



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**Rákellenes hatású pirazolcsoportot tartalmazó
(tio)szemikarbazonok és réz(II)komplexeik oldategyensúlyi
jellemzése**

Készítette:

Takács Aletta

12. Középiskolás diák

SZTE Báthory István Gyakorló Gimnázium és Általános Iskola

Témavezetők:

Dr. Enyedy Éva Anna, *tanszékvezető egyetemi tanár*

Gátszegi Gerda Tímea, *II. vegyész MSc hallgató*

Lezárva: 2025. január 7.

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	3
1. Tartalmi összefoglaló.....	4
2. Bevezetés.....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. Daganatos betegségek és kezelésük.....	6
3.2. (Tio)szemikarbazonok.....	7
3.3. A (tio)szemikarbazonok réz(II)komplexei.....	9
4. Célkitűzések.....	12
5. Kísérleti rész.....	13
5.1. Felhasznált vegyszerek.....	13
5.2. Ultraibolya-látható spektrofotometria.....	13
6. Eredmények.....	16
6.1. Ligandumok oldategyensúlyi vizsgálata.....	16
6.2. A biológiai hatás vizsgálata.....	20
6.3. A ligandumok réz(II)ionokkal való komplexképzésének oldategyensúlyi vizsgálata.....	23
6.4. Tioszemikarbazonok és réz(II)komplexeik redoxi tulajdonságai.....	26
7. Összefoglalás.....	28
8. Irodalmi jegyzék.....	30
9. Köszönetnyilvánítás.....	32

Rövidítések

AA	aszcorbinsav
FTSC	2-formil-piridin-tioszemikarbazon
GSH	glutation
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
RNR	ribonukleotid-reduktáz
ROS	reaktív oxigén származék
STSC	szalicilaldehid-tioszemikarbazon
TSC	tioszemikarbazon
SC	szemikarbazon
UV-Vis	UV-látható

1. Tartalmi összefoglaló

Számos rákellenes hatást mutató fémkomplexet állítottak elő az évek során, azonban a fellépő mellékhatások és a rezisztencia újabb és hatékonyabb vegyületek fejlesztésére adott okot. Korábbi vizsgálatok eredményei alapján a tioszemikarbazon (TSC) és szemikarbazon (SC) vegyületcsalád ígéretesnek mutatkozott a daganatos sejtekkel való küzdelemben. Az α -N-pridil-TSC-ok közül a triapin már fázis III vizsgálat alatt áll [1]. Korábban történtek vizsgálatok pirazolcsoportot tartalmazó TSC-okkal és egy SC-nal, valamint azok réz(II)komplexeivel, mely mérések eredményei alapján hatásosnak bizonyultak rákos sejtek ellen [2].

A TDK munkám során olyan pirazolcsoportot tartalmazó (tio)szemikarbazonokat vizsgáltunk, melyek nemcsak koordinációs módjukban, hanem szubsztituenseikben is különböznek. Az N-terminális csoporton NH_2 vagy NHCH_3 , a pirazolgyűrűn pedig furán- vagy tiofén szubsztituens található. Munkánk során kíváncsiak voltunk, hogy ezen szerkezeti különbségek hogyan hatnak a ligandumok proton disszociációs folyamataira, a réz(II)ionokkal képződő komplexeik stabilitására, illetve a rákellenes hatásukra. Vizsgáltuk a ligandumok lipofilitását és UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével meghatároztuk a ligandumok deprotonálódására és réz(II)ionokkal való komplexképzésre vonatkozó egyensúlyi állandókat, mindemellett tanulmányoztuk a komplexek redoxi tulajdonságaikat is.

Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a vegyületek fiziológiás pH-n semleges formában vannak jelen, ami hozzájárul a korlátozott vízoldhatóságukhoz. A ligandumok a réz(II)ionnal mono- és biszkomplexekeket képeznek, utóbbi az uralkodó részecske pH = 7,4-n. Továbbá megállapítható, hogy a TSC – SC ligandumpárok közül a TSC-ok rendelkeztek erősebb rákellenes hatással, illetve a réz(II)ionok jelenléte növelte a citotoxicitását.

Kulcsszavak: tioszemikarbazon, UV-Vis spektrofotometria, stabilitási állandó, redoxi reakció, citotoxicitás

2. Bevezetés

A daganatos betegségek gyógyítása napjainkban egyre nagyobb jelentőséggel bír, hiszen nemcsak hazánkban, hanem világszerte is a halálozások számának több mint 20%-a köthető ilyen rosszindulatú elváltozásokhoz. Rákos sejtek testünk bármely részén elszaporodhatnak, ezért különböző kezelési módok és eljárások léteznek a betegség gyógyítására. Leggyakoribb kezelések közé a műtéti beavatkozás és a sugárterápia tartozik. Több mint negyven éve nagy áttörést jelentett a platina(II)-tartalmú vegyületek hatékonyságának felfedezése [3]. Ezen platina-alapú gyógyszerek (ciszplatin, karboplatin, oxaliplatin) a mai napig is széleskörben használtak a kemoterápiás gyógykezelések során, elsősorban kombinált terápiák részeként. Használatukkor azonban komoly mellékhatások jelentkezhetnek, hiszen nem célzottan hatnak a daganatos sejtekre, így a környező egészséges sejteken is jelentős károkat okoznak. Ezen felül jellemzően kialakul a rezisztencia, amely a rákos sejtek azon képessége, hogy ellenálljanak a korábban hatékony gyógyszeres kezeléseknek, ami szintén korlátozza a gyógyszeres kezelés hatékonyságát, illetve ezáltal az alkalmazhatóságát. Éppen ezen problémák leküzdése motiválja a kutatókat hatékonyabb és szelektívebb vegyületek kifejlesztésére. A hatóanyagok hatásmechanizmusának és tulajdonságaik megismeréséhez azonban alapos kémiai és biológiai vizsgálatokra van szükség, és az így kapott ismeretek segítik további új, hatékonyabb vegyületek megtervezését.

TDK munkánkban ezen általános célok mentén különböző rákellenes hatású szemikarbazonok és tioszemikarbazonok, illetve azok réz(II)komplexeinek szisztematikus oldategyensúlyi tanulmányozását tűztük ki célul.

3. Irodalmi összefoglaló

3.1. Daganatos betegségek és kezelésük

A TDK munkám során heterociklusos tioszemikarbazonokat (TSC) és szemikarbazonokat (SC) vizsgáltam. Ilyen típusú vegyületek rákellenes hatását már a 20. század elején felismerték [4]. Az 1960-as évek előtt a rák ellen használatos törzskönyvezett gyógyszerek teljes mértékben szerves anyagok voltak. Később – egy véletlen folyamán – felfedezték a ciszplatín komplex rákellenes és citosztatikus tulajdonságait, ezzel egy teljesen új utat megnyitva a daganatos betegséggel való küzdelemben [5]. A kemoterápiás kezelések során a fellépő mellékhatások és a gyógyszer-rezisztencia azonban további citotoxikus hatású, fémtartalmú vegyület fejlesztésére ösztönzik a kutatókat. Az említett citotoxikus hatás azonban a nem megfelelő szelektivitásnak köszönhetően nemcsak a rákos, hanem az egészséges sejteket is éri, ezzel kellemetlen tüneteket (láz, hányás, hasmenés) idézve elő. Ezért olyan vegyületek előállítása a cél, amelyek a lehető legjobb farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A pozitív tulajdonságainak és eredményességének köszönhetően először más platina(II)-alapú gyógyszereket igyekeztek fejleszteni. A platina(II)komplexek közül az oxaliplatín és a karboplatin tűnt a legígéretesebbnek, melyek klinikai használatban vannak jelenleg is. A mellékhatások sajnos itt sem kerülhetők el, azonban ezek a komplexek kevésbé reakcióképesek, így kevesebb kárt okoznak a környező egészséges sejteken [6]. A legnagyobb problémát azonban még mindig a rezisztencia kialakulása jelenti, mely az onkológiai kezelések igen nagy hányadát érinti. Ezen indokok motiválják az azóta is folyó kutatásokat a minél hatékonyabb és más hatásmechanizmusú gyógyszerek előállításához. Sok esetben a megoldást a központi fémion variálása jelentheti, ugyanakkor a citotoxikus hatás a ligandumhoz is köthető. Éppen ezért a ligandumok vizsgálata is ugyanannyira fontos lehet, mint a megfelelő fémion kiválasztása.

A daganatos betegségek gyógykezeléséről viszonylag régóta beszélhetünk. Legelőször a műtéti beavatkozások váltak elterjedtté, mint például a mellrák gyógyítása radikális masztektómiával (1882. William Halsted). Később a sugárkezelés nyert inkább teret, illetve a kezelések kombinálásával próbálkoztak. Ez utóbbi a daganatok sokféleségére egy megfelelő megoldást biztosíthat, amellet, hogy a mellékhatásokat csökkenti és enyhíti. Ezenkívül még a hormonális- és immunterápia is használatosak a rák ellen való küzdelemben. A hormonális terápia az ösztrogén, illetve a tesztoszteron szintjének csökkentésével segít a here- és mellrák legyőzésében. Míg az immunterápia lényege, hogy az immunrendszert aktiválja a daganatos sejtek ellen, ezzel hozzájárulva ahhoz, hogy a

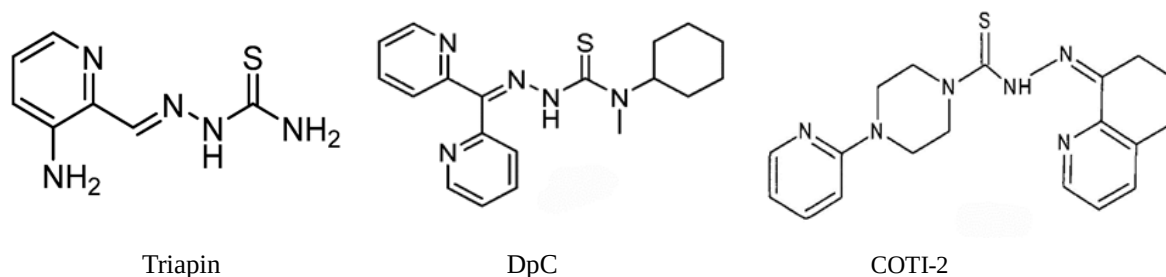
szervezet saját védekezőképessége erősödjön. A kemoterápiás kezelések során jelenleg ~150 különböző törzskönyvezett hatóanyagot használnak a klinikai gyakorlatban. A hatóanyagok igen változatos szerkezetűek és farmakológiai hatásúak, melyek között találunk DNS-alkilező szereket (pl. az említett platinakomplexek), antimetabolitokat (pl. folsav-analógok, 5-fluorouracil) és enzim inhibitorokat (pl. topoizomeráz-, hiszton-deacetiláz-, tirozin-kináz-gátlók).

