

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar



Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKÖRI DOLGOZAT

2-formilpiridin-guanilhidrazon származékok és fémkomplexeik oldategyensúlyi és redoxi tulajdonságai: a morfolin és piperazin szubsztitúció hatása

Készítette: Gátszegi Gerda Tímea

II. Vegyész MSc

Témavezető: Dr. Enyedy Éva Anna

tanszékvezető egyetemi tanár

Lezárva: 2025. január 3.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	3
1. Tartalmi összefoglaló	4
2. Bevezetés	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1. Daganatos betegségek kezelése	6
3.2. Tioszemikarbazonok és analóg vegyületeik	7
3.3. Guanilhidrazon származékok	9
3.4. Morfolin és <i>N</i> -metil-piperazin szubsztituensek hatása	10
4. Célkitűzések	12
5. Kísérleti rész	13
5.1. Felhasznált vegyszerek	13
5.2. pH-potenciometria	13
5.2.1. Mérési körülmények	14
5.3. Ultraibolya-látható spektrofotometria	15
5.4. Ciklikus voltammetria	16
5.5. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia	17
5.6. Kiegészítő mérések	17
6. Eredmények	18
6.1. A vizsgált vegyületek bemutatása	18
6.2. A 2-formilpiridin-guanilhidrazon származékok oldatkémiai vizsgálata	19
6.3. A 2-formilpiridin-guanilhidrazonok és réz(II)komplexeik biológiai hatása	24
6.4. A 2-formilpiridin-guanilhidrazonok komplexképzése réz(II)ionokkal	26
6.5. Réz(II) - 2-formilpiridin-guanilhidrazon komplexek redoxi tulajdonságainak jell.	33
6.6. 2-formilpiridin-guanilhidrazonok komplexképzése vas(II/III)ionokkal	36
7. Összefoglalás	37
8. Felhasznált irodalom	39
9. Köszönetnyilvánítás	41

Rövidítések

AA	aszkorbinsav
CV	ciklikus voltammetria
ESR	elektronspin (vagy elektron paramágneses) rezonancia spektroszkópia
FTSC	2-formil-piridin-tioszemikarbazon
GSH	glutation
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
L-P	2-formilpiridin-guanilhidrazon
L-AP	3-amino-2-formilpiridin-guanilhidrazon
L-Morf⁴-P	4-morfolinometil-2-formilpiridin-guanilhidrazon
L-Morf⁵-P	5-morfolinometil-2-formilpiridin-guanilhidrazon
L-Morf⁶-P	6-morfolinometil-2-formilpiridin-guanilhidrazon
L-Pip⁶-P	6-(piperazin-1-il)-2-formilpiridin-guanilhidrazon
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
O-triapin	oxo-triapin
Se-triapin	szeleno-triapin
TSK	tioszemikarbazon
UV-Vis	UV-látható

1. Tartalmi összefoglaló

Számos tioszemikarbazon-származékot és azok fémkomplexeit már széles körben tanulmányozták antimikrobiális, vírusellenes és daganatellenes hatásuk miatt. Mind a koordináló donorkészlet, mind a szubsztituensek erősen befolyásolják a fémkomplexek stabilitását és farmakológiai hatását. Az aminoguanidinból származó guanilhidrazon-típusú Schiff-bázisokat is széles körben vizsgálják szerkezeti sokoldalúságuk miatt. A háromfogú 2-formilpiridin-guanilhidrazonok az α -N-piridil tioszemikarbazonok analógjainak tekinthetők, ahol a tioamid egységet a guanidincsoport helyettesíti. A tioszemikarbazonokkal szemben, azonban ilyen (N,N,N) donorkészletet tartalmazó származékok oldategyensúlyi vizsgálata a szakirodalomban meglehetősen hiányos.

Tudományos diákköri munkám során különböző 2-formilpiridin-guanilhidrazon Schiff-bázis-származékokat, valamint réz(II)- és vas(II/III)komplexeiket vizsgáltuk. A tioamid iminocsoporttal ($C=S \rightarrow C=NH$) történő helyettesítése mellett vizsgáltuk amin, morfolin, és piperazin szubsztituensek hatását is a ligandumok proton disszociációs állandóira és a képződő komplexek stabilitási szorzataira. Oldategyensúlyi és redoxi tulajdonságaik jellemzése céljából pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás, ciklikus voltammetriás és spektroelektrokémiai méréseket végeztünk. Továbbá a réz(II)komplexek fiziológiás redukálószerekkel való közvetlen reakcióját UV-látható spektrofotometriás módszerrel követtük.

Megállapítottuk, hogy a fiziológiás pH-n semleges analóg tioszemikarbazonokkal szemben ezek a ligandumok túlnyomórészt pozitív töltésűek, és a számolt képződési állandóik alapján mind a réz(II)-, mind a vas(II/III)ionokkal kisebb stabilitású komplexeket képeznek. A kelátképző helyzetben lévő morfolin- és piperazin-nitrogénnel létrejövő négyfogú koordináció sem növelte meg számottevően a komplexek stabilitását. A vizsgált humán rákos sejtekkel szemben (Colo205, Colo320, MCF7) sem a ligandumok, sem a rézkomplexeik nem bizonyultak citotoxikusnak. Összefoglalva, a tioamid-kén iminocsoportra történő cseréje kisebb stabilitású fémkomplexeket és gyengébb rákellenes hatású vegyületeket eredményezett.

Kulcsszavak: tioszemikarbazon, guanilhidrazon, morfolin, piperazin, stabilitási állandó, redoxi reakció, citotoxicitás

2. Bevezetés

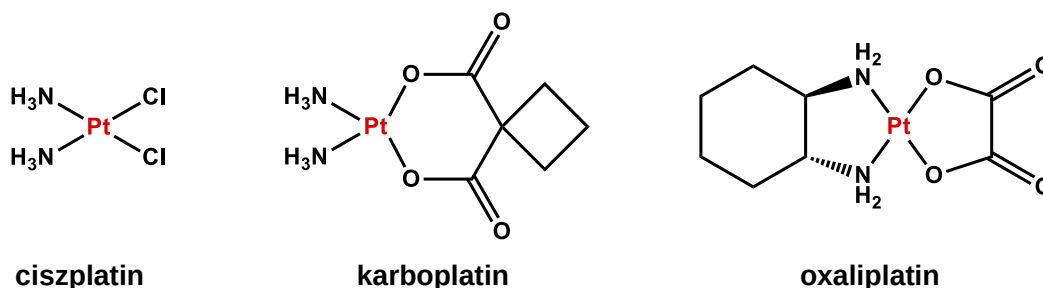
Világszerte a leggyakoribb halálokok közé tartoznak a rákos megbetegedések, melyek kezelése napjainkban is igen nagy problémát jelent. Számos sikeres rákellenes vegyületet állítottak már elő, alkalmazásukat azonban gyakran korlátozzák a fellépő súlyos mellékhatások és a kialakuló rezisztencia. Ezen problémák miatt újabb potenciális hatóanyagok, köztük többféle fémkomplex fejlesztése is intenzív kutatási területet jelent. Egy ilyen vegyületcsalád a tioszemikarbazonok (TSK-ok) és azok különböző analóg vegyületei, valamint fémkomplexeik. A TSK-okban lévő kén, egyéb kalkogénatomra (pl. O és Se) történő cseréje nagyban megváltoztatja a ligandumok fémionokkal való kölcsönhatását és biológiai hatását [1]. A tioamid egység guanidincsoportra történő cseréjével származtathatjuk a guanilhidrazonokat, és az ilyen típusú vegyületek és fémkomplexeik is gyakran mutatnak kiemelkedő antibakteriális és antivirális hatást, ill. néhány vegyületnek ígéretes rákellenes aktivitása is van [2,3].

Kutatómunkám során hat (N,N,N)-donorkészletet tartalmazó guanilhidrazon származékot vizsgáltunk, melyek a piridingyűrű eltérő pozícióiban különböző szubsztituenseket tartalmaznak, mint amin, morfolin, N-metil-piperazin. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a tioamid iminocsoporttal ($C=S \rightarrow C=NH$) történő helyettesítése, valamint a különböző szubsztituensek beépítése hogyan befolyásolja az oldatkémiai tulajdonságokat és az *in vitro* citotoxicitást. A különböző vegyületek szerkezete, oldatkémiai tulajdonságaik, valamint a rákellenes hatásuk közötti összefüggések megértéséhez szükséges a származékok oldategyensúlyi vizsgálata, továbbá azok réz(II)-, illetve vas(II/III)komplexeik oldatbeli stabilitásának és redoxi tulajdonságainak tanulmányozása és összehasonlítása rokonvegyületekkel.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Daganatos betegségek kezelése

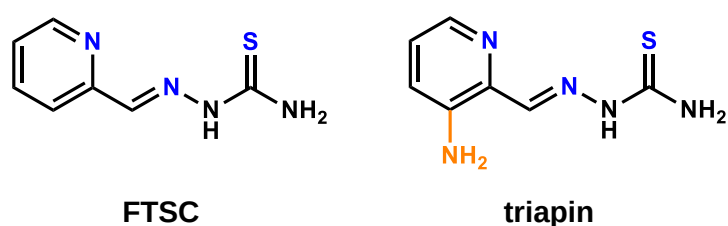
A daganatos megbetegedések napjainkban a leggyakoribb halálokok közé tartoznak. Több mint 100 különböző típusú rákos megbetegedés ismert, melyek tünete és lefolyása különböző, így ezek eltérő kezelést igényelnek. Az onkológiai sebészet, illetve a sugárterápiák mellett a gyógyszeres kezelések a legelterjedtebbek. A hatóanyagok között vannak DNS-alkilező szerek, antimetabolitok, citotoxikus antibiotikumok, tubulin mérgek, illetve célzott hatású, kismolekulás gyógyszerek, és az egyre inkább előretörő immunoterápiás készítmények. A kemoterápiás gyógyszerek közül még mindig kiemelt fontosságúak a platina(II)komplexek, melyek a legszélesebb körben használt rákellenes szerek közé tartoznak. Legelterjedtebb a ciszplatin (**1. ábra**), melyet gyógyszerként 1978-ban törzskönyvezték here- és petefészekrák, illetve húgyhólyag-, fej- és nyakdaganatok kezelésére. A ciszplatin alkalmazásának sikerét bizonyítja, hogy bevezetése óta a hererákos betegek gyógyulási aránya meghaladta a 95%-ot [4], azonban használatát korlátozzák a kialakuló súlyos mellékhatások, melynek oka a nem megfelelő szelektivitás, emellett gyakran rezisztencia alakul ki a használatkor [5,6]. Ezek a problémák ösztönözték az újabb hatóanyagok szintézisét, melyek közül a karboplatin és az oxaliplatin (**1. ábra**) [6] is klinikai alkalmazásba került. Bár a bennük található távozó ligandum inertebb a ciszplatinban levő kloridionokhoz képest, így is kellemetlen mellékhatások lépnek fel az alkalmazásuk során. Ezen okok miatt a különféle vegyületek, köztük fémkomplexek előállítására és vizsgálatára a mai napig fontos kutatói feladat. Az új vegyületek előállításakor a szelektivitás növelése mellett a vegyületek hatékonyságának növelése a cél, mely legtöbbször különféle szerek kombinálásával érhető el.



1. ábra: Klinikai használatban lévő platina(II)komplexek szerkezeti képlete.

3.2. Tioszemikarbazonok és analóg vegyületeik

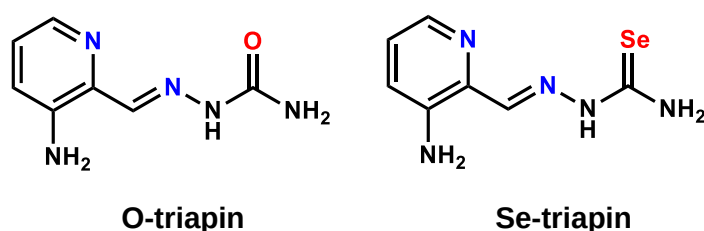
Rákellenes fémkomplexek fejlesztése mellett különböző olyan szerves molekulákat is előállítottak már, melyek hatása az emberi szervezeten belüli, endogén fémionokkal való komplexképződésükhöz kötődik. Fontos vegyületcsaládot képviselnek a szakirodalomban vaskelátorként számon tartott TSK-ok is, melyek fémkomplexei gyakran mutatnak akár a ligandumét is meghaladó rákellenes hatást. Rákellenes tulajdonságuk 1960-ban lett igazolva a 2-formil-piridin-TSK (FTSC, **2. ábra**) leukémiával szembeni hatásának felismerésével [7]. Egyik legismertebb képviselőjük a 3-aminopiridin-2-karbaldehid-TSK (triapin, **2. ábra**), mely jelenleg klinikai fázis III tesztelés alatt áll [8]. A triapin hatásmechanizmusa a DNS bioszintézisében kulcsszerepet játszó vastartalmú ribonukleotid-reduktáz enzim inhibícióján alapul. Ugyanakkor az N-terminálisan diszubsztituált származékainál inkább a rézionokkal való kölcsönhatásnak lehet szerepe [7]. A TSK-ok alapváza (N,S) donoratomokat tartalmaz, azonban általában egy harmadik donorcsoport is megtalálható a vegyületekben, az α -N-heterociklusos TSK-ok egy piridin-nitrogént (ilyen a triapin is), a szalicilaldehid TSK-ok pedig egy fenolos-OH csoportot tartalmaznak. A TSK-ok szintézise egy aldehid vagy keton és egy tioszemikarbazid kondenzációs reakciója révén történik, így Schiff-bázis származékoknak is tekinthetjük őket. A vegyületek szerkezete bioizoszter helyettesítés révén (pl. C=S cseréje C=Se, C=O ill. C=NH csoportokra), illetve különböző szubsztituensek beépítésével variálható. Az említett szerkezetbeli változtatások befolyásol(hat)ják a ligandumok proton disszociációs állandóit (K_a) és fémionkötő képességüket, így a biológiai hatást is.



2. ábra: Az α -N-heterociklusos TSK-ok két legismertebb képviselőjének szerkezeti képlete.

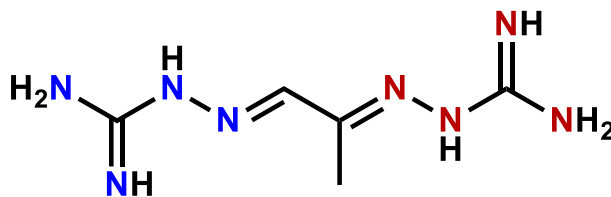
A TSK-ok legismertebb képviselője, a triapin esetén a tioamid-kén oxigénre és szelénre történő cseréjének hatását korábban már tanulmányozták az oxo-triapin (O-triapin), valamint a szeleno-triapin (Se-triapin) vizsgálatával (**3. ábra**) [1]. A ligandumok pK_a értékeit pH-potenciometria, UV-látható (UV-Vis) spektrofotometria és ^1H NMR spektroszkópiai módszerek alkalmazásával határozták meg. Az eredmények alapján a piridin- és hidrazon-

nitrogénjeinek pK_a értékei az alábbi sorrendben csökkentek: O-triapin > triapin > Se-triapin. A komplexképződési folyamatokat pH-potenciometriás, UV-Vis spektrofotometriás és elektronspin rezonancia (ESR) spektroszkópiával vizsgálták. Az eredmények alapján megállapították, hogy a Se-triapin réz(II)komplexe nagyobb stabilitású, míg az O-triapiné kisebb stabilitású a triapinéhoz viszonyítva. Nyomon követték a réz(II)komplexek két természetes redukálószerrel való reakcióját spektrofotometriásan. A nagyobb stabilitású Se-triapin réz(II)komplexét a glutation (GSH-nal) lassan redukálja, aszkorbinsavval (AA-val) azonban nem redukálható, míg a kisebb stabilitású O-triapin réz(II)komplexével a redoxi reakciók nagyon gyorsan lejártszódtak mind a két redukálószerrel. A vasionokkal való komplexképződési egyensúlyi folyamatokat vizsgálva megállapították, hogy a triapin, illetve a Se-triapin mind a vas(II), mind a vas(III)ionokkal nagy stabilitású komplexeket képez, azonban az O-triapin vas(III)ion iránti affinitása nagyobb a vas(II)ionhoz képest, de a képződő vas(III)komplexek stabilitása kisebb, a triapin vas(III)komplexéhez viszonyítva. Feltehetőleg ezen különbségek befolyásolják a vegyületek rákellenes hatását. Az O-triapin nem bizonyult citotoxikusnak. A réz(II)ionokkal való komplexképzés csak az O-triapinnál eredményezett a ligandum saját hatását meghaladó citotoxicitást [9].



