

ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

КАСЬЯН Галина Борисівна

ВЗАЄМОДІЯ АЦИДОАМІНОВИХ КОМПЛЕКСІВ ПЛАТИНИ(II) ТА ПАЛАДІЮ(II)
З БІЛКАМИ КРОВІ ТА ЗМІНА КООРДИНОВАНИХ ПРОТЕІНІВ НА
ЦИСТИН АБО ЦИСТЕІН

02.00.01 - неорганічна хімія

03.00.04 - біохімія

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата хімічних наук

Дніпропетровськ - 1996



00739492 (Y)

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі неорганічної хімії дніпропетровського державного університету.

Наукові керівники:

кандидат хімічних наук, доцент
Зегжда Георгій Дмитрович,
кандидат біологічних наук, с.н.с.
Жмарьова Олена Миколаївна

Офіційні опоненти:

доктор хімічних наук, професор
Плахотнік Володимир Миколайович,
кандидат біологічних наук
Черненко Галина Петрівна

Провідна організація: Інститут фізичної хімії ім. Л.В.
Писаржевського.

Захист відбудеться 13 червня 1996 р. в 11 годин на засіданні спеціалізованої вченої ради К 03.05.04 у Українському державному хіміко-технологічному університеті за адресою: 320640 Дніпропетровськ, пр. Гагаріна 8.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці хіміко-технологічного університету.

Автореферат розісланий 7 травня 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради
к.х.н., доцент

Молчанова
Н.Р. Молчанова.



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність роботи. Поміж багатьох об'єктів та завдань, що об'єднуються загальним поняттям "хімія координаційних сполук", увага дослідників звертається до реакцій катіонів металів з різними біомолекулами, кількість яких дедалі збільшується. Збільшення кількості металів, які входять у взаємодію з різними біосистемами, відбувається внаслідок техногенного забруднення навколишнього середовища та за рахунок використання нових хіміотерапевтичних засобів. В їх числі останнім часом постійно використовуються різні комплекси платинових металів, які виявляють протипухлеву, противірусну та радіопротекторну активність.

Слід зауважити, що перетворення біологічно активних комплексів платини, як наприклад, діацидодіамінового ряду, у присутності протеїнів залишаються майже невивченими. Одночасно поза сумнівом є те, що згадані терапевтичні ефекти, а також токсичність та алергенність комплексів платини переважно визначається мірою їхнього зв'язування з білками та наступним перетворенням у сполуки з природними тілами - цистеїном та цистином. Опис реакцій комплексних сполук платинових металів з білками є необхідним також для повної уяви про їх перетворення у біологічному середовищі. Тому вельми актуальним є дослідження ацидоамінових комплексів Pt(II) і Pd(II) з протеїнами та тілами.

Мета роботи полягала в вивченні кількісних характеристик зв'язування ряду біологічно активних комплексів платини(II) та паладію(II) з деякими типовими білками (альбуміном, гемоглобіном та імуноглобуліном), дослідженні будови та властивостей утворених метал-білкових комплексів та наступного перероблення їх у присутності цистеїна або цистина. Було передбачено також використання отриманих даних для збагачення уявлень про окремі біологічні процеси, що відбуваються за участю згаданих комплексів.

Наукова новизна роботи. Отримано кількісні характеристики взаємодії біологічно активних комплексів Pt(II) і Pd(II) з найвагомішими білками крові. Визначено константи зв'язування ціс-діацидодіамінових комплексів платини з сировоточним альбуміном. Досліджено вплив приєднання металокомплексів або їхніх фрагментів на структуру та властивості альбуміну. Вказується, що збільшення ступеня зв'язування металокомплексів з білками тягне за собою втрату токсичності. Одержано та досліджено раніш невідомі комплекси Pt(II) з цистином за допомогою хімічних і фізико-хімічних методів. Уперше запропоновано експе-

риментальний кількісний підхід до досліджень заміщення білків у платинових комплексах на цистеїн або цистин. Одержані дані щодо взаємодії хлороплатиніту калію з найвагомим компонентом імунної системи - імуноглобуліном G, завдяки чому підтверджена участь сполук платини у механізмі імунних реакцій.

Практична цінність роботи. Одержані експериментальні дані щодо перетворення платина-білкових комплексів у платина-цистеїнові та (чи) цистинові можуть бути використані для розробки нових методів профілактики платинових алергозів.

На вахист виносяться: 1) положення про взаємозв'язок між токсичністю комплексів Pt(II) і Pd(II) тетрахло- і цис-дихлородіамінового ряду та ступенем зв'язування даних сполук з білками; 2) механізм видалення платини із комплексів з білками; 3) положення про участь у координації з атомом платини в уперше виділених комплексах Pt(II) з цистином груп $-NH_2$, $-COOH$ та атому сірки.

Апробація роботи та публікації. Результати роботи доповідалися на таких конференціях: Республіканська конференція "Застосування імуноферментного аналізу в медицині" (Харків, 1989 р.), Загально-Радянська конференція молодих науковців "Нагальні проблеми біотехнології" (Москва, 1989 р.), 1-й Загально-Радянський імунологічний з'їзд (Сочи, 1989 р.), 35-й конгрес IUPAC (Стамбул, 1995 р.). Основний зміст роботи вміщений у опублікованих 2 статтях і 4 тезах доповідей.

Структура роботи. Робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу, який охоплює опис методів, трьох розділів обговорення результатів, висновків та переліку використаної літератури.