3.2. (Tio)szemikarbazonok

A (tio)szemikarbazonok hatásmechanizmusának alapja a fémionokkal való stabilis komplexek képzésének lehetősége, így képesek hatékonyan gátolni bizonyos enzimek működését, melyek a daganatos sejtek növekedésében és túlélésében játszanak szerepet [7]. A (tio)szemikarbazonok Schiff-bázisoknak tekinthetők, egy karbonil (aldehid vagy keton) és egy (tio)szemikarbazid, mint amin, reakciójával állíthatók elő [8]. Alapvázuk TSC-ok esetén (N,S), míg SC-ok esetén (N,O) donoratomokkal rendelkezik, amelyeken keresztül koordinálódnak a fémionhoz semleges vagy anionos formában. A két donoratomnak köszönhetően kétfogú ligandumként viselkednek, de gyakran egy harmadik koordinálódni képes donoratom is van a molekulában [4,9]. A két vegyületcsoport koordinációs tulajdonsága eltér egymástól, hiszen az oxigén elektronegativitása jóval nagyobb, mint a kéné. Emiatt leginkább a keletkező fémkomplex stabilitásában lesz különbség. Erre bizonyíték a korábban már tanulmányozott szalicilaldehid-tioszemikarbazon (STSC) és szalicilaldehid-szemikarbazon (SSC) mind réz(II)-, mind vas(III)- ill. vas(II)komplexének stabilitása között tapasztalt különbség [10]. Az STSC (O,N,S), míg az SSC (O,N,O) donoratomokon keresztül koordinálódik a fémionokhoz. A tioszemikarbazon ligandum általában valamennyivel stabilisabb komplexet eredményezett a *szoftabb* Lewis sav karakterű fémionokkal. A képződő fémkomplexek koordinációs geometriájában is van különbség, míg a réz(II)ionokkal torzult oktaéderes, addig a vas(III/II)ionokkal oktaéderes komplexeket képeznek [11,12]. A molekulákban jelenlévő C=N kettős kötésnek köszönhetően kialakulhat geometriai (E/Z) izoméria, valamint a TSC-nál a tion-tiol, míg a SC-nál keto-enol izoméria figyelhető meg. Emellett a fémionokkal való komplexképzés során a fém-ligandum aránytól, az adott koncentrációtól és pH-tól függően többféle sztöchiometriájú komplex is képződhet.

Ugyan a TSC vegyületcsalád már korábban is ismert volt, biológiai hatását csak a XX. század második felében ismerték fel. Legnagyobb áttörést az 1956-ban a 2-formil-

piridin-tioszemikarbazon (FTSC) leukémia elleni hatásának igazolása jelentette [13]. Számtalan sikeres és sikertelen preklinikai kísérlet után végül a 3-aminopiridin-2-karboxaldehid-tioszemikarbazon (triapin, 1. ábra) került klinikai vizsgálatba [14]. Fázis I/II vizsgálatokat követően biztató eredményeket mutatott, azonban rövid biológiai felezési idejének köszönhetően szolid tumorokkal szemben jóval kevésbé volt hatékony [1]. Jelenleg fázis III klinikai vizsgálatok zajlanak a triapinnal és a ciszplatinnal, ezenkívül sugárterápia kombinált használatával tesztelik előrehaladott stádiumú méhnyak- és hüvelyrákok esetében [1]. Ugyanakkor a triapin használatakor előfordulnak komoly mellékhatások is, mint például láz, hányás és methemoglobinémia. Ezen problémák ösztönözték a további fejlesztéseket, amelyek során egy tetrahidrokinolin-származék, a COTI-2 (1. ábra) került klinikai fázisba [14]. Egy év elteltével, 2016-ban a DpC (1. ábra) is sikeresen jutott klinikai vizsgálatba [14].



1. ábra Klinikai vizsgálatba került tioszemikarbazonok szerkezeti képlete.

Ezen vegyületek rákellenes hatása a dezoxi-ribonukleotidok képződését katalizáló ribonukleotid-reduktáz (RNR) enzim működésének akadályozásán alapszik [7]. A daganatos sejtekben az RNR enzim expressziója fokozódott, így ezen folyamat lassítása, illetve megszüntetése egy hatékony gyógykezelés alapját biztosítja. Az enzim szerkezete két részre osztható (R1 és R2), és az inhibíciós folyamatban az R2 alegység fog jelentős szerepet játszani. Ugyanis ezen utóbbiban található az aktív centrum, amelyben két vasion és egy szabad tirozil-gyök (Tyr) helyezkedik el. Az enzim gátlása során a triapin kölcsönhatásba lép az R2 alegységgel, amelynek következtében egy vas(II)komplex keletkezik, ami majd elreagál az oxigénnel, és a keletkező reaktív oxigén származékok (ROS) már képes a szabad Tyr gyökök kioltására [15]. Tulajdonképpen ezzel inaktiválja az enzimet, és ezáltal megszünteti a daganatos sejtek DNS-ének további szintézisét, és szaporodását. A képződő vas(III)kompleket különböző antioxidánsok (pl. glutation) redukálják majd vissza vas(II)komplexé. Mivel a folyamat révén vas(II)-, és vas(III)-TSC-komplex is keletkezik, így a komplexek stabilitása és redoxi tulajdonsága számottevő a biológiai hatásukban [16].

3.3. A (tio)szemikarbazonok réz(II)komplexei

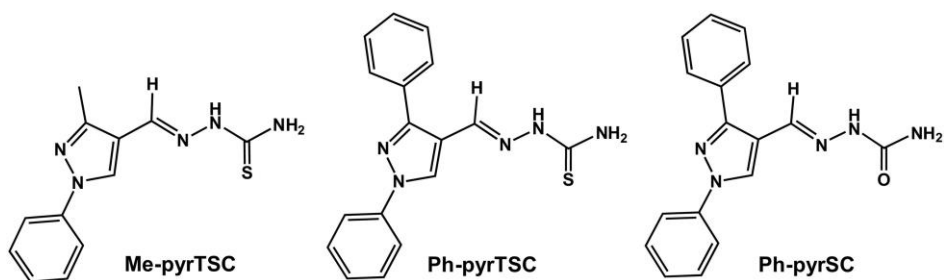
Előzetes vizsgálatok alapján nemcsak a (tio)szemikarbazonok sejten belül képződő vaskomplexei, hanem bizonyos esetekben azok rézkomplexei is nagy befolyással vannak a hatásmechanizmusra [17]. Főként azoknál a ligandumoknál jellemző ez, amelyeknek IC_{50} (ami a citotoxicitás jellemzésére szolgáló azon koncentráció, ahol a kezelt sejtek fele elpusztul) értékei nM koncentrációtartományba esnek. Ezen vegyületeknél a ligandum mellett a réz(II)ionnal képzett komplexük is jelentős antitumor hatást mutatott. Egyes vegyületeknél a komplex citotoxicitása meg is haladja a ligandumét, mint például a STSC-nál és az N-terminálisan diszubsztituált α -N-piridin-tioszemikarbazonoknál. Azonban a triapin esetében, melynél a terminális aminocsoport nem szubsztituált, a ligandum aktívabb a réz(II)komplexhez képest [18-20]. Ezen adatok okot adtak mind a ligandumok, mind a rézkomplexeik további részletesebb vizsgálatára.

A rézkomplexek mechanizmusának alapját a reaktív oxigénszármazékok képződése jelenti [21]. Az ROS-k igen aktív ágensek (pl. H_2O_2 , $OH^\cdot$ gyök, $O_2^{\cdot-}$ szuperoxid anion), amelyek a sejtekben természetes úton keletkeznek, és fontos szerepük van a sejtciklusok rendeltetésszerű lejárásában. Azonban, nagy koncentrációban komoly veszélyt jelentenek az emberi szervezetre, hiszen a sejtekben és a DNS-ben is komoly károkat okozhatnak. Pontosan emiatt lesz hatékony a megnövekedett ROS szint a kemoterápiás kezelésekben, mivel nagyban hozzájárul a daganatos sejtek pusztulásához. Vannak olyan rézkomplexek is, amely a topoizomeráz enzim működését befolyásolják [22]. Ennek az enzimnek kiemelkedő szerepe van a DNS replikációban, hiszen felelős a DNS szál felhasításáért és az új szálak kialakításáért. Az enzim működésének befolyásolásával, illetve gátlásával a daganatos sejtek szaporodását lassíthatjuk, vagy akár meg is szüntethetjük.

Azonban a (tio)szemikarbazonok oldatbeli viselkedéséről viszonylag kevés információ volt elérhető korábban a szakirodalomban vízben való oldhatóságuk korlátozottsága miatt, de az utóbbi években már számos fémkomplex stabilitását jellemezték [2]. A komplexek képződési állandóinak meghatározása legtöbb esetben a vízhez képest kisebb relatív permittivitású (apolárosabb) víz/szerves vegyes oldószeres közegben (30% (v/v) dimetil-szulfoxid (DMSO) jelenlétben) történt. Az új, potenciálisan rákellenes hatású fémkomplexek esetén is fontos, hogy ismerjük a vizes oldatban jelen lévő kémiai formákat és azok stabilitását. A fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározásához a ligandumok proton disszociációs folyamatainak a megismerése is fontos. Ugyanis a fémkomplexek képződése során kompetitív reakció játszódik le a proton és a fémion között

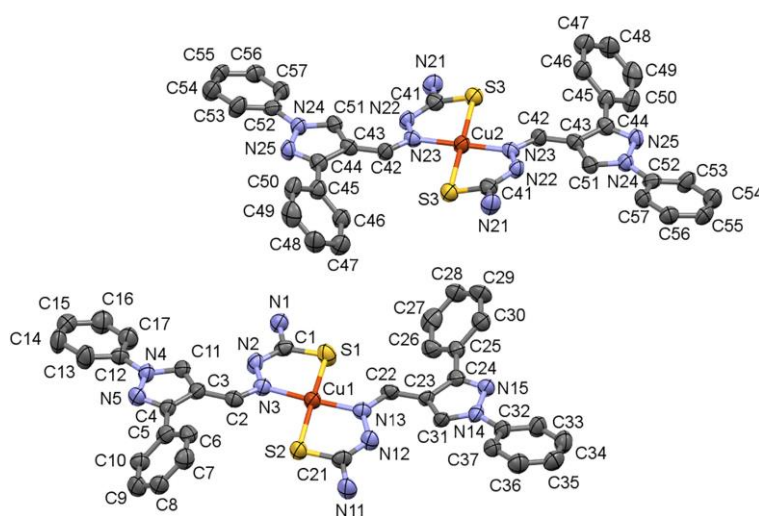
a ligandum kötőhelyeiért. Minél stabilisabb az adott komplex, annál nagyobb mértékű a protonleszorítás adott lúgekvivalensnél, így annak koncentrációjának (pH) mérésével a folyamat nyomon követhető pH-potenciometriás módszerrel. Emellett a komplexképződés hatására a ligandum abszorpciós spektruma is jellemzően megváltozik, és a réz(II)komplexeknél $S \rightarrow Cu(II)$ töltésátviteli sáv megjelenését is várhatjuk.