3. ábra: A bioizoszterikus csere révén létrejövő O-triapin és Se-triapin szerkezeti képlete.

A TSK vegyületekkel egyéb analóg szerkezetű vegyületek szintézise is igen gyakori, melyek átmenetifém-komplexeit is széles körben tanulmányozzák farmakológiai potenciáljuk miatt, beleértve a rákellenes, antibakteriális és antioxidáns hatásukat [9,10]. Ilyen a két aminoguanidin egységet tartalmazó *mitoguazon* (metilglioxál-bisz(guanilhidrazon), **4. ábra**), mely fázis II, illetve III klinikai vizsgálatok alapján potenciálisan alkalmas az akut leukémia és az AIDS-szel összefüggő non-Hodgkin limfóma kezelésére [1].

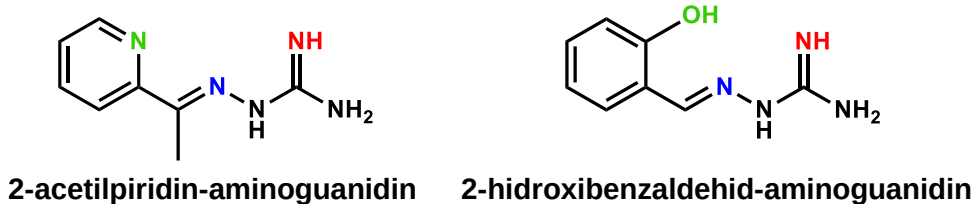


4. ábra: A mitoguazon szerkezeti képlete.

3.3. Guanilhidrazon származékok

A kénatom egyéb kalkogénatomokra történő cseréje mellett érdemesnek tartották megvizsgálni a tioamid-kén (C=S) iminocsoporttal (C=NH) történő helyettesítésének hatását is. Az így kapott guanilhidrazon-származékok, valamint fémkomplexeik gyakran kiemelkedő antibakteriális és antivirális hatással rendelkeznek, illetve néhány vegyület ígéretes rákellenes aktivitást is mutatott [2,3]. Emellett antioxidáns hatásuknak köszönhetően a karbonil stressz (ami gyakran a sejtek oxidatív stresszének eredménye) és a cukorbetegség (*diabetes mellitus*) szövődmények kialakulásának gátlójaként is ismertek [11]. Ezen tulajdonságaik miatt nagy érdeklődés mutatkozik a guanilhidrazonok, illetve fémkomplexeik vizsgálata iránt.

Ezek közül kiemelkedő fontosságú az (N,N,N)-donorcsoportokkal rendelkező 2-acetilpiridin-aminoguanidin (**5. ábra**), illetve réz(II)komplexe [11,12]. Ebben a réz(II)komplexben a ligandum a piridin-, azometin- és imin-nitrogénatomjain keresztül koordinálódik. Az eredmények alapján a réz(II)komplex mérsékelt antibakteriális és enyhe gombaellenes aktivitást mutatott. Az iminocsoporttal történő helyettesítés hatását vizsgálták az (O⁻,N,N)-donorcsoportokat tartalmazó 2-hidroxi-benzaldehid-aminoguanidinnal (**5. ábra**) [13,14] is. A réz(II)komplexek oldategyensúlyi-, valamint redoxi vizsgálatok alapján a rokon TSK-okhoz hasonlóan nagy stabilitást mutattak. Ezen ligandum vas(III)ion-kötő képessége hasonló az analóg TSK-hoz, azonban a vas(II)ionok iránt lényegesen kisebb affinitást mutatott. A vegyület humán vastagbélrákos sejtvonalakkal szemben mérsékelten volt aktív [3].



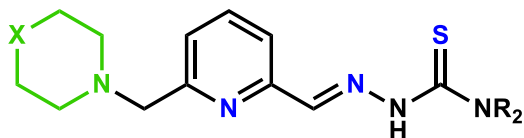
5. ábra: A tioamid kén (C=S) iminocsoporttal (C=NH) történő helyettesítése által létrejött származékok szerkezeti képlete.

Ezen eredmények alapján a tioamid-kén iminocsoportra történő cseréje várhatóan a dolgozatban tárgyalt 2-formilpiridin-származékok fémkötő képességre, valamint ennek következtében a farmakológiai aktivitásra is hatással lesz. Az (N,N,N)-donorcsoportokkal rendelkező 2-formilpiridin-guanilhidrazon Schiff-bázis-származékokra és azok fémkomplexeire vonatkozóan azonban még nem történt széles körű oldategyensúlyi vizsgálat korábban.

3.4. Morfolin és *N*-metil-piperazin szubsztituensek hatása

Korábban vizsgálták kelátképző pozícióban lévő morfolin, illetve *N*-metil-piperazin szubsztituensek hatását TSK-okkal, ugyanis ezen csoportok morfolin- vagy piperazin-nitorgénatomja képes koordinálni, ezzel létrehozva egy négyfogú (N,N,N,S)-donorcsoportokkal rendelkező ligandumot, mely hatással lehet a réz(II)komplexek stabilitására, valamint az *in vitro* citotoxicitásra. Ezen tanulmány során 4 különböző morfolin-, valamint piperazincsoportokat tartalmazó FTSC származékot szintetizáltak és jellemeztek [15]. Az így létrejött vegyületek (mPip-FTSC, mPip-dm-FTSC, Morph-FTSC, Morph-dm-FTSC, **6. ábra**) vizsgálata során többek között megfigyelték a szerkezeti módosítások hatását a réz(II)komplexek koordinációs módjaira, illetve a rákellenes hatásra. Az mPip-dm-FTSC és Morph-dm-FTSC ligandumokkal a komplexképződés miatti protonleszorítás már a kiindulási pH-n (pH ~ 2) majdnem teljes volt és csak elhanyagolható mennyiségű szabad réz(II)ion volt kimutatható ESR módszerrel, ami a képződött komplexek kiemelkedően nagy stabilitására utal. Emiatt a $[CuL]^+$ komplex látszólagos stabilitási állandóit EDTA-val végzett kompetíciós reakciókkal határozták meg. A számolt pCu ($pCu = -\lg[Cu(II)]$) értékek jóval nagyobbak (17,6 és 17,0) pH = 7,4-n, mint a háromfogú analóg TSK-onál (pl. a triapinnál pCu = 11,6) azaz a réz(II)komplexek stabilitása jelentősen megnőtt a négyfogú koordináció révén. Vizsgálták a ligandumok, valamint a réz(II)komplexek rákellenes hatását is, és bár a ligandumok nem voltak

aktívak, réz(II)komplexeik viszont igen. Ugyanakkor egyéb morfolin-szubsztituált 2-formilpiridin-tioszemikarbazonok réz(II)komplexeinek stabilitását a morfolin-nitrogén negyedik koordinációs helyen történő koordinációja nem növelte meg [16].



mPip-FTSC (R = H, X = NCH₃)
 mPip-dm-FTSC (R = CH₃, X = NCH₃)
 mMorph-FTSC (R = H, X = O)
 mMorph-dm-FTSC (R = CH₃, X = O)

6. ábra: Morfolin és *N*-metil-piperazin származékok szerkezeti képlete.

4. Célkitűzés

A tioszemikarbazonok fémkomplexeinek stabilitását és farmakológiai hatását nagymértékben befolyásolja a koordináló donorcsoportok, illetve a különböző szubsztituensek jelenléte. A tioszemikarbazonokból a tioamid-kén iminocsoportra történő cseréjével származtatható 2-formilpiridin-guanilhidrazonok (N,N,N)-donorcsoportokat tartalmaznak, és endogén fémionokkal képződő komplexeik oldatbeli stabilitására vonatkozóan meglehetősen hiányos a szakirodalom. A tioszemikarbazonokkal való összehasonlítás érdekében ezért munkánk során célul tűztük ki hat különböző guanilhidrazon származék (a triapin guanilhidrazon analógja, a 2-formilpiridin-guanilhidrazon és annak morfolin- és *N*-metil-piperazin származékainak) szisztematikus oldategyensúlyi vizsgálatát. Munkánk során összefüggéseket keresünk a különböző vegyületek szerkezete, oldategyensúlyi tulajdonságai és *in vitro* citotoxikus hatása között.

Ehhez a következőket tűzzük ki célul:

- I. A kiválasztott ligandumok proton disszociációs folyamatait pH-potenciometriás és UV-Vis spektrofotometriás titrálások segítségével vizsgáljuk, ami alapján meghatározzuk a proton disszociációs állandókat, és hogy milyen protonáltsági állapotban vannak jelen vizes oldatban, fiziológias pH-n. ^1H NMR spektroszkópiai méréseket végzünk a deprotonálódási folyamatok nyomon követése céljából.
- II. Értelmezzük a ligandumok, valamint réz(II)komplexeik együttműködő partnereink által vizsgált *in vitro* citotoxikus hatásait rákos sejtvonalakon, valamint antibakteriális hatásukat is.
- III. A réz(II)komplexek összetételét és képződési állandóit pH-potenciometriás és UV-Vis spektrofotometriás titrálások segítségével határozzuk meg. Továbbá ESR spektroszkópiai mérésekkel nyerünk információt a réz(II)komplexek koordinációs módjáról és geometriájáról.
- IV. A réz(II)komplexek redoxi tulajdonságainak megismerése céljából ciklikus voltammetriás és UV-Vis spektroelektrokémiai méréseket végzünk, illetve UV-látható spektrofotometria segítségével követjük két természetes redukálószerrel, a glutationnal és az aszkorbinsavval való reakciójuk lejátszódását.
- V. Jellemezzük a vas(II)- illetve vas(III)ionokkal való komplexképződési folyamatokat UV-Vis spektrofotometriás titrálások elvégzésével.

5. Kísérleti rész

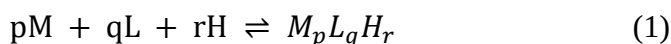
5.1. Felhasznált vegyszerek

A vizsgált vegyületek (L-P, L-AP, L-Morf⁴-P, L-Morf⁵-P, L-Morf⁶-P, L-Pip⁶-P) szintézise és karakterizálása a Bécsi Egyetem Szervetlen Kémiai Intézetének laboratóriumában történt (Tatsiana V. Petrasheuskaya, Vladimir B. Arion). A glutation (GSH), az aszkorbinsav (AA), a 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav (DSS), a D₂O és a 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-etánszulfonsav (HEPES) a Sigma-Aldrich terméke. A KCl, KOH, KNO₃, KH-ftalát, HCl, CuCl₂ és FeCl₃ a Reanal cégtől állt rendelkezésre.

A ligandum törzsoldatok elkészítéséhez Milli-Q vizet használtunk, az oldatokat tömeg szerinti beméréssel készítettük. A réz(II)- és vas(III)-tartalmú törzsoldatok készítéséhez a CuCl₂ és FeCl₃ fémsókat sósavban oldottuk, koncentrációjukat EDTA-val végzett komplexometriás titrálással határoztuk meg. A vas(II)-tartalmú oldatot vaspór sósavban történő feloldásával, készítettük, koncentrációját permanganometriás módszerrel határoztuk meg. Ezen oldatot oxigénmentes argon atmoszférában, laboratóriumi kesztyűs manipulátorban ('glove boxban'-ban) készítettük, tároltuk és használtuk. A fémtörzsoldatok savtartalmát pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A természetes eredetű redukálószerekkel (GSH, AA) történő reakciók során HEPES pufferrel állítottuk be a pH-t (pH = 7,4). A mérések során a 0,10 M-os állandó ionerősséget KCl és KNO₃ használatával állítottuk be.

5.2. pH-potenciometria

A pH-potenciometria módszere alkalmas a ligandumok protonálódási állandóinak meghatározására, illetve általános módszer a komplexképződési folyamatok követésére, amennyiben a komplexképződés során protonleszorítás történik a ligandumról. A komplexképződés (1) az alábbi egyenlet segítségével írható le (ahol M: fémion, L: teljesen deprotonált ligandum, H: proton; p, q, r: sztöchiometriai együtthatók):



A képződő részecskék stabilitási szorzata (vagy képződési állandója) (2):

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (2)$$

Az egyensúlyi állandók meghatározásához a Hyperquad programot [17] használtuk. A kiindulási fájlban három komponens szerepelt, a fémion (M), a deprotonált ligandum (L) és a proton (H), illetve megadtuk a képződő asszociátumok számát és összetételét. Bemenő adatok továbbá az adagolt mérőoldat – pH adatpárok, a komponensek kiindulási koncentrációja, a kiindulási térfogat, a közelítő stabilitási szorzatok és a vízionszorzat. Ezen adatok alapján a program az M, L és H komponensekre felírható anyagmérleg-egyenletek (3, 4, 5) megoldásával elvégezte a számolást.

Az M, L és H komponensekre felírható anyagmérleg-egyenletek:

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (3)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (4)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{p_i q_i r_i} [M]^{p_i} [L]^{q_i} [H]^{r_i} \quad (5)$$

5.2.1. Mérési körülmények

A pH-potenciometriás mérőrendszer kalibrálását az Irving-féle módszerrel végeztük el [18], ezen módszer alapja egy erős sav erős bázissal való titrálása. Az Irving-féle korrekciós faktort és a vízionszorzatot az Abu9x nevű programmal a Gran-módszer [19] segítségével határoztuk meg. A titráláshoz egy Metrohm Titrando 888 típusú, Tiamo szoftverrel rendelkező automata bürettát és a hozzátartozó 6.0262.100 kombinált üvegelektrodót használtunk. A mérőműszert 0,050 M KH-ftaláttal (pH=4,008) hitelesítettük, a meredekség értékét a titrálásokkal számolt vízionszorzat ($pK_w=13,76 \pm 0,01$) alapján választottuk meg.

A pH-potenciometriás méréseket vizes oldatban végeztük $25,0 \pm 0,1$ °C-on. A ligandum koncentrációja 2,0 mM volt a mintákban, a fémionkoncentráció pedig 0,67 – 2,0 mM között változott mind a réz(II)-, mind a vas(II)ionok esetében, a minta kezdeti térfogata 10,0 mL volt. A méréseket karbonátmentes KOH-oldattal (0,10 M) végeztük, melynek pontos koncentrációját ismert koncentrációjú KH-ftalát oldat segítségével határoztuk meg. A titrálásokat 2,0 és 11,7 közötti pH-tartományban végeztük, a minták ionerőssége állandó volt ($I = 0,10$ M (KCl)). A méréseket argon atmoszféra alatt végeztük, azaz argont buborékoltattunk a mintákba, vagy 'glove box'-ban dolgoztunk.

