

Szakdolgozat

Fenantrolin alapvázú hisztidin konjugátum átmenetifém-komplexei

Istvándi Richárd

Vegyésszmérnök BSc Hallgató

4. évfolyam



Témavezető:

Dr. Lihi Norbert

egyetemi docens

Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés	1
2. Irodalmi előzmények	3
3. Kísérleti körülmények, kísérleti eszközök	10
4. Eredmények és értékelésük	12
5. Összefoglalás	20
6. Summary	21
7. Irodalomjegyzék	22
8. Köszönetnyilvánítás	24

A dolgozatban szereplő rövidítések magyarázata

ROS	Reaktív oxigén részecskék
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
EcSOD	Extracelluláris szuperoxid-dizmutáz
His	Hisztidin
Asp	Aszparaginsav
Phen	Fenantrolin
DNS	Dezoxiribonukleinsav
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
CD	Cirkuláris dikroizmus

1. Bevezetés és célkitűzés

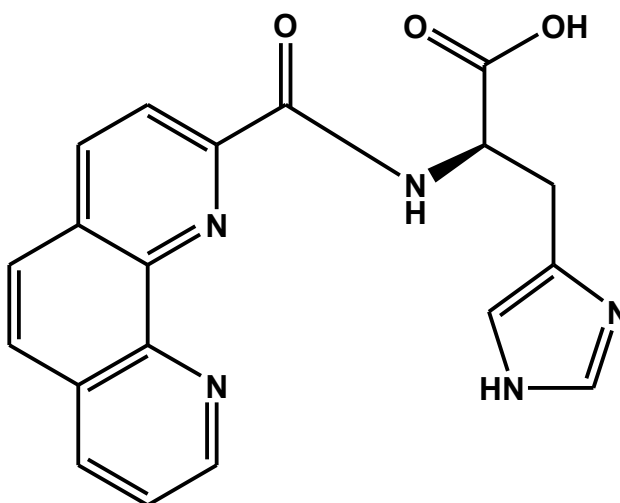
A biológiai rendszerekben a reaktív oxigénszármazékok (ROS-ok) széles skálája jön létre, amelyek keletkezése egyrészt a sejtek normális anyagcsere-folyamatainak természetes velejárója, másrészt különböző külső hatások, mint az UV-sugárzás vagy gyulladásos folyamatok következménye. Ezek a molekulák tehát nemcsak a sejtlegzés és egyéb oxidatív folyamatok melléktermékei, hanem a környezeti stressz tényezők által kiváltott oxidatív válasz részei is lehetnek.

A ROS-ok kiemelkedően nagy és gyakran nem szelektív reaktivitásuk révén súlyos sejtkárosodásokat idézhetnek elő. E tulajdonságaik következtében mára már bizonyított, hogy a ROS-ok kulcsszerepet játszanak számos gyulladásos és daganatos betegség kialakulásában és előrehaladásában, valamint az öregedési folyamatokban is. [1]

A ROS-szint enyhe növekedése előnyös lehet, mivel támogatja a sejtek osztódását, túlélését és az immunrendszer működését. Amikor azonban a ROS-termelés meghaladja a sejtek antioxidáns védelmét, oxidatív stressz jön létre, amely súlyosan károsíthatja a sejtalkotókat, például a DNS-t, fehérjéket és lipideket. Emiatt a ROS-ok központi szerepet játszanak számos betegség és kóros folyamat kialakulásában.

A túlzott ROS-termelés negatív hatását a szervezet antioxidáns tulajdonságú fehérjékkel, molekulákkal próbálja mérsékelni. Bizonyos esetekben ugyanakkor ezeket pótolni kell, hogy a ROS-ok által kiváltott sejtkárosodások és patológias állapotok mérséklődjenek. [2]

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén régóta foglalkoznak antioxidáns tulajdonságú átmenetifém-komplexek vizsgálatával. Ebbe a munkába bekapcsolódva szakdolgozatom célja egy új, fenantrolin alapvázhoz konjugált hisztidint tartalmazó molekula (PhenHis-ként hivatkozva a dolgozat további részében, 1. ábra) sav-bázis tulajdonságainak, valamint réz(II)-, mangán(II)-, vas(II)- és vas(III)-komplexeinek oldategyensúlyi és spektroszkópiai vizsgálata volt. Ezen túlmenően vizsgáltam az egyes komplexek szuperoxid gyökánnal való reakcióját abból a célból, hogy a fiziológias pH-n kialakuló komplexek antioxidáns hatásáról bővebb információt nyerjek.



1. ábra A PhenHis ligandum szerkezete.

2. Irodalmi előzmények

2.1 Szuperoxid-dizmutáz enzimek

A SOD enzimek olyan metalloenzimek, amelyek az első védelmi vonalat jelentik a sejtek számára az oxidatív károsodásokkal szemben, mivel képesek a szuperoxid gyökanyon gyors, diffúziókontrollált lebontására molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá. Ennek következtében a ROS eltávolítása a SOD által hatékony betegségmegelőzési stratégiának tekinthető. Kutatások igazolták a SOD enzimek védő hatását neurodegeneratív megbetegedésekkel, apoptózissal, karcinogenezissel és sugárzással szemben is.

Az emlős sejtekben jelenleg három fő SOD található lokalizációtól függően. Ezek az extracelluláris szuperoxid-dizmutáz (EcSOD, SOD3), a mangán-tartalmú szuperoxid-dizmutáz (MnSOD, SOD2), valamint a réz–cink szuperoxid-dizmutáz (Cu/ZnSOD, SOD1) enzimek.

Azonban az aktív centrumukban található fémionok alapján a SOD-enzimek négy fő típusba is sorolhatók: nikkel SOD (NiSOD), mangán SOD (MnSOD), vas SOD (FeSOD) és réz–cink SOD (Cu/ZnSOD). Ezek a sejt különböző sejtszakaszaiban fordulnak elő. A Cu/ZnSOD leginkább a citoplazmában, a mitokondriumokban és a kloroplasztokban fordul elő, míg a MnSOD elsősorban a peroxisómákban és mitokondriumokban található. Ezzel szemben a FeSOD főként a mitokondriumokban, kloroplasztokban és peroxisómákban van jelen. A NiSOD emlős sejtekben nem található meg, ugyanakkor cianobaktériumok fő antioxidáns enzime.

A MnSOD és FeSOD enzimek szoros kapcsolatban állnak egymással az aminosavszekvencia és szerkezetük alapján. Szerkezeti hasonlóságaik alapján a MnSOD és FeSOD valószínűleg ugyanannak az enzimnek különböző változatai. Rendkívüli hasonlóságaik alapján általában úgy vélik, hogy közös ősenzimből származnak. A korai Földön bekövetkezett oxigénszint-változások valószínűleg hozzájárultak ahhoz, hogy ezek az enzimek különböző evolúciós utat kövessenek, és kialakuljanak a ma ismert, elkülönült FeSOD és MnSOD típusok. A Cu/ZnSOD az eukarióták fő réztartalmú metalloenzimje, azonban enzimaktivitását csak 1969-ben azonosították, amikor McCord és Fridovich kimutatta, hogy képes a szuperoxid-anion dizmutációjára. [3] [4]

