SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Trimetil-ammónium-csoportot tartalmazó tioszemikarbazonok és réz(II)komplexeik oldatkémiai vizsgálata

TDK dolgozat

Szerző: Gátszegi Gerda Tímea

III. Kémia BSc

Témavezető: Dr. Enyedy Éva Anna

egyetemi docens, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Lezárva: 2023. január 9.

Tartalomjegyzék

Rövidítések 3
1. Tartalmi összefoglaló 4
2. Bevezetés 5
3. Irodalmi áttekintés 6
3.1. Daganatos betegségek és kezelésük 6
3.2. Tioszemikarbazonok 7
3.3. Tioszemikarbazonok réz(II)komplexei 9
3.4. Tioszemikarbazonok vízoldékonysága 10
4. Célkitűzések 12
5. Kísérleti rész 13
5.1. Felhasznált vegyszerek 13
5.2. Ultraibolya-látható spektrofotometria 13
5.2.1. Mérési körülmények 14
5.3. Ciklikus voltammetria (CV) 17
5.4. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia 18
5.5. Kiegészítő mérések 19
6. Eredmények 20
6.1. Tioszemikarbazonok oldatkémiai vizsgálata 20
6.2. Tioszemikarbazonok és réz(II)komplexeik biológiai hatása 27
6.3. Tioszemikarbazonok réz(II)ionokkal képzett komplexeinek stabilitása 28
6.4. Tioszemikarbazonok és réz(II)komplexeik redoxi tulajdonságaik 33
6.4.1. Réz(II)komplexek redoxi tulajdonságaik 33
6.4.2. Ligandumok szabadgyökfogó hatása 35
7. Összefoglalás 38
8. Felhasznált irodalom 40
9. Köszönetnyilvánítás 42

Rövidítések

AA	aszkorbinsav
CV	ciklikus voltammetria
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
ESR	elektronspin rezonancia spektroszkópia
FTSC	2-formil-piridin-tioszemikarbazon
GSH	glutation
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
MES	2-(N-morfolino)-etánszulfonsav
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
PTSC	piridin-2-karboxaldehid-N^4,N^4-dimetil- tioszemikarbazon
RNR	ribonukleotid-reduktáz
ROS	reaktív oxigén származék
STSC	szalicilaldehid- tioszemikarbazon
TEAC	Trolox egyenértékű antioxidáns kapacitás
TSK	tioszemikarbazon
UV-Vis	UV-látható

1. Tartalmi összefoglaló

Világszerte a leggyakoribb halálokok közé tartoznak a rákos megbetegedések, melyek kezelése napjainkban is igen nagy problémát jelent. Számos sikeres fémkomplexet állítottak már elő (pl. ciszplatin), azonban a fellépő súlyos mellékhatások és a kialakuló rezisztencia korlátozza alkalmazásukat. Ezen problémák hatására újabb potenciális hatóanyagok, köztük többféle fémkomplex fejlesztése vette kezdetét. Az egyik fontos vegyületcsaládot a tioszemikarbazonok (TSK-ok) és fémkomplexeik alkotják. Az α-*N*-piridil-TSK-ok (N,N,S) donorcsoportot tartalmaznak, legjelentősebb képviselőjük a triapin, mely jelenleg klinikai fázis III vizsgálat alatt áll [1]. A TSK-ok hatásmechanizmusa gyakran összefügg azzal, hogy stabilis, redox-aktív fémkomplexeket képeznek vas- vagy rézionokkal, ennek megértéséhez fontos az oldatkémiai tulajdonságok megismerése.

A hidrofil/lipofil jelleg optimalizálása céljából kutatómunkám során három olyan 2-formil-piridin-TSK (FTSC) származékot vizsgáltam, melyek piridin-gyűrűjének kettes pozíciójába egy metilén-trimetil-ammónium csoport került. Ez a pozitív töltésű csoport biztosíthatja a szerves kationtranszporterekkel való kölcsönhatást [2] és a megfelelő vízoldhatóságot. Vizsgáltam a ligandumok proton disszociációs folyamatait, a réz(II)- vas(II)- és vas(III)komplexeik oldatbeli stabilitását és redoxi tulajdonságait UV-látható (UV-Vis), ^{1}H NMR spektroszkópiai és ciklikus voltammetria (CV) módszerekkel.

Megállapítottuk, hogy a ligandumok fiziológiás pH-n pozitív töltésű HL^{+} részecske formájában vannak jelen, ezáltal oldékonyságuk valóban javult a referencia vegyülethez (FTSC) képest. A trimetil-ammónium csoport jelenléte lecsökkentette a fémionkötő-képességet, bár a réz(II)ionokkal még így is kiemelkedő a komplexek stabilitása, a vasionok esetében nem lehetett stabilitási állandókat meghatározni. Mindezek az oldatkémiai tulajdonságok segítik megérteni, azt hogy a ligandumoknak miért nem lett mérhető rákellenes hatása. A réz(II)komplexeik ugyanakkor aktívak voltak a rákos sejtekkel szemben.

Kulcsszavak: tioszemikarbazon, UV-Vis spektrofotometria, stabilitási állandó, redoxi reakció, hidrofil/lipofil jelleg, citotoxicitás,

2. Bevezetés

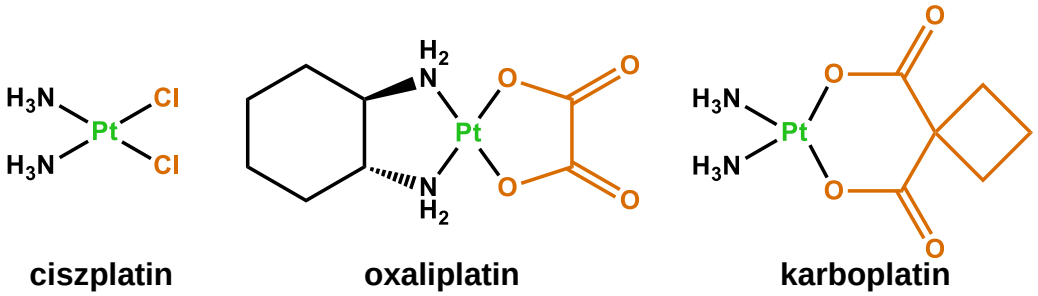
A daganatos megbetegedések a leggyakoribb halálokok közé tartoznak mind Magyarországon, mind világszerte. 2016-os adatok szerint az Európai Unióban minden negyedik halálesetért rákos megbetegedés a felelős [3]. Leggyakrabban a tüdőben keletkezik daganat, emellett gyakran előfordul az emlőben, gyomorban, hasnyálmirigyben, vastag- és végbélben, májban, prosztatában és az agyban. A rákos sejtek a véráramon át eljuthatnak a szervezet távolabbi részeire is, ezzel áttétet képezve. Több mint 200 féle rákbetegség létezik, az egyes betegségek tünetei, viselkedése eltérő, így az alkalmazott gyógykezelés sem egyforma, az onkosebészeti eljárások, illetve a sugárterápiák mellett leginkább gyógyszeres kezeléseket alkalmaznak. A kemoterápiás gyógyszerek közül kiemelkedő fontosságúak a platina(II)-tartalmú vegyületek. Ezt bizonyítja, hogy a rákos megbetegedések közel felénél alkalmaznak platina(II)komplexet [4]. A kemoterápiás gyógyszerek használhatóságát megnehezíti, hogy nem specifikusak a daganatra, így a rákos sejtekhez hasonlóan gyorsan osztódó egészséges sejtekre is hathat, ami komoly mellékhatásokat okozhat. Emellett rezisztencia is felléphet alkalmazásuk során. Ezen problémák ösztönzik az új hatóanyagok előállítását is vizsgálatát. Új hatóanyagok előállításánál a nagyobb hatékonyság elérése mellett fontos a megfelelő szelektivitás is, ezzel megóvva az egészséges sejteket és elkerülve a súlyos mellékhatásokat. A hatásmechanizmus megértéséhez meg kell vizsgálni, és ezáltal megérteni a fejlesztett hatóanyagok oldatbeli viselkedését is.

Kutatómunkám során három FTSC származékot vizsgáltam, melyeket a Bécsi Egyetemen dolgozó együttműködő partnereink szintetizáltak és karakterizáltak. Ezen származékok metilén-trimetil-csoportot tartalmaznak a piridin-gyűrű kettes pozíciójában, ezzel elősegítve a vízoldékonyság javulását, mely megkönnyítené a vegyületek oldatbeli viselkedésének vizsgálatát. A hatásmechanizmus megértésének érdekében vizsgáltuk a származékok és azok réz(II)- illetve vaskomplexeinek oldatkémiai és redoxi tulajdonságait.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Daganatos betegségek és kezelésük

A fémtartalmú vegyületeket már a XX. században alkalmazták terápiás célokra, napjainkban pedig tovább növekedett felhasználásuk, leginkább a daganatos megbetegedések kezelése céljából. Az első jelentős kemoterápiás gyógyszer a ciszplatin (*cisz*-[diamin-diklorido-platina(II)], **1. ábra**), melyet 1978-ban gyógyszerként törzskönyveztek [5]. A ciszplatint azóta is here- és petefészekrák, illetve húgyhólyag-, fej- és nyakdaganatok kezelésére használják. A szervezetbe intravénásan juttatják be, majd a vérből a citoszol és a sejtmag felé haladva a csökkenő kloridion koncentráció hatására a koordinált klorido ligandumok vízre cserélődnek. A képződő akvakomplex labilisabb az eredeti klorokomplexnél, így képes a DNS purin bázisival koordinációs kötést kialakítani, amely torzítja a DNS kettős spiráljának szerkezetét, ezzel megakadályozva a DNS-replikációt és -transzkripciót [6]. Alkalmazása során rezisztencia alakulhat ki, valamint súlyos mellékhatások léphetnek fel [4,7]. Utóbbinak oka a nem megfelelő szelektivitás, hiszen nem csak a rákos sejteken fejti ki citotoxikus hatását, hanem a szintén gyorsan osztódó, egészséges sejteken is, például a gyomorban vagy a bélrendszerben, ami hányást és hasmenést okozhat. Ezen problámák miatt további platina(II)komplexeket kezdtek vizsgálni, melyek közül a karboplatin és az oxaliplatin (**1. ábra**) klinikai alkalmazásba került. Bennük a távozó ligandum inertebb, mint a ciszplatinban levő kloridionok, azonban így is kellemetlen mellékhatások lépnek fel alkalmazásuk során. A karboplatin károsítja a csontvelőt, az oxaliplatin pedig többek között zsibbadtságot okoz [8,9]. A platina(II)-tartalmú vegyületek alkalmazásának elterjedését bizonyítja, hogy statisztikák alapján a daganatos megbetegedések kezelésének közel felénél alkalmazzák valamelyiküket [6].



1. ábra: Klinikai alkalmazásba bekerült platina(II)komplexek szerkezeti képlete.

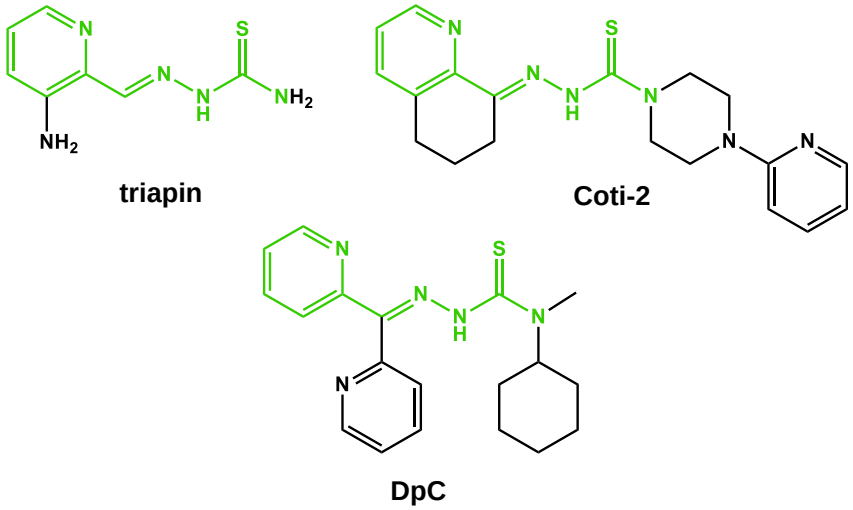
Emellett egyéb fémionok (pl. Pt(IV), Ga(III), Ru(II/III), Au(III)) komplexei is jelentős eredményeket mutattak a tesztelések során [10]. Ezeknél a vegyületeknél a rákellenes hatás legtöbbször a központi fémionhoz köthető, azonban előfordul, hogy a fémion önmagában nem hatásos, ilyenkor a komplexből disszociáló ligandumnak van citotoxikus hatása.

A daganatos megbetegedések kezelésében a gyógyszerek mellett sugárterápiát, illetve onkosebészeti eljárásokat is alkalmaznak, kiegészítve immunterápiás módszerekkel. A megfelelő módszer megtalálása azonban legtöbbször összetett, hiszen a daganatok igen sokfélék lehetnek. A mellékhatások csökkentése és a jobb hatás elérése céljából gyakran kombinálják a gyógyszereket. A hatóanyagok biológia hatása és szerkezete változatos, vannak közöttük DNS-alkilező szerek, antimetabolitok, protein-kináz gátlók, citotoxikus antibiotikumok, mikrotubulusra ható szerek, illetve célzott hatású (kismolekulás) gyógyszerek. Utóbbi egyre elterjedtebb, hiszen használatuk során enyhébb mellékhatások jelentkeznek, hátránya viszont, hogy nem mindegyik rákos megbetegedés esetében lehet alkalmazni.