Перший розділ обговорення присвячено дослідженню утворення макромолекулярних платино- і паладійових білкових комплексів, вивченню їх властивостей та будови. У другому розділі описуються методи синтезу комплексів Pt(II) з цистином, вивченню їхньої будови та властивостей, а також кінетичні параметри реакцій альбумінового комплексу платини з цистеїном та цистином. Третій розділ обговорення присвячено вивченню взаємодії імуноглобуліну G та його фрагментів з антиімуноглобуліном G (модулювання реакції антиген-антитіло) у присутності хлороплатиніту калію.

Роботу викладено на 113 сторінках, вона вміщує 14 таблиць, 18 малюнків. У списку літератури 122 джерела.

Експериментальні дані одержані особисто пошукувачем. Дослідження будови цистинвмісних комплексів платини(II) виконано з участю к.х.н. Вініченко І.Г. Результати роботи обговорені з науковими керівниками:

К.Х.Н. Зегждю Г.Д. та к.б.н. Жмарьовскоу О.М.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ.

1. Взаємодія біологічно активних комплексів платини(II) та паладію(II) тетрахлоро- та дихлородіамінового ряду в альбуміном, гемоглобіном та імуноглобуліном.

Специфічність агрегації білків під дією комплексів платини(II) та паладію(II) ($K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_4]$, цис- $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, $K_2[PtCl_4]$, цис- $[Pt(NH_2OH)_2Cl_2]$) була досліджена методом турбідиметрії. Оптичну густину розчинів гемоглобіну (Гб), сироваткового альбуміну (СА) та імуноглобуліну (Іг) вимірювали при 720 нм, коли величину власного поглинання цих білків при концентрації 1 г/л можна зневажити. Показано, що досліджені сполуки паладію та платини ($C=5 \cdot 10^{-5}$) викликали агрегацію Гб ($C=10^{-5}$): через 10 хв збільшення оптичної густини розчинів Гб для комплексу $(NH_4)_2[PdCl_4]$ склало 0.36 од. оптичної густини, для комплексу $K_2[PdCl_4]$ - 0.42 од. При співвідношенні металокомплекс:білок - 10:1 спостерігалось випадання Гб з розчину у осадок; за 8 хв весь Гб осаджувався з розчину.

Початок агрегації Гб у присутності сполук платини спостерігали через 30 хв. Через 18 г осадженою виявилась майже половина початкової кількості білку. Осадок поступово розчинюється у надлишку цистину, що є непрямим доказом участі SH- груп Гб у реакції зі сполуками платини(II) і паладію(II). Підтвердженням цьому також є результати реакцій з імуноглобуліном, молекула якого не вміщує SH- груп. Результатом реакцій сполук паладію з Іг, що тривали протягом 3 діб, стали розчинюемі агрегати, про утворення яких свідчило збільшення оптичної густини розчинів імуноглобуліну.

Кількісні аспекти взаємодії комплексних сполук платини та паладію з білками досліджувались методом твердофазного сорбційного аналізу (ТСА). У лунки полістиролових планшетів для імунологічних реакцій по черзі вносили розчин білка, потім розчин металокомплексу, потім знов розчин білка, міченого ферментом - пероксидазою, і, нарешті, субстрат для реакції з ферментом - о-фенілєндіамін. Після інкубації кожного шару протягом 30 хв та видалення розчинів лунки промивали дистильованою водою. Кількість забарвленого продукту пероксидазної реакції реєстрували спектрофотометрично. Т.ч. в умовах досліду ми спостерігали формування на поверхні полістиролового планшету комплексу "білок-метал-білок". Результати досліджень наведені у табл. 1.

Таблиця 1. Порівняльна характеристика зв'язування сполук Pt(II) і Pd(II) з білками у твердофазному сорбційному аналізі.

Сполуки	Зв'язування міченого білка, умовні одиниці,		
	M±m		
	Гемоглобін	Альбумін	Імуноглобулін
цис-[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂]	106.3 ± 2.5	110.0 ± 1.5	108.3 ± 2.9
K ₂ [PtCl ₄]	102.0 ± 1.8	100.0 ± 1.9	104.6 ± 1.3
цис-[Pt(NH ₂ OH) ₂ Cl ₂]	411.6 ± 2.2	229.2 ± 3.2	119.0 ± 2.6
K ₂ [PdCl ₄]	513.7 ± 2.9	394.4 ± 2.8	258.5 ± 1.4
(NH ₄) ₂ [PdCl ₄]	440.0 ± 3.1	419.8 ± 2.3	249.9 ± 2.1

За даними турбідиметрії і ТСА складені ряди активності комплексів відносно: а) гемоглобіну, б) альбуміну, в) імуноглобуліну;

а) K₂[PdCl₄] > (NH₄)₂[PdCl₄] > цис-[Pt(NH₂OH)₂Cl₂] > > цис-[Pt(NH₃)₂Cl₂] ≈ K₂[PtCl₄]

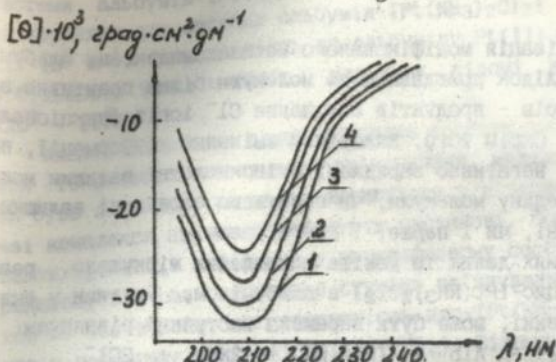
б) (NH₄)₂[PdCl₄] > K₂[PdCl₄] > цис-[Pt(NH₂OH)₂Cl₂] > > цис-[Pt(NH₃)Cl₂] > K₂[PtCl₄]

в) K₂[PdCl₄] > (NH₄)₂[PdCl₄] > цис-[Pt(NH₃)₂Cl₂] > > цис-[Pt(NH₂OH)₂Cl₂] ≈ K₂[PtCl₄].