5.3. UV-látható spektrofotometria

Az UV-Vis spektrofotometriás módszer segítségével azon kromofor csoportot tartalmazó vegyületek vizsgálhatók, melyek fényt abszorbeálnak a 200-800 nm hullámhossz-tartományban. Fémkomplexeknél az abszorpciós csúcsok a fémion d-d átmeneteihez, illetve a fémion és ligandum közötti töltésátvitelhez és magához a szabadon lévő vagy koordinált ligandumhoz köthetők, így a módszer segítségével vizsgálhatóak a komplexképződési folyamatok. A módszer segítségével meghatároztuk a különböző protonáltságú ligandumformák moláris abszorbancia spektrumait, komplexképződési egyensúlyokat vizsgáltunk, illetve nyomon követtük a réz(II)komplexek redoxi reakcióját GSH-val és AA-val.

Az UV-látható spektrumok felvételéhez az alábbi spektrofotométereket használtuk: Agilent Cary 8454, Agilent Cary 3500, Thermo Scientific Evolution 220, Avantes AvaSpec-UL2048XL-EVO Fiber Optic). Ezen titrálások során a pH-mérő, illetve annak kalibrálása megegyezett a pH-potenciometriánál leírtakkal. A kiválasztott ligandumok, illetve a réz(II)komplexek titrálása során a ligandum koncentrációja 53 – 54 μM vagy 0,32 – 0,64 mM volt, attól függően, hogy a töltésátviteli sávokra vagy a d-d átmenetekre voltunk kíváncsiak, a fémion-ligandum koncentrációarányok pedig 1:1, 1:1,5 és 1:2 voltak. Az úthossz 1 cm, illetve a d-d átmenetek vizsgálata során 4 cm volt. A vas(II)ionokkal végzett titrálásoknál a ligandum koncentrációja 0,10 – 0,49 mM volt, a fém-ligandum arányok pedig 1:1, 1:2 és 1:3. Ezen mérések során az anaerob körülmények biztosítása céljából 'glove box'-ban végeztük. A titrálásokat 1,8 és 11,6 közötti pH-tartományban végeztük, a minták ionerősségét 0,10 M KCl segítségével tartottuk állandó értéken.

A réz(II)komplexek redukálószerekkel (GSH, AA) való reakciójának időbeliségét UV-Vis spektrofotométerrel követtük. A méréseket tandemküvetében (Hellma tandem cell, 238-QS) végeztük, amelyben a reakció megkezdéséig a reaktánsok elkülönítve voltak. A fém-ligandum arány minden mérésnél 1:1 volt, a GSH/AA felesleg maximum 10,7-szeres volt. Az oldatok pH-ját 50 mM HEPES pufferrel állítottuk be pH = 7,40-re. A spektrumokat a keverés előtt, majd közvetlenül utána vettük fel, és a változásokat addig követtük, amíg már nem észleltünk további abszorbanciaváltozást.

5.4. Ciklikus voltammetria és spektroelektrokémia

A ciklikus voltammetria módszere elektroaktív anyagok redoxi tulajdonságainak vizsgálatára alkalmas. A mérés során a feszültséget lineárisan változtatjuk egy adott tartományon belül, állandó pásztázási sebesség mellett, majd mérjük a potenciált a referencia- és a munkaelektrod között, az áramerősséget pedig a munka- és a segédelektrod között. A feszültség csökkentése során megfigyelhető a vegyület oxidált formájának redukciója az elektrod felületén, mely során katódos áram képződik. A katódos áram maximuma a redukciós potenciál elérésekor tapasztalható, a feszültség további csökkentésével az oxidált forma koncentrációja az elektrod felületén csökken, így az áramerősség is csökken. Ezt követően a feszültség növelésének hatására a vegyület redukált formája oxidálódik és megjelenik az anódos áram.

A feszültségkülönbséget (6) az anódos- és katódos csúcspotenciál különbsége adja meg (ahol E_a : anódos csúcspotenciál, E_k : katódos csúcspotenciál, n : elektronátmenetek száma):

$$\Delta E = E_a - E_k = 59 n [mV] \quad (6)$$

A feszültségkülönbség elméleti értéke reverzibilis pároknál 59 mV egy elektronátmenetnél. A formálpotenciált E_a és E_k átlaga adja meg.

A ciklikus voltammetriás mérésekhez egy számítógéppel vezérelt Metrohm Autolab-PGSTAT 204 típusú elektrokémiai mérőműszert használtunk. A mérések során Ag/AgCl/KCl (3 M) referencia elektrodot, üvegszén munkaelektrodot és platina segédelektrodot alkalmaztunk. A rendszert frissen készített $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0,01 M) oldattal kalibráltuk ($E_{1/2} = +0,458 \text{ V vs. NHE}$), ezzel ellenőrizve a rendszer állapotát. A vizsgálatokat 1:1, 1:2 és 1:3 fém-ligandum arány mellett végeztük, ahol a fémion koncentrációja 0,68 – 1,96 mM között változott. A pH-t KOH oldat segítségével állítottuk pH = 7,4-es értékre. Az alkalmazott ionerősség 0,10 M volt, melyet KNO_3 -oldattal állítottunk be. Az oxigén kizárásához argont buborékolattunk a mintába mérés előtt, majd a minta fölé a mérés teljes ideje alatt.

Az UV-Vis spektroelektrokémiai méréseket az Avantes AvaSpec-UL2048XL-EVO száloptikás fotométer segítségével végeztük, AvaLight-DHc típusú fényforrással. A méréseket egy Pt mikroszerkezetű, méhsejtes munkaelektroddal és egy Ag/AgCl/KCl referenciaelektroddal végeztük. A mérésekhez a CV mérésekhez készített mintákat hígítottuk a megfelelő koncentráció elérése céljából.

5.5. ^1H NMR spektroszkópia

A ^1H NMR spektroszkópai módszert a ligandumok deprotonálódási folyamatainak nyomon követése céljából alkalmaztuk. A spektrumok kvantitatív kiértékeléséhez a PSEQUAD programot használtuk [20], ahol a számolás alapját (bemenő adatként) a különböző pH-kon mért kémiai eltolódások jelentették. A méréseket egy Bruker Avance III HD Ascend 500 Plus készüléken végeztük. Referenciaként DSS-t alkalmaztunk, melynek legnagyobb jele 0,0 ppm-nél található. A vizsgálatoknál a WATERGATE nevű pulzusszekvencia segítségével vízelnyomást végeztünk. A titráláshoz a minták 3 mM ligandumot, 10% (v/v) D_2O -t és 0,10 M KCl-ot tartalmaztak. Az állandó pH-jú (pH = 7,40) minták 0,3 mM ligandumot tartalmaztak, a pH-t foszfátpufferrel állítottuk be.

5.6. Kiegészítő mérések

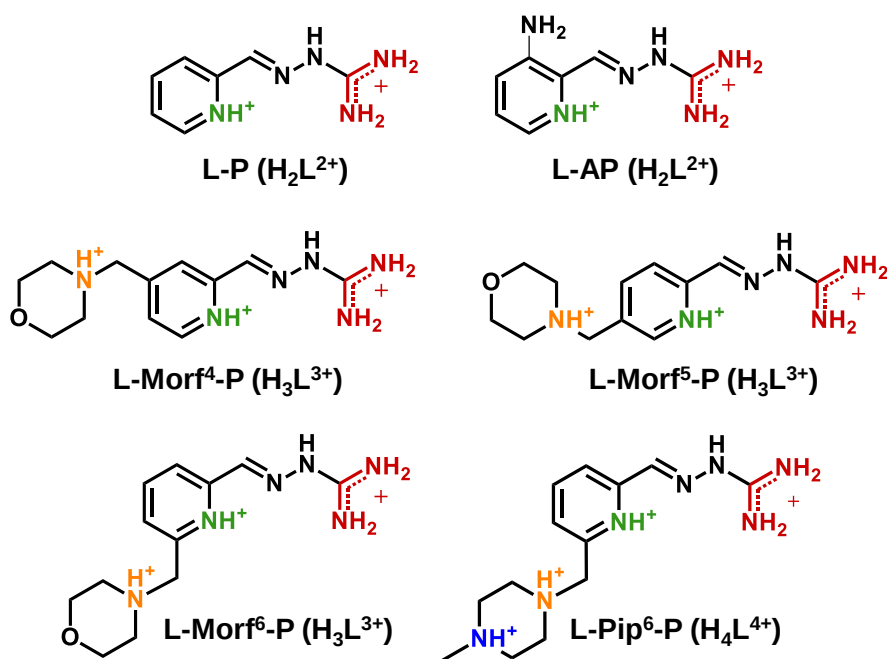
A réz(II)komplexek koordinációs módjairól és a komplexek geometriájáról az elektronspin rezonancia spektroszkópia (ESR) módszerrel nyertünk információkat. Ehhez a különböző pH-kon felvett spektrumokból számolt paraméterekre (g -tenzor, hiperfinom csatolási állandó, szuperhiperfinom csatolási állandó) volt szükség. A spektrumok kiértékelését Dr. May Nóra V. (HUN-REN, TTK, Budapest) végezte. A mérésekhez a mintákat én készítettem el és a mérésben is aktívan részt vettem. A spektrumok felvétele egy BRUKER EleXsys E500 spektrométerrel történt, szobahőmérsékleten.

A ligandumok és réz(II)komplexeik biológiai vizsgálatait Dr. Spengler Gabriella (SZTE, SZAOK, Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet) végezte, a mérésekhez szükséges törzssoldatokat én készítettem.

6. Eredmények

6.1. A vizsgált vegyületek bemutatása

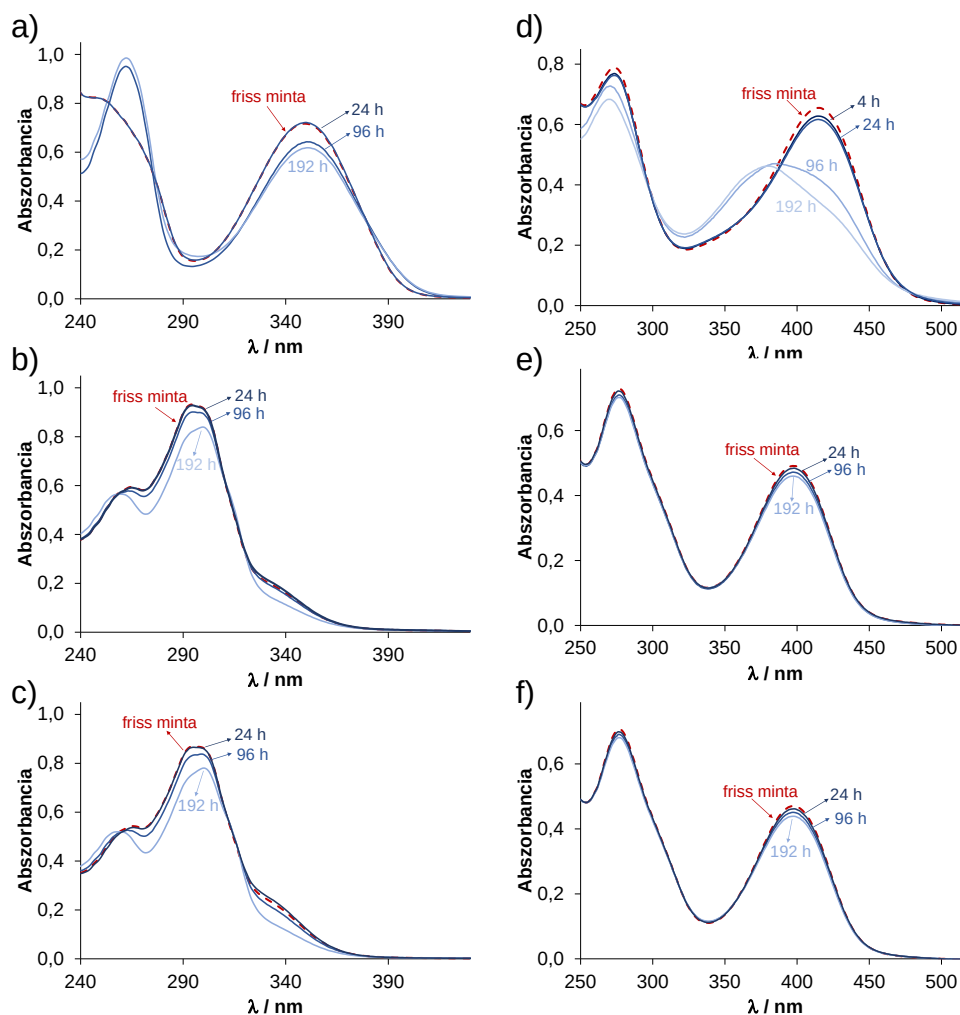
Az (N,N,S) koordinációjú triapin kénatomjának oxigénre és szelénre történő cseréjének hatását korábban már vizsgálták [9]. Ezen vizsgálatok eredményei alapján a ligandumok donorkészlete hatással van a fémkomplexek stabilitására, illetve ezáltal azok farmakológiai hatására. Ezen eredmények alapján célul tűztük különböző, (N,N,N) donorkészletet hordozó guanilhidrazon származékok (7. ábra) vizsgálatát, hiszen várhatóan a kén iminocsoporttal történő helyettesítése hatással lesz a fémionkötő képességre, valamint a farmakológiai aktivitásra. A vizsgált ligandumok a triapin guanilhidrazon-analógja, a 2-formilpiridin-guanilhidrazon, illetve annak morfolin- és *N*-metil-piperazin származékai.



7. ábra: A vizsgált guanilhidrazonok szerkezeti képlete: *L-P*: 2-formilpiridin-guanilhidrazon; *L-AP*: 3-amino-2-formilpiridin-guanilhidrazon; *L-Morf⁴-P*: 4-morfolinometil-2-formilpiridin-guanilhidrazon; *L-Morf⁵-P*: 5-morfolinometil-2-formilpiridin-guanilhidrazon; *L-Morf⁶-P*: 6-morfolinometil-2-formilpiridin-guanilhidrazon; *L-Pip⁶-P*: 6-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-2-formilpiridin-guanilhidrazon. A ligandumok a teljesen protonált formájukban vannak feltüntetve.