3.2. Tioszemikarbazonok

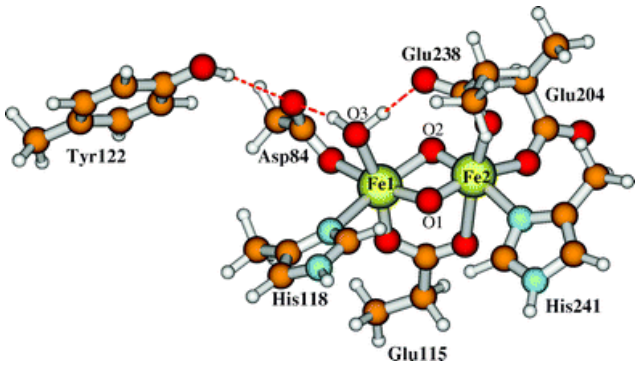
A TSK-ok alapváza (N,S) donoratomokat tartalmaz, így általában kétfogú ligandumként koordinálódnak a fémionhoz, semleges vagy ionos formában. Az anionos koordináció során deprotonálódik a hidrazin-NH csoport és tioláto kötési mód jön létre [11,12]. Gyakran egy harmadik donorcsoport is megtalálható alapvázukban, mely szintén koordinálódhat. Az α-*N*-heterociklusos TSK-ok esetében legtöbbször egy piridin-nitrogén, a szalicil-aldehid TSK-oknál pedig egy fenolos-OH csoport található az (N,S) donoratomok mellett, így képesek háromfogú ligandumként viselkedni. A TSK-okat egy megfelelő aldehid vagy keton és egy tioszemikarbazid kondenzációs reakciója révén szintetizálják. [13].

A TSK-ok rákellenes tulajdonságát az 1960-as évek közepén igazolták az FTSC leukémia elleni hatásának felismerésével [14]. További fejlesztések után sikerült előállítaniuk a TSK-ok egyik legismertebb képviselőjét, a 3-amino-piridin-2-karbaldehid-TSK-t (triapin vagy 3AP, **2. ábra**). A triapin egy α-*N*-heterociklusos TSK, mellyel több, mint 30 klinikai fázis I/II vizsgálatot végeztek el [1]. Mono- és kombinált terápiák esetében biztató eredmények születtek, azonban rövid biológiai felezési ideje miatt gyorsan kiürül a szervezetből, így szolid tumorokkal szemben nem elég hatásos. Emellett számos kellemetlen mellékhatás is jelentkezik alkalmazása során, mint például láz, kimerültség, hányás, illetve methemoglobinémia. A felmerülő problémák ösztönözték a TSK-ok további fejlesztését, melynek köszönhetően további két vegyület jutott klinikai vizsgálatba, a Coti-2 és a DpC kódnevű TSK (**2. ábra**). Ezen vegyületek jóval nagyobb citotoxicitást mutatnak, mint a triapin [15].



2. ábra: Klinikai vizsgálatokba bekerült fontosabb TSK-ok szerkezeti képlete.

A triapin és származékainak daganatellenes hatása a két vasiont tartalmazó ribonukleotid-reduktáz (RNR) enzim (**3. ábra**) inhibícióján alapul. A RNR enzim katalizálja a dezoxiribonukleotidok képződését, így részt vesz a DNS bioszintézisében [16]. Az enzim két alegységre osztható, R1 és R2. Utóbbiban található az aktív centrum, melyben két vasion és egy stabilis tirozil (Tyr) gyök helyezkedik el. A daganatos sejtekben a fokozott sejtosztódás miatt megnő a RNR expresszió, így a rákterápiák egyik célja lehet ezen enzim inaktiválása. Az enzim gátlása során a triapin kölcsönhatásba lép az R2 alegységgel, mely egy vas(II)-TSK komplexet eredményez. A képződő, egyébként katalitikus mennyiségű, komplex oxigénnel reagálva reaktív oxigén származékokat (ROS) eredményez, melyek képesek az R2 alegységben található Tyr gyököt kioltani [17]. Ez a folyamat az enzim inaktiválódásához vezet, megakadályozva a rákos sejtek DNS-ének további szintézisét. Mivel a mechanizmus során vas(II)-TSK ill. vas(III)-TSK komplexek keletkeznek, a biológia hatást befolyásolja a vaskomplexek oldatbeli stabilitása és redoxi tulajdonsága.



3. ábra: Ribonukleotid-reduktáz enzim szerkezete [18].

3.3. Tioszemikarbazonok rézkomplexei

További vizsgálatok eredményei alapján a vaskomplexek mellett a sejten belül képződő rézkomplexek is jelentősek lehetnek a TSK-ok hatásmechanizmusában [19]. Ezek főképp *N*-terminálisan diszubsztituált TSK-ok, melyek citotoxicitást jellemző IC_{50} értéke gyakran a nM-os koncentrációtartományba esik. A TSK-ok mellett szintetizált rézkomplexeik is rendelkezhetnek daganatellenes hatással. Számos olyan rézkomplexet állítottak elő, melynek citotoxicitása nagyobb az azt alkotó liganduménál (*N*-terminálisan diszubsztituált *α-N*-piridil-TSK-ok, szalicil-aldehid-TSK származékok), illetve előfordul az is, hogy a komplex kevésbé aktív a ligandumhoz viszonyítva (pl. triapin) [20,21]. A hatásmechanizmus alapja szintén a ROS képződése, amely a sejten belül képződő réz(II)ion redukálódásához, majd azt követő oxidációjához köthető [22]. Emellett vannak olyan rézkomplexek, melyek befolyásolhatják a topoizomeráz-II enzim működését is. Ez az enzim felelős a DNS szálak felhasadásáért és az új szálak felcsavarodásáért, így ezen enzim gátlása is ígéretes stratégia lehet a kemoterápiák során [23].

A komplexek szerkezete röntgenkrisztallográfiai mérések segítségével vizsgálható. Ezek a vizsgálatok kimutatták, hogy a szintetizált komplexekben a háromfogú ligandumok legtöbbször teljesen deprotonált formájukban koordinálódnak, ($N_{piridil}$,N,S^-) és (O^-,N,S^-) donoratomokon keresztül. A képződő komplexek geometriája természetesen függ az azt alkotó fémiontól. Réz(II)ion esetében torzult oktaéderes (síknégyzetes) geometriájú mono-komplex képződik, míg a vas(III)ion esetében oktaéderes geometriájú komplex alakul ki, dominánsan biszkomplexet képezve a monokomplex mellett [24,25].

A kutatócsoportunkban történt előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy az *α-N*-piridil TSK-oknak két disszociábilis protonja van, az egyik a piridinium-nitrogén, a másik pedig a hidrazin-nitrogén. Megállapították, hogy a ligandumok fiziológiás pH-n semleges formában vannak jelen, illetve, hogy a réz(II)ionnal elsősorban monokomplexeket képeznek. Savas pH tartományban $[Cu(LH)]^{2+}$ összettételű komplex képződik, melyben a ligandum koordinációja ($N_{piridil}$,N,S). A pH növelésével deprotonálódik a hidrazin-N csoport, így $[CuL]^+$ komplex jön létre, ahol a negatív töltés a kénatomon található. Ezek után megfelelően lúgos tartományban egy vegyes hidroxido komplex ([CuL(OH)]) alakul ki. A ligandum feleslegében azonban biszkomplexek is képződhetnek, ill. a triapin esetében egy kétmagvú $[Cu_2L_3]^+$ komplex képződését is leírták az ESR és ESI-MS mérések alapján. Továbbá azt tapasztalták, hogy az N,N-dimetil szubsztituált származék és a fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó származék esetében nőtt a rézkomplexek stabilitása [26].

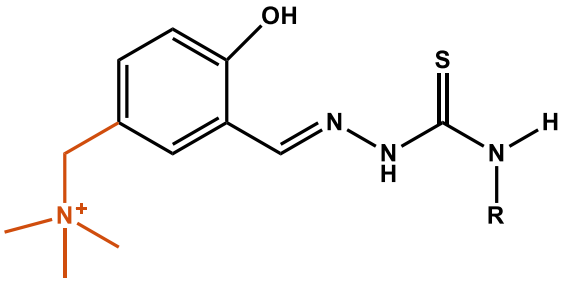
A TSK-ok a vas- és rézionok mellett platina(II), ruténium(II), nikkel(II), gallium(III), cink(II) és vanádium(IV/V) fémionokkal is képesek stabilis komplexet képezni [27]. A komplexképzés hatással van a lipofilitásra, a töltésre és a méretre, ezek változása pedig eltérő hatásmechanizmust eredményezhet.

3.4. Tioszemikarbazonok vízoldékonysága

Az *α*-*N*-heterociklusos TSK-ok hatásmechanizmusának megértéséhez az oldatkémiai tulajdonságok, illetve a fémionokkal való komplexképződés folyamatainak vizsgálata és megismerése szükséges. Sajnos a TSK-ok vízben való oldhatósága gyakran korlátozott, így a vizsgálatok nagy részét csak szilárd fázisban vagy szerves oldószerben ill. víz/szerves oldószer elegyekben lehet elvégezni. Másrészt egy potenciális gyógyszermolekulánál is előnyös lehet a jobb vízben való oldhatóság. Emiatt a TSK-ok továbbfejlesztésének egyik célja lehet a vízben való oldhatóság növelése, melynek egyik módszere a különféle csoportok beépítése már meglévő TSK-ok szerkezetébe. Kutatócsoportunkban előzetesen már történtek vizsgálatok ilyen jellegű vegyületekkel, melyeket a Bécsi Egyetem Szervetlen Kémiai Intézetének laboratóriumában szintetizálták és karakterizálták.

Először is az FTSC, piridin-2-karboxaldehid-N^4,N^4-dimetil-TSK (PTSC) és szalicilaldehid-TSK (STSC) ligandumokra olyan szubsztituenseket helyeztek, melyek nitrogénje protonálódni képes fiziológiás pH-n, mint pl. prolin, morfolin vagy metil-piperazin, ezzel előállítva a következő vegyületeket: Morf-PTSC, mPip-PTSC, L-Pro-FTSC, L-Pro-STSC [28,29]. Az elvégzett *n*-oktanol/víz megoszlási mérések megerősítették, hogy az így szintetizált vegyületek valóban jobban oldódnak vízben, mint az eredeti ligandumok. A legjelentősebb változást a prolin csoportot tartalmazó vegyületeknél figyelték meg, ez a változás az aminosav-rész ikerionos szerkezetéhez köthető. Emellett a mPip-PTSC oldhatósága sokkal jobb, mint a PTSC ligandumé, hiszen a piperidinium-nitrogén 74%-ban protonált. Azonban a Morf-PTSC megoszlási hányados (lg*D)* értéke pH = 7,4-n nem sokkal kisebb, mint a PTSC ligandumé, mivel a morfolin csoport fiziológiás pH-n már szinte cask deprotonált, azaz semleges, formában van jelen. Látható, hogy a hidrofilitás növelése sikeresnek bizonyult, azonban ezeknek a vegyületeknek nincs, vagy csak nagyon kicsi a rákellenes hatásuk, azonban a réz(II)komplexeiknek jelentős.

Emellett STSC származékokat (H_2L^H, H_2L^{Me}, H_2L^{Et}, H_2L^{Ph}; **4. ábra**) szintetizáltak metilén-trimetil-ammónium csoport beépítésével [2]. A származékok vízoldhatóságát az *n*-oktanol és a vizes fázis közötti megoszlás vizsgálatával határozták meg, melyből kiderült, hogy a származékok sokkal hidrofilebbek, mint az STSC. A $D_{7,4}$ (pH = 7,4-en meghatározott megoszlási hányados) értékek alapján a következő tendenciát figyelték meg: $H_2L^H < H_2L^{Me} < H_2L^{Et} < H_2L^{Ph}$. Minél nagyobb a $D_{7,4}$ érték, annál lipoofilebb a vegyület, tehát ebben a sorrendben nő a ligandumok lipofilitása.A rákellenes hatás szempontjából ezen ligandumok sem bizonyultak megfelelőnek, ugyanakkor a réz(II)komplexeik már igen.



4. ábra: Az STSC származékok szerkezete (ahol R: H, Me: metil, Et: etil vagy Ph: fenil).

A vízben való oldhatóság és az optimális hidrofil/lipofil jelleg igen fontos, hiszen a megfelelő lipofilitás segíti elő a passzív transzportot a sejtmembránon keresztül, így gyakran összefügg a citotoxicitással [2]. Emiatt a hatékony rákellenes gyógyszerek kifejlesztésében a legnagyobb kihívást a hidrofil/lipofil jelleg finomhangolása jelenti.

4. Célkitűzések

A potenciális hatóanyagok hatásmechanizmusának és farmakokinetikai viselkedésének megértéséhez oldategyensúlyi vizsgálatok elvégzése szükséges. A TSK-ok esetében azonban rossz vízoldékonyságuk gyakran megnehezíti a vizsgálatok elvégzését. Munkánk fő célja a hidrofil/lipofil jelleg optimalizálása és szerves kation transzport fehérjékkel való kölcsönhatás céljából kifejlesztett három FTSC származék oldatkémiai viselkedésének vizsgálata. Célunk továbbá, hogy összefüggéseket találjunk az oldatbeli viselkedés, a redoxi tulajdonságok, illetve a citotoxikus hatás között.