A kétfogú (tio)szemikarbazonoknak (egyéb befolyásoló funkciós csoport hiányában) egy disszociálabilis protonja van, és oldatban, ill. fémkomplexeikben a tion-tiol tautomeria, ill. a $C=N$ kettős kötés mentén létrejövő Z/E izoméria miatt többféle megjelenési formáik is jelen lehetnek [9]. Fémkomplexeikben a semleges (tiol) és deprotonált (tionát) alak is koordinálódhat. A kétfogú (tio)szemikarbazonokkal $Cu(II)$ -ionnal történő reakciójuk során mono-, és biszkomplexez képződnek [2], míg a háromfogú ligandumokkal a monokomplexez van kiemelt stabilitása [10,16]. A képződő komplexek oldategyensúlyi vizsgálatai segítségével meg tudjuk adni, hogy a komplexek adott pH-n milyen formában vannak jelen. A korábban vizsgált háromfogú, (N,N,S) donoratomokkal rendelkező tioszemikarbazonok esetében, a ligandumok fiziológiás pH-n semleges formában vannak jelen, és réz(II)ionnal monokomplexez kialakulása jellemző. Kisebb pH értékeken inkább a $[Cu(LH)]^{2+}$ komplex képződik, melyben a semleges ligandum koordinálódik. A pH növekedésével a $[CuL]^+$ komplex képződése figyelhető meg, melyben a ligandum negatív töltése a kénatomon lesz a hidrazin-N csoport deprotonálódását és a tautomer átrendeződést ($-N-C=S \rightarrow N=C-S^-$) követően. Kellően bázikus pH értékeken kialakul a $[CuL(OH)]$ vegyes-hidroxido komplex. Illetve ligandum felesleg esetén $[CuL_2]$ biszkomplex és $[Cu_2L_3]^+$ kétmagvú komplex is képződik α -N-piridin-tioszemikarbazonokkal [23]. Az (O,N,S) donoratomokat tartalmazó háromfogú tioszemikarbazonokkal, mint az STSC, ugyanakkor kizárólag csak monokomplexez ($[Cu(LH)]^+$, $[CuL]$ és $[CuL(OH)]^-$) képződnek [24]. Korábban történtek vizsgálatok az általam is tanulmányozott ligandumokhoz hasonló szerkezetű két pirazol-tioszemikarbazonnal, ill. egyik szemikarbazon változatával (2. ábra) [2].



2. ábra Korábban vizsgált pirazol-(tio)szemikarbazon származékok [2].

Az UV-látható spektrofotometriás mérések alapján megállapították, hogy a vegyületek semleges formában vannak jelen egészen magas pH értékekig (pH ~10-ig), mivel a hidrazin-NH csoport deprotonálódása csak a lúgos pH tartományban játszódik le. Ezek alapján kijelenthető, hogy fiziológias pH-n semleges formában vannak jelen. A vizsgált kétfogú ligandumok és a Cu(II)-ionok reakciója során mono-, és biszkomplexek egyaránt képződnek. A savas pH tartományban a monokomplex dominál, míg a pH növekedésével egyre nagyobb arányban van jelen a biszkomplex is, melynek szerkezetét az egyik esetben (Ph-pyrTSC) a 3. ábra mutatja.



3. ábra A $[\text{Cu}((\text{Ph-pyrTSC})\text{H}_{-1})_2]$ bisz-komplex Röntgen-kristallográfiás módszerrel meghatározott szerkezete [2].

Ezenkívül citotoxikus tulajdonságuk megismerésére is történtek vizsgálatok. Míg a két tioszemikarbazon közepes hatást eredményezett a rákos sejtvonalak ellen ($\text{IC}_{50} = 25 - 100 \mu\text{M}$), addig rézkomplexeik sokkal magasabb citotoxicitást mutattak ($\text{IC}_{50} = 3 - 22 \mu\text{M}$). A szemikarbazon (Ph-pyrSC) és komplexe kevésbé volt citotoxikus [2].

4. Célkitűzések

A fő célunk a választott pirazolcsoportot tartalmazó szemi- és tioszemikarbazonok (összesen hat vegyület) és réz(II)komplexeik részletes oldategyensúlyi tanulmányozása, annak érdekében, hogy feltárjuk, hogy az egyes molekulaszervezeti elemek hogyan hatnak az oldatkémiai tulajdonságokra és a biológiai hatásra. A választott vegyületekben variálódik a koordinációs mód lehetősége (N,S vs. N,O), illetve különböző szubsztituenseket tartalmaznak az N-terminális csoporton (NH_2 vs. NHCH_3) és a pirazolgyűrűn (fűrán vs. tiofén). Ezen szerkezeti különbségek ismeretében próbálunk következtetéseket levonni az adott ligandum oldatkémiai tulajdonságairól, mint a proton disszociációs folyamataik, réz(II)ionokkal képzett komplexeik stabilitása és redoxi tulajdonsága.

A ligandumok deprotonálódási folyamatainak nyomon követéséhez UV-látható abszorpciós spektrofotometriás titrálásokat végzünk, mivel a mérési adatok alapján meg tudjuk határozni, hogy a ligandum milyen formában (ionos vagy semleges) van jelen egy adott pH-n. A vegyületek lipofilitását *n*-oktanol és víz közötti megoszlásos kísérlettel vizsgáljuk. A rézkomplexeik összetételének és stabilitásának tanulmányozásához is UV-látható spektrofotometriás titrálásokat végzünk különböző réz(II)ion-ligandum arányokat használva.

A ligandumok és réz(II)komplexeik rákellenes hatását jellemző citotoxicitási adatokat a molekulaszervezeti elemekkel és a számolt oldategyensúlyi adatokkal tervezzük összevetni összefüggések feltárása céljából.

5. Kísérleti körülmények

5.1. Felhasznált vegyszerek

A vizsgált vegyületek (SC-F-NH₂, SC-T-NH₂, TSC-F-NHMe, TSC-T-NHMe, TSC-F-NH₂, TSC-T-NH₂) szintetizálása és karakterizálása az SZTE Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszéken, Dr. Frank Éva kutatócsoportjában történt. A méréseknél használt glutation (GSH), aszkorbinsav (AA), 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES), a Sigma-Aldrich terméke. A KCl, KOH, KH-ftalát, HCl és a CuCl₂ a Reanal Laborvegyszer KFT-től származik. A dimetil-szulfoxid (DMSO) pedig a VWR terméke.

A ligandumokból a törzsoldatokat tisztítás nélkül, tömeg szerinti beméréssel állítottuk elő. A ligandumok szerkezetét és tisztaságát korábban ¹H, ¹³C NMR és kvantitatív-NMR mérésekkel igazolták. A réz(II)-tartalmú törzsoldatokhoz a CuCl₂-t vízben oldottuk, majd EDTA mérőoldat segítségével határoztuk meg a pontos koncentrációjukat. Oldószerként minden esetben Milli-Q vizet használtunk. Az állandó 0,1 M-os ionerősséget KCl használatával állítottuk be a mérések során.

5.2. Ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometria

A módszer a vizsgált molekula/komplex vegyértékelektronjainak gerjesztésén, vagyis egy alacsonyabb energiapályáról egy magasabb energiájú szintre való kerülésén alapszik. A molekula azon részét, ahol az elektronátmenetek létrejönnek, kromofornak nevezzük. Ezen módszerrel olyan anyagokat érdemes vizsgálni, amelyeknek a fényelnyelési sávja a 200 és 800 nm hullámhossztartomány között helyezkedik el. Ha a vizes oldat abszorbanciáját a besugárzó fény hullámhosszána függvényében ábrázoljuk, akkor egy abszorpciós spektrumot kapunk, amelyből mind minőségi, mind mennyiségi információkat szerezhetünk.

A fény elnyelésének mértéke és tartománya anyagi minőségtől függ elsősorban, de a kromoforral kölcsönhatásban lévő egyéb csoportok is befolyásolják. Híg oldatok esetében az anyag koncentrációja és mért abszorbancia közötti összefüggést a Lambert-Beer törvény írja le: $A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$; amelyben: A_λ : λ hullámhosszon mért abszorbancia, ε_λ : λ hullámhosszon mért moláris abszorbancia (M⁻¹cm⁻¹), c : koncentráció (M) és l : úthossz (cm). A fotometriás mérésekre az ad lehetőséget, hogy komplexképződési reakciók folyamán megváltozik a molekula elektroneloszlása és gerjeszthetősége, tehát a protonált, a deprotonált és a komplexben kötött ligandum elnyelési sávja eltérő lesz.

A fémkomplexek stabilitási szorzatait a HypSpec program [25] segítségével határoztuk meg, ami a pH-függő spektrumokból, a Lambert-Beer törvényt felhasználva, illetve a komponensekre vonatkozó anyagmérlegek alapján előállított egyenletrendszer iterációs módszerekkel oldja meg.

Ezen mérési módszer kifejezetten alkalmas olyan anyagok vizsgálatára is, amelyekből korlátozott mennyiség érhető el. Éppen ezért a kutatásunkban jelentős figyelmet kapott, hiszen különböző típusú méréseket végeztünk ezen módszer segítségével olyan vegyületek esetén, amelyekből nem állt a rendelkezésünkre nagy mennyiség (< 20 mg). Ennek a módszernek a segítségével meghatároztuk a ligandumok proton disszociációs állandóit (K_a), a réz(II)komplexek képződési állandóit (β), és azok reakcióit redukálószerekkel 30% (v/v) DMSO/H₂O oldószerkeletben. Mindemellett végeztünk lipofilitást meghatározó kísérleteket is, ahol az *n*-oktanol/víz közegben a megoszlási állandókat határoztuk meg.