6.2. A 2-formilpiridin-guanilhidrazon származékok oldatkémiai vizsgálata

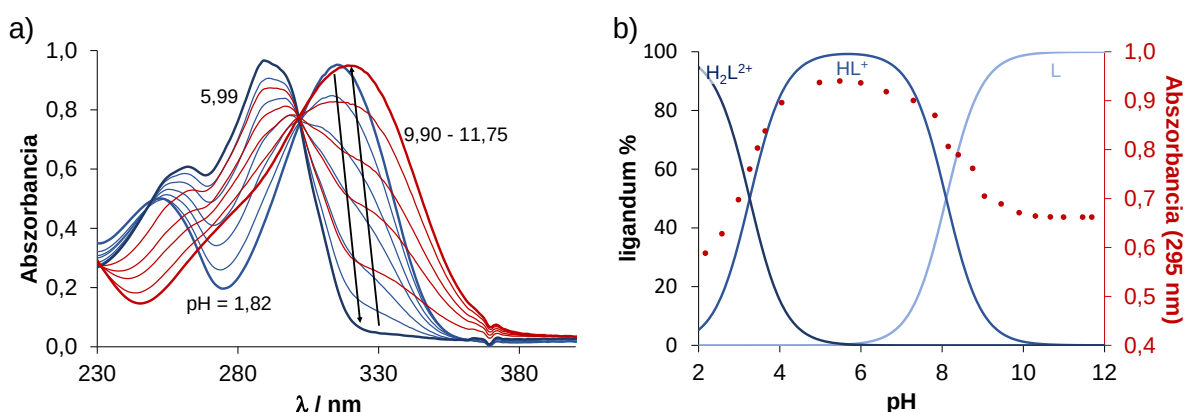
A ligandumok proton disszociációs állandóinak meghatározása révén megállapítható, hogy adott pH-n milyen protonáltsági állapotú és töltésű formák vannak jelen. A vizsgált származékok rendkívül hidrofilek, melyek közül a korábban már előállított és vizsgált L-P származéknál nagy termodinamikai vizes oldatbeli oldhatóságot figyeltek meg ($S = 42 \text{ g/L}$ [21]). A proton disszociációs állandók meghatározása előtt UV-látható spektrofotometria segítségével követtük nyomon a ligandumok stabilitását fiziológiás pH-n ($\text{pH} = 7,40$). Ahogy a **8.a-c ábrán** látható a spektrumok 24 óra elteltével nem mutattak változást, 4 nap elteltével azonban már egyértelmű spektrális változásokat tapasztaltunk, mely valószínűleg a Schiff-bázis vegyületek lassú hidrolízise miatt figyelhető meg, ez azonban a gyorsnak tekinthető ($\leq 3 \text{ óra}$) oldategyensúlyi vizsgálatokat nem akadályozza.



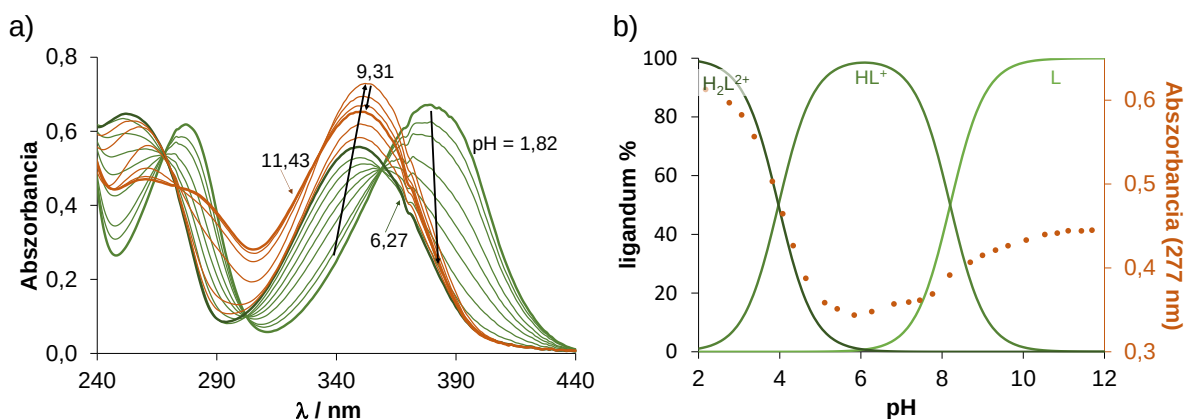
8. ábra: Az a) L-Ap b) L-Morf⁶-P, c) L-Pip⁶-P, valamint a d) Cu(II) - L-AP, e) Cu(II) - L-Morf⁶-P, f) Cu(II) - L-Pip⁶-P rendszerek UV-látható spektrumainak időfüggése. { $C_{\text{ligandum}} = 50 \text{ } \mu\text{M}$; $C_{\text{Cu(II)}} = 49 \text{ } \mu\text{M}$; $t = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,4$ (10 mM HEPES)}

A vegyületek kiemelkedő oldhatóságának köszönhetően a proton disszociációs folyamatokat pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás és ^1H NMR spektroszkópiai titrálásokkal is lehetett vizsgálni vízben. Ahogy az a **7. ábrán** is látható az L-P és L-AP ligandumok teljesen protonált formájának 2 disszociálabilis protonja van, a morfolin származékoknak 3, az *N*-metil-piperazin származékának pedig 4, azonban a morfolin- és *N*-metil-piperazin szubsztituenseket tartalmazó származékoknál a piridinium-nitrogén deprotonálódását nem tudtuk végigkövetni, mivel nagyon savas pH-n (< 2) következett be, így ezen pK_a értékeket nem tudtuk meghatározni.

A **9.a ábrán** az L-P, a **10.a ábrán** pedig az L-AP ligandum különböző pH értékeken felvett UV-Vis elnyelési spektrumai láthatók. Megfigyelhető, hogy a pH növelése jelentős változásokat okoz L-P ligandum spektrumában a 230-380 nm, L-AP származékánál pedig a 240-440 nm hullámhossz tartományokban. Ezen változások két jól elkülönülő deprotonálási folyamatra utalnak. Azonban a két ligandum elnyelése között jelentős különbség figyelhető meg, míg pH = 7,4-en az L-P ligandumnál a λ_{max} 289 nm-nél, az L-AP ligandumnál pedig 349 nm-nél található, mely különbséget a piridin-gyűrűn lévő aminocsoport jelenléte okozza.



9. ábra: Az L-P ligandum **a)** 1,82–11,66 pH-tartományban felvett UV-látható spektrumai vizes közegben, illetve **b)** számított koncentráció eloszlási görbéi, valamint a mért abszorbancia (●) értékek 295 nm-en. $\{C_{\text{L-P}} = 53,9 \mu\text{M}; I = 0,10 \text{ M KCl}; t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}, \ell = 1,0 \text{ cm}\}$



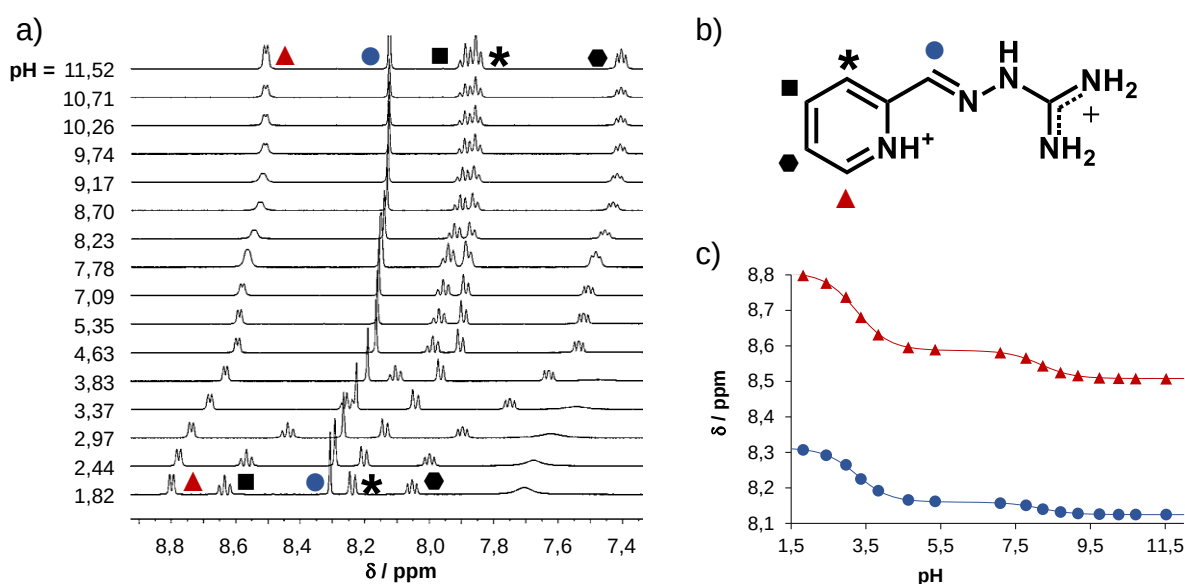
10. ábra: Az L-AP ligandum **a)** 1,82–11,43 pH-tartományban felvett UV-látható spektrumai vizes közegben, illetve **b)** számított koncentráció eloszlási görbéi, valamint a mért abszorbancia (●) értékek 277 nm-en. $\{C_{L-P} = 53,9 \mu\text{M}; I = 0,10 \text{ M KCl}; t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}, \ell = 1,0 \text{ cm}\}$

Az **1. táblázat**ban tüntetem fel a ligandumok proton disszociációs állandóit, melyeket a pH-potenciometriás mérési adatokból számoltunk a HYPERQUAD program [17] segítségével. Az L-P ligandum általunk meghatározott pK_a értékei jó egyezést mutatnak a korábbi szakirodalmi adatokkal: $pK_1 = 3,28$, $pK_2 = 8,05$ [21]. Az L-P és L-AP ligandumok pK_a értékei két elkülönülő deprotonálódási folyamathoz köthetőek, melyek beazonosításában a ^1H NMR mérések is segítséget nyújtottak, a spektrumok a **11.a ábrán** és a **12.a ábrán** találhatók meg. Mindkét esetben látható, hogy a savas pH-tartományban jelentős változást okozott a deprotonálódás mind az aromás CH-protonok, mind a CH=N rész kémiai eltolódásában, így a savas pH-tartományban lejátszódó proton disszociációs folyamatot a piridin-nitrogénhez rendeltük. Azonban a pH további növelésével a második deprotonálódási folyamatnál már jóval kisebb mértékű változás figyelhető meg a kémiai eltolódás értékekben, így ez a folyamat a távolabb elhelyezkedő aminoguanidin-rész deprotonálódásához köthető. Felhasználva a pH – kémiai eltolódás adatpárokat (**11.b ábra**, **12.b ábra**) az L-P és az L-AP pK_a értékeit ki tudtuk számolni a PSEQUAD [20] programmal, mely értékek jó egyezést mutattak a pH-potenciometriás mérésekből számolt értékekkel (**1. táblázat**).

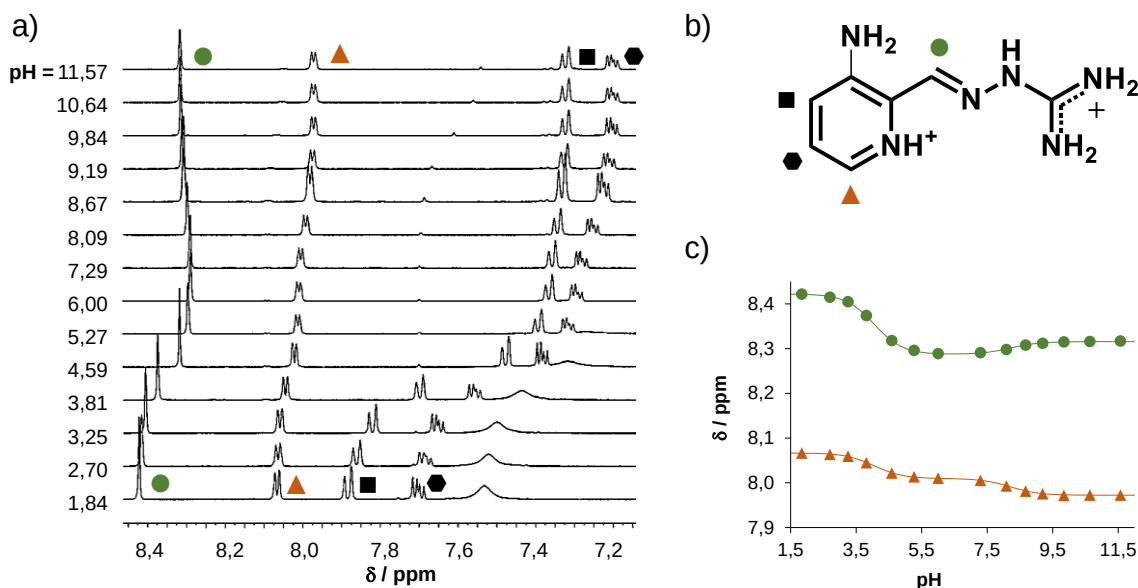
1. táblázat: A vizsgált származékok protonálódási állandói és pK_a értékei pH-potenciometriás titrálásokkal meghatározva vízben. $\{t = 25\text{ }^\circ\text{C}; I = 0.1\text{ M (KCl)}\}$

	L-P	L-AP	L-Morf ⁴ -P	L-Morf ⁵ -P	L-Morf ⁶ -P	L-Pip ⁶ -P
$\lg\beta(\text{HL}^+)$	$8,10 \pm 0,01$	$8,20 \pm 0,01$	$8,12 \pm 0,01$	$8,20 \pm 0,01$	$8,19 \pm 0,01$	$8,39 \pm 0,01$
$\lg\beta(\text{H}_2\text{L}^{2+})$	$11,36 \pm 0,03$	$12,17 \pm 0,02$	$13,43 \pm 0,01$	$13,88 \pm 0,02$	$14,01 \pm 0,01$	$15,94 \pm 0,01$
$\lg\beta(\text{H}_3\text{L}^{3+})$	–	–	n. m. ^a	n. m. ^a	n. m. ^a	$18,78 \pm 0,01$
$\lg\beta(\text{H}_4\text{L}^{4+})$	–	–	–	–	–	n. m. ^a
pK_1	$3,26^b$	$3,97^c$	< 2	< 2	< 2	< 2
pK_2	$8,10^b$	$8,20^c$	5,31	5,68	5,82	2,84
pK_3	–	–	8,12	8,20	8,19	7,55
pK_4	–	–	–	–	–	8,39

^a Nem meghatározható adatok. ^b ^1H NMR-titrálással meghatározott pK_a értékek: $pK_1 = 3,26$ és $pK_2 = 8,17$. ^c ^1H NMR-titrálással meghatározott pK_a értékek: $pK_1 = 4,05$ és $pK_2 = 8,21$.



