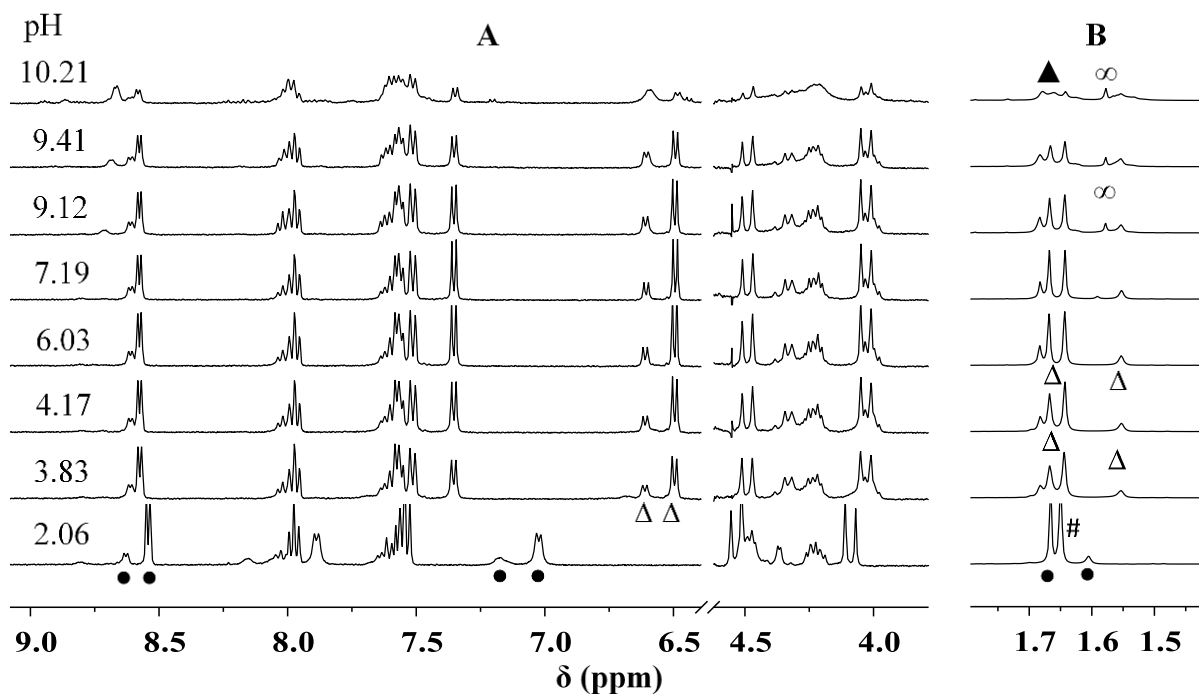
- [1] Kozsup et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2020**, *204*, 110963.
- [2] Dömötör, Enyedy, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2019**, *24*, 703.
- [3] Sun et al. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2015**, *163*, 266.
- [4] Riccardi et al. *Molecules* **2023**, *28*, 2800.
- [5] Nair et al. *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, **1982**, 555.
- [6] Bihari et al. *J. Organomet. Chem.*, **2015**, *782*, 82.
- [7] Yokokawa et al. *J. Gen. Fam. Med.* **2020**, *21*, 248.

10. Az organoródium-PyPropHp rendszer vizsgálatánál (91-92. oldal) 61. ábrán hasznos volna a referencia spektrumot is feltüntetni. Hogy néz ki a spektrum többi része, a diasztereomerek jelenlétét hogy tükrözi a többi rezonanciajel? Az (O,O), vagy (N,N) koordináció ^1H - ^{13}C illetve ^1H - ^{15}N HMBC spektrumok segítségével igazolható volna. Történtek ilyen kísérletek, ha igen, milyen eredménnyel?