A ligandumok és komplexeik spektrofotometriás titrálásánál egy Agilent Cary 8454 UV-látható diodasoros spektrofotométert használtunk, ahol az optikai úthossz a legtöbb esetben 2 cm volt. A pH méréséhez szükséges rendszer kalibrálását egy erős sav (HCl) - erős bázis (KOH) titrálással végeztük Irving-féle módszerrel [26]. Ezen mérések eredményeiből, pontosabban a lúg fogyásából (térfogat) és a pH adatpárokból a Gran-módszert felhasználó Abu9x program segítségével meghatároztuk mind az Irving-féle faktort, mind a vízionszorzatot (K_w). A titráláshoz Metrohm Dosimat 665 típusú automata bürettát, Orion 710A pH-mérőt és Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrodát használtunk. A mérőműszert 0,05 M KH-ftaláttal (pH=4,008) hitelesítettük, a meredekség értékét a vízionszorzat ($pK_w=14,53 \pm 0,01$) alapján választottuk meg.

A titrálás során a ligandumok és a réz(II)komplexek esetében is a minták a ligandumot 10-12 μ M-os koncentrációtartományban tartalmazzák. A mérések során a pH 1,7-14 közötti tartományt vizsgáltuk. A titrálásokat karbonátmentes KOH segítségével végeztük, melynek pontos koncentrációját KH-ftalát oldattal határoztuk meg. A spektrumokat argon atmoszféra jelenlétében, $25 \pm 0,1$ °C-on, állandó (0,1 M-os) ionerősség mellett vettük fel.

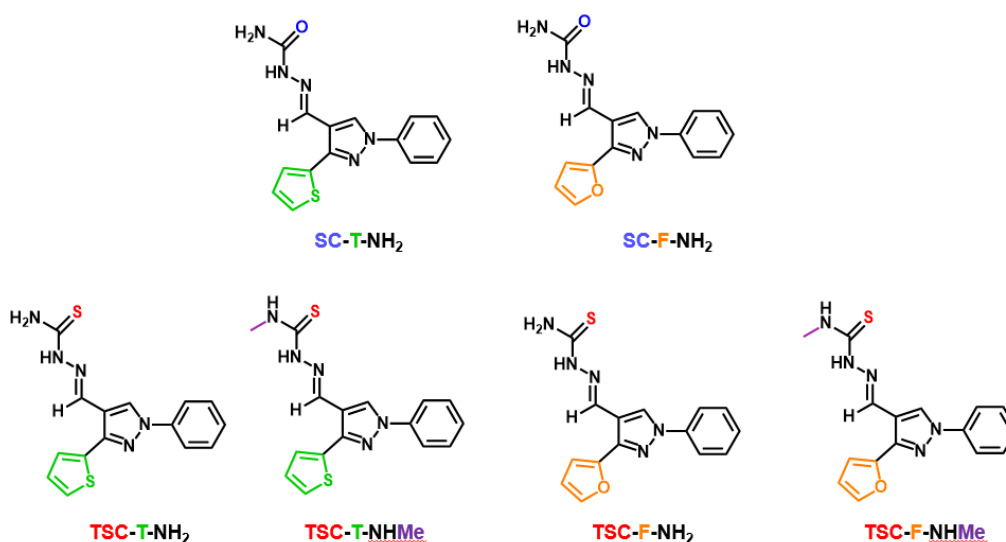
A lipofilitás meghatározására a hagyományos *n*-oktanol/víz közti megoszlásos módszert alkalmaztuk. A kísérleteket pH = 7,4-en végeztük, a pH állandó értéken tartásának érdekében 20 mM HEPES puffert adtunk a rendszerekhez. Fázisválasztás után felvettük mindkét fázis, és az eredeti *n*-oktanolos minta abszorpciós spektrumát is.

A vegyületek redoxi tulajdonságának vizsgálatánál a glutationnal és az aszkorbinsavval való reakciók során a pH-t HEPES puffer segítségével állítottuk a fiziológias értékre (7,4). A méréseket az anaerob körülmények biztosítása céljából 'glovebox'-ban (GP(Campus), Jacomex) végeztük, tandemküvetét ($l = 1\text{ cm}$) használva, hogy a Cu(II)-ligandum oldatot elkülönítsük a redukálószerrel a reakció indításáig. A spektrumokat felvettük a reagensek összekeverése előtt, majd közvetlenül utána is egy Avantes AvaSpec-UL2048XL-EVO Fiber Optic spektrofotométert használva.

6. Eredmények:

6.1. Ligandumok oldategyensúlyi vizsgálata

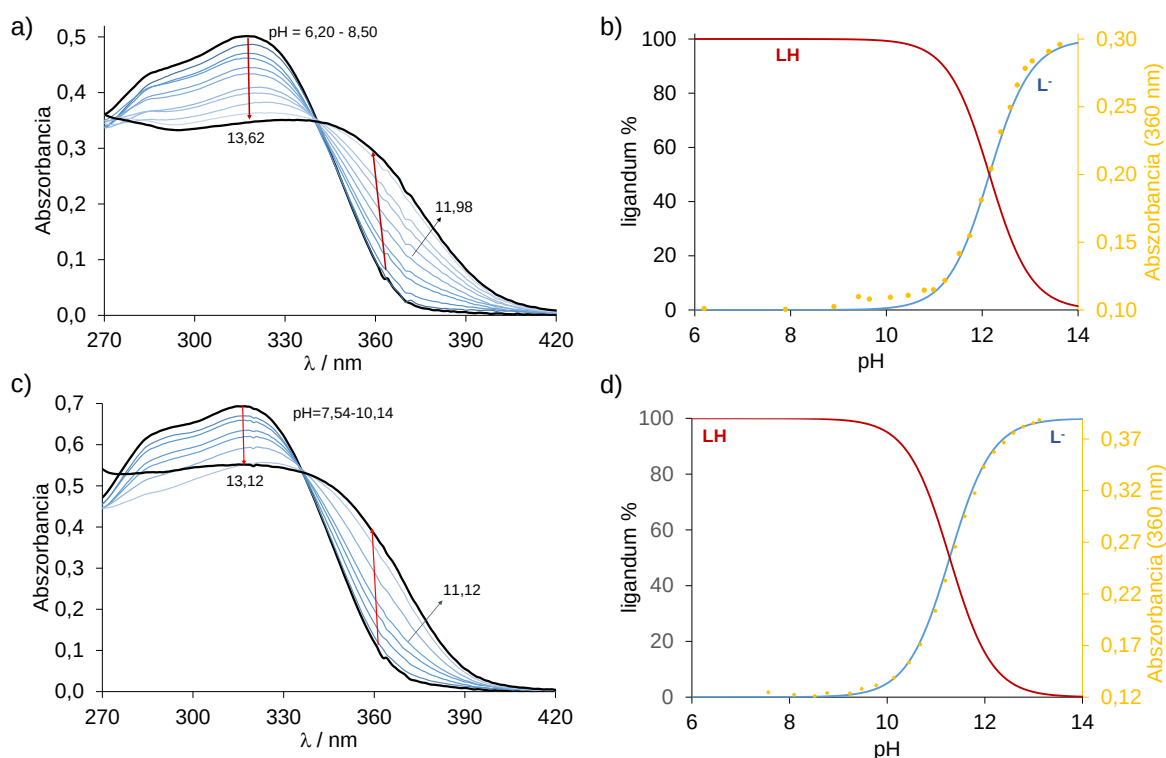
A vizsgált ligandumok mindegyike a szemi-, illetve tioszemikarbazonok csoportjába tartozik, szubsztituenseikben azonban különböznek, amelyek jelentősen befolyásolhatják a kémiai és biológiai tulajdonságokat. A 4. ábra szemlélteti az általam tanulmányozott ligandumok szerkezete közötti különbségeket. Az általunk adott jelölésük is ezeken az eltéréseken alapszik. A vegyületek neve három tagból épül fel a háromféle típusú szerkezeti különbség alapján. Az SC/TSC rész a szemikarbazon, illetve a tioszemikarbazon mivoltát határozza meg, a T/F a furán- vagy tiofén-csoport, míg az Me a metilcsoport jelenlétére utal.



4. ábra A vizsgált ligandumok szerkezeti képletei. (**SC-T-NH₂**: 2-((1-fenil-3-(tiofén-2-il)-1H-pirazol-4-il)metilén)hidrazin-karboxamid; **SC-F-NH₂**: 2-((3-(furán-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilén)hidrazin-karboxamid; **TSC-T-NH₂**: 2-((1-fenil-3-(tiofén-2-il)-1H-pirazol-4-il)metilén)hidrazin-karbotioamid; **TSC-T-NHMe**: N-metil-2-((1-fenil-3-(tiofén-2-il)-1H-pirazol-4-il)metilén)hidrazin-karbotioamid; **TSC-F-NH₂**: 2-((3-(furán-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilén)hidrazin-karbotioamid; **TSC-F-NHMe**: 2-((3-(furán-2-il)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilén)-N-metil-hidrazin-karbotioamid)

A korábban vizsgált pirazolcsoportot tartalmazó (tio)szemikarbazon vegyületekkel (2. ábra) [2] összehasonlítva, a legfőbb szerkezeti különbség a TDK munkám során vizsgált (tio)szemikarbazonokban a metil-, illetve fenilcsoport helyettesítése furán- és tiofén-csoportokkal. Ezek jelentős tulajdonságbeli eltéréseket is eredményeznek. Mi ezek közül a pK_a értékek, a rézkomplexek stabilitása és a citotoxicitásuk közti különbségekkel foglalkoztunk.

A vegyületek proton disszociációs állandóinak meghatározásával információt kaphatunk arról, hogy adott pH-n milyen protonáltsági állapotban van jelen, és így milyen a töltése. A ligandumok vízben való korlátozott oldhatósága miatt a méréseket 30% (v/v) DMSO/H₂O elegyben végeztük. A vizsgált ligandumok várhatóan igen magas pK_a értékekkel rendelkeznek. A spektrális változás, azaz a deprotonálódási folyamat minden esetben a vártak megfelelően csak $pH > 8$ felett indult el. Különböző pH-kon felvett reprezentatív UV-Vis spektrumokat mutat az 5. ábra a TSC-T-NHMe és TSC-T-NH₂ ligandumokra.