Ehhez a következő célokat tűzzük ki:

I. UV-Vis spektrofotometriás mérések segítségével vizsgáljuk az FTSC származékok proton disszociációs folyamatait, majd ez alapján meghatározzuk, hogy fiziológiás körülmények között, vizes oldatban milyen protonáltsági állapotban vannak jelen.

II. Elvégezzük a ligandumok lipofilitásának vizsgálatát az *n*-oktanol/víz közötti megoszlásos UV-Vis spektrofotometriás méréssel.

III. Az izomerek jelenlétének, illetve a ligandumok deprotonálódásának nyomon követése céljából ^{1}H NMR spektroszkópiai méréseket végzünk.

IV. A további vizsgálatokat megelőzően, partnereink rákos sejtvonalon vizsgálják a származékok és azok réz(II)komplexeinek citotoxikus hatását. Ennek eredményének ismeretében elvégezzük a réz(II)komplexek oldatbeli stabilitásának, szerkezetének és redoxi tulajdonságainak vizsgálatát UV-Vis spektrofotometriás és ciklikus voltammetriás mérések segítségével. Követjük két természetes redukálószerrel (glutation, aszkorbinsav) való reakciójuk időbeli lefutását, illetve vizsgáljuk szabad gyökfogó hatásukat.

V. Mivel a TSK-ok hatásmechanizmusa gyakran vasionokkal való kölcsönhatáson alapul, megvizsgáljuk a vas(II)- illetve vas(III)ionokkal képzett komplexek stabilitását.

5. Kísérleti körülmények

5.1. Felhasznált vegyszerek

A vizsgált vegyületeket (HL^{HH}, HL^{MeMe}, HL^{HPh}) és az FTSC-t a Bécsi Egyetem Szervetlen Kémiai Intézetének laboratóriumában szintetizálták és karakterizálták. A mérésekhez használt glutation (GSH), aszkorbinsav (AA), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES), illetve 2-(*N*-morfolino)-etánszulfonsav (MES) a Sigma-Aldrich-tól származik. A KCl, KOH, KH-ftalát, HCl, és az etanol a Reanal Laborvegyszer Kft. terméke.

A ligandum törzsoldatokat frissen, tisztítás nélkül, tömeg szerinti beméréssel készítettük az elemanalízis eredményének ismeretében. Oldószerként Milli-Q vizet használtunk. A réz(II)- és vas(III)-tartalmú fémtörzsoldatok készítéséhez a fémsókat ($CuCl_2$, $Cu(NO_3)_2$, $FeCl_3$) vízben oldottuk, majd a pontos koncentrációjukat komplexometriásan határoztuk meg EDTA mérőoldattal. A vas(II)-törzsoldat készítésénél vasport sósavban oldottunk, majd a koncentrációt permanganometriás titrimetriás módszerrel kaptuk meg. A természetes eredetű redukálószerekkel történő reakció során HEPES pufferrel (50 mM) állítottuk a pH-t 7,4-es értékre. A további méréseknél (ahol szükséges volt) a pH-t sav-, illetve lúgoldat hozzáadásával állítottuk a megfelelő értékre. A mérések során a 0,10 M-os állandó ionerősséget KCl és KNO_3 használatával állítottuk be. Az oxigénre érzékeny minták esetében az anaerob körülményeket argon bevezetésével biztosítottuk.

5.2. Ultraibolya-látható (UV-Vis) spektrofotometria

UV-látható spektrofotometriával azok az anyagok vizsgálhatók, melyek kromofór csoportot tartalmaznak és a 200-800 nm hullámhossztartományban fényt abszorbeálnak. Az elektronok gerjesztés hatására az alacsonyabb energiájú elektronpályákról magasabb energiájú szintekre kerülnek. Fémkomplexek esetén az abszorpciós csúcsok a fémion d-d átmeneteihez, illetve a fémion és ligandum közötti töltésátvitelhez és magához a szabadon lévő vagy koordinált ligandumhoz köthetők. A módszer alkalmazása rendkívül elterjedt, leginkább kvantitatív problémák megoldására alkalmas.

A módszer segítségével négyfajta mérést végeztünk. Meghatároztuk a ligandumok proton disszociációs állandóit, vizsgáltuk a réz(II)komplexek redukcióját természetes eredetű redukálószerekkel (AA, GSH). Emellett elvégeztük mindhárom vizsgált vegyülettel a DPPH-tesztet az antioxidáns hatás jellemzéséhez, valamint meghatároztuk a megoszlási állandókat az *n*-oktanol/víz megoszláson alapuló módszernél az UV-látható spektrumok elemzésével.

5.2.1. Mérési körülmények

A ligandumok és komplexeik spektrofotometriás titrálásánál egy pH-potenciometriás mérőrendszert alkalmaztunk. Ennek kalibrálását az Irving-féle módszerrel [30] végeztük el, melynek alapja egy erős sav-erős bázis titrálás. A titrálási fogyás-pH adatpárokból az Abu9x nevű programmal, Gran-módszerrel [31] meghatároztuk az Irving-féle korrekciós faktort, illetve a vízionszorzatot. A titráláshoz Metrohm Dosimat 665 típusú automata bürettát, Orion 710A pH-mérőt és Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektródot használtunk. A mérőműszert 0,05 M KH-ftaláttal (pH=4,008) hitelesítettük, a meredekség értékét a vízionszorzat (pK_w=13,76 ± 0,01) alapján választottuk meg.

A ligandumok, illetve a réz(II)komplexek titrálásánál a minták 50-75 µM, míg Fe(II)- és Fe(III)-komplexek esetében 50-300 µM ligandumot tartalmaztak. A titrálásokat karbonátmentes KOH mérőoldattal végeztük, melynek koncentrációját KH-ftalát oldattal határoztuk meg. A méréseket argon atmoszféra alatt, pH=1,7-11,7 közötti tartományban végeztük. A spektrumokat 25±0,1 °C-on, állandó ionerősség (0,10 M KCl) mellett vettük fel (a pH < 2 mintáknál az állandó ionerősséget a sósav és a KCl összkoncentrációja jelentette). Az optikai úthossz 0,2-2 cm között változott a vizsgált kémiai rendszertől függően. A méréseket egy Agilent Cary 8454 típusú és egy Thermo Scientific Evolution 220 típusú spektrofotométeren végeztük.

Az egyensúlyi állandók meghatározásához a PSEQUAD programot [32] használtuk. Komponensként a fémion (M), a deprotonált ligandum (L) és a proton (H) szerepelt. Továbbá megadtuk a mért abszorbancia spektrumokat, az adagolt mérőoldat – pH adatpárokat, az asszociátumok számát és összetételét, a komponensek kiindulási koncentrációját, a kiindulási térfogatot, közelítő stabilitási szorzatokat és különböző állandókat (vízionszorzat, Irving-féle korrekciós tényező). Ezek után a program az M, L és H komponensekre felírható anyagmérleg-egyenletek (3, 4, 5) megoldásával megadta a számított stabilitási szorzatokat, az egyedi részecskék moláris abszorbancia spektrumait, illetve a mért és számolt abszorbancia adatok illesztésére jellemző illesztési paramétereket.

A komplexképződés (1) az alábbi egyenlet segítségével írható le:

$$\mathrm{pM} + \mathrm{qL} + \mathrm{rH} \rightleftharpoons M_pL_qH_r \qquad (1)$$

ahol M: fémion, L: ligandum, H: proton; p, q, r: sztöchiometriai együtthatók.

Ebből levezethető a részecskék stabilitási szorzata (2):

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

Az M, L és H komponensekre a következő anyagmérleg-egyenletek írhatóak fel:

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

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

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

A természetes eredetű redukálószerekkel (AA, GSH) való reakciók időbeli lefutásának mérését egy Hewlett-Packard 8452A diódasoros spektrofotométeren végeztük el. A méréshez tandem küvettát használtunk, ennek egyik felébe a ligandum, a $CuCl_2$ és a HEPES puffer (pH=7,4) került, másik felébe pedig a redukálószer és a puffer. A fém-ligandum arány minden mérés során 1:1 volt, maximum 70-szeres GSH/AA felesleg mellett. Az oxigén teljes kizárása elengedhetetlen, így még a mérés előtt argont áramoltattunk át a küvetta mindkét oldalán, majd a vizsgálat során is biztosítottuk az anaerob körülményeket. Az átáramló argon oxigéntartalmát lúgos pirogallol oldattal csapdáztuk. Az oldatok elegyítése előtt felvettük a spektrumot, majd keveredés után, bizonyos időközönként megismételtük a mérést.

A ligandumok megoszlási hányadosait és állandóit *n*-oktanol és pufferelt vizes fázis közötti megoszlás alapján számoltuk. A két oldatot még a mérés előtti napon kölcsönösen telítettük egymással. A törzsoldatokat vizes pufferoldattal készítettük, majd a mintákhoz *n*-oktanolt adtunk 1:1 arányban. A mintákat 3 órán át kevertettük, majd a két fázist centrifuga segítségével választottuk el. A vizes fázisok UV-látható spektrumainak felvételével határoztuk meg a megoszlás előtti és utáni koncentrációkat. (Az oktanolnak és a vizes fázisoknak eltér a moláris abszorbancia spektruma, ezért csak az azonos oldószerben kapott spektrumokat hasonlíthatjuk össze). A megoszlási hányadosokat a következő (6) egyenlet alapján számoltuk ki:

$$D = \frac{[x]_{oktanol}}{[x]_{vizes}} = \frac{A_{eredeti} - A_{vizes\ fázis}}{A_{vizes\ fázis}} \quad (6)$$

ahol $[x]_{oktanol}$ az oktanol fázisban lévő egyensúlyi koncentráció, $[x]_{vizes}$ a vizes fázisban lévő egyensúlyi koncentráció, $A_{eredeti}$ az eredeti vizes fázisban mért abszorbancia, $A_{vizes\ fázis}$ a megoszlás utáni vizes fázisban mért abszorbancia.

DPPH segítségével megvizsgáltuk a ligandumok antioxidáns, azaz szabad gyökfogó hatását. A törzsoldatokat minden nap frissen készítettük el, oldószerként etanolt használtunk. A mintákban a DPPH koncentrációja 50 μM volt, a vizsgált vegyületekét pedig 8,5-150 μM között változtattuk. Emellett negatív kontrolként vizsgáltuk a DPPH etanolos oldatát is. A spektrumok felvételéhez egy Agilent Cary 3500 típusú spektrofotométert használtunk. A hőmérséklet 25,0 ± 0,1°C volt, melyet a fotométer saját termosztátja biztosított. A változásokat addig követtük, amíg az abszorbancia változott.

Az antioxidáns aktivitás százalékát (*AA%*) a következő egyenlet (7) segítségével számoltuk ki:

$$AA\% = \frac{A_{negatív\ kontroll} - A_{minta}}{A_{negatív\ kontroll} - A_{kontrol}} \times 100 \qquad (7)$$

ahol $A_{negatív\ kontroll}$: negatív kontroll abszorbancia értéke, A_{minta}: vizsgált minta abszorbancia értéke a reakció után, $A_{kontroll}$:Trolox-szal végzett reakció után kapott abszorbancia. Az AA% számolásához az adott λ-on (az abszorbancia maximumhoz tartozó λ-on) mért abszorbancia értékeket használtuk.

A DPPH egy stabilis gyök, melynek redukcióját jelentős abszorbanciaváltozás kíséri. IC_{50} a vegyület azon koncentrációja, amelynél a vegyület a szabad DPPH gyökök számát 50%-ára csökkenti. Ennek kiszámításához az AA% - koncentráció adatpárokat egy szigmoid függvénnyel illesztettük meg az Excel Solver programjának segítségével. Ezen értékek, illetve a Trolox (antioxidáns, az E-vitamin vízben oldódó analógja) IC_{50} értékének felhasználásával meghatároztuk a vegyületek Trolox egyenértékű antioxidáns kapacitását (TEAC – 'Trolox equivalent antioxidant capacity').

5.3. Ciklikus voltammetria (CV)

A ciklikus voltammetriával való mérés során a feszültséget változtatjuk egy adott tartományon belül, állandó pásztázási sebesség mellet. A potenciált a referencia- és a munkaelektród között, az áramerősséget pedig a munka- és a segédelektród között mérjük. A feszültség csökkentésének hatására a vegyület oxidált formája redukálódik, így katódos áram keletkezik, amely akkor éri el a maximumot, ha a feszültség eléri a redukciós potenciált. Majd amikor lecsökken az oxidált forma koncentrációja az elektród felületénél, az áramerősség lecsökken. Ezután növeljük a feszültséget, a vegyület redukált formája oxidálódik, ennek hatására megjelenik az anódos áram, ami ismét lecsökken, ahogy csökken a koncentráció.

Az anódos- és katódos csúcspotenciál különbsége megadja a feszültségkülönbséget (8):

$$\Delta E = E_a - E_k = \frac{59}{n}[mV] \qquad (8)$$

ahol E_a: anódos csúcspotenciál, E_k: katódos csúcspotenciál, n: elektronátmenetek száma.
A feszültségkülönbség elméleti értéke reverzibilis párok esetében 59 mV egy elektonátmenetnél. A formálpotenciált a redukciós és oxidációs potenciál átlaga adja meg.

