

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Antioxidáns tulajdonságú réz(II)-komplexek előállítása és vizsgálata

Szabó Mira

Vegyéssz mérnök BSc szakos hallgató

III. évfolyam

Témavezető:

Dr. Lihi Norbert

Egyetemi docens

Debreceni Egyetem, TTK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Összetett Homogén és Heterogén Fázisú Kémiai Reakciók Mechanizmusa

Kutatócsoport

2024.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi előzmények	3
2.1. A nagy oxidációs esemény	3
2.2. Reaktív oxigén részecskék.....	4
2.2.1. Szuperoxid anion	5
2.2.2. Hidroxilgyök	6
2.2.3. Hidrogén-peroxid.....	6
2.3. Szuperoxid-dizmutáz	7
2.4. Antioxidánsok.....	9
3. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek	11
3.1. Felhasznált vegyszerek	11
3.2. A CroHis ligandum szintézise	11
3.2.1. 4-oxo-4H-kromén-3-karbonilklorid (2) előállítása	11
3.2.2. Hisztidin-metilészter előállítása	11
3.2.3. Az amidkötés kialakítása	12
3.2.4. A védőcsoport eltávolítás.....	12
3.3. pH-potenciometria	13
3.4. UV-látható spektroszkópia	14
3.5. Cirkuláris dikroizmus	14
3.6. Egykristály röntgendiffrakció	14
3.7. ESR spektroszkópia	15
3.8. SOD aktivitás vizsgálat.....	15
4. Eredmények és értékelésük	16
4.1. Szintézis és karakterizálás	16
4.2. A ligandumok sav-bázis tulajdonságai és a CroHis ligandum szerkezete.....	18
4.3. A ligandumok réz(II)ionnal alkotott komplexei	20
4.4. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás.....	24
5. Összefoglalás	26
6. Hivatkozások	27

A dolgozatban előforduló rövidítések magyarázata

ROS	Reaktív oxigén részecskék
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
SOR	Szuperoxid-reduktáz
His	Hisztidin
Asp	Aszparaginsav
Tyr	Tirozin
Trp	Triptofán
Gln	Glutamin
Asn	Aszparagin
NBT	Nitroblue-tetrazólium-klorid
DKM	Diklórmétán
TEA	Trietil-amin

1. Bevezetés

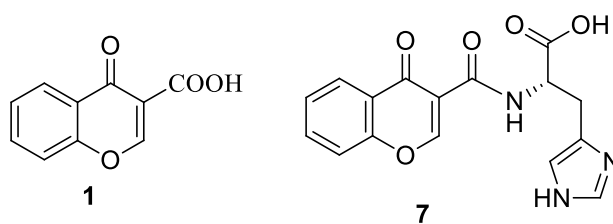
Az oxigén molekula metabolizmusának, azaz az oxigén molekula anyagcseréjének eredményeképpen reaktív oxigén részecskék (ROS) jelennek meg biológiai rendszerekben, amelyek számos betegség kialakulásában játszanak szerepet.

A metabolizmus lejárását kísérő káros biológiai hatásokat különböző enzimek semlegesítik. Ezen enzimek egyike a szuperoxid-dizmutáz (SOD), amely a szervezet által termelt, egyik legfontosabb antioxidáns enzimnek tekinthető. Ez az enzim a szuperoxid anion diszproporciós reakcióját katalizálja molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá.

Az enzim hiánya vagy a szuperoxid anion koncentrációjának nagymértékű megemelkedése az oxidatív stressz állapotát idézi elő. Amennyiben az oxidatív stressz elleni védekezésben kulcsszerepet játszó SOD nem megfelelően működik, a szervezet fokozott terhelésnek van kitéve. Ez a folyamat a sejtek károsodásához, valamint pusztulásához vezet. Fontos kiemelni, hogy hosszabb távon olyan betegségek megjelenését idézheti elő, mint a rák, a szív- és érrendszeri betegségek, a cukorbetegség, a neurológiai betegségek (Alzheimer- és Parkinson-kór, Down-szindróma), a pszichiátriai betegségek (depresszió, skizofrénia, bipoláris zavar), a vesebetegségek, a tüdőbetegségek (krónikus tüdőelzáródás, tüdőrák) és az öregedéshez is hozzájárul.

Mivel a szuperoxid-dizmutáz enzim terápiás alkalmazása nem lehetséges annak kis membrán permeabilitása, illetve a vérérszékben való kis stabilitása miatt, előtérbe kerülnek az olyan kis molekulatömegű antioxidánsok, amelyek nagy hatékonysággal képesek a szuperoxid anion koncentrációját megfelelő szintre csökkenteni.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Összetett Homogén és Heterogén Fázisú Kémiai Reakciók Mechanizmusa Kutatócsoportja eddig olyan ligandumokat vizsgált, amelynek réz(II)-komplexei kiváló katalitikus aktivitást mutattak a szuperoxid anion bontási reakciójában. A kutatócsoportban folytatott munkám során antioxidáns tulajdonságú kromén-3-karbonsavat, továbbá annak hisztidin konjugátumát (1. ábra) állítottam elő és vizsgáltam réz(II)-komplexeit. A hisztidin a réz(II) megkötésében játszik szerepet, az O-heterociklusos származék pedig az antioxidáns hatásért lehet felelős. Mivel a réz(II)ion is rendelkezik antioxidáns tulajdonsággal, így ezek a hatások tovább fokozhatók, aminek következtében a SOD aktivitás növekedését várjuk.



1. ábra Kromén-3-karbonsav (**1**), *S*-metil-3-(1*H*-imidazol-4-il)-2-(4-oxo-4*H*-kromén-3-karboxamido)propánsav, CroHis (**7**).

2. Irodalmi előzmények

2.1. A nagy oxidációs esemény

4,5 milliárd évvel ezelőtt a bioszférát erős redukáló légkör jellemezte, az atmoszféra kezdetben szén-dioxidból, metánból és vízgőzből állt. [1] Később, a korai Földön (3,5 milliárd éve) a dioxidigén (O_2) koncentrációja rendkívül alacsony volt. [2] Ennek oka, hogy bár a napfény az akkori légkör vízgőzét oxigénre és hidrogénre bontotta, az oxigén reakcióba lépett szinte azonnal a metánnal, majd a földkéregben kötődött meg. Ennek eredményeképpen a káros reaktív oxigén részecskék csekély mennyiségben, vagy egyáltalán nem is voltak jelen. [1] Így a szuperoxid-dizmutáz (SOD), valamint a szuperoxid-reduktáz (SOR) enzimnek nem volt jelentős oka kialakulni. [2] [3]

Az oxigén koncentráció megemelkedését, az oxigéndús légkör kialakulását egy baktérium fajnak köszönhetjük, nevezetesen a cianobaktériumoknak, amelyek Földünk legősibb élőlényei közé sorolhatók. Ez az élőlény a mikrobák egy egyedi csoportja, amelyek fotoszintézisre képesek, azaz a napfény energiájából kémiai energiát képesek előállítani a víz oxidációján keresztül, fotoszintézisük mellékterméke pedig az oxigén.

Kutatók azt feltételezik, hogy a tengervízbe jutott oxigén mennyisége az idő múlásával fokozatosan növekedett, majd egy bizonyos ponttól kezdve az oxigén termelődése gyorsabbá vált, mint ahogy el tudott volna reagálni különböző elemekkel, vagy megkötődni ásványokban. [1] Ennek köszönhetően a termelt oxigén felhalmozódott az óceánokban, majd fokozatosan kezdett felszabadulni a légkörbe. Ezzel megkezdődött a „nagy oxidációs folyamat”. Az óceánokból kikerült oxigén a légkörben lévő metán jelentős részét kiszorította onnan, amitől kezdve az oxigén vált az atmoszféra egyik meghatározó elemévé.

Amikor a cianobaktériumok kifejlődtek, a felszabaduló oxigén 2,7 milliárd éven át a teljesen anaerob életformát folytató élőlények számára mérgező hatású volt. Ennek hatására az anaerob élet jelentős része elpusztult, ugyanakkor az élet megtalálta annak a módját, hogy túlélje az oxigén tartalmú légkört, azáltal, hogy kihasználta az oxigénben rejlő potenciált. Az oxigén elősegítette az energia termelését a tápanyagok lebontása során, mivel magas redoxipotenciálja révén ideális terminális elektronakceptorként szolgált ezekben a folyamatokban. [1]

Az oxigén megjelenése nemcsak ROS-okhoz, hanem olyan antioxidáns enzimek megjelenéséhez is vezetett, amelyek szükségesek az oxidatív károsodás növekvő szintje elleni védelemben. [2]

Az állandónak tekinthető molekuláris oxigén koncentráció 400 millió évvel ezelőtt alakult ki a Földön. Az élet fenntartásához szükséges energiaszükséglet a tápanyagok lassú égéséből származik, amelyet az enzimek megfelelően szabályoznak. [4]

2.2. *Reaktív oxigén részecskék*

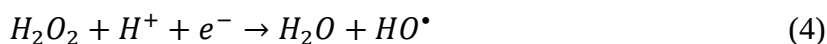
Az elmúlt években jelentős előrelépés történt a szabadgyök-kémia területén, valamint annak vizsgálatában, hogy miként játszhat szerepet mind az alapvető biológiai folyamatokban, mind pedig az öregedéssel összefüggő betegségek és működési zavarok kialakulásában. [5] 1954-ben jelent meg az első közvetlen bizonyíték arra vonatkozóan, hogy az O_2 szabadgyökök felelősek az oxigén toxicitásáért. Rebeca Gerschman, Daniel Gilbert és kollégáik megfigyelték, hogy a tüdőszövetet érintő röntgensugárzás okozta károsodás hasonló a magas oxigénkoncentráció által kiváltott károsodáshoz. [7]

Az oxigén szintjének megemelkedése a Földön átalakította a meglévő anyagszere utvonalakat és újakat hozott létre. Megjelenése reaktív oxigén részecskék (ROS) kialakulásához vezetett, mint a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hidroxilgyök ($\bullet OH$). [2] Az O_2 metabolizmusa által jellennek meg ezen ártalmas részecskék a biológiai rendszerekben, amelyek összefüggésbe hozhatók az oxidatív stresszel. Továbbá környezeti stressztényezők (UV, ionizáló sugárzás, szennyező anyagok és nehézfémek) és a xenobiotikumok (antiblasztikus gyógyszerek) jelentős mértékben hozzájárulnak a ROS termelés fokozásához. [6] Az emberi szervezet megközelítőleg 5 g ROS-t termel naponta, két elsődleges termékkel: $O_2^{\bullet-}$ és H_2O_2 . [10]