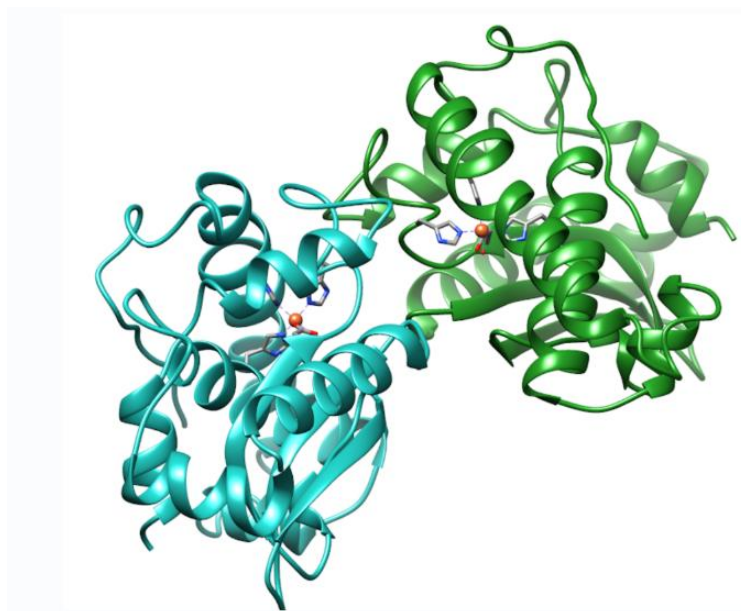
2.2 FeSOD

A vas-szuperoxid-dizmutáz (FeSOD) a SOD enzimsalád tagja. Úgy vélik, hogy a FeSOD volt az elsőként kialakult SOD-enzim, mivel a Föld redukáló tulajdonságú ősi légkörében bőségesen jelen volt a vas, miközben az oxigénszint nagyon kicsi volt.

A FeSOD-ot először 1973-ban fedezték fel élesztőben (*E. coli*) Yost és munkatársai. Azóta kimutatták archeákban, baktériumokban, egysejtű eukariótákban (protisztákban), valamint egyes ősi növényekben, különböző sejt helyeken, például a citoplazmában, a glikoszómákban és a mitokondriumokban.

Ahogy a Föld légkörében az oxigénszint fokozatosan növekedett, a vas reakcióba lépett az oxigénnel, és oldhatatlan vas-oxidokat hozott létre. Ez a folyamat csökkentette a vas oldhatóságát, így a szervezetek számára nehezebben hozzáférhetővé vált. Ennek következtében az élőlények olyan új szuperoxid-dizmutáz enzimeket fejlesztettek ki, amelyek más, elérhetőbb fémionokat, például rézet, cinket és nikkelt alkalmaztak a működésükhöz.

A FeSOD azon képessége, hogy stabilan meg tudja tartani a vasionokat biológiai környezetben, a nagy fémion-affinitásának köszönhető. Ez a három hisztidin imidazol nitrogénjének, valamint az aszparaginsav karboxilát csoport egyidejű koordinációjának az eredménye. Az enzimből a központi fémion nem szabályos oktaéderes geometriát mutat, hanem torzult háromszög alapú bipiramis szerkezetet vesz fel. Ez a geometria lehetővé teszi a dizmutálási reakció során képződő +2-es és +3-as oxidációs állapotú fémion stabilizálását. [5]



2. ábra A vas-szuperoxid-dizmutáz enzim. [5]

2.3 Cu/ZnSOD

A SOD enzimek története 1969-ben kezdődött, amikor McCord és Fridovich közölték úttörő jelentőségű tanulmányukat. Ebben kimutatták, hogy a korábban ismeretlen funkciójú, rezet tartalmazó szarvasmarha eritrokuprein valójában egy szuperoxid-dizmutáz enzim. Nem sokkal később kiderült, hogy az enzim nemcsak rezet, hanem cinket is tartalmaz, ezért a kutatók Cu/ZnSOD-ként emlegették.

A korai kutatások elsősorban a szarvasmarha- és az emberi sejten belüli Cu/ZnSOD-okra összpontosítottak, amelyekről kiderült, hogy rendkívül stabilak. Az első gombából származó Cu/ZnSOD-t Gosciniak és Fridovich izolálta 1972-ben az élesztőből (*S. cerevisiae*). Ennek génjét később, 1988-ban klónozták és szekvenálták.

Az élesztő Cu/ZnSOD vizsgálata kimutatta, hogy az enzim szintén dimer szerkezetű, és sok szempontból hasonlít az emlősök enzimjeihez, ugyanakkor kevésbé stabil, és fémion-megkötő tulajdonságai kissé eltérnek. A SOD1 gén élesztőben való klónozása lehetővé tette olyan mutáns törzsek létrehozását, amelyekből ez a gén hiányzik.

A Cu/ZnSOD enzimet sokáig kizárólag eukariótákra jellemzőnek tartották, egészen addig, amíg 1974-ben sikerült azt kimutatni a *Photobacterium leiognathi* nevű baktériumból. Később kiderült, hogy ez az enzim számos más Gram-negatív baktérium periplazmájában is megtalálható.

Míg az eukarióta sejtekben található Cu/ZnSOD-ok szinte mindig homodimer formában fordulnak elő, addig a baktériumok periplazmatikus Cu/ZnSOD-jai lehetnek monomerek vagy dimerek is. Érdekes módon, bár az egyes alegységek térszerkezete hasonló az eukarióta és prokarióta enzimekben, a dimerizációs felületek jelentősen különböznek a két csoportban.

1993-ban az emberi Cu/ZnSOD gén, amely a 21-es kromoszóma 21q22.11 régiójában található, bizonyos mutációiról kimutatták, hogy kapcsolatban állnak a familiáris amiotrófiás laterálszklerózis (FALS) néven ismert örökletes idegrendszeri betegséggel. Ez a betegség a motoros idegsejtek pusztulásával jár az agytörzsben és a gerincvelőben.

E felfedezés óta a kutatások jelentős része arra irányul, hogy megértsék, miként kapcsolódnak a Cu/ZnSOD gén mutációi a FALS kialakulásához, és milyen mechanizmusok révén járulhatnak hozzá a betegség lefolyásához. [6]

2.4 MnSOD

Nem sokkal azután, hogy 1969-ben a rezet tartalmazó eritrokupreint azonosították, mint SOD-ot, az *E. coli* baktériumban felfedeztek egy mangánt tartalmazó, dimer szerkezetű enzimet, amely ugyanazt a reakciót katalizálta. Ezt az enzimet MnSOD-nak nevezték el.

A prokariótákban a MnSOD a citoplazmában helyezkedik el. Eukarióta sejtekben az enzim elsősorban a mitokondrium mátrixában található, de bizonyos fajokban a citoplazmában is jelen lehet. A növényekben emellett a kloroplasztiszokban is megtalálható.

A MnSOD létfontosságú szerepét az emlősökben az bizonyította, hogy a MnSOD-gén hiányos tesztegérben a magzati fejlődés még lezajlott, azonban a születés után az állatok csak néhány napig maradtak életben. Még a heterozigóta (félleg hiányos génű) egerek is súlyos rendellenességeket és fokozott érzékenységet mutattak az oxigéndús környezetre.

Ez éles ellentétben áll a Cu/ZnSOD esetével, amely hiánya nem életveszélyes a rágcsálók számára. Összességében a MnSOD hiánya sokkal súlyosabb fenotípusokat okoz az eukariótákban, mint a Cu/ZnSOD elvesztése, bár a pontos hatások fajoként eltérhetnek.

Az emberi MnSOD génje a sejtmagban található, a 6-os kromoszóma 6q21 régiójában. A gén által kódolt fehérje az emberi sejtekben homotetramer formában van jelen. A MnSOD a szuperoxid-dizmutáz enzimek között a legösszetettebb működésűnek tekinthető. A MnSOD különbözik a többi SOD-típustól abban, hogy különféle sejtes aktivitást mutat a szuperoxidion kis és nagy koncentrációin, ezt a jelenséget „gating”-nek nevezik.