5. ábra A TSC-T-NHMe ligandum a) 6,20-13,62 pH-tartományban és a TSC-T-NH₂ ligandum c) 7,54-13,12 pH tartományban felvett UV-látható spektrumai 30% (v/v) DMSO/H₂O közegben, illetve b) és d) a mért abszorbancia (●) értékek 360 nm-en a pH függvényében ábrázolva a számolt koncentráció eloszlási görbékkel együtt. { c (TSC-T-NHMe) = 9,56 μ M; c (TSC-T-NH₂) = 12,46 μ M; I = 0,10 M (KCl); t = 25,0 °C, l = 2,0 cm}

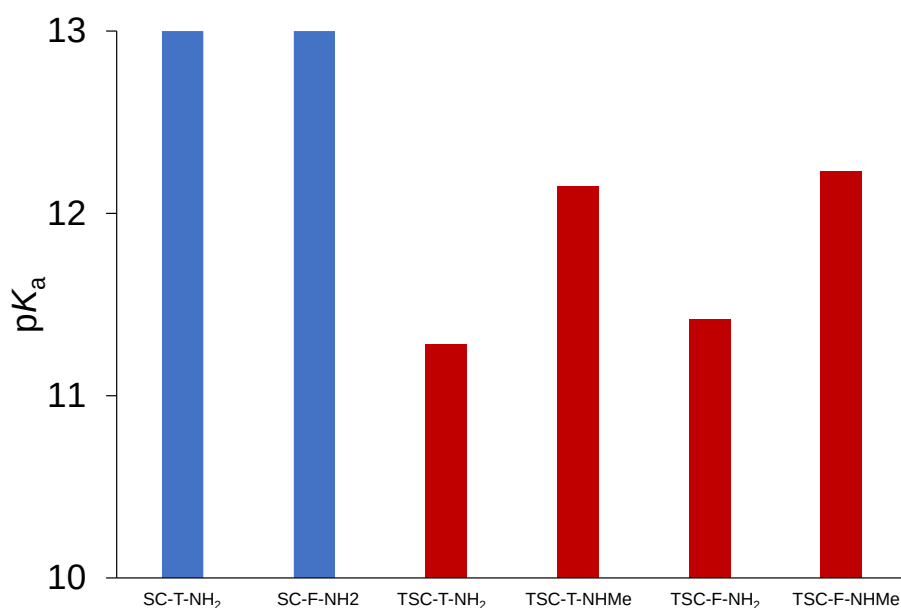
A spektrumok alapján megfigyelhető, hogy az abszorbancia értéke a ~310–330 nm hullámhosszakon folyamatosan csökkent a pH növekedésével párhuzamosan. Ezzel ellentétben, a ~340 nm hullámhossz feletti tartományban az abszorbancia növekedése figyelhető meg. A spektrumokban megjelenő izobesztikus pontok egy deprotonálódási folyamat lejátszódását mutatták, ami a hidrazin-nitrogén (NH) csoporthoz rendelhető. A

különböző pH-kon rögzített spektrumok HypSpec [25] programmal való kiértékelésével kaptuk a ligandumok protonálódási állandóit ($\lg\beta$ (HL)), ami a pK_a értékükkel egyezik meg ebben az esetben. Emellett a HL és L^- formák moláris abszorbancia spektrumait is megkaptuk. A pK_a értékeket és az abszorbancia maximumhoz tartozó hullámhosszakat ($\lambda_{\max}$) és a számolt moláris abszorbancia értékeket ($\epsilon_{\max}$) az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat A ligandumok spektrofotometriás módszerrel meghatározott pK_a értékei, illetve a különböző protonáltságú állapotú részecskék $\lambda_{\max}$ és moláris abszorbancia ($\epsilon_{\max}$) értékei a vizsgált hullámhossz tartományban. {30% (v/v) DMSO/H₂O; $I = 0,10$ M (KCl); $t = 25,0$ °C}

	SC-T-NH ₂	SC-F-NH ₂	TSC-T-NH ₂	TSC-T-NHMe	TSC-F-NH ₂	TSC-F-NHMe
pK_a	> 13	> 13	11,28±0,01	12,15±0,01	11,42±0,01	12,23±0,01
	$\lambda_{\max}$ (nm) / $\epsilon_{\max}$ (M⁻¹cm⁻¹)					
HL	300/28710	300/35870	317/27479	317/22942	284/28498	311/32772
L⁻	-	-	327/21858	336/16514	317/22030	316/25022

Az 1. táblázat adatai alapján elmondható, hogy a ligandumok adott protonáltságú formáinak abszorbancia maximuma hasonló hullámhosszú tartományba esik, és a meghatározott pK_a értékek mindegyike igen nagy. A szemikarbazonok esetében pontos érték nem volt határozható, mert a mérést pH=14-nél meg kellett szakítani. Emiatt a teljes deprotonálódási folyamat nem játszódott le, azonban az biztosan megállapítható, hogy a pK_a értékeik 13 fölé esnek.

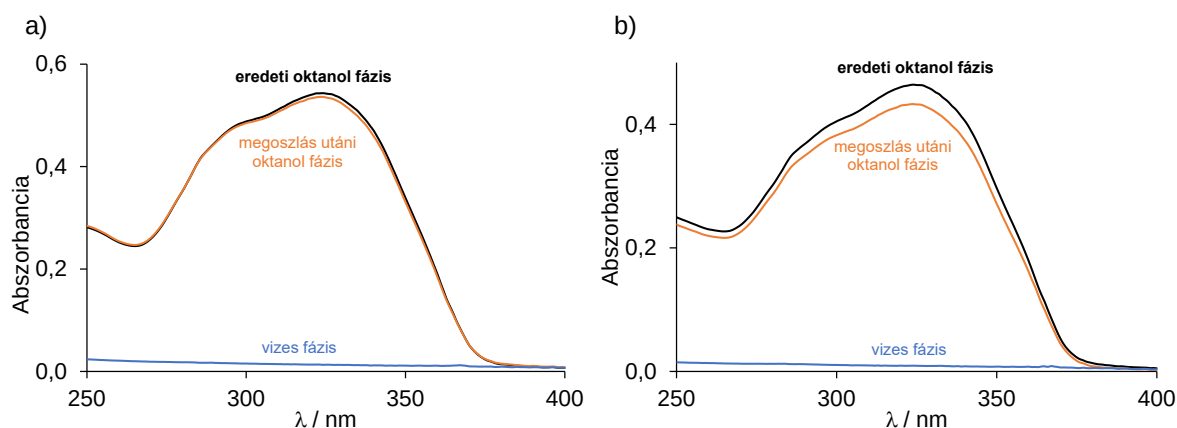


6. ábra A vizsgált ligandumok pK_a értékei.

A 6. ábra jól mutatja a pK_a értékek különbségeit, és megállapítható, hogy a különböző funkciós csoportok a deprotonálódási folyamatot egyértelműen befolyásolják. A TSC-F-NH₂ és a TSC-F-NHMe, ill. a TSC-T-NH₂ és a TSC-T-NHMe az amincsoportjuknál egy metilcsoportban különbözik egymástól, a pK_a érték a metilezett származékoknál nagyobb. Ez a metilcsoport elektronküldő hatásához köthető, ami miatt a közelben elhelyezkedő hidrazon-nitrogén deprotonálódási folyamata csak nagyobb pH értékeken játszódik le. A tiofén / furán szubsztituens cseréje ugyanakkor csak egy kisebb eltérést okoz mind a tioszemikarbazonok, mind a szemikarbazonpár esetén, amit indokol, hogy a deprotonálódó csoporttól távolabb helyezkednek, és ezáltal hatásuk is kevésbé tud érvényesülni. Azonban a tioncsoport karbonilcsoportra történő cseréje ($C=S \rightarrow C=O$) jelentősebb hatással van a molekulára, mint az egyéb csoportok cseréje. Megállapítható, hogy a szemikarbazonok pK_a értéke magasabb, mint a tioszemikarbazon párjuké.

Érdemes összevetni az eredményeket a már korábban vizsgált pirazolcsoportot tartalmazó tioszemikarbazonok (1. ábra) adataival. A Me-pyrTSC pK_a értéke 11,53, míg a Ph-pyrTSC ligandumé 11,56, melyek igen hasonlóak, mint a jelen esetben vizsgált tioszemikarbazonoké [2].

A különböző funkciós csoportok a vízben való oldhatóságra is jelentős hatással lehetnek. Mind a hat vizsgált vegyületre igaz, hogy $pH < 10$ tartományban semleges formában vannak jelen, és ennek eredményeképpen nagy lipofilitást vártunk. A lipofilitás vizsgálata során a ligandumok *n*-oktanol és víz közötti megoszlását figyeeltük meg. A ligandumokat *n*-oktanolban oldottuk és húszszoros térfogatú vizes puffer oldattal ($pH = 7,4$) elegyítettük. A megoszlásos kísérlet végén, azonban a vizes fázisban a spektrofotometriás méréseink alapján nem volt mérhető mennyiségben a vegyületekből. Így megoszlási hányadost nem tudtunk meghatározni megbízhatóan ($\lg D_{7,4} > 2,5$). Az eredmények igazolták a feltételezésünket, vagyis a ligandumok igen erős lipofil tulajdonságokat mutattak.

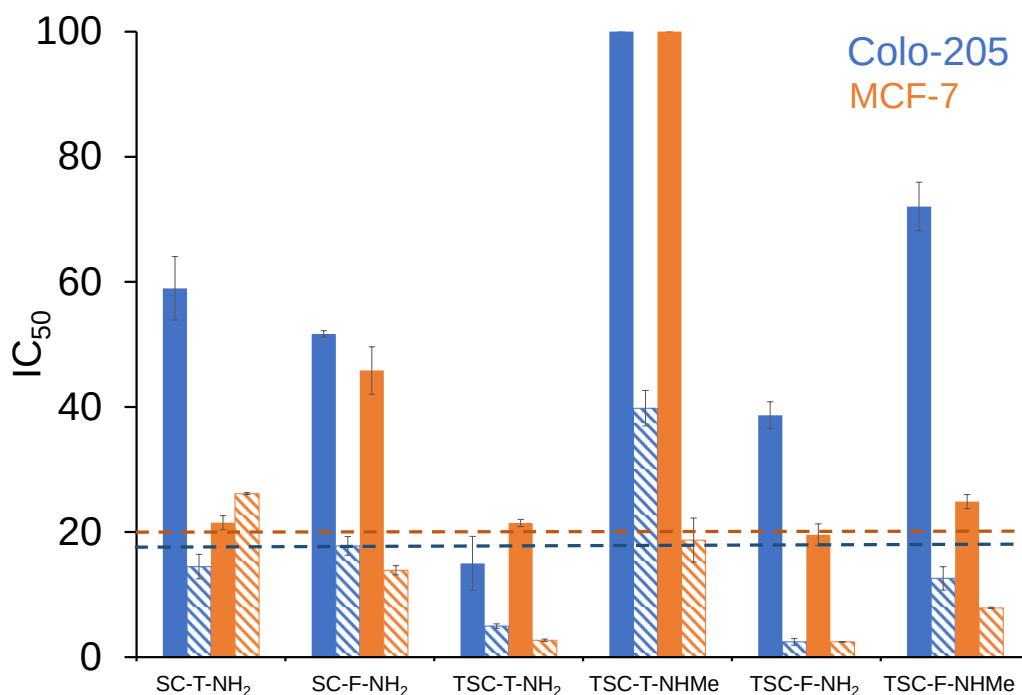


7.ábra A lipofilitás mérések eredményeként kapott UV-Vis spektrumok a) TSC-T-NH₂ és b) TSC-T-NHMe ligandumok esetén. A vegyület megoszlása 1:20 arányú *n*-oktanol/víz (pH = 7,4) keverékben.