Az organoródium-PyPropHp rendszerben 0,93:1 és 2:1 fémion-ligandum mólarányú minták NMR spektrumainak pH-függését vizsgáltuk (4. és 5. ábra). A közel ekvimoláris minta esetén a fémionhoz kapcsolódó Cp* gyűrű hidrogénjeinek szingulett jele megduplázódik: egy kis és egy nagyobb jel látható (1,6-1,7 ppm), és hasonló integrálarányú jelek rendelhetők a piridinon egység gyűrűprotonjaihoz is (8,5-8,6 és 7,0-7,2 ppm). Mindez két diasztereomer jelenlétére utal. Utóbbi jelpárok ppm értékeinek csökkenése a pH növelésével (4. ábra) a szabad, fémionhoz nem kötődő piridinon egység protonvesztési folyamataival értelmezhető. A szabad ligandumban a piridingyűrű és a szekunder aminocsoport között elhelyezkedő metilénecsoport egy szingulett jelet ad. A ligandum (N,N) koordinációja a fémionhoz azonban megszünteti a metilénprotonok ekvivalenciáját, ami a 4. ábrán is látható dupla dublett megjelenését okozza a spektrumban 4,1 és 4,55 ppm körül. Mindezek tehát az 1:1 összetételű komplexekben a ligandum N-donoratomjaival való kötődését támasztják alá. Ezzel párhuzamosan a 7,05 ppm-nél látható, a piridinongyűrű egyik hidrogénjének dublettje a pH növelésével folyamatosan a kisebb δ értékek felé tolódik, ami a fémionhoz nem kötött, szabad piridinongyűrű deprotonálódásával értelmezhető.



4. ábra A $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh}]^{2+}$ -*PyPropHp* 0,93:1 molarányú minták különböző pH értékeken rögzített NMR spektrumai ($c_L = 5$ mM). A különböző részecskék megfelelő protonjainak jelölése: PyPropHpH_x (*), $[\text{MH}_2\text{L}]^{3+}$ (●), $[\text{MHL}]^{2+}$ (○), $[\text{ML}]^+$ (▪). (A jelintenzitás skálák nem egyformák az A és B ábrákon.)



5. ábra A $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh}]^{2+}$ -*PyPropHp* 2:1 molarányú minták különböző pH értékeken rögzített NMR spektrumai ($c_L = 5$ mM). A különböző részecskék megfelelő protonjainak jelölése: $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$ és $[\text{M}(\text{Cl})_3]^-$ (#), $[\text{MH}_2\text{L}]^{3+}$ (●), $[\text{M}_2\text{L}]^{3+}$ (Δ), $[\text{M}_2\text{H}_{-1}\text{L}]^{2+}$ (▲), $[\text{M}_2(\text{OH})_3]^+$ (∞). (A jelintenzitás skálák nem egyformák az A és B ábrákon.)

2:1 arányánál (5. ábra) ugyanehhez a hidrogénhez tartozó kis és nagy jel 6,5 és 6,6 ppm körül látszik a teljes $3,3 < \text{pH} < 9,4$ tartományban, melyek a piridinon egység (O,O) koordinációját, egy második fémion megkötődésével a 2:1 összetételű komplex jelenlétét igazolják.

Az említett rendszerben kérdésbeli 2D NMR kísérleteket nem végeztünk, de megfogadjuk a tanácsot, a jövőbeli munka kapcsán tervezzük ilyen mérések végzését is. Ugyanakkor érdemes leszögezni, hogy a ligandum két elkülönült részén bekövetkező fémionmegkötés az 1D ^1H spektrumok elemzésével is megbízhatóan igazolható volt.

11. Hasonlóképp a 71. ábrán bemutatott Co(III)/Pd(II) kétmagvú komplexek javasolt oldatszerkezeteinek alátámasztását az 1D ^1H spektrumok mellett a ^1H - ^{13}C és ^1H - ^{15}N korrelációs mérések nagymértékben elősegítenék.

Köszönöm a javaslatot. Jelenleg a peptidlánc helyett egyéb, ugyancsak (N,N) koordinációra képes molekuláris részletet tartalmazó ambidentát ligandumokat állítunk elő és tervezünk vizsgálni. Ezek fémionokkal való oldatbeli kölcsönhatásának tisztázására tervezzük az említett 2D NMR kísérletek eredményeit is felhasználni.

12. Az A2780 sejtvonalon végzett sejt felvételi vizsgálatok azt mutatták, hogy az irídium felvétel a platina felvételnél hatékonyabb. Milyen kísérletekkel lehetne igazolni a sejtmembránon történő átjutási mechanizmust? A ciszplatin passzív diffúzióval vagy valamilyen transzporter segítségével jut az extracelluláris térből az intracelluláris térbe?