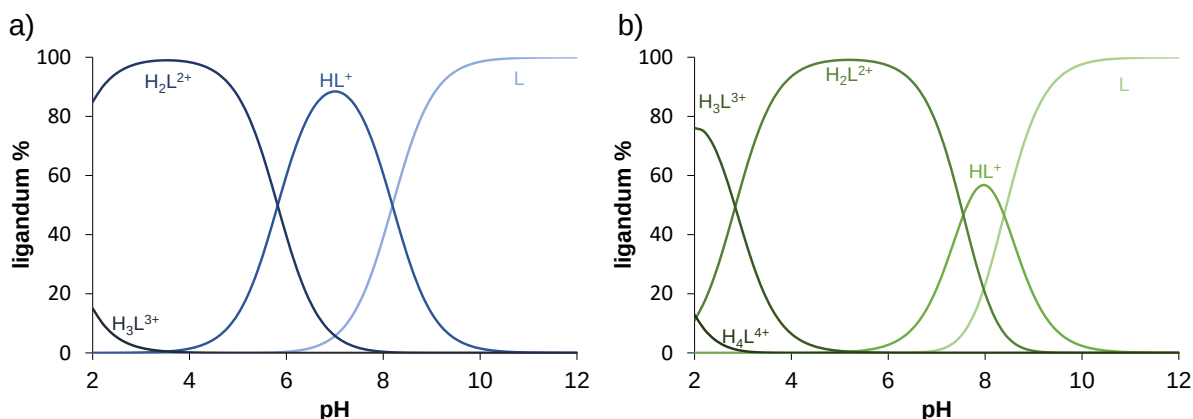
11. ábra: a) Az L-P ligandum pH = 1,8–11,5 tartományban felvett ^1H NMR spektrumainak aromás régiójának részlete, b) a csúcsokhoz tartozó szimbólumok jelölése, illetve c) két kiválasztott CH-proton kémiai eltolódása a pH függvényében. $\{c_{\text{L-P}} = 3,0\text{ mM}; 10\% \text{ (v/v) } \text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}; t = 25\text{ }^\circ\text{C}; I = 0,10\text{ M (KCl)}\}$



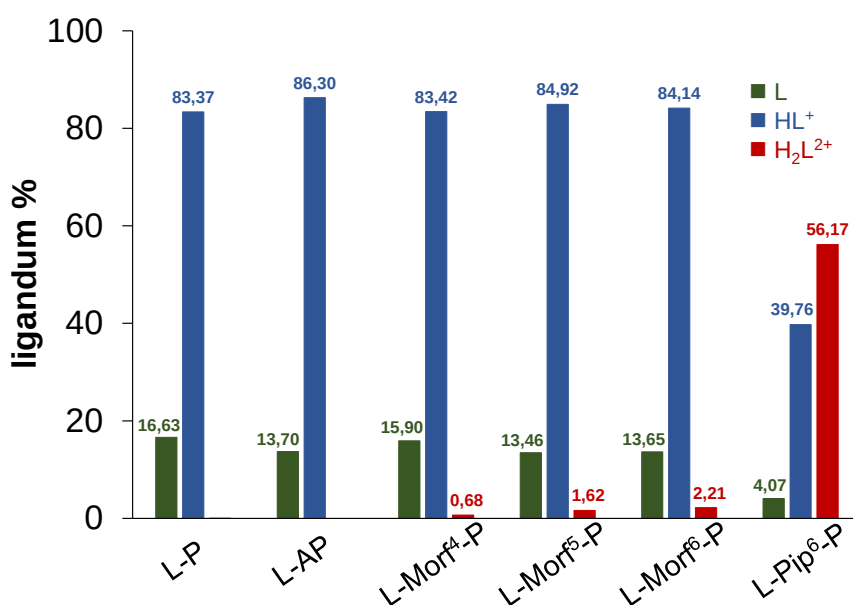
12. ábra: **a)** Az L-AP ligandum pH = 1,8–11,5 tartományban felvett ¹H NMR spektrumainak aromás régiójának részlete, **b)** a csúcsokhoz tartozó szimbólumok jelölése, illetve **c)** két kiválasztott CH-proton kémiai eltolódása a pH függvényében. { c_{L-P} = 3,0 mM; 10% (v/v) D₂O/H₂O; t = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

A morfolin szubsztituenst tartalmazó származékoknál (L-Morf⁴-P, L-Morf⁵-P és L-Morf⁶-P) a piridinium-nitrogénhez jóval kisebb pK_1 értékek tartoznak, hiszen a pozitív töltésű protonált morfolinium-nitrogén elektronszívó hatással rendelkezik. Az aminoguanidin rész pK_3 értéke hasonló az L-P és L-AP származékok pK_2 értékeihez, hiszen a morfolin-nitrogén ebben a pH-tartományban már semleges formában van jelen. A piperazin szubsztituenst tartalmazó L-Pip⁶-P származéknál a piridinium-nitrogén pK_1 értéke is jóval kisebb, a morfolin szubsztituenseknél már említett elektronszívó hatás miatt. A pK_2 a piperazin N⁴-metil nitrogénjéhez rendelhető, míg a piperazin N¹-metil nitrogén és az aminoguanidinium rész deprotonálódása átfed egymással, így ezen proton disszociációs folyamatok nem rendelhetőek egyértelműen a pK_3 és pK_4 értékekhez.

A számolt pK_a értékek felhasználásával a MEDUSA nevű program [22] segítségével koncentráció eloszlási görbéket készítettünk. A **9.a ábra** és a **10.a ábra** az L-P és az L-AP koncentráció eloszlási görbéit mutatja, a **13. ábrán** pedig az L-Morf⁶-P és az L-Pip⁶-P görbéi láthatóak. Minden esetben megállapítottuk, hogy ezen ligandumok széles pH-tartományban pozitív töltésű formáikban vannak jelen, ennek köszönhetik a kiváló vízben való oldhatóságukat. A lúgos pH-tartományban pedig (pH > 10) a semleges L forma dominál. A különböző részecskeformák eloszlása fiziológias pH-n eltérő, míg a piperazin szubsztituenst tartalmazó ligandumnál a piperazinium-nitrogén magas pK_a értéke miatt a H₂L²⁺ forma dominál, addig a további 5 ligandumnál a HL⁺ forma.



13. ábra: Az **a)** L-Morf⁶-P, valamint **b)** az L-Pip⁶-P ligandumok számított koncentráció eloszlási görbéi. $\{I = 0,10 \text{ M KCl}; t = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}\}$



14. ábra: A vizsgált guanilhidrazon származékok koncentráció eloszlása fiziológias pH-n (pH = 7,40). $\{t = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}; I = 0,10 \text{ M (KCl)}\}$

6.3. A 2-formilpiridin-guanilhidrazonok és réz(II)komplexeik biológiai hatása

A további oldategyensúlyi vizsgálatok előtt együttműködő partnereink megvizsgálták a ligandumok rákellenes hatását humán rákos sejtvonalakon (MCF7: humán emlő adenokarcinoma, Colo-205: vastagbél adenokarcinoma, Colo-320: vastagbél adenokarcinoma doxorubicin-rezisztens megfelelője), illetve antibakteriális hatását különböző baktériumtörzseken (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus* MRSA, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Azonban ezen 2-formilpiridin-guanilhidrazon származékok nem mutattak sem

citotoxikus ($IC_{50} > 100 \mu M$) sem antibakteriális ($MIC > 100 \mu M$) hatást (ahol IC_{50} : az a koncentráció mellynél a sejtek 50%-a elpusztul a megadott inkubációs idő alatt, a MIC pedig a minimális gátló koncentrációt jelöli).

Mivel a szakirodalom szerint számos TSK rákellenes hatása megnő a réz(II)ionokkal való komplexképződés hatására [23,24], ezért meghatározták a citotoxicitást egy ekvivalens réz(II)ion jelenlétében is. A számolt IC_{50} értékek (**2. táblázat**) 24,6 - 56,8 μM közötti tartományba esnek. Összehasonlítva a $CuCl_2$ IC_{50} értékeivel az adott rákos sejtvonalakon, elmondható, hogy a komplexképződés nem eredményezte a citotoxicitás növekedését. Azonban szakirodalmi adatok alapján az IC_{50} érték összefügg a komplexek stabilitásával [24], ezért a továbbiakban érdemes lehet megvizsgálni a képződő réz(II)komplexek stabilitását.

A szakirodalomban megtalálható ezen származékok TSK analógjai is. Az L-P, L-AP [24], valamint az L-Morf⁴-P [25] analóg tioszemikarbazonjai, illetve réz(II)-komplexeik is citotoxikusnak bizonyultak különböző rákos sejtvonalakkal szemben. Az L-Morf⁶-P és L-Pip⁶-P analógjai nem voltak citotoxikusak, azonban réz(II)komplexeik mérsékelt sejtölő hatást mutattak [15]. Továbbá a korábban vizsgált (O,N,N) donorcsoportokat hordozó szalicilaldehid-guanilhidrazon sem mutatott aktivitást a Colo-205 és Colo-320 sejtekben [3], mely ligandumok gyenge vas(II/III)ion-komplexáló képességgel rendelkeznek. Ezen magas IC_{50} értékek alapján elképzelhető, hogy a vizsgált 2-formilpiridin-guanilhidrazon származékok vas(II/III)-komplexáló képessége jóval gyengébb az analóg TSK-okhoz képest.

Az antibakteriális hatást vizsgálták egy ekvivalens réz(II)ion jelenlétében is, azonban nem tapasztaltak mérhető hatást ($MIC > 100 \mu M$).

2. táblázat: A vizsgált 2-formilpiridin-guanilhidrazonok *in vitro* citotoxicitása (IC_{50}) egy ekvivalens $CuCl_2$ jelenlétében az alábbi humán rákos sejtvonalakon 72 óra inkubációs idő mellett. A ligandumok önmagukban nem mutattak mérhető citotoxicitást: $IC_{50} > 100 \mu M$.

$IC_{50} / \mu M$	MCF-7	Colo-205	Colo-320
L-P	$56,8 \pm 7,0$	$29,6 \pm 1,2$	$34,93 \pm 0,37$
L-AP	$41,5 \pm 2,5$	$36,7 \pm 2,6$	$28,3 \pm 2,3$
L-Morf⁴-P	$41,45 \pm 0,60$	$36,5 \pm 1,8$	$31,6 \pm 2,5$
L-Morf⁵-P	$39,16 \pm 0,10$	$35,1 \pm 3,6$	$32,2 \pm 2,1$
L-Morf⁶-P	$30,3 \pm 2,5$	$35,3 \pm 1,1$	$28,27 \pm 0,10$
L-Pip⁶-P	$40,8 \pm 2,5$	$36,6 \pm 3,3$	$24,63 \pm 0,97$
$CuCl_2$	$54,4^a$	$32,79^a$	$48,7^b$

^a Szakirodalmi adat [26]. ^b Szakirodalmi adat [3].

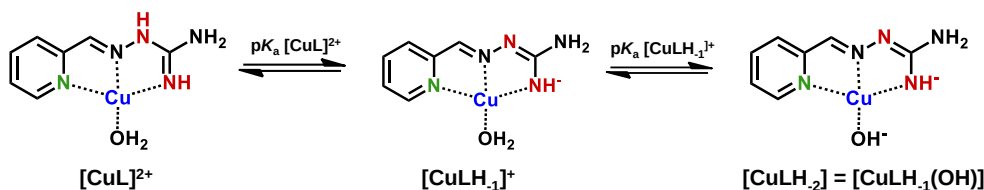
6.4. A 2-formilpiridin-guanilhidrazonok komplexképzése réz(II)ionokkal

Mivel a réz(II)ionnal való komplexképződés nem növelte meg a ligandumok citotoxicitását, feltételezhető, hogy a képződő réz(II)komplexek kis stabilitásúak, azonban ennek bizonyításához szükséges a stabilitási állandók meghatározása. A ligandumok mellett azok réz(II)komplexeinek időbeli stabilitását is követtük UV-Vis spektrofotometriás módszerrel fiziológiás pH-n (**8. d-f ábra**). Látható hogy a spektrumok 24 óra elteltével nem mutattak változást, a néhány nap alatt bekövetkező változások pedig nem korlátozták az oldategyensúlyi vizsgálatainkat. A réz(II)ionokkal történő komplexképzési folyamatokat elsősorban pH-potenciometriás titrálással követtük nyomon, illetve a speciációs modell megerősítése és a koordinációs mód megismerése céljából UV-Vis és ESR spektroszkópiai méréseket végeztünk.

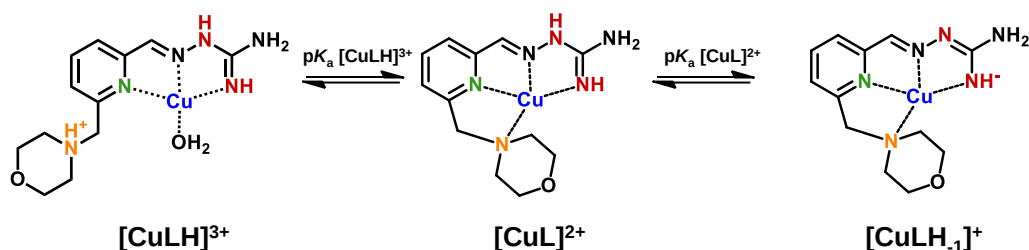
A réz(II)komplexek stabilitási szorzatait a **3. táblázat** tartalmazza. A titrálási adatok alapján csak mono-komplexek meghatározása volt lehetséges megfelelő pontosság mellett, így a speciációs modell $[\text{CuLH}]^{3+}$, $[\text{CuL}]^{2+}$, $[\text{CuLH}_{-1}]^{+}$ és $[\text{CuLH}_{-2}]$ részecskéket tartalmaz. Korábbi szakirodalmi adatok alapján a 2-acetil-piridin-aminoguanidin analóg ligandumoknál a $[\text{CuL}]^{2+}$ részecskében a ligandum semleges formában koordinálódik (N,N,N) donoratomokon keresztül [11,12], így mi is ezt a koordinációs módot feltételezzük, ahogy a **15. ábrán** és a **16 ábrán** látható. A $[\text{CuLH}_{-1}]^{+}$ komplex esetében azt feltételezzük, hogy a ligandum monoanionként kötődik, hiszen a $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexekre kis pK_a értékek ($< 6,58$, **3. táblázat**) jellemzőek a ligandumok megfelelő pK_a értékeihez hasonlítva. (A ligandumok hidrazinos NH-csoportjához tartozó $pK_a > 11,5$, melyeket nem is lehetett meghatározni magas értékük miatt). A $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplex képződése a bázikus pH-tartományban történik meg ($pK_a = 9,34 - 9,73$), így ez valószínűleg egy vegyes-hidroxido komplex.

3. táblázat: A vizsgált guanilhidrazon származékok réz(II)komplexeinek pH-potenciometriásan meghatározott stabilitási szorzatai ($\lg\beta$) és pK_a értékei. $\{I = 0,10 \text{ M KCl}; t = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}\}$

	L-P	L-AP	L-Morf ⁴ -P	L-Morf ⁵ -P	L-Morf ⁶ -P	L-Pip ⁶ -P
$\lg\beta [\text{CuLH}]^{3+}$	–	–	12,54±0,02	12,86±0,02	12,03±0,06	14,22±0,03
$\lg\beta [\text{CuL}]^{2+}$	8,02±0,03	8,10±0,02	8,03±0,02	8,02±0,02	8,38±0,01	9,01±0,02
$\lg\beta [\text{CuLH}_{-1}]^{+}$	2,01±0,05	1,54±0,03	2,01±0,03	1,91±0,03	2,76±0,02	2,43±0,03
$\lg\beta [\text{CuLH}_{-2}]$	–7,72±0,09	–7,85±0,05	–7,33±0,05	–7,53±0,05	–8,9±0,1	–
$pK_a [\text{CuLH}]^{3+}$	–	–	4,51	4,84	3,64	5,21
$pK_a [\text{CuL}]^{2+}$	6,01	6,57	6,02	6,11	5,62	6,58
$pK_a [\text{CuLH}_{-1}]^{+}$	9,73	9,39	9,34	9,44	~11,7	–



15. ábra: Az L-P ligandum réz(II)komplexeinek javasolt kémiai szerkezete különböző protonáltsági állapotokban.

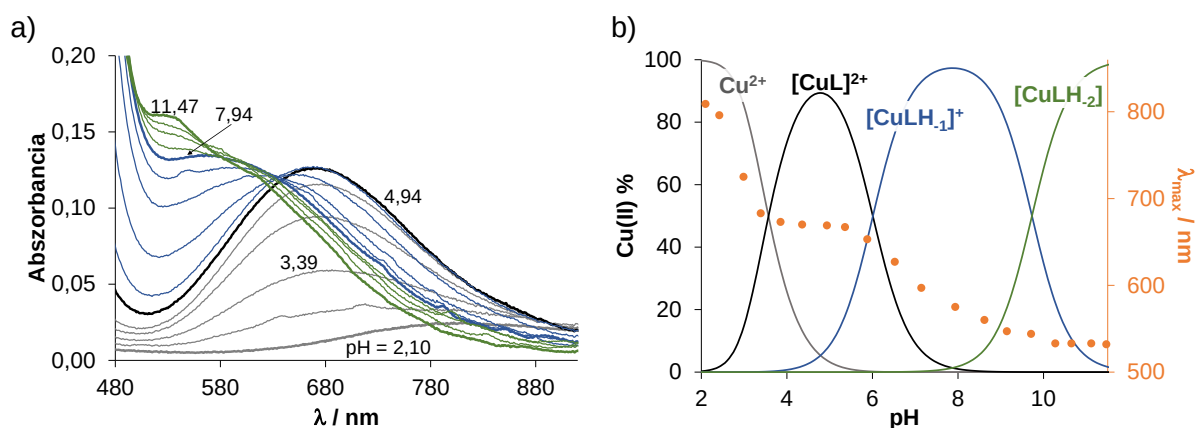


16. ábra: Az L-Morf⁶-P ligandum réz(II)komplexeinek javasolt kémiai szerkezete különböző protonáltsági állapotokban.