A gating mértéke fajoként eltérő, vagyis az enzim működésének szabályozása nem egységes az élővilágban. A MnSOD által katalizált szuperoxid-dizmutáció mechanizmusát részletesen feltárták stopped-flow és impulzus radiolízis segítségével. [6]

2.5 A vas(II) és vas(III) koordinációs és bioszervetlen kémiája

A vas(III)-komplexekre jellemző a kis és nagy spinszámú állapot egyaránt. Számos geometria előfordulhat, de a leggyakoribb az oktaéderes szerkezet.

A vas(III) koordinációs kémiájának egy érdekes sajátága, hogy bár számos semleges, kationos és anionos komplexet képez, nagyobb affinitást mutat az O-donorcsoportot tartalmazó ligandumok felé. Ez a sajátága azért is különleges, mivel a króm(III) esetén ez nem érvényes, pedig nagyon sok tekintetben hasonló a két ion.

A vas(III)-komplexei amminokkal instabilak, vízben disszociálnak. Aromás kelátképző ligandumok, például a fenantrolin, képesek a stabilitást növelni, ezen komplexek kis spinszámúak.

A vas(II) a második leggyakoribb oxidációs állapota a vasnak. A legtöbb vas(II)-komplex, hasonlóan a vas(III)-hoz, oktaéderes elrendeződésű.

A vas bioszervetlen kémiája központi szerepet játszik az életfolyamatokban. Az élőlényeknek képesnek kell lenniük arra, hogy felvegyék a vasat a környezetükből, szabályozzák annak tárolását és sejten belüli szállítását, valamint összeállítsák azokat az összetett, vasat tartalmazó redoxi kofaktorokat, amelyek a metalloproteinekben találhatók.

A hemoglobin a vörösvértestek (eritrociták) jellegzetes, oxigén szállításáért felelős fehérjeje, amely egyúttal a vér színéért is felelős kromoprotein. Fő biológiai funkciója a gáztranszport biztosítása a keringési rendszerben: oxigént szállít a tüdő alveolusaiból a perifériás szövetekbe és izmokba, majd ott leadja azt a mioglobinnak. A mioglobin, mint intracelluláris oxigénraktár, lehetővé teszi, hogy az oxigén folyamatosan rendelkezésre álljon a sejtek energiaigényét fedező glükóz-oxidációs (metabolikus) folyamatok számára.

Az anyagcsere során keletkező szén-dioxidot a hemoglobin részben visszaszállítja a tüdőbe, ahol az a kilégzéssel távozik. E kétirányú transzportfolyamat kulcsfontosságú a sejtlégzés és a sav-bázis egyensúly fenntartásában.

A hemoglobinban a vas az oxigénmentes (dezoxi-) formában nagy spinszámú Fe(II) állapotban van jelen. Az oxigén reverzibilis megkötése során a vas továbbra is formálisan Fe(II) marad, azonban elektroneloszlása megváltozik és kis spinszámú Fe(II) konfigurációt vesz fel. Ez a reverzibilis változás teszi lehetővé, hogy a hemoglobin hatékony oxigénhordozóként működjön anélkül, hogy a vas oxidációs állapota lényegesen módosulna.

Kísérletesen kimutatható, hogy a hemoglobin fehérjekomponense (globin) nélkül a hemcsoport elveszíti oxigénkötő képességét. Ha a globint sósavas-acetonos kezeléssel eltávolítjuk, az így nyert izolált hem oxidálódik, és hematinná alakul, amelyben a vas nagy spinszámú Fe(III) állapotban található. Ez jól szemlélteti, hogy a globinfehérje szerkezeti és elektronikus környezete nélkül a hem nem képes a reverzibilis oxigénkötés fenntartására, vagyis a fehérje és a hem csoport között szoros funkcionális kölcsönhatás áll fenn. [7] [8]

2.6 A mangán(II) koordinációs és bioszervetlen kémiája

A mangán(II)-sók szinte minden általános anionnal előállíthatók, és rendszerint vízzoldható hidrátok formájában fordulnak elő. A nem koordinálódó anionokat tartalmazó sók vizes oldataiban a halvány rózsaszín $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ komplexion található, amely egy tipikus, nagy spinszámú, oktaéderes mangán(II)-komplex. Az ilyen komplexek többsége kelátképző ligandumokkal, például EDTA-val vagy oxaláttal nyerhető. A mangán(II) vegyületekben a spinpárosodás számottevő energiát igényel, és csak nagyon erős terű ligandumokkal érhető el. A mangán(II) vegyületek oxidációval és redukcióval szembeni nagyfokú ellenállását általában

a szimmetrikus d^5 elektronkonfiguráció hatásának tulajdonítják. A mangán(II) komplexei egyúttal kinetikailag labilisak.

A mangán nyomelemként számos növényben, baktériumban és az emberi szervezetben is megtalálható. Egy egészséges felnőtt testében körülbelül 10–20 mg található. A mangánt tartalmazó fehérjékben a fém általában +2 oxidációs állapotban fordul elő, és bizonyos esetekben magnézium(II) ionnal helyettesíthető anélkül, hogy az enzimaktivitás csökkenne.

A mangán egyik legfontosabb és legismertebb biológiai funkciója a zöld növények fotoszintézisében betöltött szerepe. A fotorendszer II (PSII) vízbontó komplexében a mangán kulcsfontosságú a víz oxidációs folyamatában, amelynek során oxigén keletkezik. Az elnyelt fény energiáját a rendszer felhasználja arra, hogy a vízmolekulákból elektronokat vonjon el, és ezzel fokozatosan oxidálja a mangánatomokat. A folyamat négy, egymást követő, egy-fotonos és egy-elektronos lépésben zajlik. A felszabaduló elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc a NADP^+ redukálására használja fel, amely így NADPH formájában raktározza az energiát. [7]

2.7 A réz(II) koordinációs és bioszervetlen kémiája

A réz(II) vegyületek rendkívül kiterjedt kémiával rendelkeznek. Az egyszerű sók szinte valamennyi ismert anionnal előállíthatók, kivéve a cianid- és jodidionokat, amelyek inkább a kovalens kötésű és vízben rosszul oldódó réz(I) vegyületek képzésére hajlamosak. A réz(II)ion komplexvegyületeiben a leggyakoribb koordinációs szám a 4, 5 és 6, de szabályos geometriák csak ritkán fordulnak elő és a síknégyszetes és tetragonálisan torzult oktaéderes szerkezetek között gyakran nem könnyű különbséget tenni. A megnyúlt oktaéderes szerkezet következménye, hogy a réz(II)ionok monodentát típusú ligandumokkal képződő komplexei esetén az 5. és 6. lépcsőzetes stabilitási állandók értéke kivétel nélkül sokkal kisebb, mint az első négy. A réz(II)ionok az *O*-donoratomot tartalmazó ligandumokkal is stabilis komplexeket képeznek. A hexaakvaion mellett a síknégyszetes β -diketonátok is jól ismert vegyületek, a tartarátokomplexeket pedig a Fehling-reakciónál használják. A vegyes *O,N*-donoratomokat tartalmazó ligandumok, mint a Schiff-bázisok abból a szempontból is érdekesek, hogy nemcsak síknégyszetes koordinációra képesek, hanem szilárd állapotban dimerizáció eredményeként négyszetes piramisos elrendeződés is megvalósulhat.