Цікаво відзначити більшу реакційну здатність цис-дихлородигідроксидаміноплатини порівняно з цис-дихлородіаміноплатиною. Реакційна здатність білків відносно досліджених сполук зменшується у ряду: Гб, СА, Іг. Певна закономірність у цьому уявляється як зв'язок зі зменшенням кількості реакційноздатних атомів сірки.

Вплив приєднання металокомплексів чи їх фрагментів на структуру альбуміну був досліджений методом спектроскопії КД. На мал.1 зображені спектри КД у дальній УФ- області нативного СА та його комплексів зі сполуками, що були досліджені. Співвідношення метал:білок - - 2.5:1, середовище - 0.15 M NaCl, pH - 6.5.

Загальним для сполук є зменшення частки α-спіралей у молекулі альбуміну. Молярна частка α-спіралей (fα) у нативному альбуміні дорівнювала 0.57. Найбільш сильно ефект зменшення частки α-спіралей виявляється при взаємодії СА з K₂[PdCl₄]. У цьому випадку fα знижується до 0.40. Вплив сполуки (NH₄)₂[PdCl₄] менш виражений (fα=0.48) та наближується до впливу сполук платини, які однакові за своєю дією на вторинну структуру альбуміну (fα=0.51).



Малюнок 1. Спектри КД у дальній УФ-області СА та його комплексів з сполуками, що досліджувались; 1 - СА, 2 - СА+сполуки платини, 3 - СА+(NH₄)₂[PdCl₄], 4 - СА+K₂[PdCl₄].

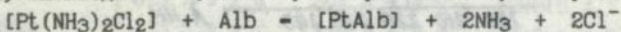
За допомогою спектрів КД у ближній УФ-області зареєстровані конформаційні зміни молекули СА під дією металокомплексів. Найбільш значні зменшення діхроїчного поглинення відбуваються в області оптичної активності білкових S-S зв'язків, також зафіксовані зміни в області оптичної активності залишків Phe, Trp, Tyr, що свідчить про змінювання мікрооточення вказаних хромофорів. Звертає на себе увагу значне конформаційне перекидання структури альбуміну внаслідок приєднання цис-дихлородигідроксиламініплатини порівняно зі зміними, викликаними іншими платиновими комплексами. Очевидно, це зв'язано з високою реакційною здатністю цієї сполуки, підтвердженої раніше іншими методами (ТСА, турбідиметрія).

Взаємодія з комплексами Pt(II) та Pd(II) впливає не тільки на структуру СА, але й на його заряд, що було показано методом ізоелектричного фокусування (ІЕФ). При ІЕФ білки, також як і метал-білкові комплекси розподіляються у гелевому середовищі в градієнті рН відповідно з власними значеннями поверхневого заряду. Нативний альбумін фокусується у вигляді розмитої смуги у зоні рН 4.4 - 5.0. Це пов'язано з мікрогетерогенністю альбуміну, який існує у вигляді кількох ізомерних форм, які відрізняються за рІ. Взаємодія з комплексними сполуками викликає зсув ізоточки СА у лужну область. Сполуки паладію викликають більший зсув заряду, ніж сполуки платини (рІ лужних фракцій 5.4 - 6.0 і 5.1 - 5.8 відповідно). Цис-дихлородіамініплатина на заряд альбуміна не впливає, що може бути пов'язано з приєднанням цього нейтрального комплексу до гідрофобній частині мо-

лекули.

Певно, деспіралізація модифікованого металокомплексами альбуміну відбувається внаслідок приєднання до молекули білка позитивно заряджених металоцентрів - продуктів заміщення Cl^- іонів функціональними групами білка. Окрім того, внаслідок змінення конформації, про яку вже згадувалось, негативно заряджені амінокислотні залишки можуть бути "втягнуті" усередину молекули, чи позитивно заряджені залишки - в'ялятися на поверхні, чи і перше, і друге разом.

Походячи з відомих даних та раніше викладених міркувань, реакція комплексів типу цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ з альбуміном, узятими у еквімолярному співвідношенні, може бути виражена наступним рівнянням:



У фізіологічних умовах рН найбільш ймовірними місцями зв'язування платини у альбуміні є атоми сірки цистеїну, метіоніну та, можливо, цистину, а також у відповідності з умовами утворення циклу азот чи кисень. Враховуючи, що усі досліди проводились на фоні 0.15 М NaCl, ступінь заміщення Cl^- у початкових комплексах чи можливе входження H_2O у внутрішню сферу повинні бути об'єктами спеціальних досліджень.

Важливими характеристиками метал-білкової взаємодії є константи зв'язування - умовні функції, у певній мірі адекватні константам стійкості у координаційній хімії. Константи зв'язування цис-дихлородіамінових комплексів платини(II) з альбуміном визначали методом рівноважного діалізу з застосуванням графічного методу Скетчарда.

Розподіл експериментальних точок аналізували на ЕОМ, використовуючи метод найменших квадратів з розрахунком коефіцієнтів кореляції. Для системи СА - цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ пряма має вигляд:

$\lg C_1 = (1.2 \pm 0.2) + (1.4 \pm 0.12) \cdot \lg K'$, где $K' = 16.9 \pm 8.2$, $r = 0.963$, $S_0 = 0.092$. Перевірка адекватності моделі розраховувалась з використанням критерію Фішера; $F = 0.15$, теоретично $F_{\text{табл}}(6; 7; 0.05) \approx 4.15$; $F < F_{\text{табл}}$, отже ця модель адекватна експерименту.