A szabadgyökök olyan kémiai anyagok, melyek általában párosítatlan elektronnal rendelkeznek és reaktivitásuk igen nagy. Mivel szabad elektronokat hordoznak, könnyen reagálnak más molekulákkal. Főképp a szabadgyökök károsítják a DNS-t, a nélkülözhetetlen sejtfunkciókhoz szükséges fehérjéket és a sejtmembrán lipideit (lipidperoxidáció). Ez akár sejthalálhoz is vezethet. [8] [11] A dioxigén négy elektronos oxidálószer, redukciós reakciójának a végterméke a víz. (1)



Ha az O_2 -t négy egymást követő, egy-egyelektronos lépésben redukálják, a közbenső termékek a három fő reaktív oxigénfajta. (2-5) [2]





2.2.1. Szuperoxid anion

A szuperoxid anion a molekuláris oxigén redukált formája, egy elektron felvételével jut el ebbe az állapotába. Így a molekula két oxigénatomból áll, 17 elektronnal. Mivel a szuperoxid töltéssel rendelkezik, emiatt kicsi a membrán permeabilitása, nehezen jut át a membránokon, bár képes áthaladni anioncsatornákon, ez a folyamat azonban nem túl hatékony. Ennek eredményeként a szuperoxid anion többnyire abban a fiziológiai térben marad, ahol keletkezett és ott is fog tovább reagálni.

Ez a részecske minden aerob élőlényben megtalálható, a mitokondriális légzési lánc során a táplálékmolekulákból származó elektronok a légzési oxigénre kerülnek át, ennek eredményeként víz képződik. Azonban előfordulhat, hogy az elektronok nem érik el a víz képződésének végső fázisát, hanem szivárognak a láncból és szuperoxid képződik. Emellett a mitokondriumban is termeli a xantin-oxidáz, lipoxigenáz, valamint a NADPH-oxidáz, amely az immunvédelem elengedhetetlen összetevője. [10] [12] [14]

A szervezetben betöltött funkciója változó lehet. Működhet jelzőmolekulaként, toxikus anyagként, illetve ártalmatlan köztes vegyületként, amely később spontán lebomlik. Koncentrációját *in vivo* két enzim, a szuperoxid-reduktáz (SOR) és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) szabályozza.

Relatív kisméretű ion, egyaránt tekinthető anionnak és gyöknek. Valamelyest instabil molekula, melynek felezési ideje milliszekundumokban mérhető savas és fiziológiás pH tartományban. Meglehetősen erős oxidálószerként viselkedik, képes oxidálni átmeneti fémionokat, továbbá a dopamint, az adrenalint, vagy az aszkorbátot, ami hidrogén-peroxid képződéséhez vezet. [14]

A szuperoxid anion gyenge savként viselkedik, a hidroperoxi gyök ($HOO^{\bullet}$) konjugált bázisa ($pK_a = 4.88$). [9] A pH szabályozza a két részecske közötti eloszlást.

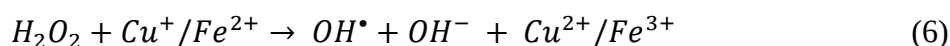
A szuperoxid anion a membrán közelében keletkezik, ahol a pH sokkal kisebb, mint a citoplazmában, ennek okán a savas forma, azaz a hidroperoxi gyök dominál. Hasonlóan a szuperoxid anionhoz, ez a részecske is lipidperoxidációs folyamatokat indukál, képes behatolni a sejtmembránba.

Az $O_2^{\bullet-}$ toxikus hatását annak köszönheti elsősorban, hogy károsítja a Fe-S központokat tartalmazó fehérjéket, például az akonitázt, a szukcinát-dehidrogenázt és a NADH-ubikinon-oxidoreduktázt. Emellett képes más, magánál is veszélyesebb reaktív részecskék keletkezéséhez is hozzájárulni, oxidatív láncreakciókat indítva el. A vas-kén fehérjékből

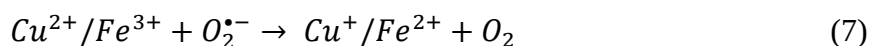
felszabaduló vas másodlagos, ugyancsak reaktív termékeket indukál, mint a hidroxilgyökök, valamint a peroxinitrit, melyeket a szuperoxid toxicitás fő tényezőjeként tartanak számon. [9] [12]

2.2.2. Hidroxilgyökök

A hidroxilgyökök hidrogén-peroxidból keletkezik, az úgynevezett Fenton-reakcióban, amelyet a Fe^{2+} vagy Cu^+ ionok katalizálják fehérjékhez, például ferritinnel, ceruloplazminnal komplex formában kötötten. (6) [5] [14]



Ebben a folyamatban a szuperoxid is szerepet játszik azáltal, hogy visszatermeli a Fe^{2+} vagy Cu^+ ionokat. (7):



E két reakciót nevezzük együttesen Haber-Weiss reakciónak, melyben fontos szerepet játszanak az átmeneti fémionok és hozzájárulnak a hidroxilgyökök képződéséhez. [5]

A hidroxilgyök nagyobb károsodást képes előidézni a sejtekben, mint a többi ROS, mivel rendkívül reaktív és nagyon mérgező. Nagy a reakcióképessége biomolekulákkal, melyekkel diffúzió kontrollált sebességgel reagál, így nem képes jelentős távolságot megtenni a sejten belül, ráadásul meglehetősen rövid felezési idővel bír. Ennek ellenére a keletkezésének helyén, kis sugárban jelentős károsodásokat okozhat.

Képes kölcsönhatásba lépni olyan makromolekulákkal, mint a DNS, fehérjék, szénhidrátok és a lipidek. A szuperoxid anionhoz hasonlóan a DNS-ben okozott károsodás daganatos megbetegedések kialakulásához vezethet. Ezenfelül képes redukálni a diszulfid kötéseket a fehérjékben, melynek következményeképp rendellenes térbeli elrendeződés alakul ki, ez pedig számos betegség kialakulását eredményezheti. [5] [8] [13] [14]

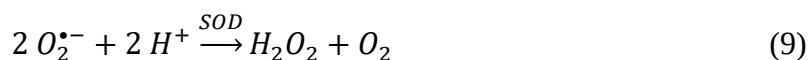
2.2.3. Hidrogén-peroxid

Főként szuperoxid-dizmutáz (SOD) által katalizált reakció során jön létre, de más enzimek, például a xantin-oxidáz is képes előállítani. [8]

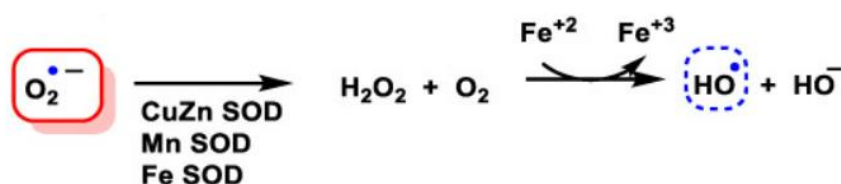
A SOR-ok a szuperoxid egy elektronos reakcióját segíti elő hidrogén-peroxiddá, melyhez 2 protonra van szükség minden egyes $O_2^{\bullet-}$ molekulához, valamint egy külső redukálószerre. (8)



Ezzel szemben a SOD-ok a szuperoxid anion diszproporciós reakcióját katalizálják, a reakció lejátszódása után dioxigén és hidrogén-peroxid képződik, miközben mindössze egyetlen protonra van szükség, illetve külső redukálószer sem igényel. (9) [2]



Mivel a molekulának nincs párosítatlan elektronja, így nem tekinthető szabadgyöknek, mégis már nagyon alacsony koncentrációban (10 μ M) is jelentős sejtkárosodásokat okozhat. Sejteken belül hajlamos felhalmozódni, vas- vagy rézionokkal kölcsönhatásba lépve károkat okozhat a lipidekben, DNS-ben, fehérjékben. E folyamat során a H_2O_2 reakcióba léphet ezekkel a fémionokkal, ami hidroxilgyökök keletkezéséhez vezet. [14]



2. ábra Hidroxilgyökök és hidrogén peroxid keletkezése szuperoxidból. [9]

2.3. Szuperoxid-dizmutáz

Az O_2 redukciója során keletkező intermediér állapotok nagy reaktivitásuk miatt a szervezet biomolekuláit képesek reakcióba vinni. A folyamat gyökös reakcióként valósul meg. Ezeknek a káros folyamatoknak a semlegesítése az aerob élő rendszerek kulcsfontosságú folyamata, a szuperoxid anion ártalmatlanítása oxidációval, redukcióval és diszproporcióval történik meg. Utóbbi két folyamat azért előnyösebb, mert 2 mól $O_2^{\bullet -}$ -t semlegesíthetünk egy lépésben, azonban ez hidrogén-peroxidot is termel, amelyet szintűgy semlegesíteni kell.

Az evolúció során a szuperoxid anion kémiai bontásához egy kétlépéses folyamat alakult ki az élő rendszerekben, melynek első lépésében a szuperoxid-dizmutáz (SOD) vesz részt. A SOD-ot a szabadgyökök elleni fő intracelluláris antioxidáns védelemnek tekintik. A SOD katalizálja a $O_2^{\bullet -}$ diszproporciós reakcióját oxigénné és hidrogén-peroxiddá. (10) [4] [15]



Ezt a reakciót nem szabályozott módon katalizálja számos, nem enzimátikus átmenetifém-komplex, viszont ezek jelenléte a szervezetben nem előnyös, mivel komplexképző tulajdonságuknak köszönhetően létfontosságú folyamatokba avatkozhatnak be.