A CV mérésekhez egy számítógép vezérelte Autolab-PGSTAT 204 típusú elektrokémiai mérőműszert használtunk. Platina munka- és segédelektródot, illetve Ag/AgCl/KCl (3 M) referencia elektródot alkalmaztunk. A rendszer állapotát frissen készített $[Fe(CN)_6]^{3+}$ (0,01 M) kalibráló oldattal ellenőriztük.

A réz(II)komplexet mérés előtt készítettük, a fémion koncentrációja 1-1,8 mM között volt. A megfelelő oldhatóság miatt a minta 30% (v/v) DMF/H_2O elegyben készült, a pH-t 7,4-es értékre állítottuk be. A vizsgálatokat 1:1, 1:2 és 1:3 fém-ligandum arány mellett végeztük. Az alkalmazott ionerősség az eddigiekhez hasonlóan 0,10 M volt, melyet KNO_3-oldattal állítottunk be. Az oxigén kizárásához argont használtunk.

A katódos és anódos csúcspotenciálok, valamint a csúcsáramok felhasználásával megállapítottuk a folyamatok reverzibilitását és formálpotenciál értékeket számoltunk.

5.4. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia

Az NMR spektroszkópia alapja a mágneses atommagok és a külső mágneses tér kölcsönhatásának vizsgálata. Külső mágneses tér hatására a magok mágneses momentuma a térrel párhuzamosan áll be, a mag ekörül precesszál. A tér hatására a mag energiája felhasad 2I+1 nívóra, ahol I a mag spinkvantumszáma. Ha az elektromágneses sugárzás mágneses tere akkora körfrekvenciával forog a külső tér körül, mint a mag mágneses momentuma, NMR átmenet jön létre. A magok mágneses momentuma kölcsönhatásba lép a mágneses térrel, ezt befolyásolja a mag körüli elektroneloszlás. Különböző minőségű és/vagy különböző kémiai környezetben levő magok esetében az árnyékolási tényező eltérő, így azok rezonanciafrekvenciája is. Az adott mag rezonanciájának mágneses térereje és a referencia rezonancia térerőssége közti különbség megadja a kémia eltolódást, amely információt ad a kémiai szerkezetről. A szomszédos magok spinjei 2I+1 jelre hasítják fel a várt csúcsokat, így multiplett jelek keletkeznek. A jelek intenzitása (csúcs alatti területe, integrál értéke) arányos a jelhez tartozó magok számával, így meghatározhatók a különböző kémiai környezetű protonok száma. A módszer alkalmas a ligandumok protonálódási folyamatainak, valamint az izomerek és fémkomplexek képződésének követésére is.

A ^{1}H NMR vizsgálatokat egy Bruker Avance III HD Ascend 500 Plus készüléken végeztük, referenciaként DSS-t (4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav) alkalmaztunk. A vizsgálatoknál vízelnyomást alkalmaztunk a WATERGATE nevű pulzusszekvencia segítségével. A minták 0,3 mM ligandumot, 10% (v/v) D_2O-ot és 0,10 M KCl-ot tartalmaztak, valamint foszfát puffert az állandó pH-jú minták esetében. A spektrumok kiértékelését a MestReNova nevű programmal végeztük.

5.5. Kiegészítő mérések

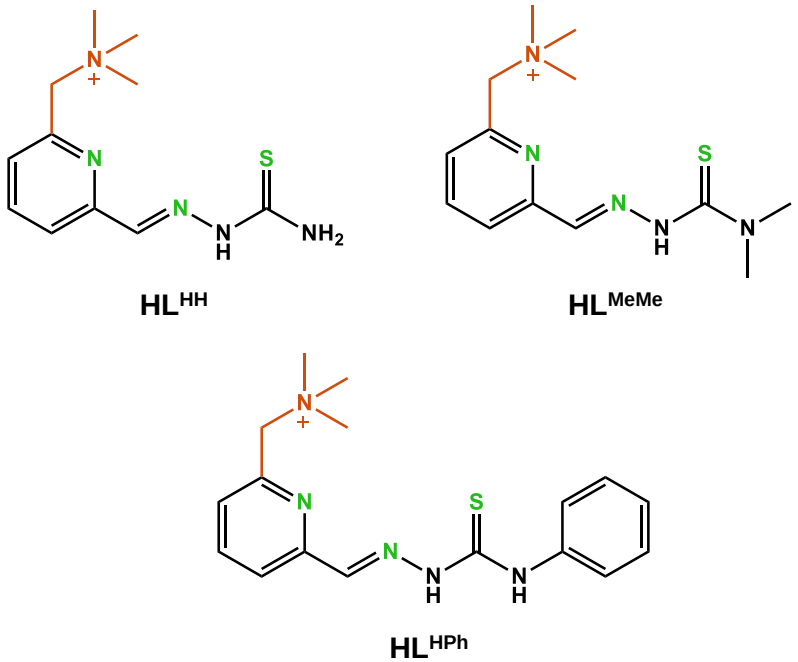
Az elektronspin rezonancia spektroszkópia (ESR) módszerrel a réz(II)komplexek koordinációs módjairól és a komplexek geometriájáról nyertük információkat. Ehhez a különböző pH-kon felvett spektrumokból számolt paraméterekre (g-tenzor, hiperfinom csatolási állandó (A)) volt szükség. A spektrumok felvételét és kiértékelését Dr. May Nóra V. (ELKH, TTIK, Budapest) végezte. A mérésekhez a mintákat mi készítettük el. A spektrumok felvétele egy BRUKER EleXsys E500 spektrométerrel történt, szobahőmérsékleten.

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

6. Eredmények

6.1. Tioszemikarbazonok oldatkémiai vizsgálata

A rákellenes gyógyszermolekulák fejlesztésének egyik nehézsége az optimális hidrofil/lipofil jelleg megtalálása. A megfelelő lipofil jelleg hozzájárulhat a hatékonyabb sejtbejutáshoz, a jó vízoldékonyság pedig szükséges az emberi szervezet víztereiben való mozgáshoz és az oldategyensúlyi vizsgálatok elvégzését is megkönnyíti. A TSK-ok vízben való oldhatósága korlátozott, azonban ez a korlát megszüntethető bizonyos funkciós csoportok beépítésével. Így készültek a Bécsi Egyetemen dolgozó együttműködő partnereink által szintetizált ligandumok (**5. ábra**), melyeket a Tudományos Diákköri munkám során vizsgáltam. Ezen ligandumok FTSC származékok, melyek piridin-gyűrűjének kettes pozíciójába egy metilén-trimetil-ammónium csoport került. Ez a funkciós csoport tartalmaz egy pozitív töltést, mely növelheti a vegyületek vízben való oldhatóságát, másrészt az organikus kationtranszporterekkel való kölcsönhatást is biztosíthatja, melyek gyakran túlexpresszáltak tumorok felületén [2,33].

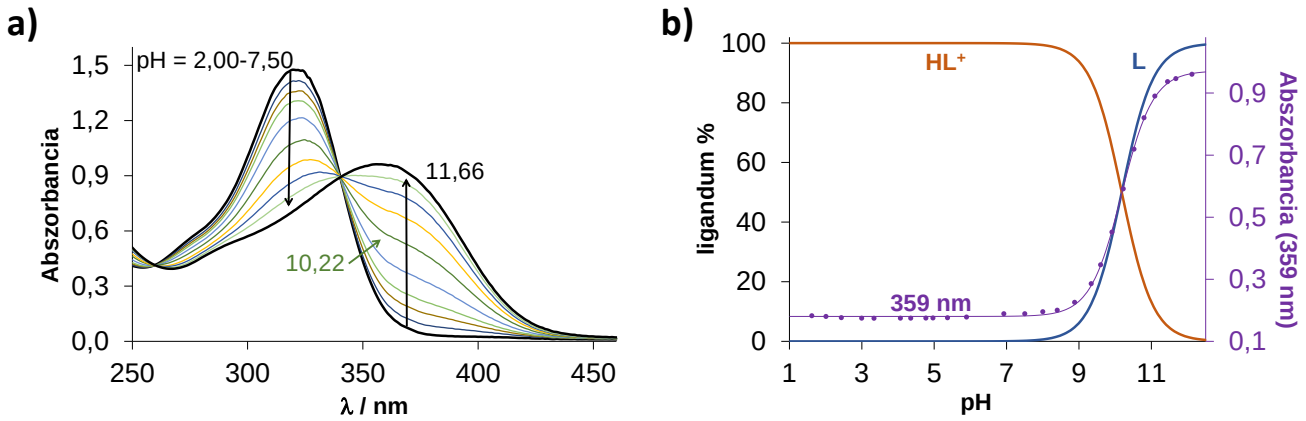


5. ábra: Az általunk vizsgált TSK-ok szerkezeti képlete. A ligandumok ellenionja: kloridion.
HL^{HH}: ({6-[(E)-{[(karbamotioil)amino]imino}metil]piridin-2-il}metil)trimetilazánium;
HL^{MeMe}: ({6-[(E)-{[(dimetilkarbamotioil)amino]imino}metil]piridin-2il}metil)trimetilazánium,
HL^{HPh}: ({6-[(E)-{[(fenilkarbamotiol)amino]imino}metil]piridin-2- il}metil)trimetilazanium.

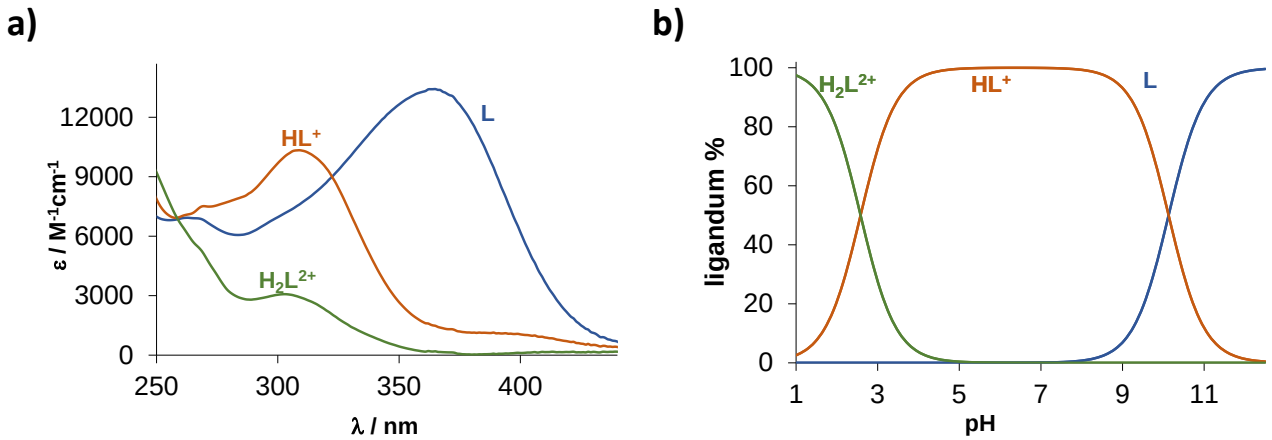
A vegyületek oldatbeli viselkedésének tanulmányozása azért fontos, mert a proton disszociációs állandók ismeretében meg tudjuk állapítani, hogy adott pH-n milyen az adott ligandum protonáltsági állapota és töltése. Ezen információk alapján megállapítható, hogy a hatóanyag milyen formában lesz jelen a szervezetben fiziológiás pH-n.

A vizsgált ligandumok oldhatóságuk alapján alkalmasak lennének pH-potenciometriás mérésekre, azonban ehhez nem állt rendelkezésünkre megfelelő mennyiségű anyag, így a proton disszociációs állandókat UV-látható spektrofotometriás titrálásokkal határoztuk meg. Az FTSC ligandum szakirodalmi adatai alapján [34,35] ezen ligandumoknak két disszociábilis protonja van. Az első deprotonálódási folyamat a piridínium-nitrogénhez köthető, a második pedig a hidrazin-nitrogénhez. Az első folyamatot azonban csak a HL^{MeMe} ligandum esetében tudtuk végig követni, a másik két ligandumnál ez túl alacsony pH-n (< 1,5) következett be.

A **6.a ábrá**n a HL^{HPh} ligandum titrálásához tartozó reprezentatív UV-látható spektrumok láthatók, melyek nagy hasonlóságot mutatnak a HL^{HH} ligandum spektrumaival. Megfigyelhető, hogy a pH növelése jelentősen megváltoztatja a spektrumot a 260-450 nm közötti hullámhossztartományban. A pH növelése a savas és semleges pH-tartományban (pH = 2,0-7,5) nem okoz spektrális változást, azonban további növelésének hatására 260-340 nm között az abszorbancia értékek csökkenése, míg 340-450 nm között a növekedése figyelhető meg. Ez a változás a HL^+ forma deprotonálódásának hatására történik, ekkor alakul ki az L forma. A különböző pH-n rögzített spektrumok alapján a különböző protonáltsági állapotú ligandumformák moláris abszorbancia spektrumait is kiszámítottuk a PSEQUAD számítógépes programmal [32] a proton disszociációs állandók mellett (**1. táblázat**). Ilyen egyedi moláris spektrumok láthatók a **7.a ábrá**n, mely jól szemlélteti a HL^{MeMe} ligandum háromféle (H_2L^{2+}, HL^+, L) formájához tartozó spektrumok eltérését. A HL^{MeMe} ligandumnál a piridínium-nitrogén deprotonálódása is megfigyelhető a vizsgált pH-tartományban, a két deprotonálódási folyamat egymástól jól elkülöníthető, így itt mindkét pK_a értéket meg tudtuk határozni (**1. táblázat**).