6.2. A biológiai hatás vizsgálata

A ligandumok lipofilitását vizsgálva előzetes feltételezéseink igazolódtak, azaz mind a hat vegyület erősen lipofil tulajdonságokkal rendelkezik. A rákos sejtek elleni küzdelemben ez előnyös lehet, hiszen a hatásmechanizmus alapja a sejtmembránon keresztüli passzív transzport, amelyet a lipofilitás elősegít. Éppen ezek indok miatt a megnövekedett lipofilitás gyakran eredményez erősebb citotoxicitást.

A rákos sejtek elleni hatásuk megismerése érdekében a vegyületekből törzsoldatokat készítettem, melyeket együttműködő partnereink (Spengler Gabriella, Bozóki-Nové Márta) az SZTE Mikrobiológiai Intézetében két humán rákos sejtvonalon is teszteltek. Az *in vitro* citotoxicitást Colo-205 vastagbélrák és MCF-7 mellrák sejtvonalakon határozták meg. A méréseket elvégeztük a ligandumokkal és egy ekvivalens réz-klorid jelenlétében is. A ligandumok és réz(II)komplexeik meghatározott IC₅₀ értékét szemléltető reprezentatív 8. ábrán a réz-klorid saját citotoxicitása is fel van tüntetve. Amely értékek ezen szaggatott vonal alatt helyezkednek el, azokról mondható el, hogy erősebben rákellenes hatásúak. Minél kisebb ez az érték, annál citotoxikusabb a vegyület.



8. ábra Ligandumokra meghatározott IC₅₀ értékek ábrázolása a vizsgált Colo-205 és MCF-7 sejtvonalakon (egyszínű oszlopok), valamint egy ekvivalens CuCl₂ jelenlétében kapott értékek (csíkos oszlopok). A CuCl₂ citotoxicitása: IC₅₀ = 17,8± 0,83 μM (Colo-205) és 20± 1,8 μM (MCF-7) (szaggatott vonal). {72 h inkubációs idő}

A 8. ábrán, illetve a 2. táblázatban feltüntetett adatokból látható, hogy a ligandumoknak gyenge, ill. közepes a citotoxicitása. Az IC₅₀ értékek a mellrákos sejtvonalon jellemzően kisebbek. A TSC-SC ligandumpárokat összehasonlítva elmondható, hogy minden esetben ez előbbi ligandumoknak erősebb citotoxikus hatása van mind a két sejtvonalon. Mindkét szemikarbazon esetében a CuCl₂-hoz hasonló értékeket kaptunk, amelyből megállapítható, hogy citotoxicitásuk gyenge. Ebből az is vélhető, hogy a ligandumok kis stabilitású komplexet alakítottak ki réz(II)ion jelenlétében. A tioszemikarbazonok is gyenge, illetve közepes hatást mutattak, azonban réz-klorid hozzáadása után már biztatóbb eredmények születtek.

2. táblázat A ligandumok és az egy ekvivalens CuCl₂-dal létrejövő réz(II)komplexek meghatározott IC₅₀ értékei Colo-205 és MCF-7 sejtvonalakon. {72 h inkubációs idő}

IC ₅₀ / μ M	Colo-205	MCF-7
Cisplatin	32,08 $\pm$ 4,65	6.7 $\pm$ 0,33
Doxorubicin	0,34 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,09
SC-T-NH₂	58,96 $\pm$ 5,08	21,51 $\pm$ 1,12
SC-F-NH₂	92,31 $\pm$ 0,5	45,83 $\pm$ 3,8
TSC-T-NH₂	15,00 $\pm$ 4,31	21,45 $\pm$ 0,58
TSC-T-NHMe	>100	>100
TSC-F-NH₂	38,68 $\pm$ 2,14	19,57 $\pm$ 1,74
TSC-F-NHMe	72,04 $\pm$ 3,87	24,86 $\pm$ 1,95
SC-T-NH₂ – Cu(II) 1:1	14,48 $\pm$ 1,97	26,14 $\pm$ 0,16
SC-F-NH₂ – Cu(II) 1:1	6,23 $\pm$ 1,5	13,89 $\pm$ 0,74
TSC-T-NH₂ – Cu(II) 1:1	4,96 $\pm$ 0,36	2,7 $\pm$ 0,19
TSC-T-NHMe – Cu(II) 1:1	39,8 $\pm$ 2,83	18,72 $\pm$ 3,51
TSC-F-NH₂ – Cu(II) 1:1	2,44 $\pm$ 0,54	2,44 $\pm$ 0,06
TSC-F-NHMe – Cu(II) 1:1	12,6 $\pm$ 1,87	7,88 $\pm$ 0,1

A ligandumok közül a Colo-205 sejtvonalon a TSC-T-NH₂ (IC₅₀ = 15 μ M), az MCF-7 sejtvonalon a TSC-T-NH₂, SC-T-NH₂, TSC-F-NH₂ és TSC-F-NHMe vegyületeknek hasonló aktivitása van (IC₅₀ = 19,6 – 24,9 μ M), a másik kettő citotoxicitása ezekhez képest jóval kisebb. A réz-klorid jelenlétében minden esetben kisebb az IC₅₀ értékek, mint a ligandumé, azaz a komplexképződés erősítette a rákellenes hatást. A rézionok jelenlétében a legkisebb IC₅₀ értékeket a TSC-T-NH₂ és TSC-F-NH₂ esetében kaptunk (IC₅₀ = 2,4 – 4,9 μ M), ezek a legígéretesebbek. Ezek az értékek a korábban vizsgált, a tiofén- és furáncsoport helyett metil- és fenilcsoportokat tartalmazó Me-pyrTSC és Ph-pyrTSC esetén kapottakhoz hasonlóak a Colo-205 sejtvonalon (IC₅₀ = 6,3 ill. 5,1 μ M), de kisebbek mint az MCF-7 sejtvonalakon kaptak (IC₅₀ = 19 ill. 19 μ M) [2]. A monometilezéssel azonban kevésbé citotoxikus vegyületeket kaptunk. Ez azonban mégsem magyarázza a TSC-T-NHMe ligandum kiugróan magas IC₅₀ értékeit. Figyelembe véve, hogy a négy TSC szerkezetileg hasonló, mivel csak egy-egy szubsztitúciós csoportban térnek el egymástól és hogy a másik három ligandum (és réz(II)komplexeik) IC₅₀ értékei ehhez képest jelentősen

eltérnek, megállapítható, hogy a biológiai mérés közben valamilyen nem várt esemény következett be, azaz nagy valószínűséggel csapadékos lett az oldat.

A ligandumok antibakteriális hatását is tesztelték *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* MRSA, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* baktériumokon, de nem bizonyultak hatásosnak (minimum inhibíciós koncentrációjuk $> 100 \mu\text{M}$), rézionok jelenlétében sem.

6.3. A ligandumok réz(II)ionokkal való komplexképzésének oldategyensúlyi vizsgálata

A biológiai mérések eredményei okot adtak a ligandumok komplexképzésének további vizsgálatára, figyelembe véve, hogy réz-klorid jelenlétében az IC_{50} értékek TSC-ok esetében mindig kedvezőbbek voltak. Ezenkívül a SC gyenge citotoxicitása feltehetőleg a kis stabilitású komplex képződésén alapszik.

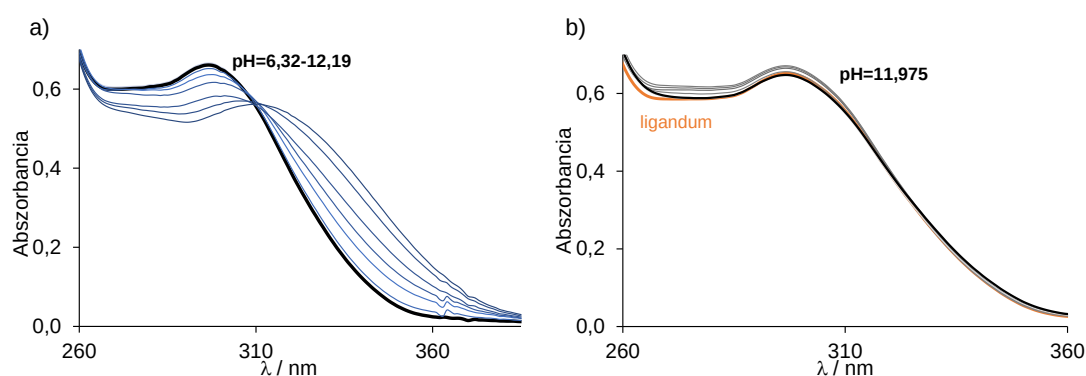
A komplexképzés hozzájárulhat a ligandumokétól akár eltérő hatásmechanizmusok kialakításához, hiszen az kihatással van a lipofilitásra, a töltésre és a méretre is. A komplexképződés miatti hidrofilitás növekedés előnyös lehet a gyógyászatban, hiszen a vegyületek így könnyebben fel tudnak szívódni az emberi szervezet víztereiből. Mindemellett az oldategyensúlyi vizsgálatok is könnyebben elvégezhetőek, amelyeknek köszönhetően a vegyületek tulajdonságait is jobban megismerhetjük. Azonban míg a monokomplexek általában oldódnak vízben, addig a semleges biszkomplexekről ugyanez már nem feltétlenül állítható. A korábban vizsgált pirazol-származékoknál azt tapasztalták, hogy a pH növekedésével a biszkomplex válik dominánssá, így sok esetben csapadékképződés fordult elő [2]. Éppen ezért elengedhetetlen a megfelelő lipofilitási érték megkeresése, hiszen csak ezáltal lehet optimalizálni az adott hatóanyag tulajdonságait. A megfelelő szubsztituensekkel ellátott ligandumok vízben való oldhatósága javítható. A TDK munkám során így a hat ligandum réz(II)ionokkal való komplexképződésének oldategyensúlyi vizsgálatát végeztem el.

A komplexek képződésére egyértelműen következtethetünk spektrofotometriás titrálási adatok alapján. Mivel az abszorpció additív tulajdonság, így különbségnek kell mutatkoznia a CuCl_2 adagolása után felvett és a ligandumok saját abszorpciós spektrumai között adott pH értéken, ha van komplexképződés, amelyet a $\text{S} \rightarrow \text{Cu(II)}$ töltésátviteli sáv megjelenése is jelez a TSK-ok esetén. Ezen méréseket pH ~ 2 -ről indítottuk el, ugyanis a fémion és a proton kompetitív reakció játszódik le a ligandum kötőhelyeiért és emiatt a

deprotonálódási folyamat lejátszódását alacsonyabb pH tartományban vártuk, mint a ligandumnál önállóan mérve azt.