A réz a növény- és állatvilágban egyaránt széles körben előforduló, biológiailag esszenciális átmenetifém. Redoxireakcióiban betöltött szerepe miatt számos oxidációs és elektrontranszport-folyamatban vesz részt, amelyek alapvetőek a sejtek energiatermelésében és anyagcseréjében.

Az emberi szervezetben átlagosan mintegy 100 mg réz található, túlnyomórészt fehérjékhez kötött formában. A napi szükséges rézbevitel megközelítőleg 3–5 mg, amely elsősorban a táplálékkal – például hüvelyesekkel, diófélékkel, májjal és teljes kiőrlésű gabonákkal – biztosítható. A biológiai rendszerekben a réz a harmadik leggyakrabban előforduló átmenetifém, a vas és a cink után.

A réz számos enzim aktív centrumában található meg, ahol váltakozó oxidációs állapotai (Cu^+ és Cu^{2+}) teszik lehetővé a redoxi-folyamatok katalízisét. Ennek köszönhetően a réz nélkülözhetetlen az oxidatív foszforilációban, a sejtlégzésben, a kötőszövet-képződésben, valamint a központi idegrendszer működésében.

A réz homeosztázisának felborulása különböző kóros állapotokat idézhet elő. Hiánya vérszegénységhez, a csontképződés zavaraihoz és idegrendszeri tünetekhez vezethet, míg a réz kiürítésének veleszületett zavara, a Wilson-kór, a fém kóros felhalmozódásával jár, amely elsősorban a májat és az idegrendszert károsítja.

Tehát a réz létfontosságú nyomelem, amely kulcsszerepet tölt be a sejtek redoxifolyamataiban, az enzimatis katalízisben és az oxidatív stressz elleni védelemben, miközben szigorú biológiai szabályozás alatt áll, hogy megőrizze a szervezet egyensúlyát. [7]

3. Kísérleti körülmények, kísérleti eszközök

3.1 Felhasznált anyagok, vegyszerek

A felhasznált vegyszerek kereskedelmi forgalomból származtak, továbbá felhasználásuk közvetlenül, tisztítás nélkül történt. A PhenHis ligandumot kutatócsoportunk korábban előállította, szerkezetét ^1H és ^{13}C NMR, valamint tömegspektroszkópia segítségével igazolták. A ligandum tisztaságát pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A titrálások kivitelezésére $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$ pontosan ismert koncentrációjú NaOH-oldatot használtunk. A ligandumok és a Cu(II)-, Mn(II)-, Fe(II)-, és Fe(III)-ionok közötti komplexképződés folyamatainak vizsgálatára pontosan ismert koncentrációjú CuCl_2 , MnCl_2 , FeCl_2 és FeCl_3 oldatokat használtunk. A SOD aktivitás méréseket NBT, xantin-oxidáz enzim és xantin felhasználásával végeztük.

3.2 pH-potenciometria

A ligandumok protonálódási állandóinak ($\log K_a$), valamint a réz(II)-, vas(II)-, vas(III)- és mangán(II)-komplexek stabilitási állandóinak ($\log \beta_{\text{pqr}}$) meghatározását pH-potenciometriás méréssel végeztük. A módszer alapelve, hogy a komplexképződés során a ligandum protonálódási egyensúlyai a fémion jelenlétében módosulnak, ami a rendszer pH-jának mérhető változását eredményezi.

A mérésekhez az oldatok ionerősségét 0,20 M-ra (KCl) állítottuk be, a kísérleteket pedig 25,0 °C hőmérsékleten végeztük. A mintákat a teljes titrálási folyamat során mágneses keverővel homogenizáltuk. Az oldott oxigén és szén-dioxid zavaró hatásának kiküszöbölése érdekében a mérések ideje alatt argongázt buborékolattunk át az oldatokon.

A pH-értékeket egy számítógép által vezérelt Metrohm 785 DMP Titrino automata titrátor segítségével rögzítettük. A nyers pH-adatokat az Irving és munkatársai által leírt eljárás alapján hidrogénion-koncentrációkká alakítottuk. A komplexek stabilitási állandóinak kiszámításához közvetlen pH-potenciometrikus titrálást alkalmaztunk, különböző fémion–ligandum arányok (1:3, 1:2 és 1:1) mellett. A stabilitási állandók meghatározása a PSEQUAD programmal történt. [9] [10]

3.3 UV-látható spektroszkópia

A spektrofotometriás módszer alapja, hogy bizonyos átmenetifém ionok és komplexeik elnyelik a fényt, amelynek során d-d átmenetek és a töltésátviteli folyamatok valósulnak meg. Töltésátviteli folyamat, amikor a ligandumról fémionra (LMCT), vagy fordított irányban, fémionról ligandumra (MLCT) töltés áthelyeződés történik.

Egy Agilent Technologies Carry 60 spektrofotométert használtunk a réz(II)-, vas(II)-, vas(III)- és mangán(II)-komplexek UV-látható spektrumának felvételére a 250-800 nm-es hullámhossz-tartományban 25,0 °C-on. A minták koncentrációi megegyeztek a pH-potenciometrikus titrálásoknál alkalmazott koncentrációkkal.

3.4 SOD aktivitás vizsgálat

A fémkomplexek SOD aktivitását a xantin/xantin-oxidáz/NBT-teszt segítségével határoztuk meg. A módszer alapja, hogy a xantin és a xantin-oxidáz reakciója során az oldott oxigénből szuperoxid-anion keletkezik. A képződő szuperoxid-anion redukálja a nitroblue-tetrazónium-klorid (NBT) indikátor molekulát, melynek eredményeként diformazán képződik. A folyamat abszorbanciaváltozása spektrofotometriásan, 560 nm hullámhosszon követhető.

A kísérlet első szakaszában a reakcióelegy nem tartalmazta sem a ligandumot, sem a komplexeket, így az NBT redukciója zavartalanul ment végbe. A reakció negyedik percében a vizsgálati mintához hozzáadtuk a komplexet, amely ezután kompetícióba lépett az NBT-vel a szuperoxid-anion megkötéséért. Ennek hatására a korábban lineáris kinetikai görbén törés figyelhető meg, ami a reakció sebességének csökkenését jelzi.

A komplex hozzáadása előtti és utáni szakaszban mért egyenesek meredekségéből, adott koncentráció mellett, kiszámítható az inhibíció mértéke. A mérést több különböző komplexkoncentráció mellett megismételtük, majd az inhibíciós százalékot a komplex koncentrációjának függvényében ábrázoltuk. Az így kapott görbéből meghatározható az IC_{50} érték, vagyis az a koncentráció, amely 50%-os inhibíciót eredményez, és amely a vizsgált komplex szuperoxid-dizmutáz mimetikus aktivitásának jellemző mutatója.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 A PhenHis ligandum savbázis tulajdonságai

Az általunk vizsgált PhenHis ligandum négy deprotonálódásra képes csoportot tartalmaz. Ezen csoportok közül pH potenciometria segítségével csak három savi disszociációs állandót tudtunk meghatározni, amely arra enged következtetni, hogy egy deprotonálódási folyamat a pH-potenciometriásan mérhető pH-tartományon kívül esik.