Для системи СА - цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{Cl}_2]$ пряма має вигляд:

$\lg C_1 = (2.1 \pm 0.4) + (1.7 \pm 0.1) \cdot \lg K'$, где $K' = 147.5 \pm 63.8$; $r = 0.979$, $S_0 = 0.102$, $F = 0.04$, теоретично $F_{\text{табл}}(8; 9; 0.05) \approx 3.34$; $F < F_{\text{табл}}$, отже ця модель адекватна експерименту.

Розраховані за програмою значення K' для систем СА - цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{Cl}_2]$ та СА - цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ склали ~ 147 і 17 відповідно. Так як концентрація альбуміна в усіх дослідах складала 1.5 мг/мл ($2.2 \cdot 10^{-5}$ М), то істинна константа зв'язування ($K-K'/P$) для

системи альбумін- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{Cl}_2]$ дорівнює $6.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Константа зв'язування для системи альбумін- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ відповідає значенню $7.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Спорідненість до альбуміну Pt(II) виявляється вище, ніж у більшості інших металів, для яких відомі константи зв'язування ($10^2 - 10^4 \text{ M}^{-1}$).

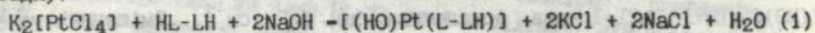
Аналіз одержаних даних дозволяє зробити висновок про взаємозв'язок токсичності та ступеня зв'язування металокомплексів з білками. Як було показано, за своєю активністю у відношенні до білків паладієві комплекси значно перевищують платинові. Зокрема, ступінь зв'язування $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ з білками у твердофазному сорбційному аналізі у середньому в 4 рази перевищує ступінь зв'язування цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$. У той же час відомо, що токсичність цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ більш ніж у 30 разів перевищує токсичність $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$. Відомо також, що протипухлинний препарат на основі цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{Cl}_2]$ (Платин) менш токсичний, ніж цис-дихлородіаміноплатина (ДДП): адекватні за токсичністю дози Платину та ДДП корелюють як 2:1. У той же час ступінь та $\text{K}_{\text{зв'яз}}$ першого комплексу, наприклад з альбуміном, більше, ніж ступінь та $\text{K}_{\text{зв'яз}}$ другого комплексу.

Таким чином, чим вище ступінь зв'язування сполук платини(II) та паладію(II) у відношенні до білків, тим нижче їх токсичність. Цей феномен може бути, зокрема, пояснений тим, що сплуки, які циркулюють у вільній формі, набагато токсичніші їх макромолекулярних комплексів. Зв'язування з білками (особливо з альбуміном) значно лімітує прояви гострої токсичності сполук цих металів за рахунок зниження значення вільної концентрації останніх у крові.

2. Взаємодія хлороплатинату калію та його альбумінового комплексу в цистинном чи цистеїновому.

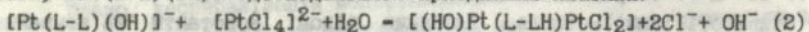
Відомо, що низькомолекулярні тіоли беруть участь у механізмі введення платини в організм людини. Дослідження будови та властивостей комплексів Pt(II) з тіоамінокислотами має не тільки теоретичний, але й практичний інтерес.

Цистин $\text{NH}_2(\text{COOH})\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ (умовно HL-LH) теоретично може бути розглянутий як амбідентатний біокомплексон, який вміщує дві аміно-, дві карбоксильні та дисульфідну групи. Взаємодія на холоді розчину $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ (концентрація 0,2 моль/л з еквімолярною кількістю цистину, нейтралізованого NaOH, приводила до випадання осадку.



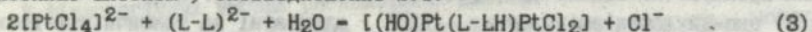
З хімічних властивостей моноцистината, що певним чином характе-

ривують координаційну ємність ліганду, істотною виявилась здатність аніону $[\text{Pt}(\text{L-L})(\text{OH})]^-$ до подальшого приєднання платини:



Практично наважку $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})]$ ровчиняли у мінімальній кількості NaOH (1 еквівалент на моль платини) та добавляли рівну кількість молей $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$. Осадок починав утворюватись через 30-60 хв після зливання реактивів. (Вихід ~ 80%).

Комплекс $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})\text{PtCl}_2]$ відрізняється від початкового аналітичними характеристиками та більш насиченим оранжевим кольором; він не ровчиняється у воді та органічних ровчинниках, переходить у ровчин під дією лугу чи ровбавлених мінеральних кислот. Іншим способом одержання сполуки може бути безпосередня взаємодія $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ з цистинат-аніоном у співвідношенні 2:1.



Повне заміщення хлор-іонів у реакції (1) та половинне - у реакціях (2,3) було показано на основі виявлення хлору в комплексах, що утворюються, потенціометрично в хлор-селективним електродом EM-Cl-01, а також ваговим методом.

У зв'язку з тим, що обидва комплекси виявляють кислотні властивості (ровчиняються у лугах), важливим уявлялось виявлення групи, яка містить протон. Обидві сполуки титруються рН-метрично лугом як одноосновні слабкі кислоти, що мають схожі криві титрування. Розрахунок за даними титрування дає величину константи кислотної диссоціації комплексів $\sim 8 \cdot 10^5$. Таке значення досить близько відповідає COOH групі координованого цистину.