A keletkező H_2O_2 -t a kataláz és a peroxidáz enzimek gyorsan oxigénné és vízzé alakítják egy kétlépeses folyamatban. Ezek az enzimek antioxidáns enzimek közé tartoznak, feladatuk a szervezet sejtjeinek védelme a ROS-ok ellen. [4]

A kutatók többféle SOD enzimet is felfedeztek, amelyek különböző fémionokat tartalmaznak. Ezek az enzimek oligomer fehérjékből állnak, így több alegységből épülnek fel. Az enzim működését olyan koenzimek végzik, mint a vas-, mangán-, nikkel- vagy réz- és cinkionok olyan módon, hogy fokozzák a SOD katalitikus aktivitás, amely a ROS-ok lebontásához szükségesek. A SOD alegységei két doménre oszlanak: az egyik domént α -hélixek alkotják, míg a másik domén α -hélixekből és β -lemezekből áll, a fémionkötő hely pedig a SOD két doménje között helyezkedik el. [15]

A Cu/Zn tartalmú SOD enzimek (SOD1) általában eukariótákban (sejtmaggal rendelkező organizmusokban) és néhány növény kloroplasztiszában találhatók. Vastartalmú SOD enzimek prokariótákban (sejtmaggal nem rendelkező organizmusokban), mint például növényekben és baktériumokban, míg mangántartalmú SOD enzimek a mitokondriumokban és baktériumokban fordulnak elő. [3] [4]

A SOD enzimek közül a legjobban ismert a Cu/Zn tartalmú. Szerkezete két kisebb alegységből áll, melyek mindegyike tartalmaz egy réz- és egy cinkiont. A két fémiont oxidált formájukban egy deprotonált imidazoláto gyűrű hídligandumként köti össze. Ezen túlmenően a réz(II)ion további három hisztidin imidazol nitrogénje, a cink(II)iont pedig két hisztidin imidazol nitrogénje és egy aszparaginsav karboxilát csoportja koordinálja. A cinkion koordinációs szférája közel tetraéderes, míg a rézioné meglehetősen torzult, négyzetes piramisos, valamint bipiramis geometria között képez átmenetet. Az enzimben a rézion képes az $\text{O}_2^{\cdot-}$ megkötésére. A dizmutálási reakció lényege, hogy a redoxi aktív rézcentrum egyik állapotban képes metastabilis $\text{O}_2^{\cdot-}$ oxidálására, míg egy másik állapotban annak redukálására. A folyamat hajtóereje a réz(II)ion affinitása a hisztidin imidazol nitrogénjéhez. A reakció rendkívül gyors ($k = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), emiatt közel van a diffúziós határhoz és így antioxidánsként viselkedve képes a citoszolból eltávolítani a szuperoxid aniont.

A vastartalmú SOD az evolúció korai szakaszában alakulhatott ki, amikor kis oxigénkoncentráció jellemezte a légkört. Ahogy az oxigénszint fokozatosan emelkedett, a vas hozzáférhetősége csökkent annak oxidációjának következtében. Az O_2 semlegesítésének feladatát egyre inkább átvették a mangánt tartalmazó, valamint a korábban említett Cu/Zn-tartalmú SOD-ok.

A vas- és mangántartalmú SOD-ok homológok, mivel alig van eltérés az enzim aktív centruma tekintetében. Ebben az esetben a fémion koordinációs szférájában három His, egy

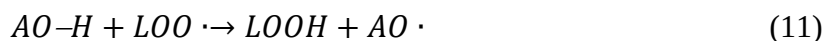
Asp és egy $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$ található. Továbbá az aktív centrum létrehozásában hidrogénkötéseken keresztül további oldalláncok, mint a Tyr, Trp, Gln és Asn is részt vesznek. Az elektrontranszfer folyamatot a Fe(III)/Fe(II) , illetve Mn(III)/Mn(II) redoxipárok közvetítik. [4]

2.4. Antioxidánsok

Az antioxidánsok olyan vegyületek, amelyek képesek eltávolítani a szabad gyököket, emellett megállítani azok termelődését. Ezen antioxidánsok egy részét képes a szervezet is megtermelni, továbbá vannak olyanok is, amelyeket csak táplálkozással tudunk bejuttatni szervezetünkbe. [16] [17]

Táplálékkal a szervezetünkbe jutó polifenolok, ezen belül a flavonoidok kulcsszerepet játszanak a szabadgyökök megkötésében. [20] Hatásuk abból ered, hogy megakadályozzák a lipidperoxidációs folyamatokat. Kelátképző sajátságuk révén kötik a redoxi aktív fémionokat és csillapítanak más, ROS-okat érintő folyamatokat. Ezen vegyületeket leginkább gyümölcsökben, zöldségekben, teákban, borokban és a kakaóban vannak jelen nagyobb mennyiségben. [19] A flavonoidok olyan molekulacsoportot képviselnek, amelyek antioxidáns tulajdonsággal rendelkeznek. [16] A flavonoidok a polifenolok közé sorolhatók, ezen származékok között számos olyan molekula található, melyek több fenolos hidroxilcsoportot tartalmaznak. Flavonoidok, illetve az izoflavonoidok, amelyek különböző pozícióban fenolos hidroxilcsoporttal szubsztituáltak, rendkívül nagy szerkezeti változatossággal rendelkeznek, ma már körülbelül 6000 képviselőjük molekulaszerkezete ismert.

A láncmegszakító antioxidánsok, mint a flavonoidok hatékonyan lassítják a lipidperoxidáció folyamatát, mivel képesek megszakítani a szabad gyökök láncreakcióját, így megakadályozva a további szabad gyökök keletkezését. (11):



ahol: AO-H: antioxidáns vegyület, $\text{LOO} \cdot$: lipidperoxigyök, $\text{AO} \cdot$: antioxidánsból képződött szabad gyök, LOOH: lipidhidroperoxigyök.

Azok az antioxidánsok, melyek gátolják a lipidperoxidáció folyamatát, azok láncmegszakítóak, fémkomplekképzők, és $^1\text{O}_2$ közömbösítő hatásúak. A rájuk jellemző reakció során maguk is szabadgyökké alakulnak, azonban a reaktív szabad gyököktől eltérően, ezek relatíve stabil, hosszú élettartamú gyököknek tekinthetők. [20]

A kromonok a flavonoid molekulacsoport családjába tartoznak, fémion-megkötő képességgel rendelkeznek, amely hozzájárul biológiai hatásaikhoz. Antioxidáns hatásuk úgy

valósul meg, hogy közvetlenül reagálnak a szabad gyökkel, vagy ROS képződésében részt vevő fémionokat kötnek meg, segítve ezzel a sejtek védelmét. [18]

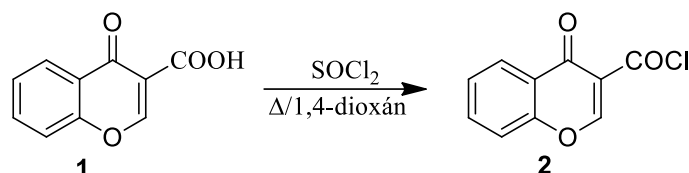
3. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek

A felhasznált vegyszerek kereskedelmi forgalomból származnak, továbbá felhasználásuk közvetlenül, tisztítás nélkül történt. A titrálások kivitelezésére $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$ pontosan ismert koncentrációjú NaOH-oldatot használtunk. A ligandumok és a réz(II)ionok közötti komplexképződés folyamatainak vizsgálatára pontosan ismert koncentrációjú CuCl_2 -oldatot használtunk. A SOD aktivitás méréseket NBT, xantin-oxidáz enzim és xantin felhasználásával valósítottuk meg (Sigma-Aldrich).

3.2. A CroHis ligandum szintézise

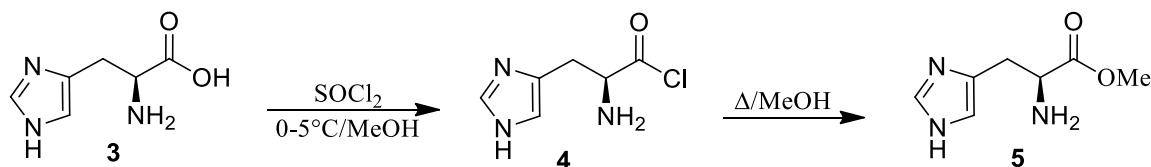
3.2.1. 4-oxo-4*H*-kromén-3-karbonilklorid (2) előállítása



3. ábra A 4-oxo-4*H*-kromén-3-karbonilklorid előállítása.

Kromén-3-karbonsavat (**1**, 1508,3 mg; 7,92 mmol; 1 ekv.) háromnyakú lombikba mértük be, majd 1,4-dioxánt (25 mL-t) öntöttünk hozzá folyamatos kevertetés mellett, hűtés nélkül. A megfelelő mennyiségű SOCl_2 -t (4,02 mL; 7 ekv.) hozzácsepegtettük az oldathoz és olajfürdőn, 150°C -on melegítettük. A karbonsav 50 perc alatt alakult át, amelyet vékonyréteg kromatográfiával követtünk nyomon, majd rotációs vákuumbepárló segítségével az oldószert eltávolítottuk. Az előállítás sémáját a 3. ábra mutatja be.

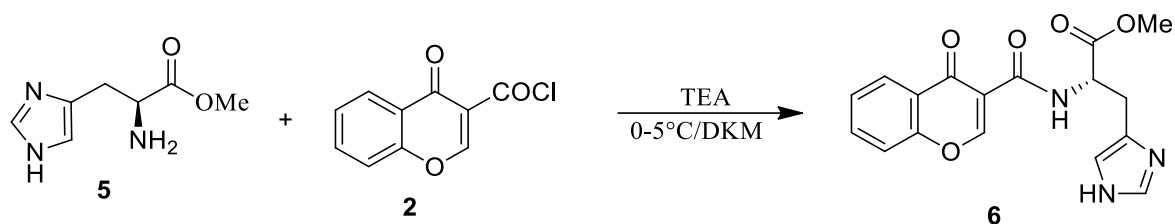
3.2.2. Hisztidin-metilészter előállítása



4. ábra Az *L*-hisztidin-metilészter (**5**) szintézise.

Az *L*-hisztidint (300,91 mg; 19,3 mmol; 1 ekv.) egynyakú lombikba mértük be és folyamatos kevertetés és hűtés mellett oldottuk a megfelelő mennyiségű MeOH-ban (70 mL) és SOCl_2 -t (2,10 mL; 1,5 ekv.) csepegtettünk hozzá. Ezt követően refluxáltattuk 2 óra hosszát. Az oldószert rotációs vákuumbepárlón távolítottuk el. Fehér kristályos **5** anyagot kaptunk (4,59 g; kitermelés: 98%). A reakciót a 4. ábra mutatja be.