6. ábra: A HL^{HPh} ligandum **a)** 2,00-11,66 pH-tartományban felvett UV-látható spektrumai vizes közegben, illetve **b)** számított koncentráció eloszlási görbéi a meghatározott pK_a értékek alapján, valamint a számolt (folytonos vonal) és mért abszorbancia (●) értékek illeszkedése 359 nm-en. {c_L = 49 µM; I = 0,10 M KCl; T = 25,0 °C, l = 1,0 cm}



7. ábra: A HL^{MeMe} ligandum **a)** különböző formáinak számolt moláris abszorbancia spektrumai, illetve **b)** számított koncentráció eloszlási görbéi a meghatározott pK_a értékek alapján. {c_L = 49 µM; I = 0,10 M KCl; T = 25,0 °C, l = 1,0 cm}

Az **1. táblázat**ban található pK_a értékek alapján megfigyelhető, hogy az *N*,*N*-dimetil szubsztituált származék esetében nőtt az első, illetve csökkent a második deprotonálódási folyamathoz tartozó pK_a érték. Ez nemcsak az általunk vizsgált ligandumoknál, hanem az FTSC-PTSC ligandumpár esetében is így volt, ahol FTSC nem-szubsztituált, PTSC pedig *N*,*N*-dimetil szubsztituált származék [34,35].

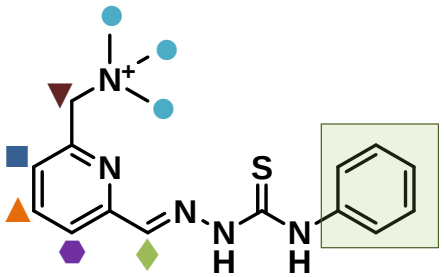
1. táblázat: A vizsgált TSK-ok (HL^{HH}, HL^{MeMe}, HL^{HPh}) valamint az FTSC és a PTSC protonálódási állandói (lgβ), pK_a és lg$D_{7,4}$ értékei UV-Vis spektrofotometriával meghatározva, illetve a különböző protonáltsági állapotú részecskék λ_{max} és moláris abszorbancia (ε) értékei.

	HL^{HH}	HL^{MeMe}	HL^{HPh}	FTSC [b]	PTSC [b]
lgβ (HL^+)	10,58 ± 0,01	10,13 ± 0,01	10,18 ± 0,01 [a]	10,72	10,22
lgβ (H_2L^{2+})	–	12,71 ± 0,02	–	14,2	13,83
pK_a (H_2L^{2+})	< 1,5	2,58	< 1,5	3,48	3,61
pK_a (HL^+)	10,58	10,13	10,18	10,72	10,22
lg$D_{7,4}$	< -1,4	< -1,4	-0,85 ± 0,01	+0,73	+1,15
	λ_{max} (nm) / ε ($M^{-1}cm^{-1}$)				
H_2L^{2+}	–	303 / 3075	–	–	–
HL^+	316 / 21960	309 / 10340	322 / 29680	–	–
$L^{0\,(+/-)}$	344 / 15990	365 / 13420	359 / 19690	–	–

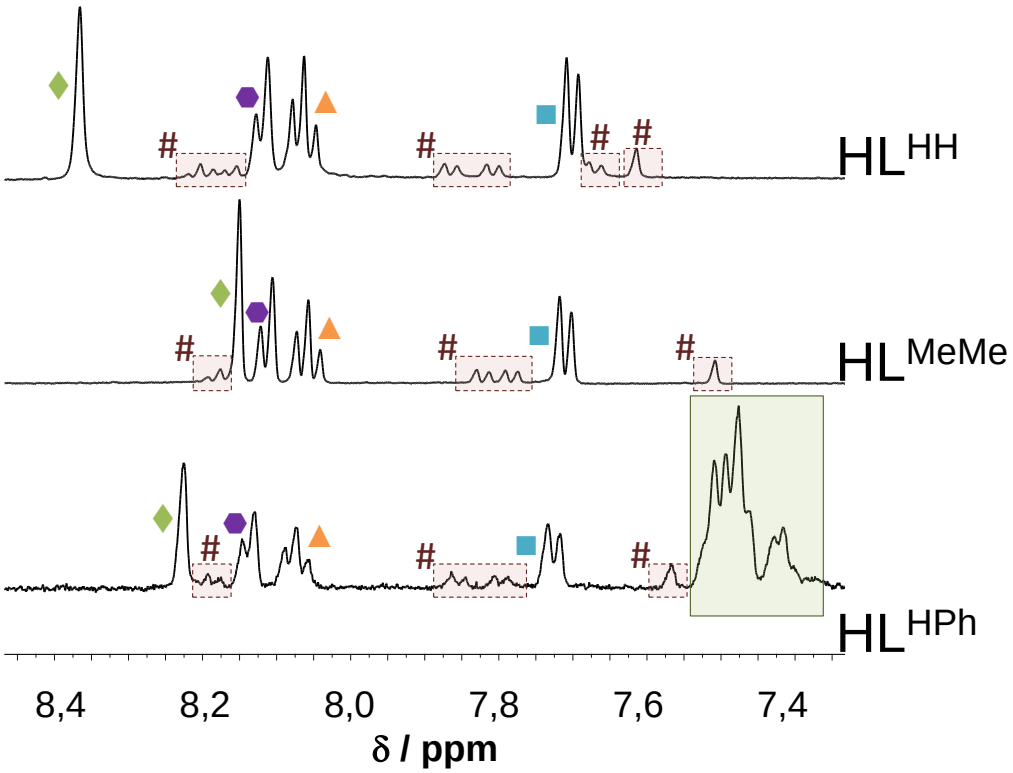
[a] ^{1}H NMR titrálással meghatározott pK_a: 10,20 ± 0,03. [b] Az FTSC és PTSC értékei szakirodalmi adatok [34,35].

A kapott egyensúlyi állandókból a MEDUSA nevű program [36] segítségével koncentráció eloszlási görbéket (**6.b, 7.b ábra**) számoltunk. Ezen görbék segítenek megállapítani, hogy adott pH-n milyen arányban fordulnak elő a különböző protonáltsági állapotú részecskék. Jól látható, hogy az általunk vizsgált három ligandum esetében fiziológiás pH-n az uralkodó részecske a HL^+. Ez a pozitív töltés elősegíti a jó vízoldékonyságot, illetve segítheti a szerves kation transzportfehérjékkel kialakuló kölcsönhatást (melynek vizsgálata folyamatban van). Fontos megjegyezni, hogy az L forma ugyan semleges, de ikerionos szerkezetű ($L^{+/-}$) a hidrazin-nitrogén deprotonálódásának következtében. Ekkor nagy valószínűséggel a negatív töltés a kénre került a tion-tiol tautomériának köszönhetően.

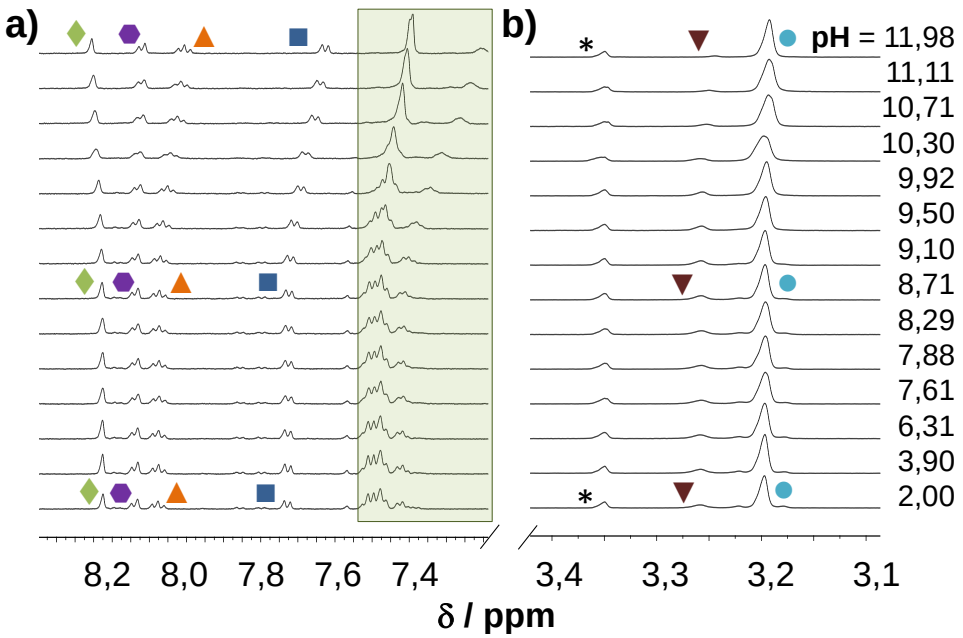
A ^{1}H NMR spektroszkópia segítségével nyomon követhető a ligandumok deprotonálódása, illetve izomerek jelenléte. A méréshez a ligandumokat 10% (v/v) D_2O/H_2O elegyben oldottuk fel. Ezek után HL^{HH} és HL^{MeMe} ligandumok esetében pH = 7,4-n (**9. ábra**), HL^{HPh} ligandum esetében pedig pH = 2-12 tartományban vettük fel a spektrumokat (**10. ábra**). A rezonanciák azonosítása a rokonvegyületek (pl. FTSC) NMR spektruma alapján történt [37].



8. ábra: A ^{1}H NMR spektrumokon használt jelölések a csúcsok megkülönböztetésére.

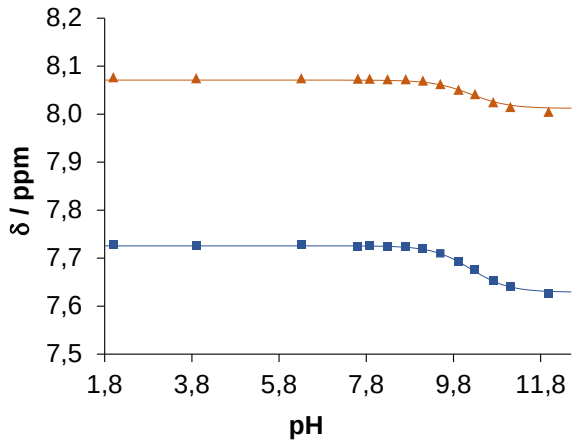


9. ábra: A vizsgált ligandumok (HL^{HH}, HL^{MeMe}, HL^{HPh}) ^1H NMR spektrumai az aromás régióban pH = 7,4-n (10/90% (v/v) D_2O/H_2O). A csúcsokhoz tartozó jelölések a **4. ábrá**n láthatóak, illetve # jelöli a Z izomerhez tartozó csúcsokat. {c_L = 0,3 mM; 10% (v/v) D_2O; I = 0,1 M KCl}



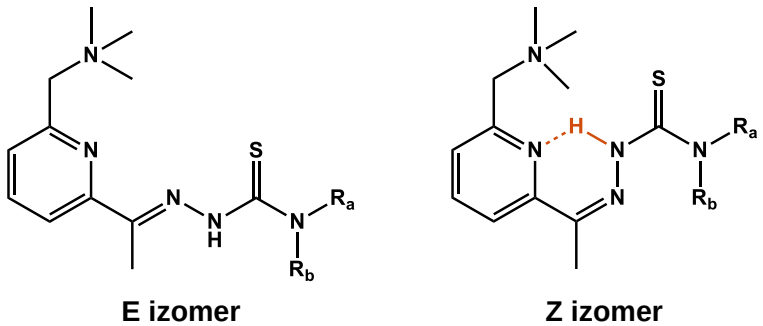
10. ábra: A HL^{HPh} ligandum pH = 2-12 tartományban (10/90% (v/v) D_2O/H_2O) felvett ^1H NMR spektrumainak **a)** aromás és **b)** alifás régiójának részlete. A csúcsokhoz tartozó jelölések a **4. ábrá**n láthatóak, * pedig a metanol jelét jelöli. {c_L = 0,3 mM; 10% (v/v) D_2O; I = 0,1 M KCl}

A HL^{HPh} ligandum különböző pH-kon felvett spektrumainál megfigyeltük, hogy csak egy deprotonálódás játszódik le a vizsgált pH-tartományban, és gyakorlatilag mindegyik CH-proton érzékeny erre a folyamata, azonban legnagyobb mértékben az aromás protonok. Ezt a folyamatot a hidrazin-nitrogénhez kötöttük, és a spektrumok alapján a pH − kémiai eltolódás adatpárok felhasználásával, a PSEQUAD programmal [32] pK_2-t (10,20 ± 0,03) tudtunk számolni (**11. ábra**), ami jó egyezést mutat az UV-Vis fotometriás módszerrel számolt pK_2 értékkel (**1. táblázat**).