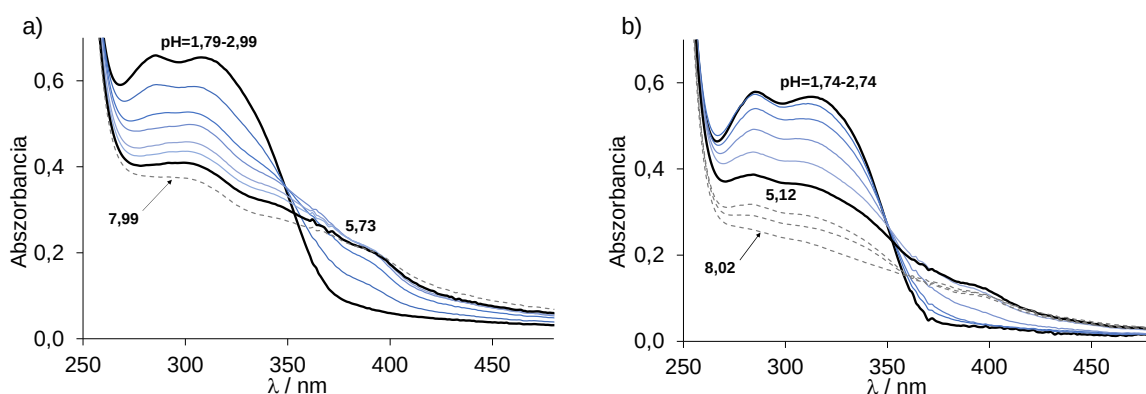
A szemikarbazonok esetében a spektrofotometriás vizsgálatnál az SC-F-NH₂ ligandummal történt az első mérés. A CuCl₂ hozzáadása után azonban a mért spektrumok minden pH értéken megegyeztek a liganduméval. Ezek alapján az a következtetés vonható le, hogy egyáltalán nem történt komplexképződés az adott körülmények között (azaz ~10 µM koncentrációtartományban). A mérést a SC-T-NH₂ ligandummal így nem is végeztük el, hiszen a szerkezetileg hasonló referenciavegyületek is esetében látható volt [2], hogy ezen típusú szemikarbazonok komplexképzési tulajdonságai is nagy mértékben hasonlóak.

A 9. ábrán jól megfigyelhető, hogy egészen bázikus pH-ig (~12) semmilyen változás nem történt a spektrumokban. Így kijelenthető, hogy a szemikarbazonok nem képeztek komplexet a réz(II)ionnal a vizsgált körülmények között.



9. ábra a) SC-F-NH₂ ligandum és b) CuCl₂ hozzáadása után különböző pH-kon felvett abszorpciós spektrumai. { $c_L = 10,84 \mu\text{M}$; $c_{\text{Cu(II)}} = 10,47 \mu\text{M}$; $I = 0,10 \text{ M KCl}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $l = 2,0 \text{ cm}$ }

A tioszemikarbazonok esetében a komplexképződés során azonban jól látható különbségek voltak a felvett abszorpciós spektrumokon a ligandum spektrumaihoz képest (10. ábra). A PSEQUAD program segítségével kiszámítottuk a képződő komplexek stabilitási szorzatait (3. táblázat). A különböző pH értékeken és fém-ligandum arányoknál rögzített spektrumokat mono- és biszkomplexek képződésével tudtuk legjobban megilleszteni. A TSC-F-NH₂ és TSC-F-NHMe ligandumok monokomplexei esetén jelentősen magasabb lett a meghatározott egyensúlyi állandó hibaszázaléka. A kapott stabilitási szorzatok segítségével koncentráció eloszlási görbéket számoltunk, ahogy a 11. ábra is mutatja, jól láthatóvá vált, hogy savasabb pH-n a monokomplex, míg a pH növekedésével a semleges biszkomplex válik dominánssá.

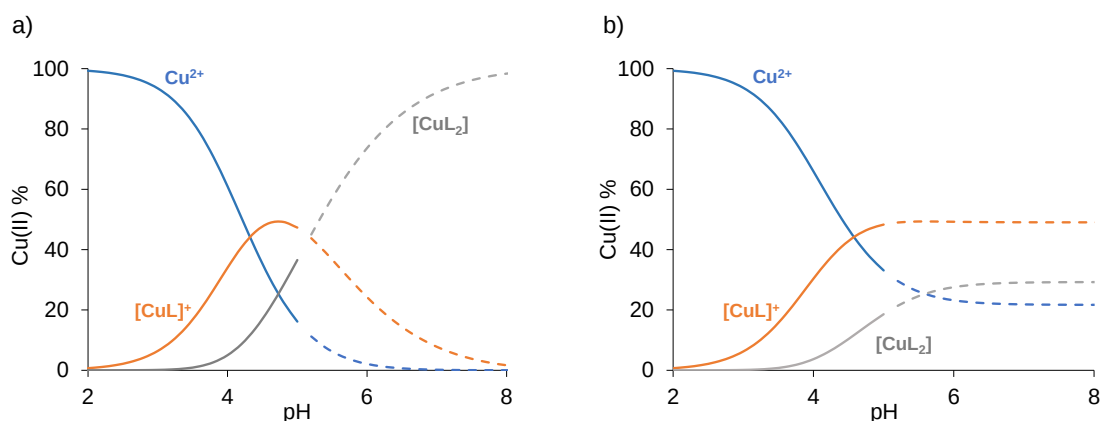


10. ábra a) A Cu(II) – TSC-F-NHMe és b) a Cu(II) – TSC-F-NH₂ rendszerek UV-Vis abszorpciós spektrumai különböző pH-kon. { $c_L = 10,0 \mu\text{M}$; $c_{\text{Cu(II)}} = 5,0 \mu\text{M}$; $I = 0,10 \text{ M KCl}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $l = 2,0 \text{ cm}$ }

3. táblázat A tioszemikarbazonokkal képződő komplexek számított stabilitási szorzatai (β). { $I = 0,10 \text{ M KCl}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ }

	TSC-T-NH ₂	TSC-T-NHMe	TSC-F-NH ₂	TSC-F-NHMe
$\lg\beta [\text{CuL}]$	$11,36 \pm 0,02$	$13,44 \pm 0,1$	$12,26 \pm 0,03$	$13,91 \pm 0,03$
$\lg\beta [\text{CuL}_2]$	$24,35 \pm 0,02$	$28,22 \pm 0,03$	$23,94 \pm 0,03$	$27,10 \pm 0,04$

Megállapítottuk, hogy a kapott eredmények hasonlóak a korábban vizsgált Me-pyrTSC és Ph-pyrTSC vegyületekéhez [2].



11. ábra A Cu(II) - TSC-F-NH₂ rendszer számított koncentrációeloszlási görbéi a) a Cu(II) - TSC-F-NH₂ (1:2) rendszerre, valamint b) a Cu(II) - TSC-F-NH₂ (1:1) rendszerre a meghatározott egyensúlyi állandók (a ligandumok pK_a és a komplexek $\lg\beta$ értékei) alapján. { $c_L = 10 \mu\text{M}$; $I = 0,10 \text{ M KCl}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ }

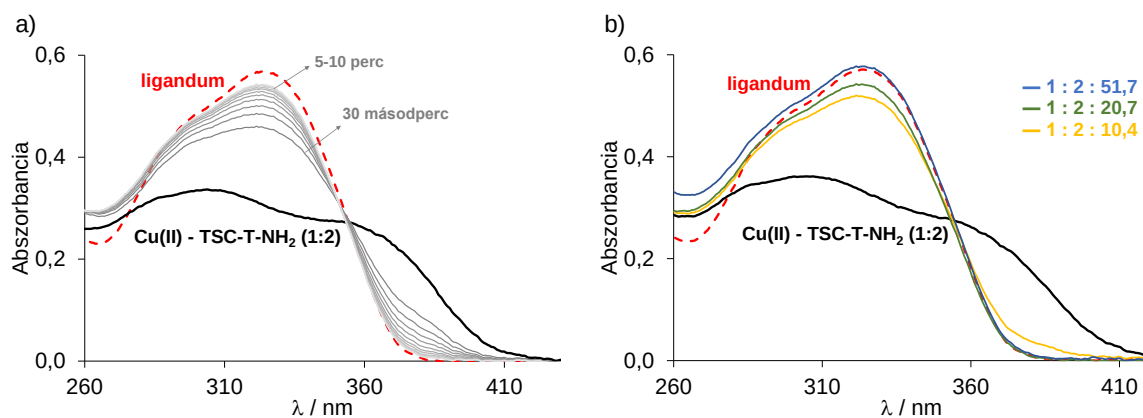
6.4. Tioszemikarbazonok és réz(II)komplexeik redoxi tulajdonságaik

A (tio)szemikarbazonok réz(II)komplexeinek hatásmechanizmusának alapját az oxidálóképességükkel gyakran kapcsolatba hozzák. Redukciójuk a szervezetben jelenlévő természetes redukálószerrel segítségével játszódna le, mint például a GSH vagy az aszkorbinsav. A komplexek sejtbe jutását követően a GSH redukálhatja a réz(II)komplext réz(I)komplexszé. Ezen utóbbi oxigénnel való reakcióját követően ROS-ket alakít ki, amelyek már képesek a RNR R2 alegységében található Tyr szabad gyökök kioltására. Ennek következtében a dezoxi-ribonukleotidok képződését katalizáló enzim működést meggátolják, de a képződő ROS egyéb módokon is képesek lehetnek a sejteket károsítani.

Éppen ezen indok miatt vizsgáltuk a ligandumok réz(II)komplexeinek redukálhatóságát GSH, illetve egy gyengébb redukálószer, az AA jelenlétében. A vizsgálatot 'glovebox' rendszerben végeztük, a redukálószerrel való érzékenysége miatt, így megteremtve egy olyan anaerob környezetet, amelyben a redoxi tulajdonságok jellemezhetőek. A mérés során használt tandemküvetta egyik ágába került a réz(II)ion és a ligandum 1:2 arányban ($C_L = 24,3 \mu\text{M}$; $C_{\text{Cu(II)}} = 11,6 \mu\text{M}$), a másik ágba került a redukálószer. A méréseket többféle komplex:GSH (ill. AA) arány mellett is elvégeztük, a pH-t 7,4-es értékre állítottuk be pufferrel.