A sejtmembránon való átjutás történhet passzív és aktív transzporttal. Előbbi nem igényel energiát és valamilyen ioncsatornán keresztüli vagy hordozó segítségével történő passzív diffúziót jelent. Az aktív vagy receptor által közvetített transzporthoz az ATP szolgáltatja az energiát. Ilyen transzporter lehet a Na^+/K^+ -ATPáz vagy egy réz transzporter fehérje, a CTR1 is. Az átjutási mechanizmus felderítésére vizsgálhatjuk azt, hogy a sejtek mennyi fémkomplexet vesznek fel különböző hőmérsékleteken ($4 - 37\text{ }^\circ\text{C}$). Ha kis hőmérsékleten is van influx akkor a folyamat legalább részben passzív diffúzió. Ha az intracelluláris ATP-t gátló anyagok (pl. 2-dezoxi-D-glükóz + oligomicin) vagy transzporter inhibitorok (pl. ouabain a Na^+/K^+ -ATPáz blokkolására) jelenlétében csökkent fémkomplex felvétel tapasztalható, akkor a sejtbe történő bejutás aktív transzporttal történik [1].

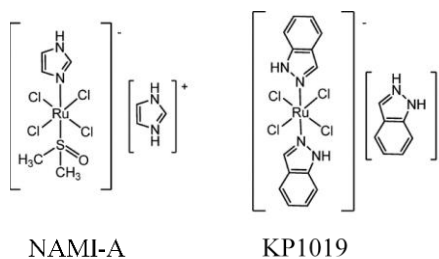
Korábbi szakirodalmi eredmények [2] alapján azt feltételezték, hogy a kisméretű és semleges ciszplatin passzív diffúzióval jut át a sejtmembránon, amit az intracelluláris térbeli csökkent kloridion koncentráció is elősegít. Részletesebb vizsgálatok alapján azonban a ciszplatin döntően aktív transzporttal kerül be a kísérletekben használt A2780 sejtekbe. A folyamatban a Na^+/K^+ -ATPáz és a CTR1 [1,3] továbbá szerves kation transzporterek (pl. OCT1-3) is szerepet játszanak [4].

A sejtbeli fémkomplex mennyisége atomspektrometriás (AAS, ICP) technikákkal mérhető, a sejt-szervecskében történő lokalizáció például fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálható.

- [1] Novohradsky et al, *Metallomics*, **2014**, 6, 682
 [2] Gately and Howell, *Br. J. Cancer*, **1993**, 67, 1171
 [3] Romero-Canelon et al, *Metallomics*, **2012**, 4, 1271
 [4] Riddel and Lippard, in: *Metallo-drugs: Development and action of anticancer agents*, eds: Sigel & Freisinger, *Met. Ions Life Sci.* **2018**, 18, pp. 1-42

13. A ciszplatint intravénásan adják be normál sóoldatban, infúzióként. Amennyiben potenciális kemoterápiás gyógyszer fejlesztése a cél, akkor a tanulmányozott vegyületek is hasonlóképpen kerülnének bejuttatásra és hasonló volna a hatásmechanizmusuk is (?). A cél a sejtmaghoz való eljutás, a DNS-hez való kötődés. Ezen az útvonalon kik volnának a fő kölcsönható partnerek és a változó körülményekhez (koncentráció, pH) milyen ideális szerkezeti/dinamikai jellemzőkkel kell rendelkeznie a fémkomplexnek? A tanulmányozott vegyületek közül kik volnának erre valóban potenciálisan alkalmasak, és milyen további vizsgálatokat javasolna?

Noha a beteg számára a szájon át történő gyógyszerbeadás a legkíméletesebb, a kemoterápiában használt Pt(II) komplexeket intravénásan adják be, hogy elkerüljék például a szájon át történő alkalmazáskor a gyomor-bél traktus jelentősen eltérő pH-ja miatti biotranszformációs reakciókat és gyenge felszívódást. A véráramba juttatott komplexek a szérum kis és nagy molekulatömegű komponenseivel reagálhatnak. Utóbbiak közül a HSA és a HTf a legfontosabbak. A nagy koncentrációban jelenlevő HSA (630 μM) fontos szerepet játszik mind a kemoterápiában használt Pt(II), mind a fázis I és II vizsgálatokban használt Ru(III) komplexek (NAMI-A, KP1019/1339) szállításában. A síknégyzetes ciszplatint a sejtmagban akválódás (klorid \rightarrow víz csere) útján aktiválódik és a sejtmagban a DNS-beli, elsősorban guanin bázisokhoz kötődve megzavarja a DNS replikációját. Noha új, várhatóan rákellenes hatású fémkomplexek DNS-sel való kölcsönhatását gyakran megvizsgálják, a fémkomplexeknek nagyon változatos lehet a hatásmechanizmusa. Ezek a vegyületek az esetek jelentős részében „prodrug”-nak tekinthetők, bioaktív formájuk kialakulását