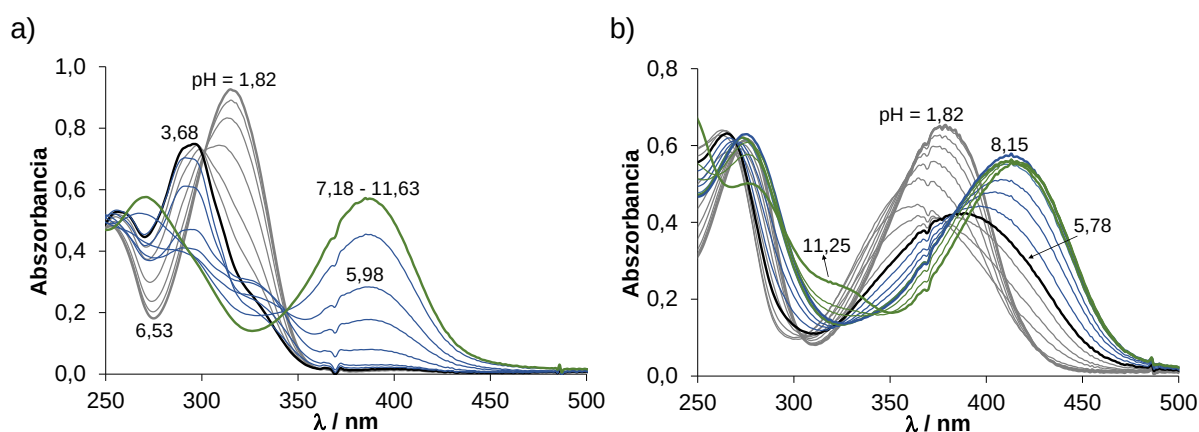
A **3. táblázat** adatai alapján látható, hogy az L-Morf⁶-P származék $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplexének képződéséhez nagyon magas $\text{p}K_a$ érték tartozik ($\sim 11,7$), az L-Pip⁶-P származéknál pedig a vizsgált pH-tartományban nem is volt megfigyelhető a $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplex képződése. Ez alapján feltételezhető, hogy a $[\text{CuLH}_{-1}]^{+}$ komplexben a ligandum morfolin- ill. piperazin gyűrűjének nitrogénje is kötődik a fémionhoz, kialakítva így egy (N,N,N,N) koordinációt (**16. ábra**). Erre azért van lehetőség, mivel a C6 pozícióban lévő szubsztituensek nitrogén donor atomja kelátképző pozícióban van. Emellett megfigyeltük, hogy ezen két származék $[\text{CuLH}]^{3+}$ komplexének $\text{p}K_a$ értékei jóval kisebbek, mint amit a ligandumoknál tapasztaltuk a morfolinium- és piperazinium-nitrogének esetében (L-Morf⁶-P: 3,64 vs. 5,82; L-Pip⁶-P: 5,21 vs. 7,56), mely szintén az ekvatoriális sík telített koordinációs szférájára utal a $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexekben.

Az oldatspeciációs modell megerősítése céljából UV-Vis spektroszkópai méréseket is végeztünk. A Cu(II)-L-P (1:1) rendszer különböző pH-kon felvett spektrumai láthatók a **17.a ábrán**. A d-d sávok spektrális változásai a 480–900 nm hullámhossz-tartományban láthatók. A $[\text{CuL}]^{2+}$ komplex kialakulásának pH-tartományában egy $\lambda_{\text{max}} = 670$ nm-es sáv alakul ki, mely a komplex deprotonálódásakor az alacsonyabb hullámhosszak felé tolódik, illetve egyre inkább átfed a töltésátviteli sávokkal, mely jelentős átrendeződésre utal. A $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplex

kialakulása során kevésbé jelentős spektrális változások láthatók. Vizsgáltuk a Cu(II) – L-P (1:2) rendszert is, azonban a változások megegyeztek a fent leírtakkal, ezzel megerősítve, hogy csak monokomplexek képződnek. Követtük a komplexképződést kisebb koncentrációk mellett is (**18.a ábra**). Megfigyeltük, hogy a $[\text{CuLH}_{-1}]^+$ komplex kialakulásakor egy intenzív töltésátviteli (CT) sáv ($\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$) jelenik meg, mely a $[\text{CuL}]^{2+}$ és $[\text{CuLH}_{-1}]^+$ komplexek eltérő koordinációs módjára utalnak. $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplex kialakulásakor a CT-sáv kisebb változást mutat a $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH}^-$ csere hatására. Az L-AP réz(II)komplexeinél (**18.b ábra**) hasonlókat tapasztaltunk.

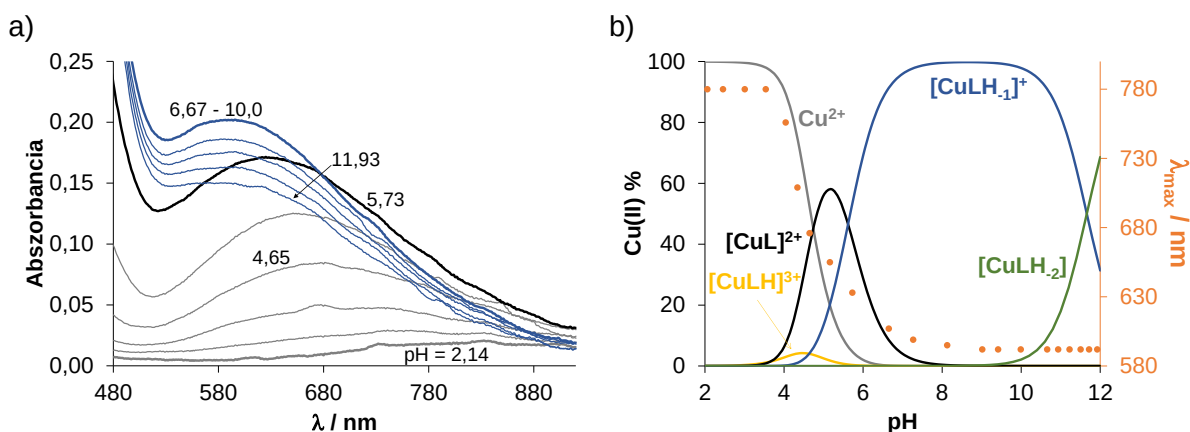


17. ábra: a) A Cu(II) – L-P (1:1) rendszerre felvett UV-Vis spektrumok a 2,1–11,5 pH-tartományban. **b)** Számított koncentráció eloszlási görbék a meghatározott egyensúlyi állandók alapján, valamint a λ_{max} értékek változása a pH növelésével. $\{C_{\text{ligandum}} = 0,32 \text{ mM}; C_{\text{Cu(II)}} = 0,32 \text{ mM}; I = 0,10 \text{ M KCl}; t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}, \ell = 4,0 \text{ cm}\}$



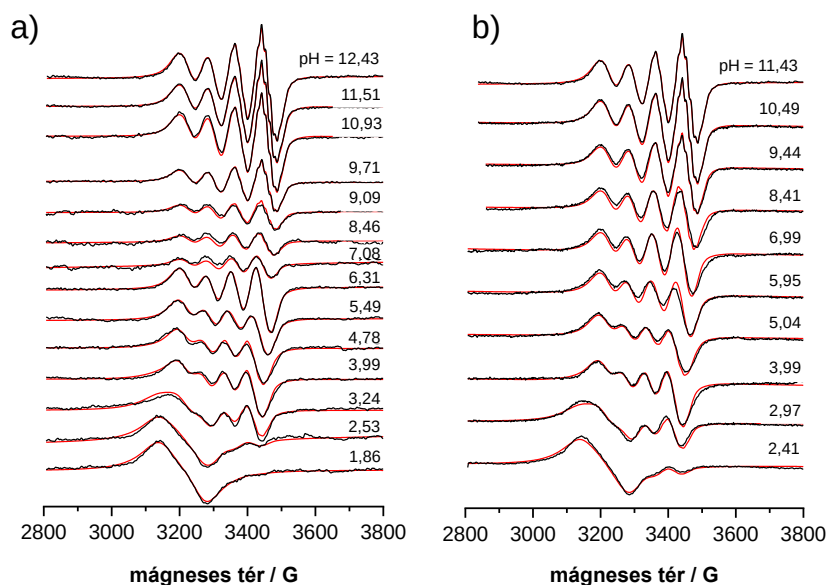
18. ábra: a) A Cu(II) – L-P (1:1) és a **b)** A Cu(II) – L-AP (1:1) rendszerekre különböző pH-kon rögzített UV-Vis spektrumok. $\{C_{\text{ligandum}} = 53\text{--}54 \text{ } \mu\text{M}; C_{\text{Cu(II)}} = 49 \text{ } \mu\text{M}; I = 0,10 \text{ M KCl}; t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}, \ell = 1,0 \text{ cm}\}$

A Cu(II) – L-Morf⁶-P (1:1) rendszer esetén is követtük a d-d sávok komplexképződés hatására bekövetkező változását, mely a **19.a ábrán** látható. Megfigyeltük, hogy az L-P és L-AP réz(II)komplexeihez képest a [CuLH₋₁]⁺ komplex képződése jóval szélesebb pH-tartományban van jelen. Ennek oka valószínűleg a [CuLH₋₁]⁺ komplexben javasolt négyfogú koordináció, mely visszaszorítja a vegyes hidroxidokomplex kialakulását.



19. ábra: a) A Cu(II) – L-Morf⁶-P (1:1) rendszer 2,1–11,9 pH-tartományban rögzített UV-Vis spektrumai. **b)** Számított koncentráció eloszlási görbék a meghatározott egyensúlyi állandók alapján, valamint a $\lambda_{\max}$ értékek. { $C_{\text{ligandum}} = 0,33 \text{ mM}$; $C_{\text{Cu(II)}} = 0,32 \text{ mM}$; $I = 0,10 \text{ M KCl}$; $t = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\ell = 4,0 \text{ cm}$ }

A Cu(II) – L-P és Cu(II) – L-Morf⁶-P rendszereket ESR spektroszkópai módszerrel is vizsgáltuk, a spektrumok 1:1 és 1:2 fém-ligandum arányok mellett lettek felvéve szobahőmérsékleten. A kísérleti és szimulált spektrumokat a **20. ábra**, a szimulációból számolt ESR spektroszkópai adatokat pedig a **4. táblázat** tartalmazza. A számított komponensek ESR spektrumai a **21. ábrán** láthatók. A Cu(II)-L-P rendszer modellében a [CuL]²⁺, [CuLH₋₁]⁺ és [CuLH₋₂] komplexek képződése illeszthető meg. Ezen részecskék g_0 -tenzorai és A_0 hiperfinom csatolási állandói (**4. táblázat**) megfelelnek a ligandum három nitrogén donoratomon keresztüli koordinációjának. Az ESR spektrumokat ESR-csendes kétmagvú [Cu₂L₂H₋₃]⁺ komplexet is feltételezve lehetett illeszteni. Ez valószínűleg úgy valósul meg, hogy a koordinált víz molekula deprotonálásakor a keletkező OH⁻ hídképző ligandumként működhet két monomer komplex, a [CuLH₋₁]⁺ és a [CuLH₋₂] között. A számított stabilitási szorzatok (**4. táblázat**) némileg eltérnek a pH-potenciometriás adatokból számoltaktól, azonban az ESR mérés során csapadékképződést tapasztaltunk, mely okozhatja ezen eltérést. Az Cu(II) – L-Morf⁶-P rendszer esetében nem találhatók kétmagvú vagy bisz-ligandum komplexek, melyek hiánya megerősíti a morfolin-nitrogén koordinációját. Továbbá a négyfogú koordinációt megerősítik a [CuL]²⁺ komplex alacsonyabb A_0 és g_0 értékei is az L-P származék megfelelő adataihoz viszonyítva.

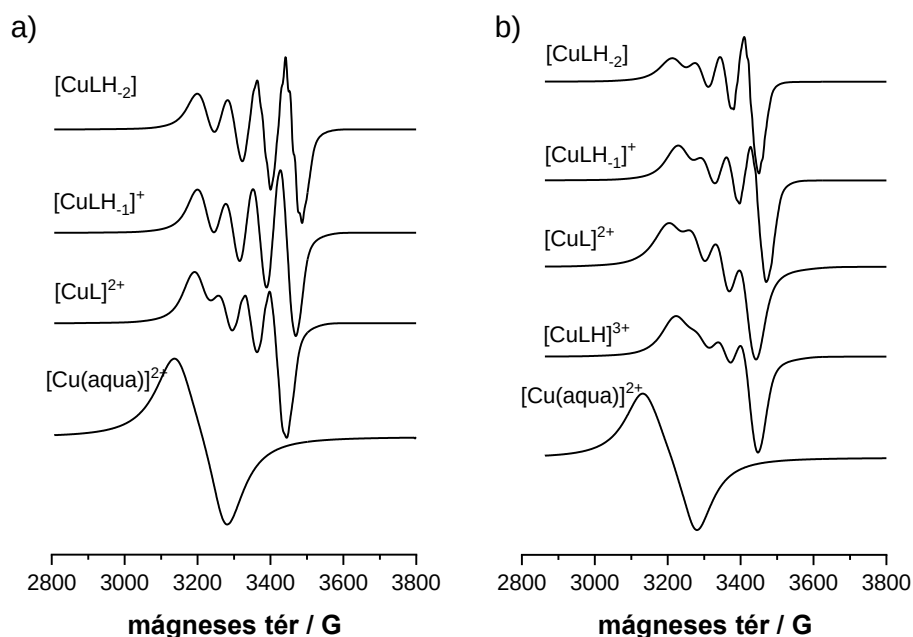


20. ábra: Cu(II) – L-P rendszer kísérleti (fekete) és számított (piros) szobahőmérsékletű oldat ESR spektrumai **a)** 1:1 és **b)** 1:2 fém-ligandum arány mellett.

4. táblázat. A Cu(II) - L-P és Cu(II) -L-Morf⁶-P rendszerekben szobahőmérsékleten felvett ESR spektrumokból meghatározott komplexek izotróp ESR paraméterei. ^a

	g_0	A_0	a_0^N	α	β	γ	$\lg\beta$
L-P							
Cu (akva)	2,196	34		61	-1,8	-0,7	
[CuL]²⁺	2,123	63	15, 15, 11	20,3	-6,9	1,3	8,0
[CuLH₋₁]⁺	2,111	70	14, 14, 9	22,8	-6,6	1,6	2,4
[CuLH₋₂]	2,106	71	14, 14, 9	17,5	-7,2	1,7	-6,1
[Cu₂L₂H₋₃]⁺ csendes							-0,3
L-Morf⁶-P							
Cu (akva)	2,198	36		60	-2,4	0,5	
[CuLH]³⁺	2,120	59	14, 14, 9	27,6	-8,1	3,5	12,4
[CuL]²⁺	2,112	55	14, 14, 9, 9	26,5	-8,5	0,7	8,6
[CuLH₋₁]⁺	2,102	60	14, 14, 9, 9	19,3	-9,1	1,5	3,4
[CuLH₋₂]	2,113	60	13, 13, 9, 9	18,9	-10,6	1,8	-8,6

^a A csatolási értékek 10⁻⁴ cm⁻¹-ben, a relaxációs paraméterek G-ben vannak megadva. A kísérleti hiba ±0,001 volt a g és ±1 × 10⁻⁴ cm⁻¹ a csatolási értékek esetében.