Köszönhetően annak, hogy a SC-k a vizsgált körülmények között nem képeztek stabilis komplexet a Cu(II)-ionokkal, így komplexeik redoxi tulajdonságainak vizsgálatát nem végeztük el. A TSC-k közül a legkisebb IC_{50} értéket adó TSC-T-NH₂ réz(II)komplexeinek redukálhatóságát vizsgáltuk.

A mérést 50-szeres, 20-szoros, majd 10-szeres mennyiségű GSH-nal is elvégeztük. Mindhárom során a reakció percek alatt végbe ment, és 10 perc után sem mutatott már további változást. Korábbi szakirodalmi eredmények alapján [20], a réz(II)komplex valószínűleg redukálódik, a képződő redukált réz(I)iont tartalmazó komplex disszociálódik, és Cu(I)-GSH komplex képződik. Így a folyamat során a ligandum kiszorul a koordinációs szférából. Ennek következtében a felvett spektrumok a reakció lejátszódása után a vártak megfelelően a liganduméhoz hasonlóak, ahogyan a 12.a ábra mutatja a húszszoros GSH esetén. A spektrumok minden GSH felesleg esetén a szabad liganduméra hasonlítanak, ahogy azt a 11.b ábra mutatja. Húszszoros aszkorbinsav feleslegben is elvégeztük a mérést, ahol azonban meglehetősen hosszabb idő kellett a redoxi egyensúly beállításáig, de az abszorpciós spektrum ott is a liganduméhoz hasonló alakot vett fel.



12. ábra a) Cu(II) - TSC-T-NH₂ rendszerre felvett időfüggő UV-látható spektrumok húszszoros GSH felesleg mellett, illetve b) különböző GSH felesleg esetében kapott spektrumok a reakciók lejátszódása után pH = 7,4-n. { $c_L = 24,3 \mu\text{M}$; $c_{\text{Cu(II)}} = 11,6 \mu\text{M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $l = 2,0 \text{ cm}$ }

7. Összefoglalás

TDK munkám során hat pirazolcsoportot tartalmazó szemi- és tioszemikarbazon vegyület oldategyensúlyi tulajdonságait, réz(II)ionokkal történő kölcsönhatásait vizsgáltam. A szerkezetbeli különbségek, illetve az oldatkémiai és biológiai hatásuk eltérései között próbáltunk összefüggést keresni.

UV-Vis abszorpciós spektrofotometriás mérések segítségével meghatároztuk a ligandumok proton disszociációs állandóit. Ezen adatokból egyértelművé vált, hogy a ligandumok széles pH tartományban semleges formában vannak jelen. Mivel pK_a értékeik minden esetben 11 fölött voltak, így kijelenthető, hogy fiziológiás pH-n (7,4) is semleges formában lesznek jelen. A funkciós csoportok változtatása egyértelmű különbségeket okozott a pK_a értékekben. Megállapítottuk, hogy a szemikarbazonok deprotonálódási állandója minden esetben nagyobb volt, mint tioszemikarbazon párjáé, a monometilezés növelte a pK_a értékeket, de a tiofén/furán csere nem befolyásolta a deprotonálódási folyamatokat. Figyelembe véve a különböző funkciós csoportokat és a széles pH tartományban előforduló semleges formát, erősen lipofil tulajdonságokra számítottunk. Mindezt víz/n-oktanol közötti megoszlásos mérések során be is bizonyítottunk.

Citotoxikus hatásukra közvetlenül is történtek mérések IC_{50} érték meghatározásával Colo-205 vastagbélrák, illetve MFC-7 mellrák humán sejteken. Az MCF-7 sejtvonalon az értékek minden esetben kisebbek voltak. A ligandumok közül mind a SC-ok, mind a TSC-ok gyenge vagy közepes hatást mutattak. A SC-TSC párok közül minden esetben az utóbbi értékei voltak kisebbek. Emellett a TSC-ok esetében egy ekvivalens $CuCl_2$ hozzáadása után kialakuló komplexek értékei már biztatóbbak voltak, azaz a komplexképződés erősítette a rákellenes hatásukat.

Ezen citotoxicitásbeli különbségek miatt vizsgáltuk a $Cu(II)$ – ligandum rendszereket is különböző fém-ligandum arányoknál végzett UV-Vis spektrofotometriás titrálások segítségével, a képződési állandók meghatározása céljából. A vizsgált szemikarbazon esetében a réz(II)ionok jelenléte nem okozott spektrális változást, amelyből az a következtetést vontuk le, hogy a vizsgált körülmények között nem alakított ki komplexet a réz(II)ionnal. Ezzel ellentétben a tioszemikarbazonok esetén rögzített spektrumok egyértelműen különböztek a szabad ligandumétól komplexképződés miatt. A meghatározott képződési állandók alapján savasabb pH tartományban a monokomplex, míg a pH emelkedésével a biszkomplex válik dominánssá pH > 5 tartományban 1:2 fém-ligandum esetén.

Tekintve, hogy a tioszemikarbazonok réz(II)komplexeinek hatásmechanizmusa a sejten belüli redoxi reakciókon alapszik, így a legerősebb citotoxicitást mutató TSC-T-NH₂ réz(II)komplexének oxidáló tulajdonságát is megvizsgáltuk. Természetes redukálószerekkel (GSH és aszkorbinsav) történtek a mérések, ahol mindkét esetben néhány perc alatt lejátszódott a reakció. Az abszorpciós spektrumok alapján kijelenthető, hogy a rézkomplex redukálódott a reakció során, és a koordinált ligandum szabaddá vált.

Az eredményeim alapján megállapítható, hogy a vizsgált vegyületek közül a tiofént tartalmazó, N-terminálisan nem-szubsztituált pirazol-tioszemikarbazon a legígéretesebb, mert réz(II)ionnal képződött komplexe stabilis, redoxi-aktív és erősen citotoxikus tulajdonságú.

8. Irodalmi jegyzék

- [1] 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.
- [2] O. Dömötör, M. A. Kiss, G. T. Gál, N. V. May, G. Spengler, M. Nové, A. Č. Gašparović, É. A. Enyedy, *J. Inorg. Biochem.* 202 (2020) 110883.
- [3] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, *Dalton Trans.* 47 (2018) 6645–6653.
- [4] J. R. Dilworth, R. Hueting, *Inorg. Chim. Acta* 389 (2012) 3–15.
- [5] Y. Jung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* 107 (2007) 1387–1407
- [6] C. Monneret, *Ann. Pharm. Fr.* 69 (2011) 286–295.
- [7] M. Uppsten, M. Färnegårdh, V. Domkin, U. Uhlin, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 365–377.
- [8] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 31–39.
- [9] T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 977–1055
- [10] V. Pósa, B. Hajdu, G. Tóth, O. Dömötör, C. R. Kowol, B. K. Keppler, G. Spengler, B. Gyurcsik, É. A. Enyedy, *J. Inorg. Biochem.* 231 (2022) 1111786.
- [11] C. R. Kowol, P. Heffeter, W. Miklos, L. Gille, R. Trondl, L. Cappellacci, W. Berger, B. K. Keppler, *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 409–423.
- [12] C. R. Kowol, R. Berger, R. Eichinger, A. Roller, M. A. Jakupec, P. P. Schmidt, V. B. Arion, B. K. Keppler, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 1254–1265.
- [13] R. W. Brockman, J. R. Thomson, M. J. Bell, H. E. Skskipper, *Cancer Res.* 16 (1956) 167–170.
- [14] P. J. Jansson, D. S. Kalinowski, D. J. Lane, Z. Kovacevic, N. A. Seebacher, L. Fouani, S. Sahni, A.M. Merlot, D.R. Richardson, *Pharmacol. Res.* 100 (2015) 255–260.
- [15] J. Shao, B. Zhou, A.J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 586–592.
- [16] É. A. Enyedy, M. F. Primik, C. R. Kowol, V. B. Arion, T. Kiss, B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 40 (2011) 5895–5905.
- [17] C. R. Kowol, W. Miklos, S. Pfaff, S. Hager, S. Kallus, K. Pelivan, M. Kubanik, É. A. Enyedy, W. Berger, P. Heffeter, B. K. Keppler, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 6739–6752.

- [18] P. J. Jansson, P. C. Sharpe, P. V. Bernhardt, D. R. Richardson, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5759–5769.
- [19] D. B. Lovejoy, P. J. Jansson, U. T. Brunk, J. Wong, P. Ponka, D. R. Richardson, *Cancer Res.* 71 (2011) 5871–5880.
- [20] 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.
- [21] A. Sîrbu, O. Palamarcu, M. V. Babak, J. M. Lim, K. Ohui, E. A. Enyedy, S. Shova, D. Darvasiová, P. Raptă, W. H. Ang, V. B. Arion, *Dalton T.* 46 (2017) 3833–3847.
- [22] Y. N. V. Gopal, D. Jayaraju, A. K. Kondapi, *Biochemistry* 38 (1999) 4382–4388.
- [23] É. A. Enyedy, N. V. Nagy, É. Zsigó, C. R. Kowol, V. B. Arion, B. K. Keppler, T. Kiss, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2010 (11) (2010) 1717–1728.
- [24] É. A. Enyedy, É. Zsigó, N. V. Nagy, C. R. Kowol, A. Roller, B. K. Keppler, T. Kiss, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012 (2012) 4036–4047.
- [25] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, 43 (1996) 1739–1753.
- [26] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Petit, *Anal. Chim. Acta* 38 (1967) 475–482.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Enyedy Éva Annának** (tanszékvezető, egyetemi tanár), hogy a SZTE Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszékén, az MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoportban végezhettem el a Tudományos Diákköri munkámhoz szükséges méréseket. Köszönöm **Gátszegi Gerda Tímea** (II. vegyész MSc hallgató, SZTE) segítségét. Hálával tartozom a lelkiismeretes témavezetésükért, a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségért, és hogy általuk közelebb kerülhettem dolgozatom témájának megértéséhez.

Köszönöm **Dr. Frank Éva** egyetemi docensnek (SZTE Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék), hogy biztosították a mérésekhez szükséges vegyületeket. Köszönetet illeti **Dr. Spengler Gabriella** egyetemi adjunktust és **Dr. Bozóki-Nové Márta** tudományos munkatársat (SZTE, Orvosi Mikrobiológiai Intézet) a biológiai mérések elvégzéséért.

Köszönöm a középiskolai kémia tanáromnak, **Tóth Károlynénak** a folyamatos biztatást és hogy megteremtette a lehetőségét, annak hogy középiskolás diákként bekapcsolódhattam egyetemi kutatói munkába.

Továbbá köszönöm a kutatócsoport összes tagjának, hogy bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.