3.2.3. Az amidkötés kialakítása

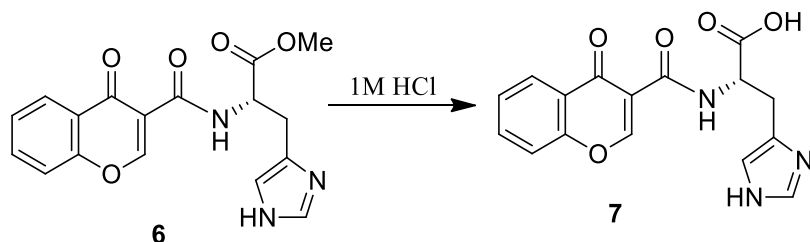


5. ábra Az S-metil-3-(1*H*-imidazol-4-il)-2-(4-oxo-4*H*-kromén-3-karboxamido)propanoát (6) előállítása.

A készített hisztidin metilésztert (5; 1,918 g; 7,93 mmol; 1 ekv.) háromnyakú lombikba mértük be. Feloldottuk 40 mL DKM-ban kevertetés mellett. Jeges hűtést alkalmazva adagoltuk hozzá megfelelő mennyiségű TEA (3,31 mL; 4 ekv.) oldatot. Ezt követően az elegyhez később további 10 mL DKM-et adtunk, mivel a hisztidin metilészter nem oldódott fel teljesen.

Az előzőleg elkészített 2 savkloridot is szintén DKM-ben (25 mL) oldottuk és cseppenként adtuk hozzá a feloldódott 5 hisztidin metilészterhez. Az elegy 10 perc után halványsárga színű lett, valamint 40 perc alatt a teljes mennyiségű savkloridot hozzá csepegettük. Egy napi kevertetés után kiindulási anyagot már nem tartalmazott a reakcióelegy, ezért feldolgoztuk azt. A tisztítás érdekében extrahálást alkalmaztunk, 1x25 mL telített NaCl oldattal, 2x30 mL telített NaHCO₃ oldattal, valamint 2x30 mL vízzel. Ezt követően a szerves fázist MgSO₄-on szárítottuk, szűrést követően az oldószert csökkentett nyomáson távolítottuk el. A kapott 6 szilárd anyag citromsárga színű volt. (2,147 g; kitermelés: 79%). Az amidkötés kialakítását az 5. ábra mutatja be.

3.2.4. A védőcsoport eltávolítás



6. ábra A védőcsoport eltávolítása.

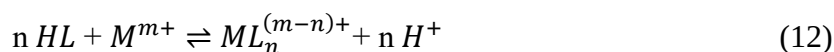
Egynyakú lombikba mértük a 6-os hisztidin-metilésztert (2,147 g; 6,290 mmol). Kevertetés mellett 1 M-os HCl-t (40 mL) öntöttünk hozzá, majd az elegyet 150 °C-on 3 órán keresztül kevertettük. A reakció követése HPLC segítségével történt. A HPLC-s kromatogramokat Knauer Azura típusú készüléken rögzítettük. A detektálás fotometriásan történt 254 nm hullámhosszon. Ezután a reakcióelegyet 1 M-os NaOH oldattal semlegesítettük,

a kivált szilárd szennyezőt, szűréssel eltávolítottuk. Az így kapott oldat tartalmazta a végterméket és a felesleges oldószert liofilizálással eltávolítottuk. A szintetizált nyers végterméket preparatív HPLC-vel tisztítottuk víz és acetonitril felhasználásával, amelyek 5 mM trifluorecetsavat tartalmaztak. Az áramlási sebesség 21,2 mL/perc volt. A tisztítás után az oldószert liofilizálással távolítottuk el. A védőcsoport eltávolítását a 6. ábra mutatja be.

3.3. pH-potenciometria

A komplexképződési folyamatokat jellemző protonálódási állandók/egyensúlyi állandók ($\log K_a$) és a réz(II)-komplexek stabilitási állandóinak ($\log \beta_{pqr}$) meghatározásához pH-potenciometriát, valamint a réz(II)/kromén-3-karbonsav rendszer esetén pH-potenciometriával kombinált UV-látható spektroszkópiát alkalmaztunk. Ennek az eljárásnak az alapja, hogy komplexképződést követően az oldat pH-ja megváltozzon, mivel a fémion jelenlétében a ligandum protonálódási folyamatai módosulnak.

A komplexképződési reakciók során kialakul egy kompetíciós reakció a fémion (M^{m+}) és a hidrogénion (H^+) között, amely a következő egyenlettel (12) adható meg:



A bruttó komplexképződési folyamat általános alakját pedig a (13) egyenlet szemlélteti:



ahol M: a fémion, L: a ligandum teljesen deprotonált formája, H: hidrogénion, p,q,r: sztöchiometriai együtthatók.

Az alkalmazott módszer alapján a képződő komplexek stabilitási állandói a (14) egyenlettel számolhatók:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (14)$$

Az oldategyensúlyi vizsgálatokat 25.0 ± 0.1 °C-on, DMSO:víz 30:70 (m/m)% oldószerkeverékben végeztük. A titrálás kivitelezése karbonátmentes NaOH-oldattal történt. A bázis, valamint a sósav koncentrációját pH-potenciometriás titrálásokkal határoztuk meg. A titrálásokhoz 785 DMP Titrino (Metrohm) automata bürettát és pH-mérőt használtunk, amely Metrohm kombinált elektróddal (6.0234.100) volt felszerelve. Az elektródrendszerrel a $pH = -\log[H^+]$ skálára történő konvertálás DMSO/víz oldószerkeverékben történt erős sav erős bázissal történő titrálásával, hasonlóan az Irving és munkatársai által javasolt módszerhez. Ilyen

körülmények között a vízion szorzat átlagos értéke $pK_w = 14,33 \pm 0,01$ volt, ami jól egyezik a szakirodalmi adatokkal. [27]

3.4. UV-látható spektroszkópia

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 a ligandumra (MLCT) töltés áthelyeződés történik. Oktaédres geometriájú réz(II)-komplexek esetén gerjesztése során a t_{2g} orbitálról kerül az elektron az e_g orbitálra, miközben elnyeli a megfelelő energiájú elektromágneses sugárzást. Amikor az elektron visszatér alapállapotába, az energiakülönbségnek megfelelő hullámhosszúságú fényt bocsát ki. Az elnyelt és kibocsátott fény a látható színtartományba esik, így az átmenetifém-komplexek színesek.

Vizsgálataink során Agilent Carry 60 (Agilent Technologies) UV-Vis fotométert használtunk. A spektrumok rögzítése 1,00 cm úthosszúságú küvettában történt 230 – 800 nm hullámhossztartományban.

3.5. Cirkuláris dikroizmus

A CD spektroszkópia olyan spektroszkópai módszer, amely a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapszik. A fémkomplexek optikai aktivitását az okozhatja, hogy már maga a ligandum is rendelkezik aszimmetria centrummal, valamint az is tényező lehet, hogy az aszimmetria centrum akkor alakul ki, amikor a ligandum koordinál a fémionhoz. A CD spektrumok általában több információt hordoznak magukban az UV-látható spektrumokhoz képest, mivel az elektronátmentek viszonylag keskeny sávokkal jelentkeznek, emiatt átfedésük ritkán fordul elő, illetve az átmenet előjele is szerkezeti információkat hordoz magában.

Az optikailag aktív anyagok kölcsönhatása a síkban polarizált fény balra és jobbra cirkulárisan polarizált komponensével reagálva eltérő mértékű. A kilépő fénysugár elliptikusan polarizálttá válik. A cirkuláris dikroizmus a síkban polarizált fény két komponensének abszorpciója, amely a teljes abszorpciónak kb. 1 %-át teszi ki.

A CD spektrumok rögzítése JASCO F810 CD spektropolariméter segítségével történt. A spektrumokat 1 mm-es vagy 1 cm-es kvarcküvettában, 200–800 nm hullámhossz tartományban rögzítettük 25°C hőmérsékleten.

3.6. Egykristály röntgendiffrakció

A CroHis ligandum sósavas metanolos oldatának, továbbá a Cu(II)/CroHis 1:1 arányú rendszer lúgos metanolos oldatának lassú bepárlásával röntgendiffrakcióra alkalmas kristályokat nyertünk. A kivált egykristályok röntgendiffrakciós adatainak gyűjtését Dr. Bényei Attila egyetemi docens végezte el Bruker D8 VENTURE diffraktométerrel a CroHis ligandum esetén. Az adatokat az OLEX² [22] grafikus programba integrált ShelXT [23] (a diffrakciós adatok megoldáshoz), a ShelXL [24] (a szerkezet finomításához) és a validálására a PLATON [25] segédprogramokkal dolgoztuk fel. Az ábrákat a Mercury Programmal készítettük el. [26]

3.7. ESR spektroszkópia

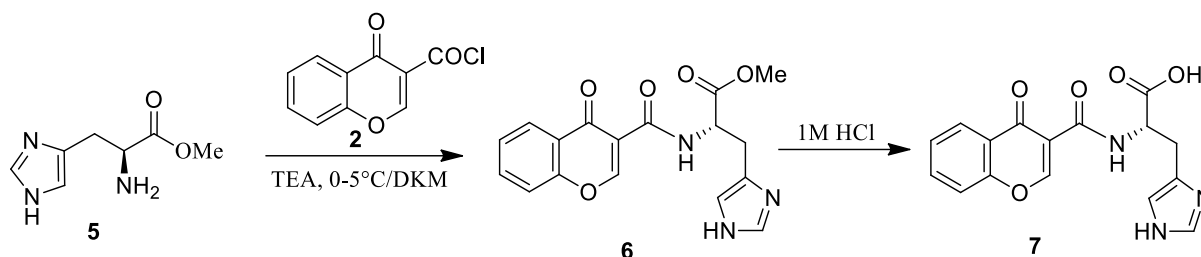
Az X-sávú CW-ESR spektrumok rögzítése Bruker EleXsys E500 spektrométer segítségével történt Dr. May Nóra V. (HUN-REN-TTK, Budapest) segítségével. A spektrumok rögzítésekor az alábbi akvizíciós paramétereket alkalmaztuk: mikrohullám frekvenciája: 9,4 GHz, mikrohullám erőssége: 13 mW, amplitúdómoduláció: 5 G, frekvenciamoduláció: 100 kHz. A minták spektrumait 77 K-en, folyékony nitrogén alkalmazása mellett rögzítettük