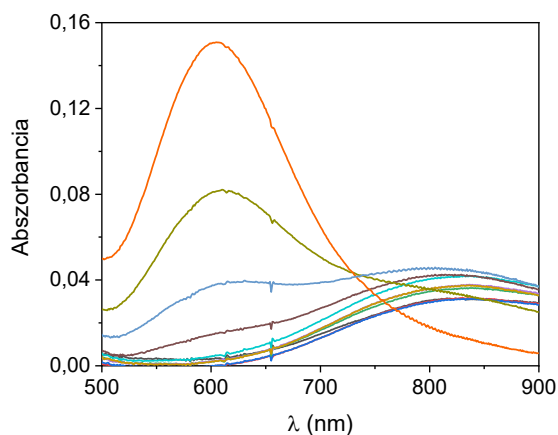
A legnagyobb savi disszociációs állandó $\log K_a = 7,01 \pm 0,01$ -nek adódott, ami az imidazol nitrogén deprotonálódásához rendelhető érték. A két kisebb savi disszociációs állandó ($\log K_a = 4,33 \pm 0,02$ és $\log K_a = 2,30 \pm 0,02$) a fenantrolin alapváz két aromás nitrogénjének a deprotonálódásához, valamint a karboxilcsoport deprotonálódásához rendelhető értékek lehetnek. Ugyanakkor ennek eldöntése csak a pH-potenciometriás titrálás alapján nem lehetséges, ehhez további vizsgálatok szükségesek, például ^1H NMR spektroszkópia.

4.2 A PhenHis ligandum komplexképződési tulajdonságai

A ligandum komplexképződési sajátosságait Cu(II)-, Mn(II)-, Fe(II)- és Fe(III)-ionokkal vizsgáltuk pH-potenciometria segítségével. A Fe(III):PhenHis 1:2 és 1:3 arányú rendszerek esetében nem tapasztaltunk komplexképződési folyamatokat, ugyanis a titrálási görbék illesztése a vas(III)-hidroxokomplexek figyelembevételével leírható volt. Ebből arra következtettünk, hogy a PhenHis ligandum nem képez komplexet a Fe(III)-ionokkal. A másik három ionnal meghatározott stabilitási állandókat az 1. táblázat foglalja magába.

1. táblázat: A PhenHis ligandum Cu(II)-, Mn(II)- és Fe(II)-ionokkal képzett komplexeinek stabilitási állandói ($\log \beta_{\text{pqr}}$). Az L a PhenHis ligandumot jelöli, az M pedig az adott fémiont. Az egyes komplexek töltésének jelölésétől eltekintünk. ($I = 0,2\text{M KCl}$, $T = 25^\circ\text{C}$)

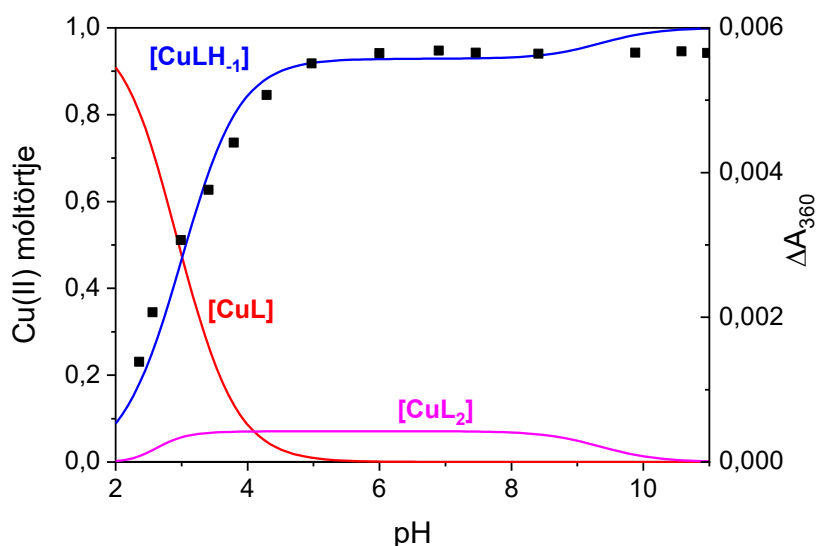
	Cu(II)	Mn(II)	Fe(II)
ML	$17,1 \pm 0,3$	$3,01 \pm 0,06$	-
MH ₁ L	$14,1 \pm 0,3$	$-5,46 \pm 0,05$	-
MHL ₂	-	-	$14,3 \pm 0,2$
ML ₂	$26,3 \pm 0,3$	-	$7,6 \pm 0,2$
MH ₁ L	-	-	$1,4 \pm 0,1$



3. ábra A Cu(II)/PhenHis 1:1 arányú rendszer pH-függő UV-látható spektrumai. Egyedi minták, H^+ -ion koncentrációból számított pH-kon 0 és 3,87 között.

$$c_{Cu(II)} = 1,43 \text{ mM}, c_{PhenHis} = 1,49 \text{ mM}$$

A Cu^{2+} -ionok esetében a pH potenciometriás titrálást kiegészítettük savas pH-tartományban egyedi mintás UV-látható spektroszkópiás vizsgálatokkal (3. ábra). Ennek oka, hogy a Cu^{2+} -ionok a pH potenciometriás titrálás kezdetekor már 100%-ban komplex formában voltak jelen, ami a stabilitási állandók meghatározását nem tette lehetővé. Ugyanakkor erősen savas oldatban a komplexképződés visszaszorítható, ami lehetőséget ad a savas pH-tartományban képződő komplex stabilitási állandójának a meghatározására. Ezt rögzítve a pH potenciometriás titrálási görbék illeszthetők.



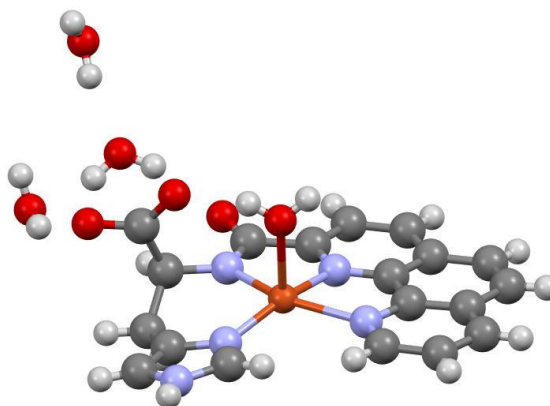
4. ábra A Cu(II)/PhenHis 1:1 arányú rendszer koncentráció eloszlás diagramja a pH függvényében és a 360 nm-en vett CD spektroszkópiás ΔA értékek a pH függvényében.

$$c_{Cu(II)} = 1,0 \text{ mM}, c_{PhenHis} = 1,1 \text{ mM}$$

Az így kapott stabilitási állandók ismeretében meghatároztuk a Cu(II)/PhenHis 1:1 arányú rendszerének pH-függő koncentráció eloszlási diagramját, amely a 4. ábrán látható.

Ezek alapján látható, hogy pH 2 alatt a [CuL] komplex az uralkodó részecske, amelyben a fémiont fenantrolin váz két aromás nitrogén atomja, az imidazol nitrogén és a karboxilát csoport koordinálja. A pH növelésével az amid nitrogén fémion indukált deprotonálódásának és koordinációjának eredményeképpen a [CuLH₁] összetételű komplex képződik, amely azután széles pH tartományban uralkodó részecske. A komplex képződése során feltételezhető, hogy a karboxilát csoport kiszorul a fémion koordinációs szférájából vagy axiális pozícióba kerül és a fémion ekvatoriális pozíciójában egy (4N) donoratombból álló (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki. Ez a fajta kötés mód megakadályozza a fémion hidrolízisét és vegyes hidroxokomplexek kialakulását. Az amid nitrogén deprotonálódását és koordinációját az UV-látható spektrumok és CD is alátámasztották.