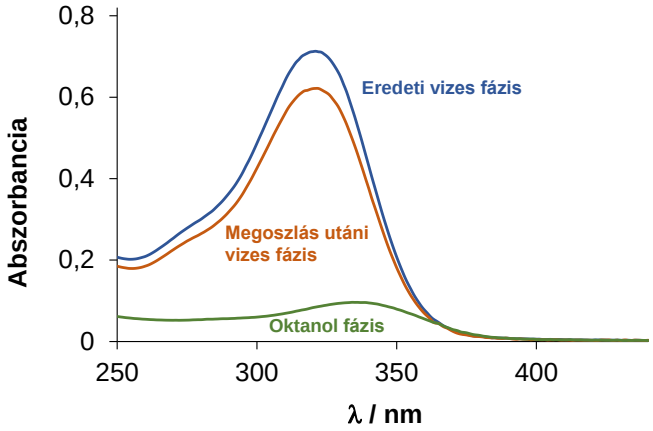
11. ábra: A HL^{HPh} ligandum CH(3) (■), ill CH(4) (▲) protonjainak mért és számolt (illesztett) kémiai eltolódása a pH függvényében. {c_L = 0,3 mM; 10% (v/v) D_2O; I = 0,1 M KCl}

A pH=7,4-n felvett spektrumok (**9. ábra**) alapján izomerek jelenléte figyelhető meg mindhárom ligandum esetében. A Z/E izoméria (**12. ábra**) a $C=N^2$ kettős kötésen keresztül jön létre, aránya függ az oldószertől és a pH-tól, de a szakirodalom alapján jellemzően az E forma a domináns [37]. A megfelelő csúcsintegrálok arányából kiszámoltuk a valószínűsített Z izomer arányát, ami a HL^{HPh} és HL^{MeMe} ligandumok esetében 10%, a HL^{HH} ligandum esetében pedig 15%.



12. ábra: A vizsgált ligandumok izomerjeinek javasolt általános szerkezete.

A vizsgált ligandumok fiziológiás pH-n HL^+ formában vannak jelen, a megjelenő pozitív töltés jó vízoldhatóságot eredményez. A ligandumok hidrofil/lipofil jellegének vizsgálatát az *n*-oktanol/víz közötti megoszlásos UV-látható spektrofotometriás méréssel végeztük. A megoszlási hányadosok ($\lg D_{7,4}$, **1. táblázat**) alapján megállapítható, hogy a metilén-trimetil-ammónium csoport beépítése növelte a vízben való oldhatóságot. Mindhárom FTSC származék $\lg D_{7,4}$ értéke jóval kisebb az FTSC-nél, tehát vízben való oldékonyságuk meglehetősen jobb. A három vegyület közül a HL^{HPh} ligandum a kevésbé hidrofil, esetében szemmel látható a különbség az eredeti vizes fázis, illetve a megoszlás utáni vizes fázis spektruma között, mely változás a **13. ábrá**n látható.



13. ábra: A HL^{HPh} ligandum UV-Vis spektrofotometriás méréssel kapott spektrumai az *n*-oktanol/víz fázis közötti megoszlás előtt és után. {I = 0,10 M KCl; pH = 7,4 (puffer: 10 mM HEPES); T = 25 °C; l = 0,2 cm}

6.2. Tioszemikarbazonok és réz(II)komplexeik biológiai hatása

A ligandumok további vizsgálatai előtt kíváncsiak voltunk, hogy ez az erős hidrofil jelleg nem csökkenti-e le a citotoxicitást, hiszen ahogyan fentebb említettem a rákellenes gyógyszermolekulák esetében a vegyületek lipofil jellege és citotoxikus hatása gyakran összefügg. Mivel az általunk vizsgált TSK-ok fiziológiás pH-n a pozitív töltésű HL^+ formában vannak jelen, hidrofil jellegük megfelelő, vízben jól oldódnak. Azonban ha egy ligandum nagyon hidrofil, előfordulhat, hogy nem képes bejutni a célsejtbe, ezáltal nem rendelkezik citotoxikus hatással. A Colo205 humán vastagbél karcinóma és A549 adenokarcinóma sejtvonalakon végzett citotoxicitás mérésekkel kapott IC_{50} értékek (IC_{50}: az a koncentráció, melynél a sejtek 50%-a elpusztul a megadott inkubációs idő alatt, **2. táblázat**) alapján a ligandumoknak nincs mérhető rákellenes hatása.

Mivel számos TSK rákellenes hatása megnő rézionokkal komplexképződés hatására [2,34], a citotoxicitás méréseket egy ekvivalens rézion jelenlétében is elvégezték, valamint rendelkezésünkre állt a HL^{HH} ligandum izolált réz(II)komplexe is.

Az eredmények (**2. táblázat**) azt mutatták, hogy a réz(II)komplexek citotoxikusak voltak a rákos sejteken. A **HL^{HH}** ligandum izolált és *in situ* előállított előállított komplexének aktivitása hibahatáron belül hasonló volt. A fenilcsoportot tartalmazó TSK ill. az *N*,*N*-dimetil szubsztituált származék réz(II)komplexei aktívabbak voltak a nem-szubsztituálthoz képest, azonban aktivitásuk kisebb a kontrolként használt doxorubicinnél. Mivel a réz(II)komplexek citotoxikusnak bizonyultak, így a munka folytatásaként megvizsgáltuk vizes oldatbeli stabilitásukat és redoxi tulajdonságaikat.

2. táblázat: A vizsgált TSK-ok (HL^{HH}, HL^{MeMe}, HL^{HPh}) és réz(II)komplexeik *in vitro* citotoxicitása (IC_{50}) Colo205 és A549 sejtvonalakon 72 óra inkubációs idő mellett.

IC_{50} / µM	**Colo205**	**A549**
HL^{HH}	>100	>100
HL^{MeMe}	>100	>100
HL^{HPh}	>100	>100
HL^{HH} - réz(II) 1:1	25,2 ± 3,4	27,3 ± 1,4
HL^{MeMe} - réz(II) 1:1	14,8 ± 1,1	7,15 ± 0,47
HL^{HPh} - réz(II) 1:1	12,75 ± 0,86	8,19 ± 0,49
HL^{HH} - réz(II) 1:1 [a]	17,22 ± 0,91	33,51 ± 0,35
doxorubicin	0,679 ± 0,061	3,195 ± 0,098
DMSO	>2%	>2%

[a] Szintetizált és izolált komplex.

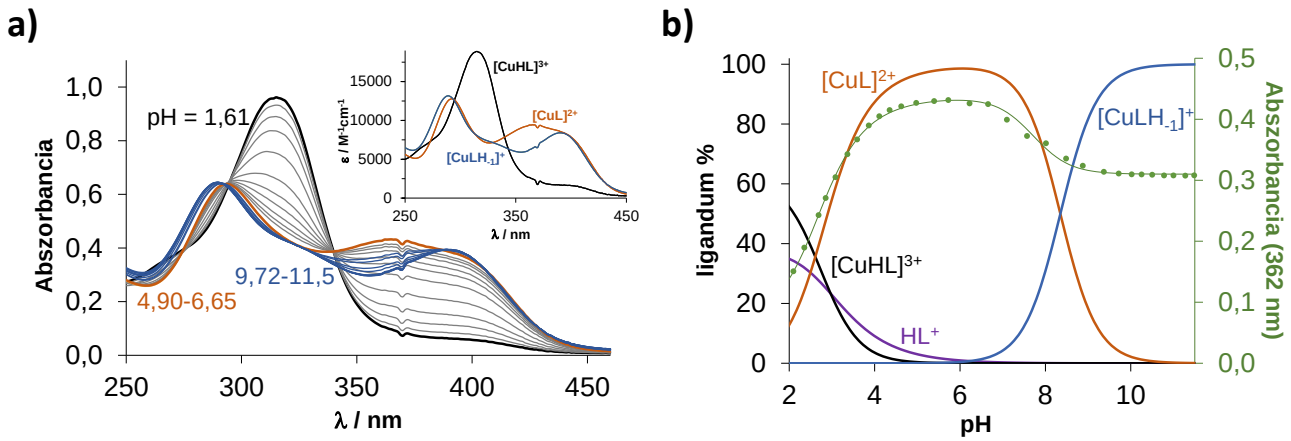
A rákellenes hatás mérése mellett a ligandumok és a réz(II)komplexeik különböző baktériumtörzseken (Gram-negatív: *E. coli* ATCC 25822, *Klebsiella pneumoniae*; Gram-pozitív: *S. aureus* ATCC 25928, *E. faecalis* ATTC) is tesztelve voltak. A minimális gátló koncentráció (amely még hatásosan gátolja az adott törzs növekedését) értékek azonban kisebbnek adódtak 100 μM-nál, azaz a vizsgált vegyületek nem mutattak mérhető antibakteriális hatást.

6.3. Tioszemikarbazonok réz(II)ionokkal képzett komplexeinek stabilitása

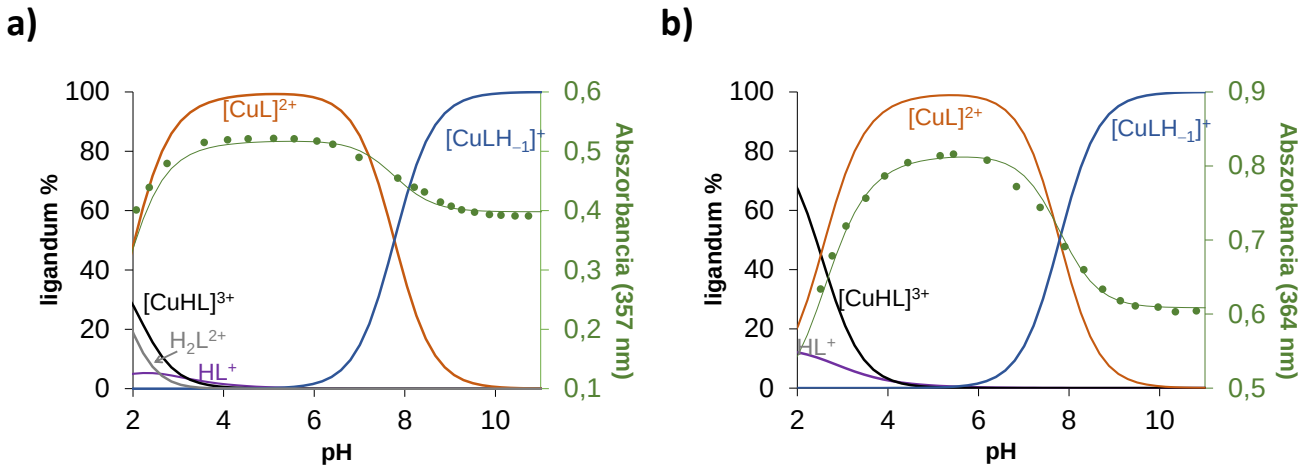
A TSK-ok legtöbbször nagy stabilitású, redox-aktív komplexeket képeznek a réz(II)ionokkal, mely komplexek gyakran rákellenes hatással bírnak [2,34,21]. A biológiai hatás a RNR enzim gátlásán alapszik, emellett szerepet játszhat a sejtben keletkező réz(II)ionok redukálódása során képződő ROS-ok jelenléte is [34,21]. Emiatt érdemes megvizsgálni a TSK-ok réz(II)ionokkal képzett komplexeinek stabilitását és redukálhatóságát.

Kutatócsoportunkban már történtek mérések TSK-ok réz(II)komplexeivel [2,34,38] 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben, mely során megállapították, hogy a legtöbb α-*N*-piridil-TSK háromfogú ligandumként koordinálódik a réz(II)ionokhoz, stabilis komplexet képezve. Emellett megfigyelték, hogy a vizsgált α-*N*-piridil-TSK-ok $[CuL]^+$ komplexet képeznek széles pH-tartományban, melyben (N,N,S^-) a jellemző koordinációs mód. A meghatározott stabilitási állandók alapján a vizsgált komplexek disszociációja elhanyagolható még igen híg (pl. 1-10 μM) oldatban is.

Az általunk vizsgált TSK-ok réz(II)komplexeinek oldatbeli stabilitását és szerkezetét UV-Vis spektrofotometriás titrálások segítségével jellemeztük tiszta vízben, illetve ahol szükséges volt 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben, ill. ESR spektroszkópiás mérések is történtek (TTK, Budapest, May Nóra V.). A komplexek stabilitási állandói (lgβ) és pK_a értékeik meghatározásához réz(II)iont és ligandumot különböző arányban tartalmazó mintákat titráltunk meg, és követtük az UV-Vis spektrumok változását pH = 1,6-11,5 közötti tartományban. Reprezentatív spektrumok láthatók a **14.a ábrá**n, melyet a HL^{HH} –Cu(II) (1:1) rendszerre kaptunk. A pH növelésével (pH = 1,61-4,90) a $[CuLH]^{2+}$ komplex képződése majd deprotonálódása várható az FTSC ligandum viselkedése alapján [34,35]. Ebben a pH-tartományban a 297-342 nm hullámhossz tartományban az abszorbancia értékek csökkenése, a 342-450 nm tartományban pedig növekedés figyelhető meg. Megfigyelhető, hogy pH = 4,90-6,65 tartományban nincs spektrális változás, ugyanis ebben a tartományban az uralkodó részecske nagy valószínűséggel a $[CuL]^{2+}$. A $[CuL]^{2+}$ komplexben a koordinált vízmolekula deprotonálódása során 331-390 nm tartományban abszorbancia csökkenés figyelhető meg, a keletkező $[CuLH_{-1}]^+$ (azaz $[CuL(OH)]^+$) spektruma csak ebben a tartományban különbözik számottevőbben.