3.8. SOD aktivitás vizsgálat

A ligandumok és réz(II)-komplexeinek SOD aktivitását az irodalomban található xantin/xantin-oxidáz/NBT rendszeren alapuló módszerrel vizsgáltuk fiziológiás pH-n, foszfát puffer alkalmazása mellett. A mérés során a xantin és a xantin-oxidáz az oldott oxigénből generálja a szuperoxid aniont. Ez reakcióba lép a nitroblue-tetrazónium-klorid nevű indikátorral, ami ennek hatására diformazánná alakul és a változás 560 nm-en, spektrofotometriás módszerrel detektálható. A reakció első részében a reakcióelegy nem tartalmazta a ligandumot vagy réz(II)-komplexét. Ezt követően a vizsgálat 4. perce után a mintához hozzáadjuk a komplexet, ekkor az NBT és a SOD mimetikum között kompetíció alakul ki a szuperoxid anion iránt. Ez az eddig lineáris kinetikai görbén egy törést okoz. A két egyenes meredekségéből, adott komplex koncentráció mellett az inhibíció mértéke meghatározható. Több különböző komplex koncentráció mellett elvégezve a kísérletet és ábrázolva a kapott inhibíció értékeket a komplex koncentrációjának függvényében az IC₅₀, vagyis az 50%-os inhibícióhoz tartozó koncentrációérték meghatározható.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Szintézis és karakterizálás



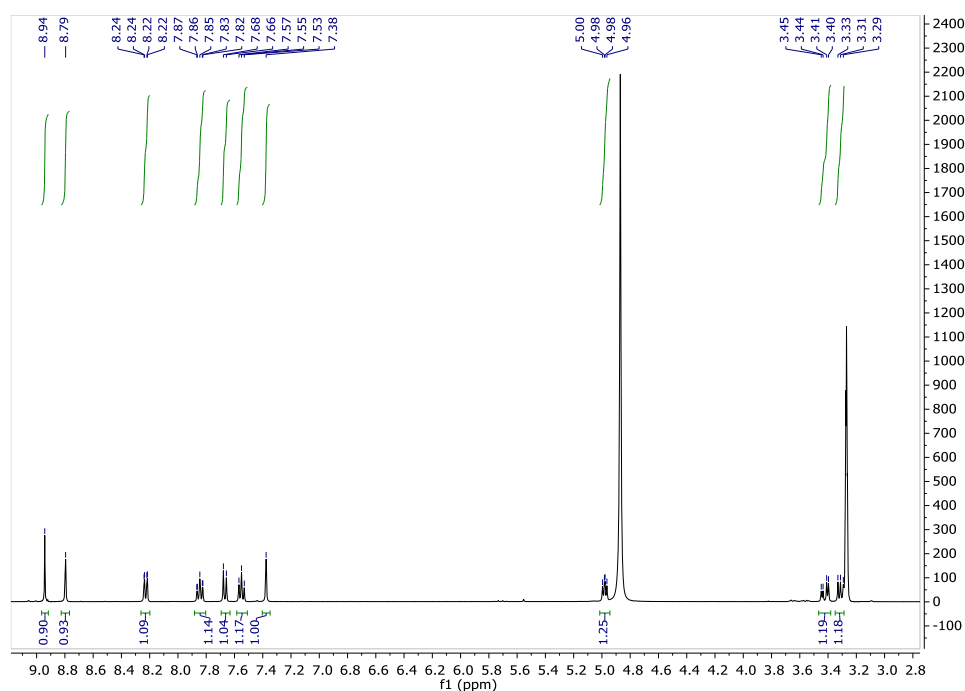
7. ábra A CroHis ligandum (7) előállítási sémája.

Első lépésben a kromén-3-karbonsavból (1) előállítottuk a 2 savklorid származékot SOCl_2 segítségével. Párhuzamosan az 5 *L*-hisztidin-metilészter származékot is előállítottuk metanolos közegben SOCl_2 -vel *L*-hisztidinből kiindulva. Az előállított kiindulási anyagokból végrehajtottuk az amidkötés kialakítását DKM-os közegben, TEA felhasználásával. Az így képződött 6-os metilészter védett ligandum hidrolízisével kaptuk a célvegyület 7 szabad karbonsav funkcióval rendelkező célligandumot (7. ábra).

A kapott termék szerkezetének vizsgálatára és azonosítására NMR vizsgálatokat végeztünk, oldószerként MeOD-t használtunk.

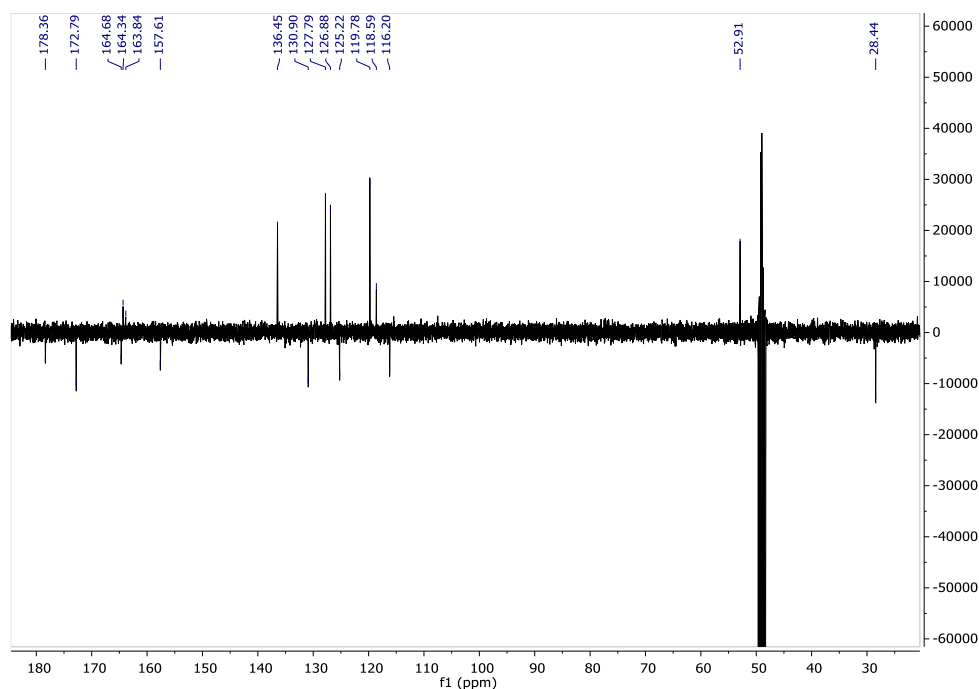
A CroHis ^1H NMR (8. ábra) spektrumának aromás tartományában 6 db jelet várunk: 4 db hidrogént a benzol gyűrűhöz, valamint 2 db hidrogén az imidazol gyűrűhöz rendelhető. Azonban 7 db jel jelent meg. Ez arra utal, hogy az egyik jel a karboxilát csoporton lévő hidroxil-csoport protonjához rendelhető. Mivel az imidazol gyűrűben található 2 db hidrogén nem csatol más hidrogénnel, így ezek igazolására szinglet jelet várunk, amely meg is figyelhető 8,8 és 7,4 ppm-nél.

Alifás tartományban, az oldószer csúcs mellett, 5 ppm-nél található jel a CH csoporthoz rendelhető, míg a kb. 3,4 ppm-nél a CH_2 csoporthoz rendelhető, így ebben a tartományban lévő protonokat is igazoltuk.



8. ábra A CroHis ligandum ^1H NMR spektruma (MeOD).

A ^{13}C NMR spektrumok (9. ábra) esetén a pozitív és negatív fázisú jelek alapján megállapítható, hogy az adott szénatom hány darab hidrogénatommal van kötésben. A negatív fázisú jelek páros számú hidrogént vagy hidrogén nélküli szénatomokat jelölnek, míg a pozitív fázisúak páratlan számú hidrogént jeleznek az adott szénatomon. Az alifás tartományban a 28,4 ppm kémiai eltolódásnál egy páros számú hidrogént tartalmazó CH_2 -csoporthoz asszignálható, míg az 52,9 ppm-hez tartozó jel egy páratlan hidrogénnel rendelkező CH -csoporthoz rendelhető. A szintetizált molekulában 7 db terciér szénatom található, amelyekhez nem kapcsolódik hidrogén. Ez a spektrumon is igazolható a negatív fázisú jelekből az aromás tartományban. A spektrumból az 1 db hidrogén atomot tartalmazó szénatomok is igazolhatók, amelyek a következők: 4 db a benzol gyűrűhöz, 2 db pedig az imidazol gyűrűhöz rendelhető jelek.



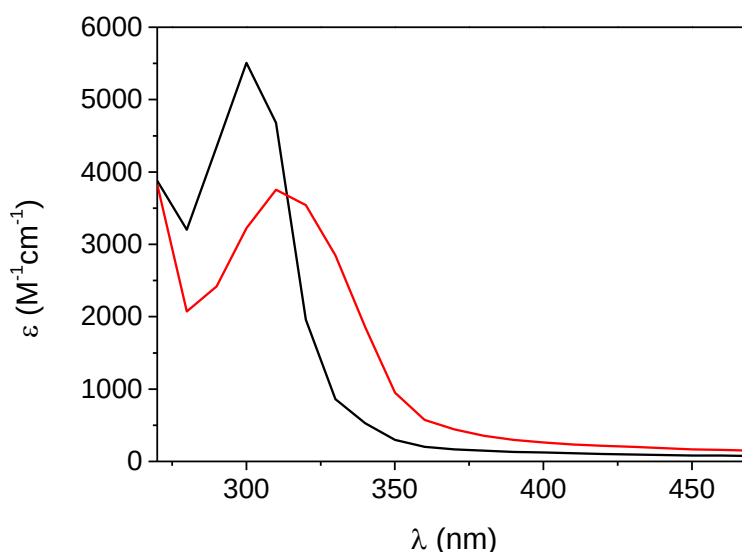
9. ábra A CroHis ligandum ^{13}C NMR spektruma (MeOD).

4.2. A ligandumok sav-bázis tulajdonságai és a CroHis ligandum szerkezete

A CroHis protonálódási folyamatait pH-potenciometria segítségével határoztuk meg 30 (m/m)%-os DMSO-víz oldószerelegyen. A kromén-3-karbonsav rossz oldhatósága miatt ugyanakkor híg oldatban dolgoztunk, a ligandum savi disszociációs állandóit pH-potenciometriával kombinált UV-látható spektroszkópia módszerével állapítottuk meg. Vélhetően a CroHis esetében a hisztidinnel történő konjugáció növelte a kromén-3-karbonsav oldhatóságát, aminek oka a hisztidin imidazólium csoportja.