У ІЧ-спектрі $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})]$ чітко видно смуги при $\sim 3200 \text{ cm}^{-1}$, які були віднесені до коливань координованої NH_2 -групи, а також протонованої COOH -групи (1720 cm^{-1}). Широка смуга при 3400 cm^{-1} відповідає коливанням некоординованої NH_2 -групи та зв'язків O-H у комплексах.

У області $500-600 \text{ cm}^{-1}$ у спектрі комплексу $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})\text{PtCl}_2]$ (табл. 2) спостерігаються кілька досить сильних смуг. З них частота 573 cm^{-1} характерна для коливань Pt-N, частоти 556 та 540 cm^{-1} відповідають розрахунковим значенням $\nu_{\text{Pt-O}}$ з симетрією B_{1g} та A_{1g} (571 та 543 cm^{-1} відповідно). Смуга при 551 cm^{-1} у спектрі цистина відноситься до коливання дисульфідної групи, у спектрі комплексу $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})\text{PtCl}_2]$ вона зсувається до 527 cm^{-1} . Зміщення $\nu_{\text{S-S}}$ безперечно повинно бути пов'язане з утворенням зв'язку платина-сірка. На те ж саме показує зсув смуги, обумовленої коливанням C-S.

(727-704 cm^{-1}).

Участь у координації атомів азоту аміногрупи у комплексі $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})\text{PtCl}_2]$ було підтверджено також асумом реванансного сигналу у спектрі ^{14}N ЯМР від 334.7 м.д. у випадку цистина до 385 м.д. у спектрі комплексу.

Таблиця 2. Максимуми основних частот поглинання в ІЧ-спектрах цистина та $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})\text{PtCl}_2]$

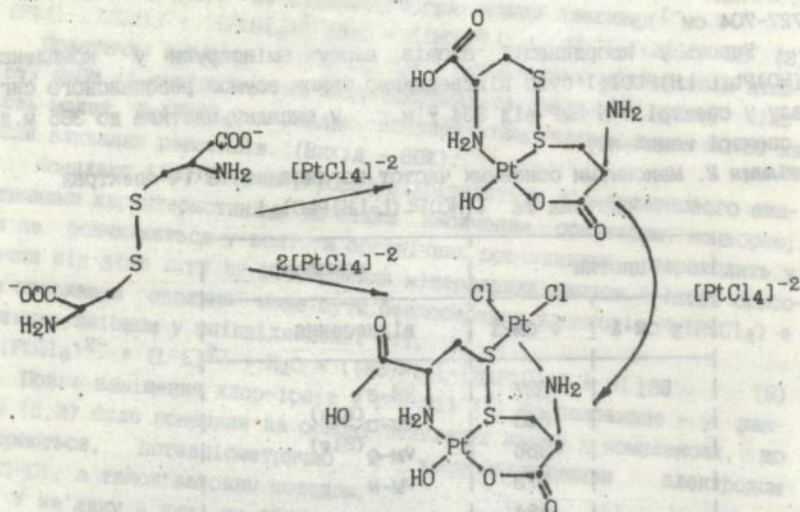
ЦИСТИН		КОМПЛЕКС	
ν cm^{-1}	ν cm^{-1}	віднесення	
551	527	$\nu_{\text{S-S}}$	
	540	$\nu_{\text{M-O}}$ (A1g)	
	556	$\nu_{\text{M-O}}$ (B1g)	
	573	$\nu_{\text{M-N}}$	
	584		
728	704	$\nu_{\text{C-S}}$	
	902	$\nu_{\text{M-OH}}$	
1386	1385	$\nu_{\text{S}}(\text{COO}^-)$	
1509	1491		
1606	1619	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	
	1728	$\nu_{\text{C=O}}(\text{COOH})$	

На підставі наведених даних можна стверджувати, що у комплексі платини складу 1:1 цистин виступає як тридентатний ліганд, у координації з атомом платини беруть участь групи $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ та атом сірки; четверте координаційне місце зайняте гідроксилом. Подальше комплексоутворення $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})]$ з $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ відбувається за рахунок аміногрупи, що залишилася незв'язаною, та другого атома сірки.

Безпосереднім доказом участі дисульфідної групи у координації з металом є забарвлення комплексів, спричинене переносом заряду метал-сірка. Важливим є й те, що значення молярного коефіцієнту поглинання для смуг у видимій області спектра комплексу $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})\text{PtCl}_2]$ (два зв'язки Pt-S) удвічі більше, ніж у спектрі $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})]$. Наявність сірки у координаційному вузлі виявляється також у помітній лабільності транс-розташованого до неї гідроксила. Комплекс $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})]$ дуже швидко взаємодіє, наприклад, з аміаком.