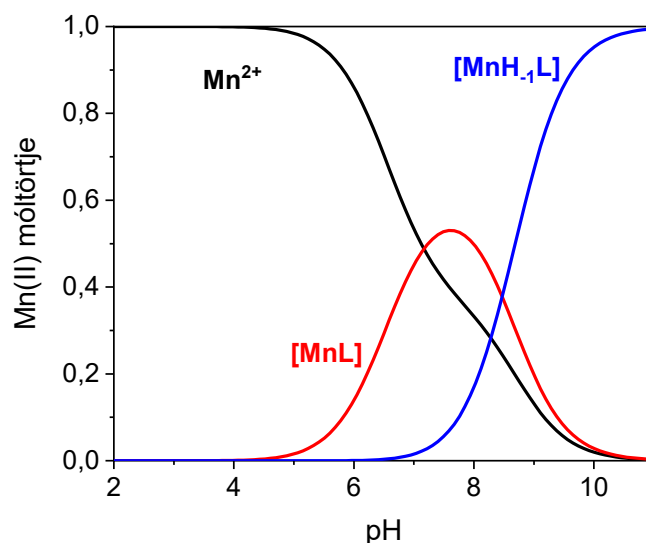
Egy együttműködés keretein belül lehetőségünk volt a [CuLH] összetételű komplexből egy kristály röntgendiffrakcióra alkalmas kristályokat nyerni és a komplex szerkezetét meghatározni szilárd fázisban. Ezt a szerkezetet az 5. ábra mutatja be.



5. ábra A Cu(II)/PhenHis rendszerben képződő komplex egykristály röntgendiffrakció alapján kapott ORTEP diagramja, 50%-os valószínűséggel ábrázolva.

Ezek alapján jól látható, hogy a központi fémion négyzetes piramisos elrendeződésű, amelyben a négy nitrogén egy síkban található és egy további vízmolekula axiális pozícióban kapcsolódik a Cu(II)ionhoz. A szerkezet további érdekessége, hogy a nem koordinálódó karboxilát csoport két víz molekulával hidrogénkötéssel rendszert alakít ki.

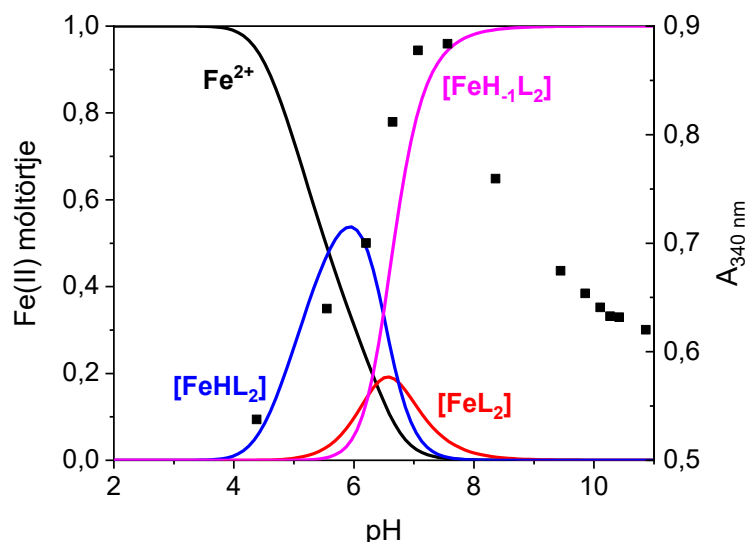
A Mn(II)/PhenHis 1:3 összetételű rendszer koncentráció eloszlását a pH függvényben a 6. ábra mutatja be.



6. ábra A Mn(II)/PhenHis 1:3 arányú rendszerének koncentráció eloszlása a pH függvényében. $c_{\text{Mn(II)}} = 0,70 \text{ mM}$, $c_{\text{PhenHis}} = 2,10 \text{ mM}$

Ez alapján jól látható, hogy a Mn(II)ionok kisebb affinitást mutatnak a ligandum irányába, mint a Cu(II)ionok. A komplexképződés pH 5 felett indul el, a [MnL] összetételű komplex kialakulásával. Ez a komplex kis stabilitású, amelynek eredményeképpen megindul a komplex hidrolízise vegyes [MnL(OH)] összetételű komplexet eredményezve, amelyet a fémion hidrolízise és a Mn(OH)_2 csapadék leválása követ.

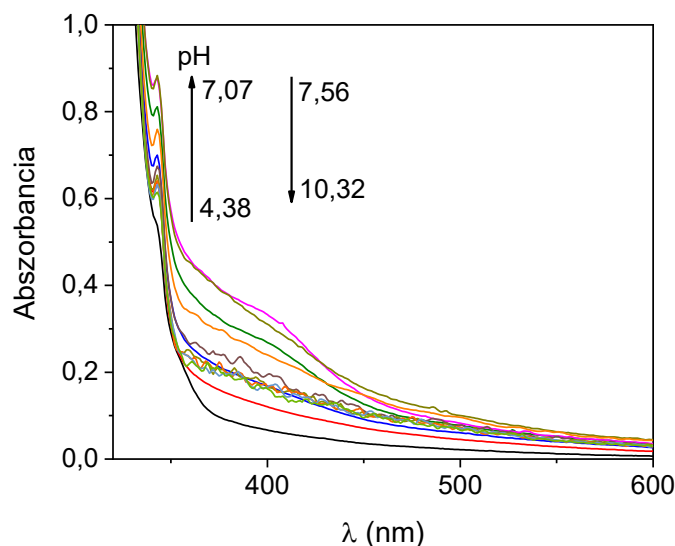
A Fe(II)/PhenHis rendszer komplexeinek koncentráció eloszlását 1:3 fémion : ligandum arányú rendszerben a 7. ábra mutatja be. A pH-potenciometriás titrálási görbék illesztése csak a biszkomplexek képződésének a figyelembevételével volt lehetséges. Bár a Fe(II)-ionok nagy stabilitású triszkomplexeket képeznek a fenantrolinnal, a PhenHis ligandumban jelenlévő hisztidin imidazol nitrogén koordinációja gátolja a triszkomplexek képződését, hiszen a biszkomplexben kialakuló $2 \times (3N)$ kötésmód telíti a központi fémion koordinációs szféráját.



7. ábra A Fe(II)/PhenHis 1:3 arányú rendszerének koncentráció eloszlás diagramja a pH függvényében és a 340 nm-en vett UV-látható abszorbancia értékek a pH függvényében. $c_{\text{Fe(II)}} = 0,70 \text{ mM}$, $c_{\text{PhenHis}} = 2,10 \text{ mM}$

A 7. ábra alapján a komplexképződés pH 4,5 felett indul az $[\text{FeHL}_2]$ összetételű komplex kialakulásával. Ezt az UV-látható spektroszkópia is igazolja. A 340 nm-nél megjelenő abszorpciós maximum a fenantrolin nitrogén koordinációjához rendelhető. A pH növelésével a $[\text{FeL}_2]$ összetételű komplex képződik, amely kis mennyiségben megtalálható részecske és képződése átfed a $[\text{FeH}_{-1}\text{L}_2]$ összetételű komplex képződésével. A Fe(II)/PhenHis 1:3 arányú rendszerének pH-függő UV-látható spektrumai a 8. ábrán szerepelnek.