gyakran valamilyen külső hatás, például a ráksejt vagy szövet eltérő pH-ja, egyes fehérjék túlzott kifejeződése, megváltozott redoxi potenciál, oxigénhiányos állapot, hidrolízis stb. idézi elő. A bioaktív részecske fizikai és kémiai tulajdonságai fogják meghatározni a sejtbeli eloszlását és a hatásmechanizmusát. Előbbi vonatkozásában, például a két nagyon hasonló szerkezetű Ru(III) komplexről azonos körülmények között végzett

kísérletekkel megállapították, hogy amíg a KP1019 a citoszolban és a sejtmagban is lokalizálódik, addig a NAMI-A a sejtmagba egyáltalán nem jut be [1]. A hatásmechanizmus a DNS mellett alapulhat a sejtmembránnal és a sejt egyéb szervecskéivel, elsősorban a mitokondriummal és a lizoszómával való kölcsönhatáson. Sokszor akár a szoros szerkezeti hasonlóság ellenére is eltérő a fémkomplexek hatásmechanizmusa. Újabb eredmények szerint, például a ciszplatinnal ellentétben az oxaliplatin riboszóma biogenezis stresszt

okozva fejt ki rákellenes hatását [2]. Ugyancsak ismert, hogy számos organoirídium komplex *in vitro* rákellenes hatása reaktív oxigéntartalmú részecske (ROS) képzésükkel függ össze [3]. A klinikai vizsgálatokba bevont GaX₃ komplexek (X = maltolát, GAM; X = 8-OH-kinolin anionja, KP46) közül a GAM a ribonukleotid reduktáz enzimmel, míg a KP46 citoskeletális fehérjékkel kölcsönhatva okoz sejthalált [4].

A fémkomplexek szérumban való szállításában a HSA és HTf vesz leginkább részt, a sejtbe a korábban tárgyalt aktív vagy passzív transzporttal juthatnak be, amely módja ismét a fémkomplex aktív formájának tulajdonságaitól függhet. Nehéz egyértelműen definiálni a komplex tulajdonságaival szembeni elvárásokat, de a dolgozatomban összefoglalt munka eredményei is azt mutatják, hogy az alkalmazott fémionok és a komplexképző ligandumok sav-bázis tulajdonságai, ebből adódóan az oldatspeciáció, továbbá a komplexek megfelelő stabilizálása, inertsége, redoxi tulajdonságaik, lipofil jellegük mind fontos szerepet játszanak. Ezen tulajdonságok megismerése, trendek feltárása segítheti elő a munka megfelelő irányban való folytatását.

Hatékony, várhatóan rákellenes hatást mutató komplexek tervezésekor fontos szerep jut a szelektivitásnak. Ez a hipoxia-aktiválással is biztosítható. Így munka egy folytatási irányát jelentheti a Co(III) hordozó komplexek szerkezeti módosítása: a tpa komplexek stabilitásának és/vagy a tren ligandumúak lipofil jellegének a növelése. A szerkezet-hatás összefüggések feltárására olyan új ambidentát ligandumok előállításán és jellemzésén dolgozunk, amelyek új típusú (N,N) kelát kialakítására képesek. Ugyancsak tervezzük az enzim inhibitor hatásáról jól ismert hidroxamát alapú fémionmegkötő egységek beépítését a ligandumokba. Ezen ligandumok fémkomplexeinek előállítása és kémiai jellemzése valamint – együttműködés keretében – biológiai vizsgálata képezheti a kutatás folytatását.

[1] Aitken et al, *Metallomics*, **2012**, *4*, 1051

[2] Bruno et al, *Nat. Med.*, **2017**, *23*, 1

[3] Štarha, *Inorg. Chem. Front.*, **2025**, *Advance Article*

[4] Jungwirth et al, *Mol. Cancer Ther.*, **2014**, *13*, 2436

Végezetül ismételtén szeretném megköszönni opponensemnek, hogy elkészítette az értekezésem bírálatát és hogy jobbító szándékú megjegyzéseivel, gondolatébresztő észrevételeivel járult hozzá a kutatómunka tervezett folytatásához.

Debrecen, 2025. február 5.



Buglyó Péter
egyetemi tanár