Обговореним структурам комплексів та їх взаємним перетворенням

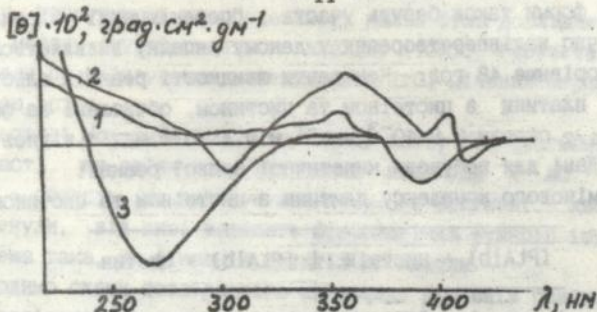
відповідає наступна схема:



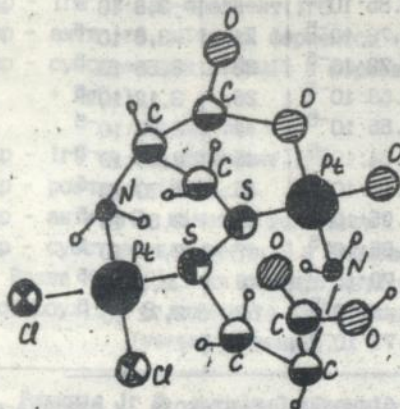
Розглянута будова комплексів в'ясує положення стрибка на кривій титрування, який білш всунутий у лужну область, ніж це характерно для COOH-групи амінокіслот. Хоча комплекси й титруються, як одноосновні кислоти, але у розчині між їх протоноакцепторними групами безперечно устанавлюються рівноваги протонного обміну. Це може спричиняти утворення у розчині ізомерних форм, що включають NH₃⁺ чи COOH- групи, або навіть молекули води.

Координації атому сірки відповідає і характеристика оптичної активності комплексів. У спектрах КД цистинатів (мал. 2) замість смуги при 260 нм, пов'язаної з дисульфідною групою ліганду, спостерігаються смуги протилежного ачаку у області 300-350 нм. Очевидно, що у комплексах, які розглядаються, індукуються віциальні ефекти Коттона у області d-d переходів металу.

Можлива координація, що відповідає наведеній будові комплексів, може бути показана на основі моделі Дрейдінга для [(HO)Pt(L-LH)PtCl₂] (мал. 3). Два хелатних цикли мають конформацію, яка близька до кресловидної, третій - конформацію ванни. У незв'язаний з металом COOH-групі карбонільний кисень опиняється приблизно на однаковій відстані від атомів платини, приблизно над центрами кожного з координаційних квадратів, що, мабуть, сприяє стабілізації комплексу.

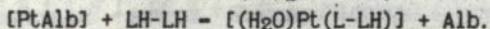
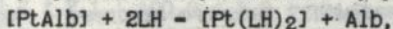


Малюнок 2. Спектри КД. 1 - $[(HO)Pt(L-LH)]$,
2 - $[(HO)Pt(L-LH)PtCl_2]$, 3 - HLLH.



Малюнок 3. Модель Дрейдинга комплексу $[(HO)Pt(L-LH)PtCl_2]$.

Важливою ланкою у загальній схемі метаболічного ланцюга з участю сполук платинових металів є зникання останніх з металокомплексів. З метою з'ясування можливого механізму видалення платини з білків плазми, визначали швидкість утворення комплексів платини з цистеїном та цистином у процесі обміну іонів Pt^{2+} у реакціях:



Експериментальні дані для побудови кінетичної кривої (приведені у табл. 3) лягають на прямі у координатах $lgC - t$, що характерно для реакцій першого порядку.

У дослідженому проміжку часу у обох реакціях хімічному заміненню підлягає половина зв'язаної з альбуміном платини; основну роль у

даному процесі мабуть, відіграє цистеїн - $t_{1/2} = 3$ г. Істотно, що дисульфідні форми також беруть участь у "переключенні" платини; зрозуміло, що час напівперетворення у даному випадку виявляється значно більшим і дорівнює 48 год. Константи швидкості реакцій альбумінових комплексів платини з цистеїном та цистином, обчислені за формулою: $k = 0.693/t_{1/2}$ склали $3.8 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ і $2.4 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$ відповідно.

Таблиця 3. Дані для побудови кинетичної кривої реакції альбумінового комплексу платини з цистеїном та цистином.

[PtAlb] + цистеїн		[PtAlb] + цистин	
t, хв	$\Delta C_{Pt}, M$	t, ч	$\Delta C_{Pt}, M$
60	$3.85 \cdot 10^{-5}$	5	$3.8 \cdot 10^{-5}$
70	$3.78 \cdot 10^{-5}$	21	$3.6 \cdot 10^{-5}$
90	$3.72 \cdot 10^{-5}$	23	$3.56 \cdot 10^{-5}$
100	$3.68 \cdot 10^{-5}$	26	$3.12 \cdot 10^{-5}$
110	$3.55 \cdot 10^{-5}$	44	$2.93 \cdot 10^{-5}$
120	$3.34 \cdot 10^{-5}$	45	$2.80 \cdot 10^{-5}$
130	$3.10 \cdot 10^{-5}$	45	$2.70 \cdot 10^{-5}$
140	$2.95 \cdot 10^{-5}$	46	$2.56 \cdot 10^{-5}$
150	$2.85 \cdot 10^{-5}$	47	$2.45 \cdot 10^{-5}$
160	$2.70 \cdot 10^{-5}$	48	$2.3 \cdot 10^{-5}$
170	$2.45 \cdot 10^{-5}$	52	$2.72 \cdot 10^{-5}$
190	$2.75 \cdot 10^{-5}$		

Перетворення платина-білкових комплексів у платина-цистеїнові та (чи) цистинові, мабуть, має відношення до імунохімії платини: даний ефект може бути використаний для розробки методів профілактики платинових алергозів.

3. Нові експериментальні підходи до вивчення механізму платинових алергозів.

Уявлення про можливий механізм платинових алергозів були отримані на основі дослідження взаємодії типового алергену - $K_2[PtCl_4]$ з основним компонентом імунної системи людини - імуноглобуліном G, який є представником великого класу білків, що також відомі як антитіла.