14. ábra: a) A Cu(II) - HL^{HH} (1:1) rendszerre felvett UV-Vis spektrumok az 1,6-11,5 pH-tartományban. A beillesztett ábra a különböző formáinak számolt moláris abszorbancia spektrumait tartalmazza. **b)** Számított koncentráció eloszlási görbék a meghatározott egyensúlyi állandók alapján, valamint a számolt (folytonos zöld vonal) és mért abszorbancia értékek (●) illeszkedése 359 nm-en. {c_L = 49 µM; $c_{Cu(II)}$ = 49 µM; I = 0,10 M KCl; T = 25,0 °C, l = 1,0 cm}



15. ábra: Számított koncentráció eloszlási görbék **a)** a Cu(II) - HL^{MeMe} (1:1) rendszerre, valamint **b)** a Cu(II) - HL^{HPh} (1:1) rendszerre a meghatározott pK_a értékek alapján, valamint a számolt és mért abszorbancia értékek illeszkedése 357, valamint 364 nm-en. {c_L = 49 µM; $c_{Cu(II)}$ = 49 µM; I = 0,10 M KCl; T = 25,0 °C, l = 1,0 cm}

A komplexek stabilitási szorzatait a PSEQUAD programmal [32] számoltuk ki, ezeket az adatokat a **3. táblázat** tartalmazza. A kapott spektrumokra többféle modellt is tudtunk illeszteni elfogadható jósággal (pl. bisz-komplexek képződése), azonban az ESR spektroszkópia eredményei (lásd később) alapján egyértelműen csak mono-komplexek képződnek. Így azt a modellt fogadtuk el, melyben $[CuLH]^{3+}$, $[CuL]^{2+}$ és $[CuLH_{-1}]^{+}$ szerepel.

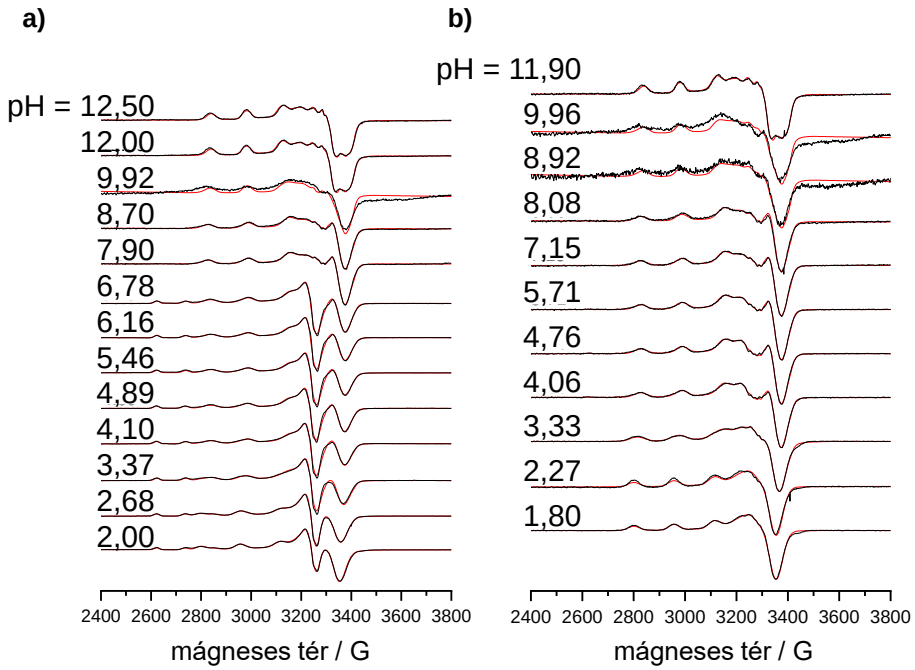
A **3. táblázat** pCu értékeket is tartalmaz, ez az érték a ligandumhoz nem kötött réz(II)ionok egyensúlyi koncentrációjának tízes alapú negatív logaritmusa. Értéke minél nagyobb, annál kevesebb a szabadon lévő réz(II)ion az adott körülmények között, így annál stabilisabb a réz(II)komplex. Ezen pCu értékek alapján megállapítható, hogy pH = 7,4-nél, 1 μM koncentráció mellett a komplexek kevesebb, mint 1%-a disszociál. A számolt pCu értékek sokkal kisebbek, mint az FTSC (12,0), PTSC (12,7) és triapin (11,4) estében, azonos körülmények között [34,35]. Az általam vizsgált ligandumok esetében a kis pCu értéket valószínűleg a pozitív töltésű, nagy térkitöltésű $N(CH_3)_3^+$ csoport okozza, ugyanis ez gátolhatja a ligandum koordinációját. Koncentráció eloszlási görbéket is számoltunk a kapott egyensúlyi állandók segítségével (**10.b, 11. ábra**), hogy szemléltessük az egyes komplexek képződési pH-tartományát. A számolások alapján pH = 7,4-n az uralkodó részecskék: LH^{HH}: 66% $[CuL]^{2+}$, 44% $[CuLH_{-1}]^+$; LH^{MeMe}: 70% $[CuL]^{2+}$, 30% $[CuLH_{-1}]^+$; LH^{HPh}: 71% $[CuL]^{2+}$, 29% $CuLH_{-1}^+$. Ez alapján a vizsgált ligandumok esetében jóval alacsonyabb százalékban van jelen pH = 7,4-en a $[CuL]^{2+}$ forma, mint a rokonvegyületek esetében, másrészt ezekben az esetekben ez egy kétszeresen pozitív töltésű komplexet jelent. Ugyanis a nagyobb $[CuL]^+$ pK_a-val rendelkező FTSC, PTSC és triapinnál fiziológiás pH-n 95%-ban a $[CuL]^+$ forma van jelen [34,35].

3. táblázat: A HL^{HH}, HL^{MeMe} és HL^{HPh} ligandumok réz(II)komplexeinek UV-Vis spektrofotometriásan meghatározott stabilitási szorzatai (lgβ), pK_a értékei, illetve pCu értékei pH = 7,4-en, $c_L = c_{Cu(II)} = 1$ μM mellett. {I = 0,10 M KCl; T = 25,0 °C}

	$\mathbf{L^{HH}}$	$\mathbf{L^{MeMe}}$	$\mathbf{L^{HPh}}$
lgβ [CuLH]$^{3+}$	15,42 ± 0.05	15,81 ± 0.05	16,15 ± 0.09
lgβ [CuL]$^{2+}$	13,00 ± 0.03	14,04 ± 0.03	13,63 ± 0.06
lgβ [CuLH$_{-1}$]$^+$	5,29 ± 0.03	6,27 ± 0.09	5,84 ± 0.06
pK_a [CuLH]$^{3+}$	2,42	1,77	2,53
pK_a [CuL]$^{2+}$	7,72	7,77	7,78
pCu	8,0	8,8	8,6

Az ESR spektroszkópiai mérések 77 K-en készültek 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben a Cu(II) - HL^{MeMe} rendszer esetében. A DMSO-t a csapadékképződés biztos elkerülése miatt alkalmaztuk, másrészt a rokon rendszerek (pl. FTSC, triapin) vizsgálata is ilyen körülmények között történt [35]. A módszer segítségével információk nyerhetők a koordinációs módról és a komplexek geometriájáról, a számolt ESR paraméterek (g-tenzor, A hiperfinom csatolási állandó) felhasználásával. Az ESR mérés eredményei alapján a vizsgált rendszerekben nem képződik bisz-komplex ligandum felesleg esetén sem. A **16. ábrá**n láthatóak a Cu(II) - HL^{MeMe} rendszerre különböző pH-kon felvett spektrumok. A spektrumok

felbontásával összesen háromféle részecskére ($[CuLH]^{3+}$, $[CuL]^{2+}$ és $[CuLH_{-1}]^{+}$) lehetett ESR paramétereket meghatározni (**4. táblázat**). Az ESR paraméterek is alátámasztják azt a javaslatunkat, hogy a $[CuLH]^{3+}$ komplexben a ligandum az (N,N,S), a $[CuL]^{2+}$ komplexben (N,N,S^{-}) donoratomokon keresztül koordinálódik, tehát az utóbbi esetben megtörténik a hidrazin-nitrogén deprotonálódása. A $[CuLH_{-1}]^{+}$ pedig egy vegyes-hidroxido komplex. Az ESR paraméterek (**4. táblázat**) alapján megállapítható az is, hogy az ekvatoriális sík torzul, ugyanis A_z paraméter mindegyik részecske esetén rendkívül alacsony, illetve g_x és g_y is különbözik $[CuL]^{2+}$ és $[CuLH_{-1}]^{+}$ esetében. Ennek oka valószínűleg a metilén-trimetil-ammóniumcsoport sztérikus hatása. Ezt a megállapítást megerősíti a röntgendiffrakciós analízissel meghatározott $[CuLCl_2]$ komplex szerkezete is (**17. ábra**), melyet együttműködő partnerünk (V.B. Arion) határozott meg.

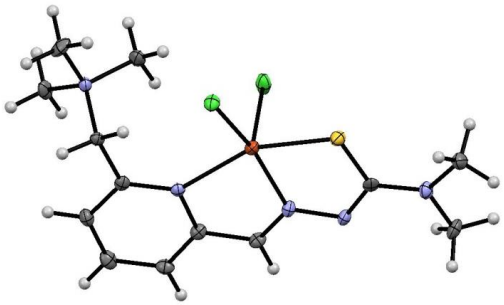


16. ábra: A **a)** Cu(II) - HL^{MeMe} (1,25:1), valamint **b)** Cu(II) - HL^{MeMe} (1:1,6) rendszerre felvett kísérleti (fekete) és szimulált (piros) fagyasztott ESR spektrumok 30% (v/v) DMSO/H_2O-ban, különböző pH-értékek mellett. Megjegyzés: a mért pH értéket nem korrigáltuk az Irving-tényezővel (0,3). {c_L = 0,4 mM; $c_{Cu(II)}$ = a) 0,5 mM, b) 0,25 mM; I = 0,10 M KCl; T = 77 K}

4. táblázat: A Cu(II) − HL^{MeMe} rendszerre 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben felvett fagyasztott spektrumok szimulációjából meghatározott anizotróp ESR paraméterek. {I = 0,10 M KCl; T = 77 K}

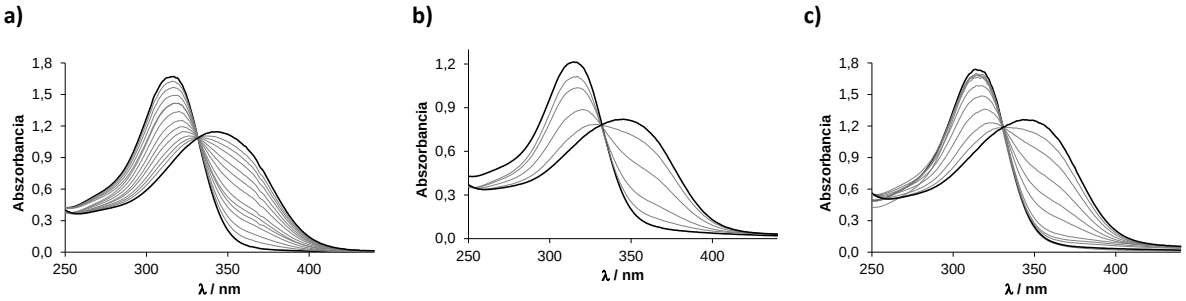
	Cu^{2+}	$[CuLH]^{3+}$	$[CuL]^{2+}$	$[CuLH_{-1}]^{+}$
$g_{x,y}$ [a]	2,079	2,048	2,036 (x)	2,027 (x)
			2,055 (y)	2,068 (y)
g_z [a]	2,408	2,218	2,195	2,206
$A_{x,y}$ / G [a]	9	22	46 (x)	43 (x)
			15 (y)	30 (y)
A_z / G [a]	113	154	158	137
a_x^N	–	–	18 / 13	16 / 6
a_y^N	–	–	8 / 15	6 / 17
a_z^N	–	–	14 / 13	12 / 6

[a] A kísérleti hiba ±0,002 volt g_x és g_y esetében és ± 0,001 g_z esetében, ± 2 G A_x és A_y esetében és ± 1 G Az esetében.



17. ábra: Röntgendiffrakciós analízissel meghatározott $[Cu(L)Cl_2]$ komplex szerkezete.

Ahogy a pCu értékek (**3. táblázat**) is mutatják az FTSC-hez és a triapinhoz képest kisebb stabilitású réz(II)komplexek képződtek, tehát lecsökkent a réz(II)ionhoz való affinitás, valószínűleg a pozitív töltésű, nagy térkitöltésű $N(CH_3)_3^+$ csoport miatt. A munka folytatásaként megvizsgáltuk, hogy a vasionokhoz való affinitás is lecsökken-e. A vas(III)ionnal való komplexképződést 184 µM, a vas(II)ionnal pedig 320 µM ligandum koncentráció mellett vizsgáltuk különböző fém-ligandum arányok mellett. A kapott UV-Vis spektrumok (**18. ábra**) alapján azonban a vizsgált rendszerekben nem volt jelen mérhető komplex, ugyanis a fémionok jelenlétében nem vagy csak minimális mértékben változott meg a ligandum spektruma.