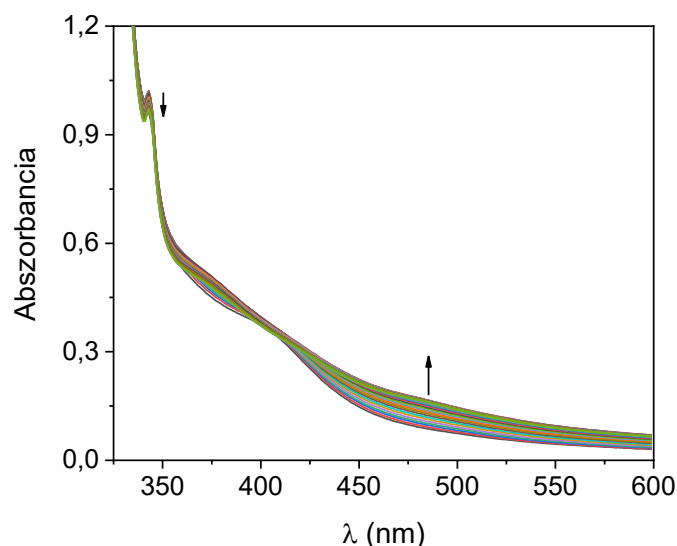
Az ezt a folyamatot jellemző lépcsőzetes egyensúlyi állandó értéke 6,24, amely nem zárja ki az amid nitrogén fémionindukált deprotonálódását és koordinációját, illetve a fémion hidrolízisét és vegyes hidroxokomplexek kialakulását.



8. ábra A Fe(II)/PhenHis 1:3 arányú rendszerének pH-függő UV-látható spektrumai.

$c_{\text{Fe(II)}} = 0,17 \text{ mM}$, $c_{\text{PhenHis}} = 0,50 \text{ mM}$

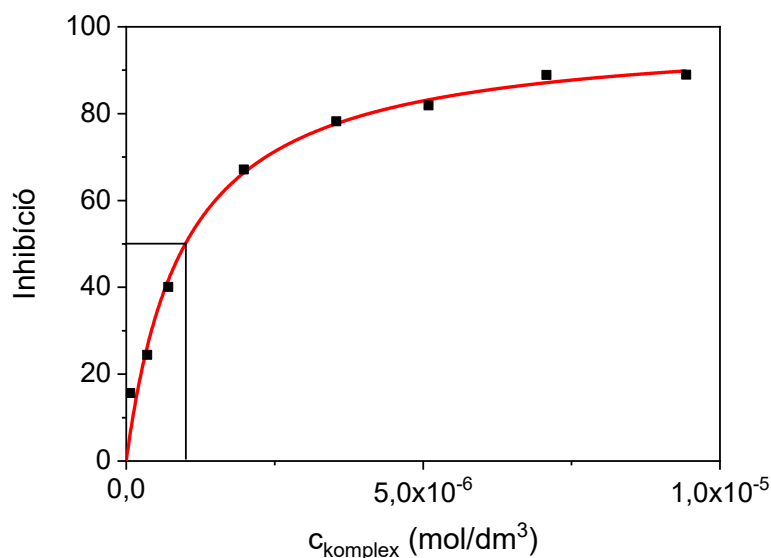
A dolgozat következő alfejezetében a Cu(II)- és Fe(II)-komplexelek SOD aktivitás vizsgálatát tárgyalom. Ehhez vizsgáltuk a Fe(II)-komplex stabilitását fiziológiás pH-n HEPES pufferben. A Fe(II):PhenHis 1:3 arányú elegyét HEPES pufferben kevertük össze és egy órán keresztül követtük a változásokat UV-látható spektrofotométerrel. Az így kapott spektrumok a 9. ábrán találhatóak. Látható, hogy a vizsgálat időtartama alatt minimális változás észlelhető spektrumokban, így a SOD aktivitás mérés során a komplex oldatát stabilnak tekintettük.



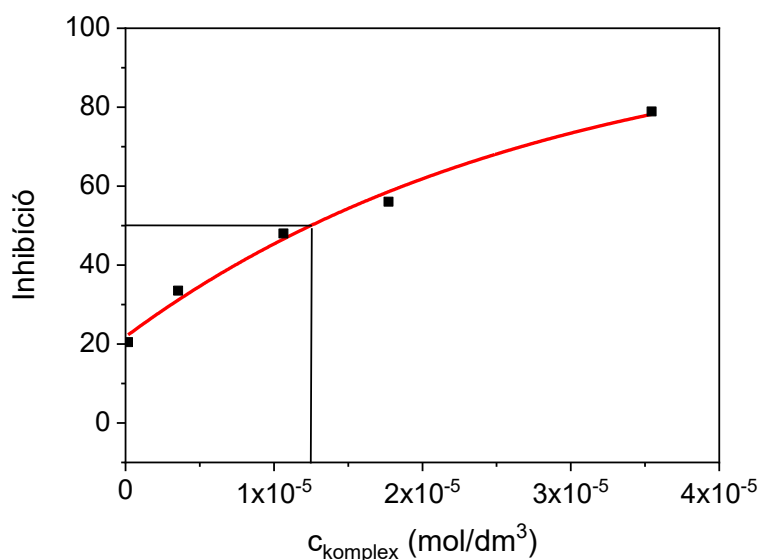
9. ábra A Fe(II)/PhenHis 1:3 arányú rendszerének stabilitásvizsgálata fiziológiás pH-n UV-látható spektrofotométer segítségével. ($I = 0,2 \text{ M KCl}$, $T = 25^\circ\text{C}$, $c_{\text{Fe(II)}} = 0,17 \text{ mM}$, $c_{\text{PhenHis}} = 0,50 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7,43$)

4.3 SOD aktivitás vizsgálat

A PhenHis ligandum Cu(II)- és Fe(II)-komplexének SOD aktivitás vizsgálata a Kísérleti körülmények fejezetben leírtak szerint történt. A kapott inhibíció görbék a 10. és 11. ábrán, míg a meghatározott IC_{50} értékek és a belőlük származtatható katalízisre jellemző sebességi állandó értékek a 2. táblázatban találhatóak.



10. ábra A Cu(II)/PhenHis 1:1 arányú rendszerének inhibíció görbéje a komplex koncentrációjának függvényében. A pontok a mért, a folytonos vonalak az illesztett inhibíció görbéket mutatják be.



11. ábra A Fe(II)/PhenHis 1:3 arányú rendszerének inhibíció görbéje a komplex koncentrációjának függvényében. A pontok a mért, a folytonos vonalak az illesztett inhibíció görbéket mutatják be.

2. táblázat: A Cu(II)/PhenHis 1:1 és a Fe(II)/PhenHis 1:3 arányú rendszerének IC_{50} értékei és a katalízisre jellemző sebességi állandó értékek, illetve néhány összehasonlító irodalmi példa.

	IC_{50} érték (μM)	k_{McCF} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ^a
Cu(II)/PhenHis	$1,0 \pm 0,1$	$2,9 * 10^6$
Fe(II)/PhenHis	12 ± 8	$2,45 * 10^5$
Cu(II)/PyHis ^b	147	$1,82 * 10^4$
Cu(II)/ChroHis ^c	0,10	$2,7 * 10^7$

^a $k_{\text{McCF}} = k_{\text{NBT}} \times [\text{NBT}] / IC_{50}$, ^b Az adatok a [11] hivatkozásból származnak. ^c Az adatok a [12] hivatkozásból származnak.