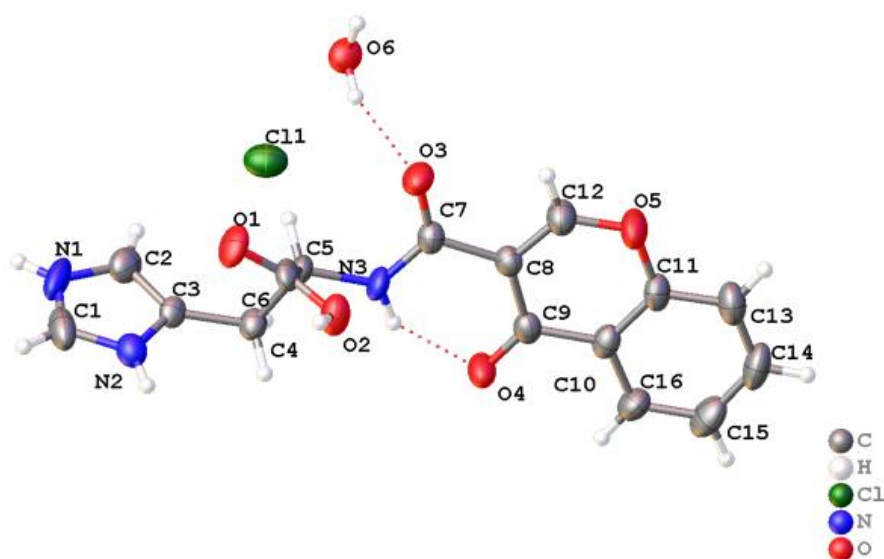
A kromén-3-karbonsav esetében vizsgálataink során egy savi disszociációs állandót határoztunk meg ($\text{pK}_a = 3,4 \pm 0,1$) amely a karboxilcsoport deprotonálódásához rendelhető érték. Ezt a deprotonálódást az UV-látható spektrumban a 320 nm-nél megjelenő abszorbanciaváltozással jól lehet követni, a deprotonálódás hatására az abszorpciós maximum helye kb. 20 nm-rel a nagyobb energiájú tartomány felé tolódik el. A PSEQUAD program segítségével számítottuk az egyes részecskék moláris abszorbanciáját, amelyet a 10. ábra mutat be.

A CroHis ligandum esetében két deprotonálódásra képes csoport pK_a értékeit határoztuk meg, amely összhangban van a ligandum szerkezetével. A kisebb pK_a érték ($\text{pK} = 3,01 \pm 0,05$) a hisztidin aminosav karboxilcsoportjának deprotonálódásához rendelhető, míg a nagyobb ($\text{pK} = 7,09 \pm 0,04$) az imidazóliumcsoport deprotonálódásához. Fiziológiás körülmények között a kromén-3-karbonsav és a CroHis ligandumok egyszeres negatív töltéssel bírnak.



10. ábra A kromén-3-karbonsav protonált (piros) és deprotonált formáinak (fekete) moláris abszorpciája.

A CroHis ligandum sósavas, metanolos oldatának lassú bepárlásával egykristály röntgendiffrakcióra alkalmas kristályokat nyertünk. Az aszimmetrikus egység (11. ábra) protonált formában tartalmazza a ligandumot, vagyis mind a karboxil, mind pedig az imidazol csoportok protonált formában vannak jelen. Ilyen módon a ligandum egyszeres pozitív töltéssel bír, amely töltést egy kloridion, mint ellenion kompenzál, továbbá egy vízmolekula is megtalálható az elemi cellában. Ez a vízmolekula hidrogénkötést alakít ki az amidkötés karbonil oxigén atomjával. Egy további, intramolekuláris hidrogénkötést is találunk a molekulában, amely az O4 karbonil oxigén és az amidkötés NH protonja között alakul ki.



11. ábra A CroHis ligandum ORTEP diagramja 50%-os valószínűség mellett.

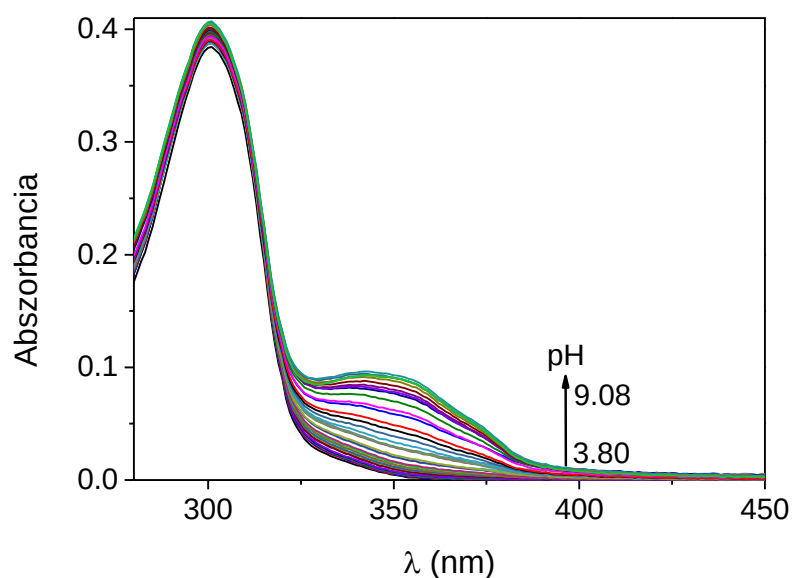
4.3. A ligandumok réz(II)ionnal alkotott komplexei

A két vizsgált ligandum réz(II)-ionokkal alkotott komplexeinek stabilitási állandóit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat A vizsgált ligandumok és a Cu(II)-komplexek stabilitási állandói. ($I = 0,2 \text{ M KCl}$, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

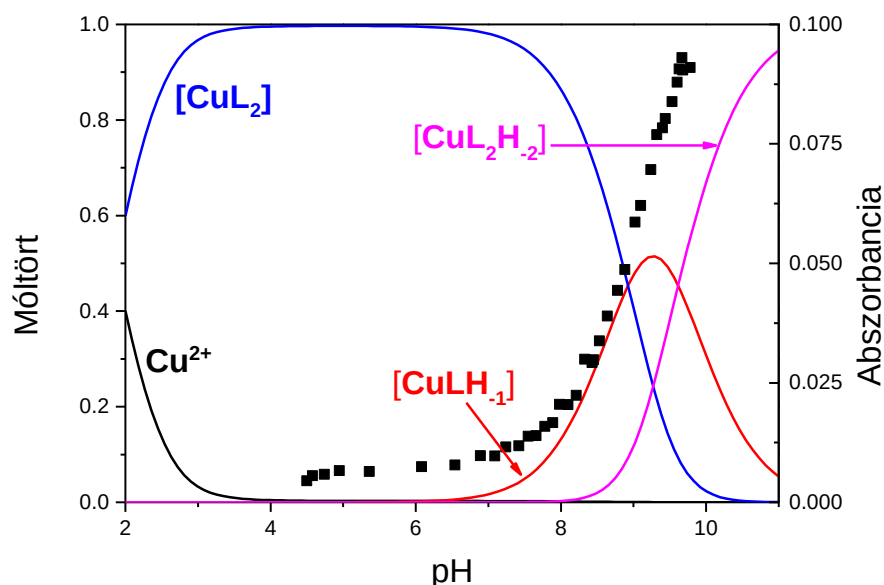
kromén-3-karbonsav		CroHis	
Részecske	$\log\beta$	Részecske	$\log\beta$
CuL_2	11.91 ± 0.09	Cu_2L_2	14.99 ± 0.05
CuLH_{-1}	-1.53 ± 0.05	$\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_{-2}$	7.69 ± 0.02
$\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$	-6.6 ± 0.1		

A réz(II)/kromén-3-karbonsav esetében az oldategyensúlyi vizsgálatokat UV-látható spektroszkópiával kombinált pH-potenciometriás titrálással végeztük el 1:1, 1:2 és 1:3 fémion/ligandum koncentrációarányú rendszerekben. Az így nyert pH-függő spektrumsort a réz(II)/kromén-3-karbonsav 1:3 arányú rendszere esetében az 12. ábra mutatja be, míg a stabilitási állandók alapján számított részecske eloszlási diagrammot a pH-függvényében pedig a 13. ábra. Az egyensúlyi modell megalkotása során a CuL_2 , CuLH_{-1} és $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ összetételű részecskék képződését vettük figyelembe. A CuL összetételű komplex képződését ilyen körülmények között nem tudtuk kimutatni.



12. ábra A Cu(II)/kromén-3-karbonsav 1:3 arányú rendszer pH-függő UV-látható spektrumai

$c_{\text{Cu}} = 0,0211 \text{ mM}$, $c_{\text{lig}} = 0,0631 \text{ mM}$.

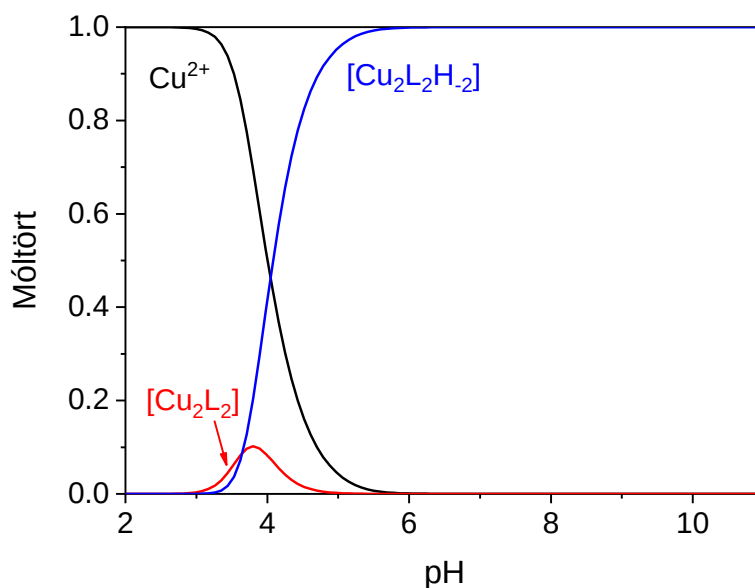


13. ábra Cu(II)/kromén-3-karbonsav 1:3 arányú rendszer koncentráció eloszlás diagramja a pH függvényében és az 350 nm-en ábrázolt abszorbancia értékek a pH függvényében.