21. ábra: Az **a)** Cu(II) - L-P és **b)** Cu(II) - L-Morf⁶-P rendszerek szobahőmérsékletű oldat spektrumának szimulációjából számított komponens ESR spektrumok.

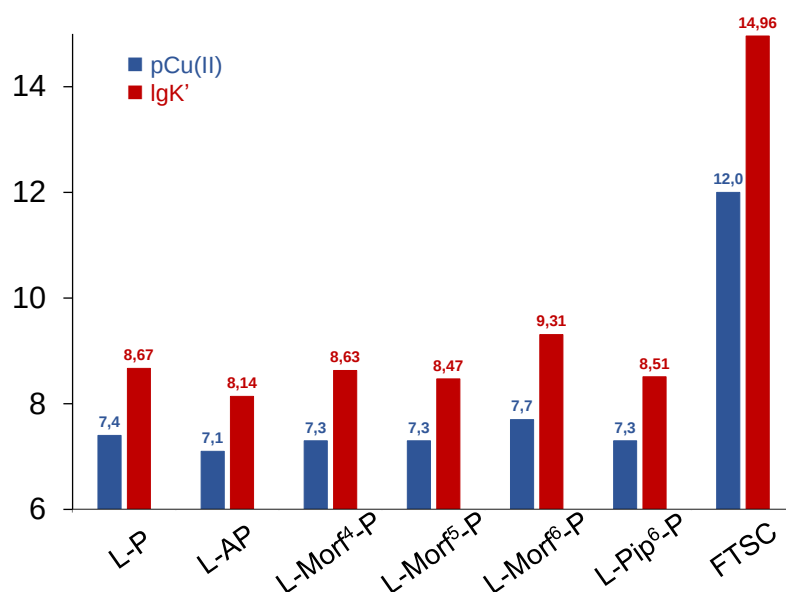
A további négy származék réz(II)komplexeével fiziológias pH-n készültek ESR spektrumok. Az L-AP, L-Morf⁴-P és L-Morf⁵-P izotróp (**5. táblázat**) és izotróp paraméterei hasonlóak az L-P paramétereihez, míg az L-Pip⁶-P az L-Mopf⁶-P paramétereivel mutat rokonságot. Ezen hasonlóságok a megfelelő ligandumok hasonló koordinációjára utalnak.

5. táblázat: Az L-AP, L-Morf⁴-P és L-Morf⁵-P [CuL]²⁺, ill. az L-Pip⁶-P [CuLH]³⁺ komplexeinek izotróp ESR paraméterei szobahőmérsékleten. ^a

ligandum	g_0	A_0	a_0^N	α	β	γ
L-AP	2,123	65	13, 13, 13	26,3	-9	1,9
L-Morf⁴-P	2,124	65	13, 13, 13	28,1	-12,4	1,9
L-Morf⁵-P	2,125	65	13, 13, 13	28,9	-12,4	2,0
L-Pip⁶-P	2,117	65	16, 16, 9	29,9	-7,1	2,8

^a A csatolási értékek 10⁻⁴ cm⁻¹-ben, a relaxációs paraméterek G-ben vannak megadva. A kísérleti hiba ±0,001 volt a g és ±1 × 10⁻⁴ cm⁻¹ a csatolási értékek esetében.

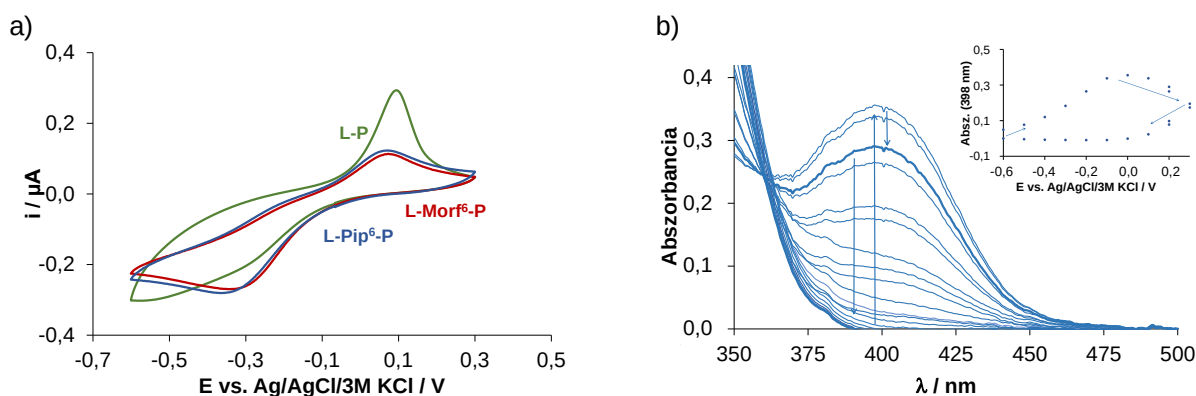
A képződési állandókból számított koncentráció eloszlási görbék (17.b ábra és 19.b ábra) alapján megállapítottuk, hogy pH = 7,40-n minden vizsgált rendszerben a $[\text{CuLH}_{-1}]^+$ komplex az uralkodó részecske. A képződési állandók nem hasonlíthatók össze közvetlenül, mivel a ligandumoknak különböző számú disszociálható protonja van, ezért kiszámoltuk a komplexek látszólagos stabilitási állandóit ($\lg K'$) és pCu(II)-értékeit (a ligandumhoz nem kötött réz(II)ionok egyensúlyi koncentrációjának tízes alapú negatív logaritmusát) pH = 7,4-n (22. ábra). Ezen értékek minél nagyobbak, annál erősebb a ligandum fémionkötő képessége az adott körülmények között. Az adatok alapján a vizsgált származékok közül az L-Morf⁶-P rendelkezik a legerősebb réz(II)ionkötő képességgel, ekkor a réz(II)komplexek disszociációs foka 2%, míg a további vizsgált származékoknál 4-8% pH = 7,4-n és 1 μM koncentráció mellett. Azonban a morfolin- és *N*-metil-piperazin-származékoknál a négyfogú koordináció miatt sokkal erősebb fémkötő képességet vártunk. Feltüntettük az FTSC értékeit is [24], amelyekből egyértelműen kiderül, hogy a C=S rész C=NH-val történő helyettesítése jelentősen lecsökkentette a képződő réz(II)komplexek stabilitását.



22. ábra: A 2-formilpiridin-guanilhidrazon származékok pCu(II) ($= -\lg[\text{Cu(II)}]$) értékei, valamint a Cu(II)-ligandum (1:1) rendszerekre számított látszólagos stabilitási állandók pH 7,40-nél ($\lg K'$). Továbbá az FTSC pCu(II) és $\lg K'$ értékei [24]. $\{C_{\text{Cu(II)}} = C_{\text{ligandum}} = 1,0 \mu\text{M}; t = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,10 \text{ M (KCl)}\}$

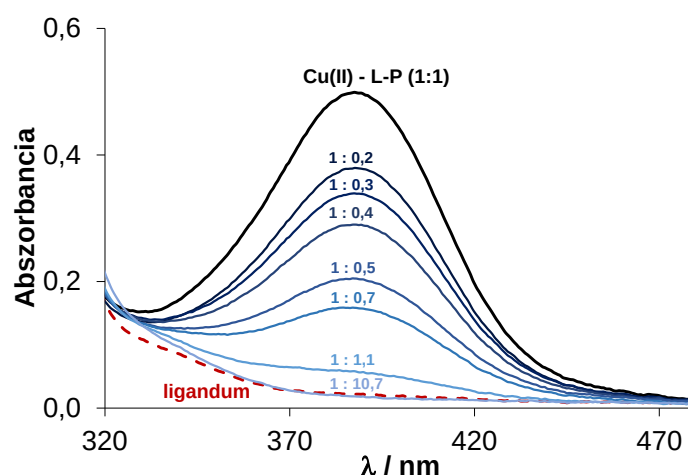
6.5. Réz(II) – 2-formilpiridin-guanilhidrazon komplexek redoxi tulajdonságainak jellemzése

A triapinban a kénatom (C=S) oxigénnel (C=O) vagy szelénnel (C=Se) való helyettesítése fémkomplexeik redoxi tulajdonságaira is jelentős hatással volt [1], ezért várhatóan az imino-csoporttal való szubsztitúció is befolyásolja a fémkomplexek redoxi viselkedését. A réz(II)komplexek redoxi tulajdonságait ciklikus voltammetriás és UV-Vis spektroelettrokémiai módszerekkel vizsgáltuk. Az L-P, L-Morf⁶-P és L-Pip⁶-P származékok réz(II)komplexeinek ciklikus voltammogramjai a **23.a ábrán** láthatók. A voltammogramok alapján megállapítottuk, hogy ezen rendszereknél nagy a feszültségkülönbség az anódos és a katódos csúcsok között ($\Delta E > 390$ mV). A spektroelettrokémiai mérés során felvett Cu(II) – L-Morf⁶-P rendszer reprezentatív spektrumai láthatók a **23.b ábrán**, mely alapján a réz(II)komplexek redukciója során lecsökken az N $\rightarrow$ Cu CT sáv, majd az oxidáció során ismét növekszik. Megbecsültük a formális potenciálértékeket, az L-Morf⁶-P és L-Pip⁶-P komplexeknél +0,06 V és +0,09 V vs. NHE értékűnek adódott. Az L-P komplex esetén az elektrokémiai folyamatok irreverzibilis jellege miatt csak a katódpotenciált tudtuk leolvasni ($E_k \sim +0,09$ V vs. NHE). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a vizsgált származékok réz(II)komplexei redukálhatók természetes redukálószerekkel, mint pl. GSH vagy AA.



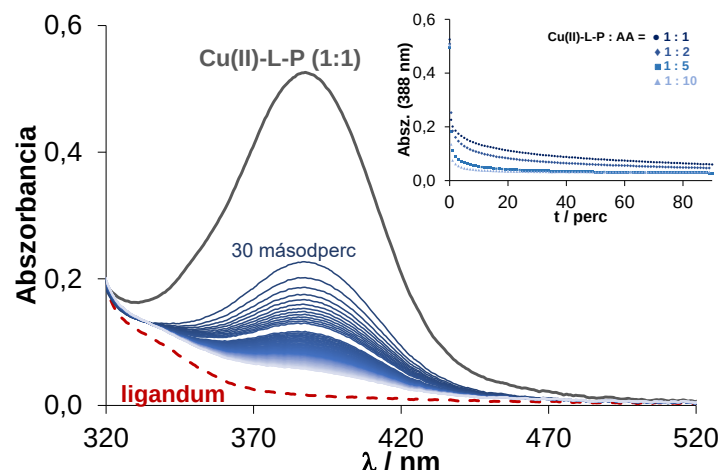
23. ábra: a) A Cu(II) – L-P, Cu(II) – L-Morf⁶-P és Cu(II) – L-Pip⁶-P rendszerek ciklikus voltammogramjai pH=7,4-n. **b)** A Cu(II) – L-Morf⁶-P rendszerre felvett UV-látható spektrumok különböző potenciálértékek mellett spektroelettrokémiai cellával. A beillesztett ábra a 398 nm-en mért abszorbancia értékeket mutatja a potenciál függvényében. { $c_{\text{Cu(II)}}$ = 0,68 mM; c_{ligandum} = 2,06 mM; pH = 7,4; I = 0,1 M (KNO₃); l = 1,70 mm; pásztázási sebesség = 10 mV/s; t = 25 °C}

A L-P, L-Morf⁶-P és L-Pip⁶-P származékok réz(II)komplexeik oxidáló hatását megvizsgáltuk GSH-nal, valamint a gyengébb redukáló hatású AA-val szemben, fiziológias pH-n. A reakciókat UV-Vis spektrofotometria segítségével követtük tandem küvétát használva, anaerob körülmények között. Reprezentatív spektrumok láthatók a **24. ábrán** a Cu(II) – L-P rendszerre. A 10,7-szeres GSH felesleg a réz(II)komplex azonnali redukcióját eredményezte, a reaktánsok összekeverése után felvett első spektrum a szabad ligandum spektrumára hasonlított, mely a ligandum komplexből való disszociációjára utal. A további vizsgált rendszereknél is egy ekvivalens GSH hozzáadása után közel teljes volt a komplexek redukciója. Korábbi eredmények alapján az FTSC és a triapin réz(II)komplexei is redukálhatók voltak GSH-nal, azonban ahhoz jóval nagyobb, akár 50-szeres GSH feleslegre és 1 óra reakcióidőre volt szükség [24].



24. ábra: A Cu(II) – L-P rendszerre felvett UV-látható spektrumok a reakció lejátszódása után különböző GSH-felesleg (0,2–10,7) mellett pH = 7,4-en, kesztyűs manipulátorban. { $c_{\text{Cu(II)}} = 48 \mu\text{M}$; $c_{\text{L-P}} = 51 \mu\text{M}$; $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,1 \text{ M (KCl)}$; pH = 7,40 (50 mM HEPES)}

Az L-P származék réz(II)komplexének redukciója a gyengébb redukáló hatású AA-val is lejátszódott (**25. ábra**), azonban jóval lassabban, mint GSH-nal. 10-szeres AA felesleg mellett a redoxi egyensúly kb. 15 perc alatt állt be. Ezzel szemben az α -N-piridil-TSK-ok réz(II)komplexei nem redukálhatók AA-val.



25. ábra: A Cu(II)-L-P rendszer időfüggő UV-Vis spektrumai egy ekvivalens aszkorbinsav jelenlétében, pH = 7,4-en, kesztyűs manipulátorban. A beillesztett ábra a 388 nm-en mért abszorbancia értékeket mutatja az idő függvényében ábrázolva különböző arányok mellett. $\{C_{\text{Cu(II)}} = 48 \mu\text{M}; C_{\text{ligandum}} = 51 \mu\text{M}; C_{\text{aszorbinsav}} = 49\text{--}490 \mu\text{M}; t = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,1 \text{ M (KCl)}; \text{pH} = 7,40 (50 \text{ mM HEPES})\}$

6.6. 2-formilpiridin-guanilhidrazonok komplexképzése vas(II/III)ionokkal

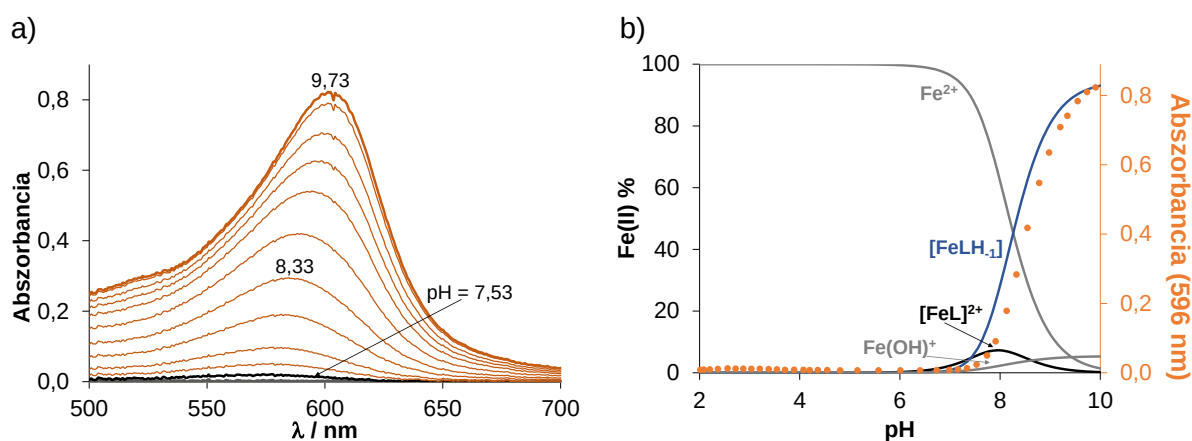
Vizsgáltuk a vasionokkal való komplexképződést is pH-potenciometria és UV-Vis spektrofotometria módszerekkel. A vas(III)komplexek esetében nem tudtunk képződési állandókat meghatározni, mert bár észleltünk komplexképződést pH > 3 tartományban, de pH = ~5-n vas(III)hidroxid csapadék leválását tapasztaltuk. Ez alapján a képződő vas(III)komplexek kis stabilitásúak.