A PhenHis ligandum Cu(II)- és Fe(II)-komplexei eltérő SOD aktivitással rendelkeznek, a Cu(II)/PhenHis egy nagyságrenddel kisebb IC_{50} értékkel rendelkezik, vagyis nagyobb mértékben képes katalizálni a szuperoxid gyökanion bomlását. Kutatócsoportunkban korábban számos kis molekulatömegű vegyületet állítottak elő és vizsgálták a Cu(II)-komplexeik SOD aktivitását. Ezek közül a hisztidinnel funkcionáliszt heterociklusos vegyületek kiemelkedő SOD aktivitással rendelkeznek. A Cu(II)/PyHis komplexhez képest a Cu(II)/PhenHis két nagyságrenddel jobb, míg a Cu(II)/ChroHis komplexhez képest egy nagyságrenddel kisebb IC_{50} értékkel rendelkezik. Ezzel együtt is elmondható, hogy a PhenHis ligandum mindkét fémionnal jó SOD aktivitással rendelkező komplexet képez.

5. Összefoglalás

A munkám célja egy új, fenantrolin alapvázhoz konjugált hisztidint tartalmazó molekula sav-bázis tulajdonságainak, valamint réz(II)-, mangán(II)-, vas(II)- és vas(III)-komplexeinek oldategyensúlyi és spektroszkópiai vizsgálata volt. Ezen túlmenően vizsgáltam az egyes komplexek szuperoxid gyökánionnal való reakcióját abból a célból, hogy a fiziológias pH-n kialakuló komplexek antioxidáns hatásáról bővebb információt nyerjek.

Első lépésben a ligandumok protonálódási állandóinak, valamint a réz(II)-, vas(II)-, vas(III)- és mangán(II)-komplexek stabilitási állandóinak meghatározását végeztük el pH potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás módszerek segítségével. Így a PhenHis ligandum négy deprotonálódásra képes csoportjából, három savi disszociációs állandót tudtunk meghatározni. A ligandum eltérő stabilitású komplexeket képez a felsorolt fémionokkal. A PhenHis ligandum Cu(II)ionokkal képződő komplexe kiemelkedő stabilitású, pH 2-n már 100%-os a komplexképződés. Ezzel szemben a Fe(II)- és a Mn(II)-ionokkal 4-es pH felett indul a komplexképződés és lúgos pH tartományban hidroxokomplexek alakulnak ki. Eredményeink alapján a PhenHis ligandum nem képes a Fe(III)ionok megkötésére.

A réz(II)- és vas(II)-komplexek SOD aktivitását a xantin/xantin-oxidáz/NBT modellrendszer segítségével vizsgáltuk. A Cu(II)-komplex egy nagyságrenddel kisebb IC_{50} értékkel rendelkezik, azonban a PhenHis ligandum mindkét fémionnal kialakuló komplexe hatékonynak bizonyult a szuperoxid gyökánion bontásában.

6. Summary

The aim of my work was to investigate the acid–base properties of a phenanthroline-based ligand containing histidine moiety, as well as the solution equilibria and spectroscopic features of its copper(II), manganese(II), iron(II), and iron(III) complexes were studied. In addition, I studied the reactions of the complexes with the superoxide radical anion in order to obtain more information on the antioxidant effect of the complexes formed at physiological pH.

In the first step, we determined the protonation constants of the ligands and the stability constants of its copper(II), iron(II), iron(III), and manganese(II) complexes using pH-potentiometric and UV–visible spectrophotometric methods. On the basis of the structure of the ligand, PhenHis contains four groups involved in acid-base equilibria, however, we were able to determine three acid dissociation constants. The complex formation processes of PhenHis with the metal ions differ significantly. Copper(II) complexes of PhenHis show outstanding thermodynamic stability, majority of copper(II) is in form of complex below pH 2. In contrast, complex formation with Fe(II) and Mn(II) ions starts above pH 4, and hydroxocomplexes are formed in alkaline solution. Based on our results, the PhenHis ligand is not able to bind Fe(III) ions.

The SOD activity of the copper(II) and iron(II) complexes was investigated using the xanthine/xanthine oxidase/NBT model system. The Cu(II) complex exhibits an IC_{50} value an order of magnitude lower, but the PhenHis ligand forms complexes with both metal ions that proved effective in the decomposition of the superoxide anion radical.

7. Irodalomjegyzék

[1] N. Péter, „Oxidatív stressz és redoxijelátvitel”, MTA Doktori értekezés, 2015 https://real-d.mtak.hu/859/13/NagyPeter_doktori_mu.pdf

Megtekintve: 2025.10.19.

[2] Reactive oxygen species (ROS): utilizing injectable antioxidative hydrogels and ROS-producing therapies to manage the double-edged sword, 32. szám, 2021 <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/tb/d1tb00728a>

Megtekintve: 2025.10.19.

[3] Anwar, S.; Sarwar, T.; Ali Khan, A.; Husain Rahmani, A. Therapeutic Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase (SOD) in Different Pathogenesis. *Biomolecules* 2025, 15(8) <https://www.mdpi.com/2218-273X/15/8/1130>

Megtekintve: 2025.10.25.

[4] Zheng, M.; Liu, Y.; Zhang, G.; Yang, Z.; Xu, W.; Chen, Q. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants* 2023, 12(9), 1675. <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/9/1675>

Megtekintve: 2025.10.26.

[5] Innis, E.; Haas, K.; Sendzik, M.; Feigl, D. Iron Superoxide Dismutase (FeSOD), 2018 [https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3ABio-inorganic_Chemistry/Readings/Metals_in_Biological_Systems_\(Saint_Mary's_College\)/Iron_Superoxide_Dismutase_\(FeSOD\)](https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3ABio-inorganic_Chemistry/Readings/Metals_in_Biological_Systems_(Saint_Mary's_College)/Iron_Superoxide_Dismutase_(FeSOD))

Megtekintve: 2025.10.27

[6] Y. Sheng és mtsai., „Superoxide dismutases and superoxide reductases”, *Chem. Rev.*, 114. kötet, 2014 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr4005296>

Megtekintve: 2025.11.03

[7] N. N. Greenwood; A. Earnshaw; Az elemek kémiája III. 1448-1641, Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 2004

[8] Groves J. T. The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies. 2003 <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC152962/>

Megtekintve: 2025.10.28

[9] The determination of dissociation constants of dibasic acids” — H. Irving, H. S. Rossotti, G. Harris, *Analyst*, 947. szám, 1955

Megtekintve: 2025.11.20

[10] Zekany, L., Nagypal, I. PSEQUAD. In: Leggett, D.J. (eds) Computational Methods for the Determination of Formation Constants. Modern Inorganic Chemistry. 291-353 Springer, Boston, MA. 1985 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-4934-1_8

Megtekintve: 2025.11.20

[11] R. Diószegi és mtsai., „Highly active superoxide dismutase mimic: pyridine carboxamide-based copper(II) complexes”, Inorg. Chem. Front., 2025

[12] D. Vargáné Szalóki és mtsai., „Chromone-Based Antioxidant Copper(II) Complex with High Superoxide Dismutase Activity”, Inorg. Chem., 2025

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik segítségükkel, támogatásukkal és bátorításukkal hozzájárultak a szakdolgozatom elkészítéséhez.

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Lihi Norbertnek, hogy szakmai útmutatásával, hasznos tanácsaival és türelmével végigkísérte a munkámat. Értékes meglátásai és iránymutatása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Külön köszönettel tartozom Bonczidai-Kelemen Dórának aki mindig ott volt, hogy felvilágosítson, ha valami kérdésem volt vagy kételyem támadt.

Hálás vagyok a családomnak, barátaimnak és barátnőmnek a kitartó biztatásért és támogatásért, amelyet tanulmányaim során és különösen a szakdolgozat írása alatt nyújtottak.

Végül köszönöm mindazoknak, akik bármilyen formában hozzájárultak ahhoz, hogy ezt a munkát befejezhessem.