$c_{\text{Cu(II)}} = 0,0211 \text{ mM}$, $c_{\text{lig}} = 0,0631 \text{ mM}$.

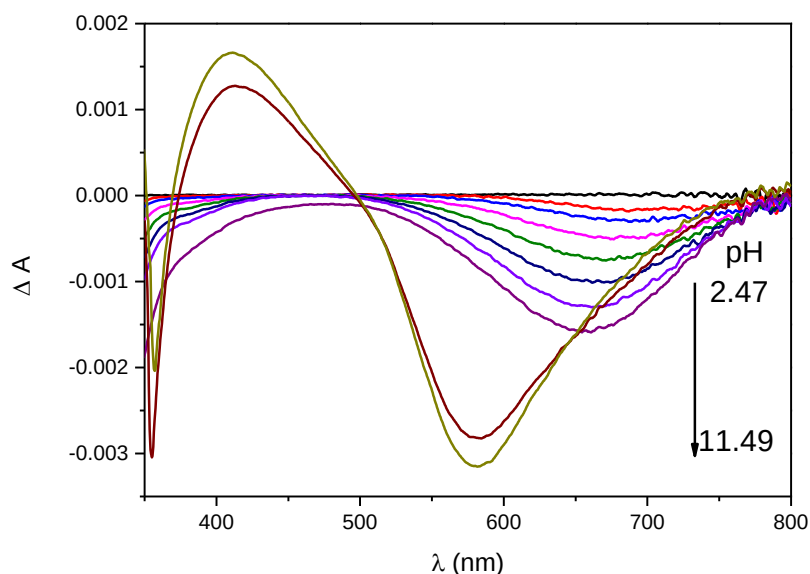
Savas körülmények között ($\text{pH} > 2$) a CuL_2 összetételű komplex képződik, amely széles pH-tartományban domináns részecske. A komplexben egy ligandum a fémionhoz a karboxilátcsoport oxigénatomján és a heterociklus O4 atomján keresztül koordinálódik egy hattagú kelátgyűrű kialakulásával. A pH növelésével a CuLH_{-1} és $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ összetételű részecskék képződnek. Ezen komplexek esetén a fémionhoz koordinált vízmolekulák deprotonálódását és koordinációját feltételezzük, amelynek eredményeképpen vegyes hidroxokomplexek képződnek. Ezen komplexek képződését spektrális változás is kíséri, az UV-látható spektrumban 350 nm-en található elnyelési sáv növekszik a CuLH_{-1} és $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ összetételű részecskék képződésével, alátámasztva ezzel az egyensúlyi modell helyességét. A $\text{CuL}_2\text{H}_{-2}$ összetételű komplex esetében a koordinációs szféra átrendeződését feltételezzük, amelynek eredményeképpen az O-heterociklus oxigénatomja kiszorul a fémion koordinációs szférájából és helyére a hidroxido csoport kerül.

A CroHis rendszer esetében az egyensúlyi modellt a Cu_2L_2 és a $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_{-2}$ komplexek képződésének figyelembevételével írtuk le. Fontos megjegyezni, hogy a pH-potenciometria nem tud különbséget tenni monomer és dimer részecskék között, ugyanakkor ESR spektroszkópiával (lásd később) igazoltuk, hogy a Cu(II)/CroHis rendszer esetén dimer részecskék képződnek a vizsgált pH-tartományban, monomer részecskék megjelenését nem tudtuk kimutatni.



14. ábra Cu(II)/CroHis 1:1 arányú rendszer koncentráció eloszlás diagramja a pH függvényében. $c_{\text{Cu(II)}} = 2,21 \text{ mM}$, $c_{\text{lig}} = 2,35 \text{ mM}$.

Ellentétben a réz(II)/kromén-3-karbonsav rendszerrel, a komplexképződés enyhén savas pH tartományba tolódik el. A 14. ábra szemlélteti, hogy a komplexképződés 4-es pH felett indul a Cu_2L_2 komplex megjelenésével. Ennek a részecskének a képződését a CD spektroszkópia is alátámasztotta (15. ábra), ugyanis a Cu_2L_2 összetételű komplex képződésével párhuzamosan 650 nm-nél egy negatív Cotton-effektusú csúcs jelenik meg. Ez a csúcs az imidazol-nitrogén koordinációjához rendelhető, így a Cu_2L_2 összetételű komplexben egy réz(II)iont a heteroaromás gyűrű karbonil oxigén atomja és a karboxilát csoport, valamint a másik CroHis alegység hisztidin imidazol nitrogénje koordinálja. A pH növelésével ($5 < \text{pH}$) extra lúgfogyasztó folyamatban $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2$ részecske képződik, amely komplex képződése a CD spektrum teljes megváltozását eredményezi. A nagy intenzitású, 580 nm-nél megjelenő negatív, valamint a 410 nm-nél található pozitív Cotton-effektus csúcsok az amidkötés nitrogén atomjának fémion indukált deprotonálódásához és koordinációjához köthető. Ilyen módon a fémion koordinációs szférájában ($\text{O}, \text{O}, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-$) donorcsoportok vannak jelen.



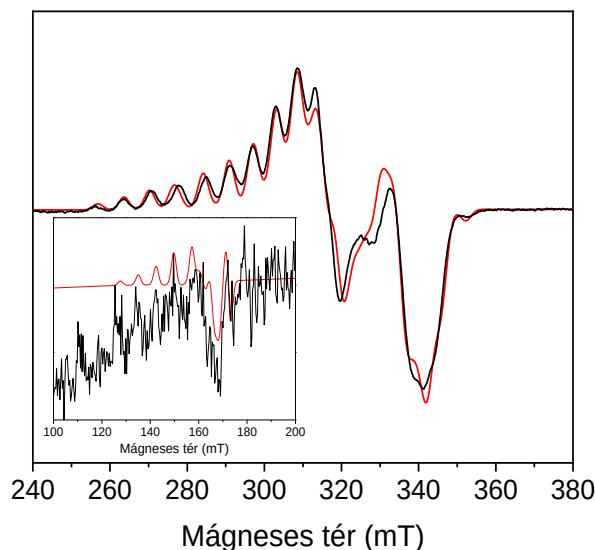
15. ábra Cu(II)/CroHis 1:1 arányú rendszer pH-függő CD spektrumai. $c_{\text{Cu(II)}} = 2,19 \text{ mM}$, $c_{\text{lig}} = 2,10 \text{ mM}$.

Egy együttműködés keretein belül lehetőségünk volt a Cu(II)/CroHis 1:1 arányú rendszer pH-függő ESR spektrumait rögzíteni. A fiziológiás pH-n képződő komplex ESR spektrumát a 16. ábra mutatja be. Az ábrán megjelenő 7 vonalból álló jelcsoport igazolja, hogy a mintában dimer részecske képződik, továbbá megjelenik „félter” értéken ($\sim 160 \text{ mT}$) egy újabb jelcsoport. Az ilyen típusú ESR spektrumok szimulációjával lehetőség van meghatározni a Cu(II)-Cu(II) kötéstávolságot, amely $4,95 \text{ \AA}$ -nek adódott. Az ESR spektrum szimulációjával ugyanakkor további információt is kaptunk a Cu(II)-centrumok egymáshoz viszonyított elhelyezkedéséről. Ezek alapján a két Cu(II) ekvatoriális síkja egymás alatt és felett helyezkedik el, valamint a két Cu(II) centrum kis mértékben el van tolódva egymáshoz képest a síkban. [21]

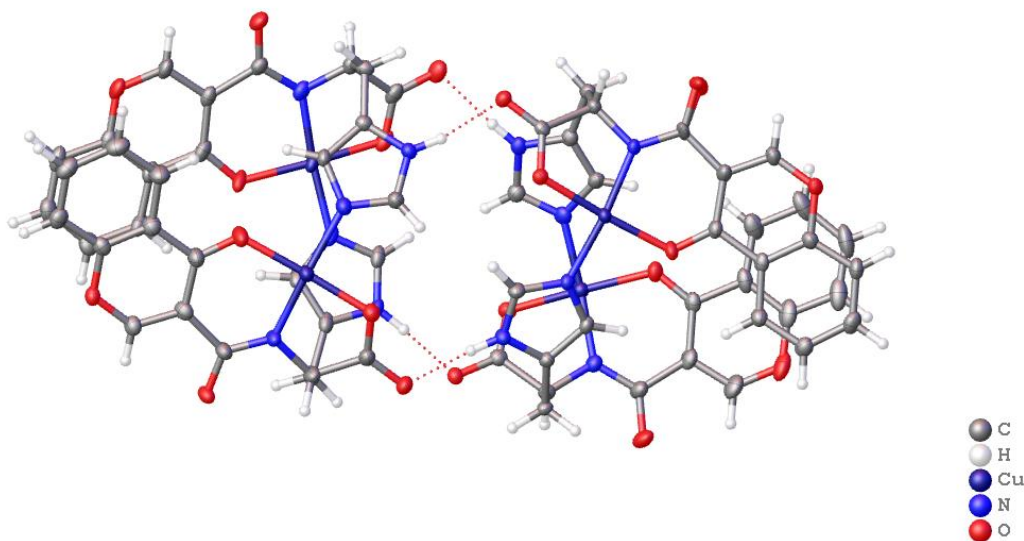
A Cu(II)/CroHis 1:1 arányú rendszer lúgos-metanolos oldatának lassú bepárlásával egykristály röntgendiffrakcióra alkalmas kristályokat nyertünk, az aszimmetrikus egységet az 17. ábra mutatja be. Jól látható, hogy az oldatfázisban is feltételezett szerkezetű és sztöchiometriájú $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_{-2}$ komplex képződik, ahol egy monomer egységet a karboxilát oxigén, az amid-nitrogén és a heteroaromás karbonil oxigén koordinál, valamint egy másik ligandum imidazol-nitrogénje is részt vesz a koordinációban. Ennek eredményeképpen a hisztidin imidazol-nitrogénje köt össze két monomer egységet. Fontos megjegyezni, hogy a ligandumok heterociklusos részei egymás alatt és felett helyezkednek el, amelyeket π -stacking kölcsönhatás stabilizál.