Ezzel szemben a vas(II)komplexek ($[\text{Fe(II)L}]^{2+}$, $[\text{Fe(II)LH}_{-1}]^{+}$) képződési állandóit meg tudtuk határozni 'glove box'-ban, anaerob körülmények között pH-potenciometriás titrálásokkal (**6. táblázat**). A számolt egyensúlyi állandók jóval kisebbek a megfelelő réz(II)komplexekhez viszonyítva. UV-Vis spektrumokat is vettünk fel különböző pH-kon, melyre reprezentatív példa látható a **26.a ábrán**, mely megerősítette, hogy a komplexképződés csak nagyobb pH-értéknél (pH > 7) kezdődik el. Pedig az α -N-piridil tioszemikarbazonok nagy stabilitású vaskomplexeket képeznek mind a +3 mind a +2 oxidációs állapotú fémionnal. Ezen stabilitási adatok alapján a tionkén iminocsoporttal ($\text{C}=\text{S} \rightarrow \text{C}=\text{NH}$) történő helyettesítése a 2-formil-piridin-guanilhidrazon-származékok vasmegkötő képességét jelentősen lecsökkentette.

6. táblázat: A vizsgált 2-formilpiridin-guanilhidrazon származékok vas(II)komplexeinek pH-potenciometriásan meghatározott stabilitási szorzatai ($\lg\beta$). $\{I = 0,10 \text{ M KCl}; t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}\}$

	L-P	L-AP	L-Morf ⁴ -P	L-Morf ⁵ -P	L-Morf ⁶ -P	L-Pip ⁶ -P
$\lg\beta [\text{Fe(II)L}]^{2+}$	$2,80 \pm 0,08$	n. m. ^a	—	—	—	—
$\lg\beta [\text{Fe(II)LH}_{-1}]^{+}$	$-4,61 \pm 0,02$	n. m. ^a	$-4,71 \pm 0,02$	$-4,56 \pm 0,03$	$-5,99 \pm 0,04$	$-6,32 \pm 0,07$

^aNem meghatározott adat (a ligandum limitált mennyisége miatt).



26. ábra: **a)** A Fe(II) – L-P (1:2) különböző pH értékeken felvett UV-látható spektrumai anaerob körülmények mellett. **b)** A számolt koncentráció eloszlási görbék és az 596 nm-en mért abszorbancia értékek. $\{c_{\text{Fe(II)}} = 0,49 \text{ mM}; c_{\text{ligandum}} = 0,53 \text{ mM}; t = 25 \text{ }^\circ\text{C}; I = 0,10 \text{ M}; \ell = 0,41 \text{ cm}\}$

7. Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám során hat különböző 2-formilpiridin-guanilhidrazon-származék oldategyensúlyi tulajdonságait, valamint réz(II)- és vas(II/III)ionokkal való kölcsönhatását tanulmányoztam. Vizsgálatunk célja egyrészt a tioamid-kén iminocsoporttal való helyettesítésének, valamint különböző szubsztituensek (NH_2 , morfolin, *N*-metil piperazin) jelenlétének hatásának feltérképezése az oldatkémiai tulajdonságokra, az endogén fémionokkal (Cu(II) , Fe(II) , Fe(III)) való komplexképző képességre és az *in vitro* farmakológiai aktivitásra.

A proton disszociációs állandókat pH-potenciometriás titrálások elvégzésével határoztuk meg, kiegészítve UV-Vis spektrofotometriás és ^1H NMR spektroszkópai mérésekkel. Utóbbi segítségével beazonosítottuk az L-P valamint az L-AP ligandumokhoz tartozó pK_a értékeket. A savas pH-tartományban lejátszódó proton disszociációs folyamat a piridinium-nitrogén disszociációjához, a semleges pH-jú közegben bekövetkező folyamat pedig az aminoguanidin-rész deprotonálódásához tartozik. A morfolin- és piperazin szubsztituenseket tartalmazó származékoknál (L-Morf⁴-P, L-Morf⁵-P és L-Morf⁶-P, L-Pip⁶-P) a piridinium-nitrogénhez kisebb pK_a értékek tartoznak, hiszen a morfolin- és piperazin-nitrogének még protonált formában vannak jelen a molekulákban, és a pozitív töltésű formájuk pedig elektronelszívó hatásúak. Az aminoguanidin rész pK_a értékei már hasonlóak, hiszen ekkor a morfolin/piperazin-nitrogén már semleges formában van jelen a molekulában. A számolt koncentráció eloszlási görbék alapján az L-P, az L-AP és a morfolin-származékoknál $\text{pH} = 7,4$ -n az egyszerűen protonált HL^+ forma a domináns (>83%), míg az L-Pip⁶-P ligandumnál a H_2L^{2+} forma az uralkodó (56% H_2L^{2+} , 40% HL^+ és 4% L). Vizsgáltuk együttműködés révén a ligandumok és réz(II)komplexeik *in vitro* rákellenes és antibakteriális hatását, a vegyületek azonban nem bizonyultak hatásosnak.

A réz(II)ionokkal való komplexképződést a tioszemikarbazonokkal való összehasonlítás érdekében, és az elmaradt biológiai hatás jobb megértése miatt pH-potenciometriás, UV-látható spektrofotometriás, valamint ESR spektroszkópai módszerekkel vizsgáltuk. A pH-potenciometriás meghatározások alapján mono-komplexeik képződnek, a speciációs modellünk $[\text{CuLH}]^{3+}$, $[\text{CuL}]^{2+}$, $[\text{CuLH}_{-1}]^+$ és $[\text{CuLH}_{-2}]$ részecskéket tartalmaznak. A $[\text{CuL}]^{2+}$ komplexben a ligandum semleges formában koordinálódik (N,N,N) donoratomokon keresztül, míg a $[\text{CuLH}_{-1}]^+$ komplexben a ligandum monoanionként kötődik. A bázikus pH-tartományban képződő $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplex feltételezéseink szerint egy vegyes-hidroxido komplex. Megfigyeltük, hogy amennyiben a morfolin/piperazin-nitrogén donor kelátképző pozícióban helyezkedik el (L-Morf⁶-P, L-Pip⁶-P), a ligandumok négy donoratommal

koordinálódnak a fémionhoz a $[\text{CuL}]^{2+}$, $[\text{CuLH}_{-1}]^{+}$ és $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplexekben. A számolt stabilitási szorzatok alapján ezen 2-formil-piridin-guanilhidrazon származékok jóval gyengébb réz(II)-komplexáló képességűek az analóg TSK-okhoz képest. A kisebb stabilitású komplexek képződése miatt a vizsgált guanilhidrazon-származékok réz(II)komplexei gyorsabban redukálódnak glutation és aszkorbinsav által, mint az analóg TSK-ok komplexei.

Vizsgáltuk a vas(II)- és vas(III)ionokkal való komplexképződést is pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás módszerekkel. Azonban vas(III)ionnal pH $\sim$ 5-n vas(III)hidroxid csapadék vált le, így kis stabilitású vas(III)komplexek képződését feltételezzük. A vas(II)komplexek is kis stabilitásúnak bizonyultak, a komplexképződés csak pH > 7-n kezdődik. A számolt képződési állandók alapján ezen komplexek ($[\text{Fe(II)L}]^{2+}$, $[\text{Fe(II)LH}_{-1}]^{+}$) jóval kisebb stabilitásúak a megfelelő réz(II)komplexekhez viszonyítva.

Összességében elmondható, hogy a tioamid-kén iminocsoporttal való helyettesítése lecsökkentette az endogén fémionokkal képződő komplexek stabilitását, ami hozzájárulhat a vizsgált 2-formil-piridin-guanilhidrazon származékok, valamint azok réz(II)komplexeinek tioszemikarbazonokhoz képesti jóval kisebb, gyakorlatilag nem is mérhető citotoxikus hatásához.

8. Felhasznált irodalom

- [1] É. A. Enyedy, N. V. May, V. F.S. Pape, P. Heffeter, G. Szakács, B. K. Keppler, C. R. Kowol, Dalton Trans. 49 (2020) 16887-16902.
- [2] G. Matela, Anti-Cancer Agents Med. Chem. 20 (2020) 1908-1917.
- [3] O. Dömötör, N. V. May, G. T. Gál, G. Spengler, A. Dobrova, V. B. Arion, É. A. Enyedy, Molecules 27 (2022) 2044.
- [4] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, Chem. Rev. 116 (2016) 3436-3486.
- [5] L. Kelland, Nat. Rev. Cancer 8 (2007) 573-584.
- [6] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, Dalton Trans. 47 (2018) 6645–6653.
- [7] R. W. Brockmac, J. R. Thomson, M. J. Bell. H. E. Skipper, Cancer Res. 16 (1956) 167-170.
- [8] C. A. Leath, W. Deng, L. K. Mell, D. L. Richardson, J. L. Walker, L. L. Holman, J. S. Lea, S. R. Amarnath, L. J. Santos-Reyes, R. C. Arend, J. Mayadev, N. Jegadeesh, P. Disilvestro, H. S. Chon, S. A. Ghamande, A. M Quick, J. P. Chino, H. Mackay, C. Aghajanian, B. J. Monk. J. Clin. Oncol. 41 (2023) 5502.
- [9] T. Ashraf, B. Ali, H. Qayyum, M. S. Haroone, G. Shabbir, Inorg. Chem. Comm. 150 (2023) 110449
- [10] A. M. Levine, A. Tulpule, D. Tessman, L. Kaplan, F. Giles, B. D. Luskey, D. T. Scadden, D. W. Northfelt, I. Silverberg, J. Wernz, B. Espina, and D. V. Hoff, J. Clin. Oncol. 15 (1997) 1094.
- [11] L.S. Vojinović-Ješić, M.M. Radanović, M.V. Rodić, V. Živković-Radovanović, L.S. Jovanović, V.M. Leovac, Polyhedron 117 (2016) 526-534.
- [12] M.S. Kostic, N.D. Radnovic, M.V. Rodic, B.B. Holló, L.S. Vojinovic-Jesic, M.M. Radanovic, J. Serb. Chem. Soc. 88 (2023) 1265-1278.
- [13] A. Mondal, C. Das, M. Corbella, A. Bauzá, A. Frontera, M. Saha, S. Mondal, K.D. Saha, S.K. Chattopadhyay, New J. Chem. 44 (2020) 7319-7328.
- [14] L.S. Vojinovic-Jesic, M.M. Radanovic, M.V. Rodic, L.S. Jovanovic, V.I. Cesljevic, M.D. Joksovic, Polyhedron 80 (2014) 90-96.

- [15] F. Bacher, O. Dömötör, A. Chugunova, N. V. Nagy, L. Filipović, S. Radulović, É. A. Enyedy, V. B. Arion, Dalton Trans. 44 (2015) 9071-9090
- [16] M. N. M. Milunovic, K. O. Besleaga, T. V. Petrasheuskaya, O. Dömötör, É. A. Enyedy, D. Darvasiova, P. Rapta, Z. Barbieriková, D. Vegh, S. Tóth, J. Tóth, N. Kucsma, G. Szakács, A. Popović-Bijelić, A. Zafar, J. Reynisson, A. D. Shutalev, R. Bai, E. Hamel, V. B. Arion, J. Med. Chem. 67 (2024) 9069-9090
- [17] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Talanta 43 (1996) 1739-1753.
- [18] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Petit, Anal. Chim. Acta 38 (1967) 475-482.
- [19] G. Gran, Acta Chem. Scand., 4 (1950) 559-577.
- [20] L. Zékány, I. Nagypál, Plenum Press, New York (1985) 291-353.
- [21] M.R. Ceba, J.J.B. Nevado, A.E. Mansilla, Talanta 28 (1981) 134-136.
- [22] I. Puigdomenech, Medusa, <https://www.kth.se/che/medusa> (2024.11.16.)
- [23] M. N. M. Milunović, O. Palamarcu, A. Sirbu, Sergiu Shova, D. Dumitrescu, D. Dvoranová, P. Rapta, T. V. Petrasheuskaya, E. A. Enyedy, G. Spengler, M. Ilic, H. H. Sitte, G. Lubec, V. B. Arion, Biomolecules 10 (2020) 1213.
- [24] S. Hager, V. F. S. Pape, V. Pósa, B. Montsch, L. Uhlik, G. Szakács, S. Tóth, N. Jabronka, B. K. Keppler, C.R. Kowol, É. A. Enyedy, P. Heffeter, Antioxid. Redox Signal. 33 (2020) 395-414.
- [25] K. Ohui, E. Afanasenko, F. Bacher, R. L. X. Ting, A. Zafar, N. Blanco-Cabra, E. Torrents, O. Dömötör, N. V. May, D. Darvasiova, É. A. Enyedy, A. Popović-Bijelić, J. Reynisson, P. Rapta, M. V. Babak, G. Pastorin, V. B. Arion, J. Med. Chem. 62 (2019) 512-530.
- [26] É. A. Enyedy, A. Giricz, T. V. Petrasheuskaya, J. P. Mészáros, N. V. May, G. Spengler, F. Kovács, B. Molnár, É. Frank, Inorganics 12 (2024) 49.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Enyedy Éva Annának** (tanszékvezető egyetemi tanár) a lehetőségért, hogy a SZTE TTK Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszékén, az MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoportban végezhettem el a Tudományos Diákköri munkámhoz szükséges méréseket. Hálával tartozom a lehetőségekért és támogatásáért, melyek segítik céljaim elérését, továbbá köszönettel tartozom a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségért.

Köszönöm külföldi együttműködő partnerünknek, **Dr. Vladimir B. Arionnak** és kutatócsoportunk volt tagjának **Dr. Tatsiana V. Petrasheuskaya**-nak hogy biztosították a mérésekhez szükséges vegyületeket. Köszönet illeti hazai partnereinket, **Dr. May Nóra Veronikát** az ESR mérések elvégzéséért és kiértékeléséért, továbbá **Dr. Spengler Gabriellát** a biológiai mérések elvégzéséért és kiértékeléséért.

Továbbá köszönöm a kutatócsoport összes tagjának, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel, kiemelve **Kovács Hilda** PhD hallgatót.