Взаємодія молекули імуноглобуліну G та її фрагментів (Fab та Fc) з антиімуноглобуліном G (анти IgG) (моделювання реакції антиген-ан-

титіло) у присутності хлороплатиніту калію була досліджена в застосуванні методу імуноферментного аналізу (ІФА). Результати реакції реєстрували по зв'язуванню молекул анти IgG, мічених ферментом - пероксидазою хрину.

У частині молекули IgG, яка носить назву Fab фрагмент, розташовані області, що зв'язують антигенні молекули (ab - "antigen bindung" - область, що зв'язує антиген). Fc-фрагмент - хвостова частина молекули, від якої залежить фізіологічна функція імуноглобуліну, зокрема така, як фіксація антитіл до клітин.

Наводимо схеми послідовного нанесення розчинів реагуючих сполук у лунки полістиролових планшетів для ІФА:

Схема ІФА N 1

- 1-й шар - IgG чи Fab-фрагмент IgG
- 2-й шар - анти-IgG, мічений ферментом + $K_2[PtCl_4]$
- 3-й шар - субстрат для реакції з ферментом (ортофенілдіамін + H_2O_2).

Схема ІФА N 2

- 1-й шар - IgG чи Fab-фрагмент IgG
- 2-й шар - розчин $K_2[PtCl_4]$
- 3-й шар - анти-IgG, мічений ферментом
- 4-й шар - субстрат для реакції з ферментом.

Таблиця 4. Вплив $K_2[PtCl_4]$ на реакцію антиімуноглобулінових антитіл з імуноглобуліном G людини та Fab-фрагментами його молекули (умовні одиниці).

Ig G	Реакція Ig G -антиIg G		Реакція Fab-фрагмент-антиIg G	
	Схема N1	Схема N2	Схема N1	Схема N2
0	99,2 ± 2,1	100,0 ± 2,0	101,4 ± 1,5	100,7 ± 0,9
-6	96,3 ± 1,8	98,7 ± 1,9	102,6 ± 1,4	101,3 ± 1,2
-5	89,9 ± 1,9	112,3 ± 1,9	96,3 ± 0,9	95,1 ± 0,8
-4	72,4 ± 1,1	122,9 ± 2,2	84,3 ± 1,1	89,6 ± 0,9
-3	11,7 ± 0,5	188,1 ± 2,5	12,8 ± 0,7	88,3 ± 0,7

З результатів табл. 4 виходить, що вплив $K_2[PtCl_4]$ на реакцію

антиген - антитіло є, мабуть, результатом двох процесів, що проходять у різних напрямках. Перший процес - блокування реакцій антиген-антитіло у результаті інактивациі антигензв'язуючого центру у молекулі імуноглобуліну. У взаємодії антигена з антитілом величезне значення має комплементарність - стерична відповідність антигенної детермінанти та області, що зв'язує антиген. Будь-яке порушення цієї відповідності веде до блокування реакції. Другий процес - носилання зв'язування між антигеном та антитілом за рахунок формування додаткових центрів зв'язування в інших частинах молекули імуноглобуліну. У цьому випадку ми спостерігаємо утворення макромолекулярних комплексів типу "білок-метал-білок", про які вже шла мова у розділі 1.

Як вже відзначалося раніше, константні ділянки молекул імуноглобулінів (Fc-області) відповідальні за фіксацію антитіл до клітин. Зміна властивостей Fc-фрагмента під впливом $K_2[PtCl_4]$ досліджували за допомогою взаємодії Fc-фрагмент - Fc-рецептор плазматичних мембран синцитіотрофобласту плаценти. Відомо, що останній має великі ділянки, гомологічні молекулам імуноглобулінів. Встановлено, що хлороплатинит калію стабілізував комплекс ліганд - рецептор у всьому дослідженому діапазоні концентрацій.

Аналіз одержаних даних дозволяє висловити деякі нові уявлення щодо механізму платинових алергозів. Вважається, що сполуки сполучаються з власними білками організму, котрі внаслідок цього набувають антигенних властивостей і тим спонукають до виробництва специфічних антитіл. Фактично для активації ефекторних клітин алергічної реакції може бути досить подіяти на мембрану клітини. Таким впливом може стати утворення агрегатів молекул імуноглобуліну, які перебувають у асоціації з рецепторами клітин а також зміна характеру взаємодії цитofilних імуноглобулінів з їхніми рецепторами. Останнє можна довести наявністю стабілізації комплексу Fc-фрагмент - Fc-рецептор плазматичних мембран синтрофобласту плаценти під дією $K_2[PtCl_4]$.

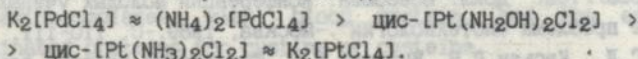
Коли прийняти вище викладену гіпотезу, стає зрозумілим, чому сполуки паладію перевершують сполуки платини за своєю здатністю до сенсифілізації. Наслідки досліджень, котрі обговорюються у розділі 1, вказують, що адатність комплексів паладію до утворення сполук типу "білок-метал-білок" значно переважає здатність платинових комплексів що до утворення метал-білкових олігомерів та полімерів. Цей факт може стати вирішальним у здійсненні механізмів алергічних реакцій при контакті зі сполуками платинових металів.

ВИСНОВКИ.

1. За допомогою препаративних та фізико-хімічних методів досліджено утворення білкових макрокомплексів ацидоамінатів паладію(II) і платини(II), а також взаємодію останніх з цистеїном і цистином.