Összhangban az ESR spektroszkópia eredményeivel a két Cu(II) centrum valóban eltolódik egymás mellett, illetve a két ekvatoriális sík egymás alatt és felett helyezkedik el. A röntgenkristallográfia alapján meghatározott Cu(II)-Cu(II) kötéstávolság $4,52 \text{ \AA}$, amely kis

mértékben rövidebb, mint amit az ESR spektroszkópia alapján határoztunk meg. Ennek vélhetően az az oka, hogy szilárd fázisban a kristály stabilizálódásának érdekében a szerkezet kompaktabb lesz.



16. ábra A réz(II)/CroHis 1:1 arányú rendszer mért (fekete) és számított (piros) CW X-sávú ESR spektruma 77 K-en mérve. A beszűrt ábrán a „félter” értéknél megjelenő jelcsoport látható.

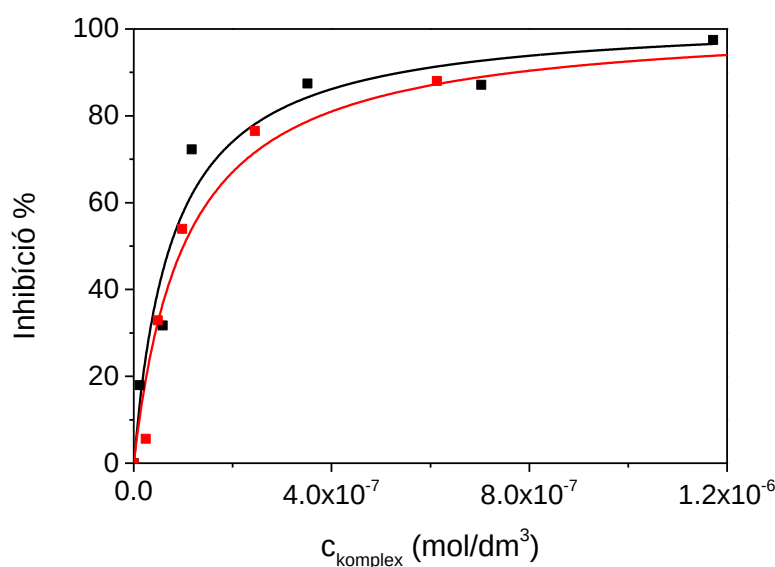


17. ábra A réz(II)/CroHis rendszerben képződő komplex egykristály röntgendiffrakció alapján kapott ORTEOP diagramja, 50%-os valószínűséggel ábrázolva.

4.4. Szuperoxid-dizmutáz aktivitás

A Cu(II)/kromén-3-karbonsav 1:2, valamint a Cu(II)/CroHis 1:1 arányú rendszer SOD aktivitását a xantin/xantin-oxidáz/NBT modellrendszer segítségével vizsgáltuk. Vizsgálatainkat kiegészítettük a ligandumok SOD aktivitásának a vizsgálatával is, ugyanakkor

ezeknél a rendszereknél nem tapasztalunk inhibíciót, vagyis a ligandumok önmagukban nem képesek a szuperoxid gyökanyon bontására. A réz(II)-komplexekre kapott inhibíció görbéket a koncentráció függvényében a 18. ábra mutatja be. Az 50%-os inhibícióhoz tartozó komplex koncentráció Cu(II)/kromén-3-karbonsav esetében 70 ± 30 nmol, míg Cu(II)/CroHis rendszer esetében 100 ± 20 nmol értéknek adódott, amelyek kimagaslóan jó SOD aktivitás értéknek tekinthetők. Ugyanakkor a két rendszer SOD aktivitása hibahatáron belül azonosnak tekinthető, amely az alábbiakra enged következtetni: (i) a hisztidin imidazol-nitrogénjének a hozzájárulása elhanyagolható a SOD aktivitáshoz, (ii) a Cu(II)/kromén alegység az, amelyhez a SOD aktivitás elsősorban hozzárendelhető, (iii) a hisztidin aminosav jelenléte ugyanakkor fontos, mivel nagymértékben növeli a komplex termodinamikai stabilitását, ami későbbi biológiai vizsgálatok szempontjából előnyös.



18. ábra Inhibíció görbék a Cu(II)-komplexek koncentrációjának a függvényében (piros Cu(II)/CroHis, fekete Cu(II)/kromén-3-karbonsav, a folytonos vonalak az illesztett inhibíció görbéket mutatják be).

5. Összefoglalás

Munkám során új, vélhetően antioxidáns tulajdonsággal rendelkező kromén-3-karbonsavval konjugált ligandumot (CroHis) állítottunk elő, jellemeztük spektroszkópiai módszerekkel, valamint réz(II)ionokkal való komplexképződési reakcióját vizsgáltuk. Az így nyert fiziko-kémiai paramétereket és a komplex antioxidáns tulajdonságát hasonlítottuk össze a réz(II)/kromén-3-karbonsav modellrendszerrel.

Első lépésben a ligandumok protonálódási állandóit határoztuk meg, amely alapján igazoltuk, hogy a karboxilcsoport és a CroHis esetén a hisztidin imidazol nitrogénje vesznek részt sav-bázis folyamatokban. A két ligandum komplexképződési folyamatai különbözőek. A kromén-3-karbonsav esetén ligandumfelesleget tartalmazó rendszerben biszkomplexek képződésére van lehetőség $2x(O,O)$ kelátrendszer kialakulásán keresztül. Ezen biszkomplexek képződése lúgos pH-tartományban nem akadályozza meg a fémionhoz koordinált vízmolekulák hidrolízisét, amelynek eredményeképpen vegyes hidroxokomplexek képződnek. A réz(II)/CroHis rendszerben az egyensúlyi modellt a Cu_2L_2 és a $Cu_2L_2H_{-2}$ komplexek képződésének figyelembevételével írtuk le. A dimer szerkezetű részecskék képződését az ESR spektroszkópia igazolta. Fiziológias pH-tartományban a $Cu_2L_2H_{-2}$ részecske domináns, amelyben a karboxamid nitrogén fémion indukált deprotonálódása és koordinációja eredményeképpen a réz(II)iont az (O,O,N^-,N_{Im}) donorcsoportok koordinálják. Az ESR spektrum alapján ebben a részecskében a két Cu(II) ekvatoriális síkjai egymás alatt és felett helyezkednek el, valamint a két fémion kis mértékben el van tolódva egymáshoz képest a síkban. A komplex röntgendiffrakciós vizsgálata alátámasztotta az ESR spektrum alapján feltételezett szerkezetet.

A réz(II)-komplexek SOD aktivitását a xantin/xantin-oxidáz/NBT modellrendszer segítségével vizsgáltuk. A két komplex SOD aktivitása hasonló, így vélhetően az antioxidáns tulajdonságért az O-heterociklus és a réz(II)ionok közötti kölcsönhatás a felelős. A hisztidin imidazol nitrogénjének koordinációja a CroHis réz(II)-komplexének a termodinamikai stabilitását növeli, így alkalmasabb jelölt lehet biológiai vizsgálatokban.

6. Hivatkozások

- [1] Aiyer K., *The Great Oxidation Event: How Cyanobacteria Changed Life*, 2022, megtekintve: 2024. 11. 07.
- [2] Y. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A-F. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 3854-3918.
- [3] Kripli B., *Doktori értekezés, Pannon Egyetem*, 2011.
- [4] T. Kiss, T. Gajda, B. Gyurcsik, *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, 2007.
- [5] W. S. Laitonjam, *Studies in Natural Products Chemistry*, 2012, **37**, 259-275.
- [6] G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, *Oxid. Med. and Cell. Longev.*, 2017, cikk ID 8416763.
- [7] L. Gastro, B. A. Freeman, *Nutrition*, 2001, **17**, 161-165.
- [8] K. H. Cheesman, T. F. Slater, *Br. Med. Bull.*, 1993, **49**, 481-493.
- [9] C. M. Curieses Andrés, J. M. Pérez de la Lastra, C. Andrés Juan, F. J. Plou., E. Pérez-Lebeña, *Int. J. of Mol. Sci.*, 2023, **24.3**, 1841.
- [10] N. Lihi, I. Fábíán, *Adv. in Inorg. Chem.*, 2022, **79**, 1-22.
- [11] F. J. Menvielle-Bourg, *Phytothérapie*, 2005, **3**, 118-121.
- [12] G. Bánhegyi, M. Csala, A. Hrabák, G. Keszler, Z. Kukor, J. Mandl, T. Mészáros, N. Müllner, Cs. Sőti, M. Staub, *Orvosi Biokémia*, 2011.
- [13] R. J. Reiter, D. Melchiorri, E. Sewerynek, B. Poeggeler, L. Barlow-Walden, J. Chuang, G. G. Ortiz, D. Acufia-Castroviejo, *J. of Pineal Res.*, 1995, **18.1**, 1-11.
- [14] E. Tvrda, F. Benko, *Pathology*, 2020, 3-13.
- [15] S. Stephenie, Y. P. Chang, A. Gnanasekaran, N. M. Esa, C. Gnanaraj, *J. Func. Foods*, 2020, **68**, 103917.
- [16] S. Aitha, V. Thumma, R. Matta, S. Ambala, K. Jyothi, S. Manda, J. Pochampally, *Results in Chem.*, 2023, **5**, 100987.
- [17] Dóczi, István András és Fritz, Péter *Szabadgyökök és antioxidánsok*, 2011., **1.4**, 26-30.
- [18] P. Nunes, Y. Yildizhan, Z. Adiguzel, F. Marques, J. Costa Pessoa, C. Acilan, I. Correia, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2021, **27**, 89-109.
- [19] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*, 2002, **13**, 572-584.
- [20] A. Blázovics, *Doktori értekezés*, 2005.
- [21] F. Bacher; É. A. Enyedy; N. V. Nagy; A. Rockenbauer; G. M. Bognár; R. Trondl; M. S. Novak; E. Klapproth; T. Kiss; V. B. Arion, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 8895–8908.

- [22] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Cryst.*, 2009, **42**, 339-341.
- [23] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.*, 2015, **A71**, 3-8.
- [24] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.*, 2008, **A64**, 112-122.
- [25] A. L. Spek, *Acta Cryst.*, 2020, **E76**, 1-11.
- [26] C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. V. D. Streek, P. A. Wood, *J. Appl. Cryst.*, 2008, **41**, 466-470.
- [27] H. Jenkins, L. MacLean, S. McClean, G. Cooke, M. Devereux, O. Howe, M. D. Pereira, N. V. May, É. A. Enyedy, B. S. Creaven, *J. Inorg. Chem.*, 2023, **249**, 112383.