2. У індивідуальному стані уперше виділені та вивчені індивідуальні комплекси платини(II) з цистином: $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})]$ (I) і $[(\text{HO})\text{Pt}(\text{L-LH})\text{PtCl}_2]$ (II). При застосуванні ІЧ-спектроскопії, ЯМР ^{14}N , електронної спектроскопії доведено, що у I цистин поводить себе як тридентатний ліганд, у координації з атомом платини беруть участь групи $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ і атом сірки. Перехід від I до II здійснюється за рахунок аміногрупи та другого атому сірки цистину.

3. За допомогою методів турбідиметрії та твердофазного сорбційного аналізу вивчена порівняльна реакційна здатність сполук Pt(II) та Pd(II) щодо альбуміну, гемоглобіну і імуноглобуліну. Активність комплексів змінюється у такій послідовності:



4. Вказується, що біологічні ефекти сполук платинових металів до певної міри обумовлені впливом комплексоутворення на структуру біополімерів. Методами ізоелектричного фокусування і спектроскопії КД доведено зміну заряду молекули альбуміну та зменшення частки α -спіралей під час взаємодії з сполуками, які досліджувались. У обох випадках виразною рисою є те, що вплив сполук паладію(II) є помітнішим.

5. Привертає увагу взаємозв'язок між токсичністю комплексів платини(II) і паладію(II) тетрахло- і цис-дихлородіамінового ряду та ступенем зв'язування даних сполук з білками: чим вище ступінь зв'язування, тим менше токсичність металокомплексів. Даний ефект можна, зокрема, пояснити тим, що сполуки, котрі циркулюють у вільній формі, є набагато токсичнішими за їх метал-білкові комплекси.

6. Методом рівноважного діалізу уперше визначено константи зв'язування комплексів цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ і цис- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{Cl}_2]$ з альбуміном: $7.7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ і $6.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ відповідно. Вища константа зв'язування є одним з факторів, що зменшує токсичність цис-дихлородигідроксиламінплатини та більшої пролонгованості протипухлинної дії останньої у порівнянні з цис-дихлородіамінплатиною.

7. Визначено кінетичні параметри реакцій альбумінового комплексу платини(II) з цистеїном та цистином, які кількісно характеризують механізм видалення платини з комплексів з білками через її хімічне

заміщення низькомолекулярними тіолами.

8. На підставі досліджень зв'язування $K_2[PtCl_4]$ з імуноглобуліном експериментально підтверджена участь сполук платини у механізмі імунних реакцій.

Публікації за темою дисертації.

1. Касьян Г.В., Жмарева Е.Н. Иммунные и неиммунные взаимодействия при развитии платиновых аллергозов: исследование методом иммуноферментного анализа//Тез. докл. респ. научн. конференции "Применение ИФА в медицине". - Харьков, 1989. - С. 103-104.
2. Зегжда Г.Д., Касьян Г.В. Изучение молекулярного механизма платиновых аллергозов//Тез. докл. I Всесоюз. иммунологического съезда. - Сочи, 1989. - Т. 2. - С. 333.
3. Касьян Г.В., Долженко М.И., Горелая М.М. Применение иммуноферментного анализа для изучения молекулярного механизма платиновых аллергозов//Тез. докл. Всесоюз. конференции молодых ученых "Актуальные проблемы биотехнологии". - Москва, 1989. - С. 110-111.
4. Зегжда Г.Д., Касьян Г.В. Жмарева Е.Н. Связывание платина альбумином и иммуноглобулином//Днепропетровск.-1995.-16 с. -Деп. в ГНТБ Украины, N 899 -Ук 95 от 13.04.95.
5. Zegzda G.D., Zhmarlova E.N., Kasyan G.V. et al. Interaction of bioactive platinum and palladium complex compounds with proteins//35th IUPAC Congress, Istanbul.-1995, -P. 1290.
6. Зегжда Г.Д., Виңиченко И.Г., Касьян Г.В. Хелатообразование в системе тетрахлороплатинит калия - цистин // Журн. неорган. химии.-1995. -Т. 40, N 7. -С. 1172-1175.

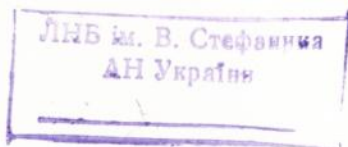
Касьян Галина Борисовна. Взаимодействие ацидоаминовых комплексов платины(II) и палладия(II) с белками крови и обмен координированных протеинов на цистин или цистеин. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.01 - неорганическая химия и 03.00.04 - биохимия. Днепропетровский государственный университет, 1996 г.

Получены характеристики взаимодействия биологически активных ацидоаминовых комплексов Pt(II) и Pd(II) с белками крови и последующего превращения платина-белковых соединений в цистеиновые или цистиновые. Описаны состав и строение новых комплексов платины(II) с цистином. Предложено использование полученных результатов для расширения представлений о механизмах токсичности и аллергенности платиновых комплексов.

Kasyan G.B. Interaction of platinum(II) and palladium(II) acidoaminocomplexes with blood protein, and the exchange of coordinated proteins for cystine or cysteine.

Thesis for aquisition of scientific degree "candidate of chemical sciences" on specialitis 02.00.01 - Inorganic chemistry and 03.00.04 - Biochemistry. Dniepropetrovsk State University. 1996.

Characteristics of the interaction have been obtained of bioactive Pt(II) and Pd(II) acidoaminocomplexes with blood proteins and of the consequent transformation of the protein-metal compounds to cysteine or cystine ones. The chemical composition and structure of the new platinum(II) complexes with cystin have been described. His suggested that the obtained results should be used to broaden the concepts of the toxicity and allergenicity mechanisms of the platinumous complexes.



AB 34.790

AB 34.790