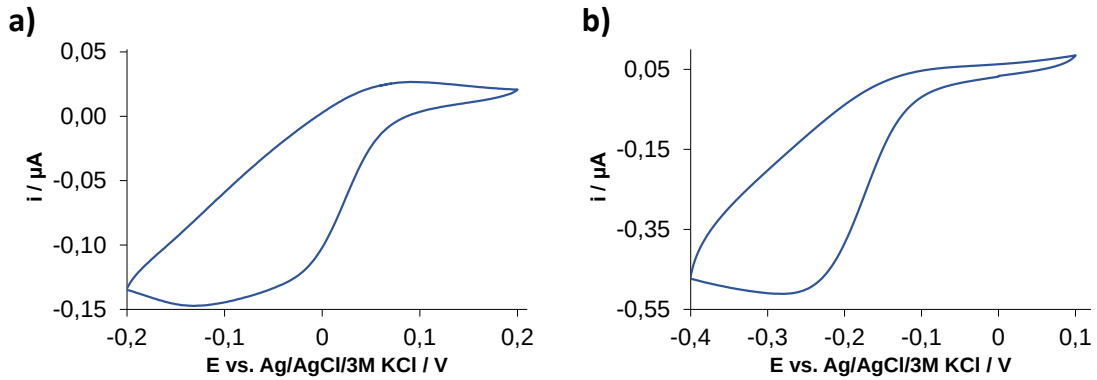
18. ábra: Az **a)** LH^{HH} ligandum, a **b)** LH^{HH}-Fe(III) (1:1), illetve a **c)** LH^{HH}-Fe(II) (1:1) rendszer 2,0-11,5 pH-tartományban felvett UV-Vis spektrumai vizes közegben. {I = 0,10 M KCl; T = 25,0 °C; a) c_L = 76 µM; l = 1,0 cm; b) c_L = 188 µM; $c_{Fe(III)}$ = 184 µM; l = 0,2 cm; c_L = 324 µM; $c_{Fe(III)}$ = 320 µM; l = 0,2 cm}

Ez egy nem várt eredmény, ugyanis az (N,N,S^-) koordinációjú TSK-ok mind a vas(III)ionnal, mind a vas(II)ionnal általában igen stabilis komplexet képeznek, ami rendkívül fontos a hatásmechanizmus miatt [35]. Ez alapján arra következtetünk, hogy a hidrofil jelleg mellett ez is okozhatja a ligandumok inaktivitását.

6.4. Tioszemikarbazonok és réz(II)komplexeik redoxi tulajdonságaik

6.4.1. Réz(II)komplexek redoxi tulajdonságaik

A redoxi tulajdonságok megállapítása céljából ciklikus voltammetria méréseket végeztünk a Cu(II) − HL^{HPh} (1:1) illetve az Cu(II) − FTSC (1:1) (mivel a Cu(II)-FTSC rendszerre nem találtunk ilyen körülmények között szakirodalmi adatot) rendszerekre. A komplexek *in situ* előállításához $Cu(NO_3)_2$-ot használtunk, az ionerősséget pedig KNO_3 segítségével állítottuk be. Az FTSC rossz vízoldhatósága indokolta, hogy a méréseket 30% (v/v) DMF/H_2O elegyben végezzük. A fiziológiás pH beállításához HCl és NaOH oldatot használtunk.



19. ábra: A **a)** Cu(II) − HL^{HPh}, (1:1) illetve a **b)** Cu(II) − FTSC (1:1) rendszerre felvett ciklikus voltammogramok, pH = 7,4-nél, 30% (v/v) DMF/H_2O elegyben. {I = 0,10 M KNO_3; T = 25,0 °C; a) $c_{ligandum}$ = 1,05 mM; $c_{Cu(II)}$ = 1,0; b) $c_{ligandum}$ = 1,85 mM; $c_{Cu(II)}$ = 1,85 mM}

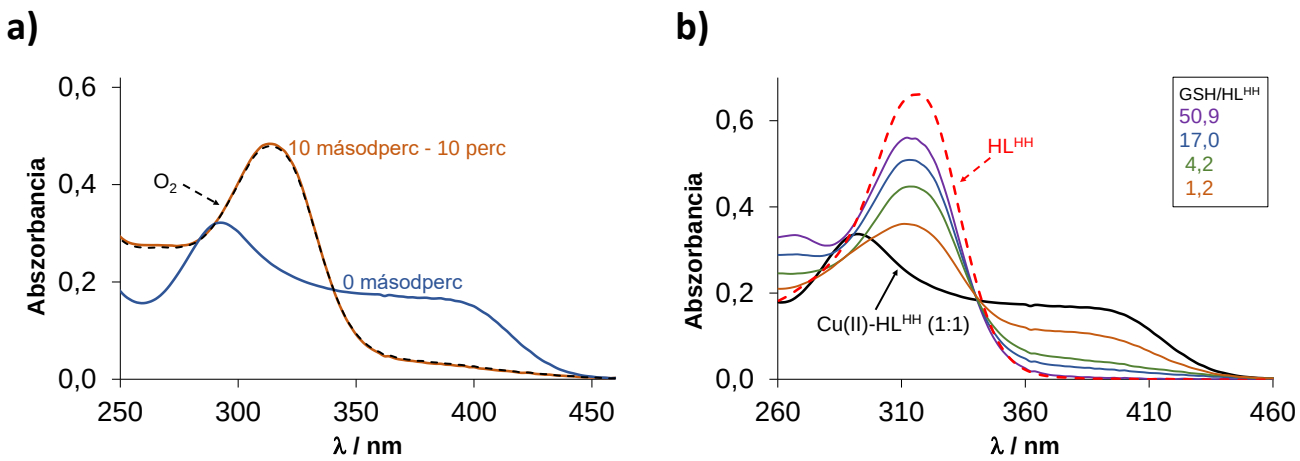
A CV mérések során kapott anódos és katódos csúcsokhoz tartozó potenciál értékeket az **5. táblázat** tartalmazza. Ahogy a csúcspotenciálok különbségéből, valamint a **15. ábrá**n is látható, ezek a csúcsok egymástól távol találhatóak, így a redoxi folyamatok egyértelműen irreverzibilisek. A mért csúcspotenciálok alapján félértékpotenciálokat számoltunk. Megállapítható, hogy a Cu(II)-HL^{HPh} komplex csúcsai az FTSC-hez képest a pozitívabb tartományban találhatóak, tehát erősebb oxidáló tulajdonsággal rendelkezik. Ez alapján elképzelhető, hogy a vizsgált TSK-ok réz(II)komplexei redukálhatóak természetes redukálószerekkel, mint pl. GSH vagy AA.

5. táblázat: A vizsgált rendszerek anódos és katódos csúcspotenciáljai, valamint a számolt félértékpotenciálok. {I = 0,10 M KNO_3; T = 25,0 °C}

	E_k (mV)	E_a (mV)	ΔE (mV)	$E'_{1/2}$ (mV)	$E'_{1/2}$ (mV) *vs.* NHE
Cu(II)-HL^{HPh} (1:1)	-145	+82	227	-32	+178
Cu(II)-FTSC (1:1)	-276	-90	186	-183	+27

Feltehetőleg a sejtekben a GSH redukálja a réz(II)-TSK komplexet réz(I)-TSK komplexé, majd ennek oxidációja során ROS-ok képződhetnek [38]. Ezek a részecskék képesek az RNR enzim R2 alegységében található Tyr gyököt kioltani, mely az enzim inaktiválódásához vezet [17]. Emiatt a réz(II)komplexek oxidáló hatását megvizsgáltuk GSH-val, valamint a gyengébb redukáló hatású aszkorbinsavval szemben is, fiziológiás pH-n. A reakciókat UV-Vis spektrofotometria segítségével követtük tandem küvettát használva, anaerob körülmények biztosítása mellett.

Mindhárom vizsgált ligandum komplexe esetében ugyanazt a változást tapasztaltuk. A GSH-nal való redoxi reakciónál először 50-szeres GSH felesleget alkalmaztunk, azonban a reakció pillanatok alatt végbe ment, a spektrumok (**20.a ábra**) 10 perc után sem mutattak további változást. A reakció lejátszódása után kapott spektrum a szabad ligandum spektrumára hasonlít, ahogyan az analóg rendszereknél is az tapasztalható volt korábban [3,9]. A reakció során képződő réz(II)komplex disszociálódik, a réz(I)ion pedig a GSH-nal képez komplexet, tehát a ligandum kiszorítódik a komplexből. Ezek után csökkentettük a GSH mennyiségét, a komplex redukciója azonban még 1,2-szeres GSH felesleg mellett is azonnal megtörtént. A redukálódás mértéke az alkalmazott GSH-felesleg függvényében változott, mely változás a **20.b ábrá**n látható. A reakciók lejátszódása után oxigéngázt buborékoltattunk a mintába, hatására azonban nem történt spektrális változás. Ez alapján a redoxi reakció irreverzibilis, ahogy a CV mérések során is tapasztaltuk. Ez összefüggésben állhat a nem túl jelentős biológiai hatással, hiszen így nem megfelelőek a körülmények a ROS képződésére. Az AA-val való redoxi reakciók nagy egyezést mutatnak a GSH-nál tapasztaltakkal.

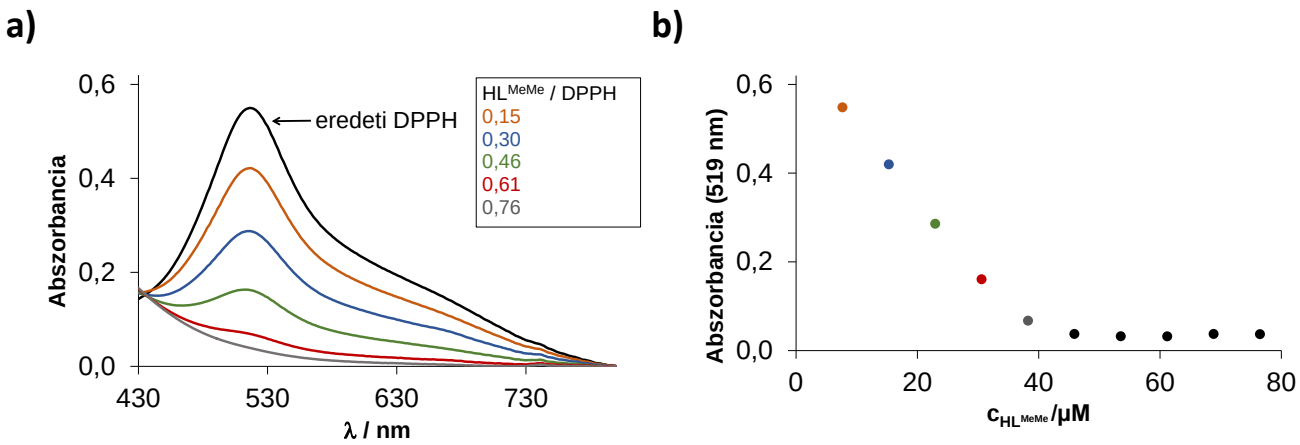


20. ábra: a) A Cu(II)-HL^{HH} (1:1) rendszerre felvett UV-Vis spektrumok időfüggő változásai négyszeres GSH-felesleg jelenlétében, 7,4-es pH mellett. **b)** Különböző GSH-felesleg mellett kapott spektrumok a reakciók lejátszódása után. {a) $c_L = c_{Cu(II)} = 25$ µM; $c_{GSH} =$ 1,04 mM; b) $c_L = c_{Cu(II)} = 25$ µM; $c_{GSH} = 62$ µM - 1,43 mM; $I =$ 0,10 M KCl; $T = 25{,}0$ °C}

6.4.2. Ligandumok szabadgyökfogó hatása

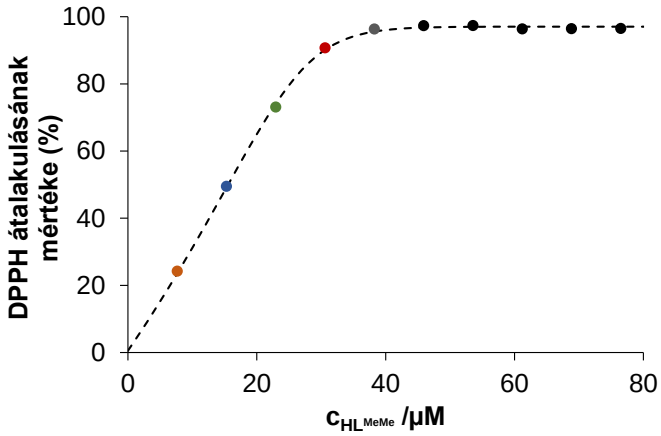
A rákellenes vegyületek esetében azok szabad gyökfogó hatását is érdemes megvizsgálni, erre a DPPH egy alkalmas vegyület. A DPPH egy stabilis gyök, redukcióját jelentős spektrális változás követi, ennek a változásnak a reakciósebessége függ a vizsgált vegyület minőségétől, illetve koncentrációjától. A reakciót különböző ligandum-DPPH arányoknál, UV-Vis spektrofotométerrel követtük a redoxi egyensúly eléréséig. A három vizsgált ligandum mellett, az FTSC és a triapin gyökfogó hatását is vizsgáltuk az összehasonlíthatóság miatt.

A reakciók kinetikája eltérő, míg a HL^{MeMe} ligandum esetében 12 perc alatt, a HL^{HH} ligandum esetében egy óra alatt állt be a redoxi egyensúly, addig a többi ligandum esetében 20 óra után sem, így az addig lejátszódó változást vettük figyelembe. Reprezentatív spektrumok láthatók a **21.a ábrá**n, mely szemlélteti, hogy a HL^{MeMe} ligandum esetében különböző ligandum/DPPH arányok mellett milyen a DPPH redukálódásának mértéke.



21. ábra: a) A HL^{MeMe} ligandum esetében a ligandum/DPPH aránytól függő végső állapotok UV-Vis spektrofotométerrel felvett spektrumai. **b)** A λ_{max}-hoz (519 nm) tartozó abszorbancia értékek a koncentráció függvényében. {c_{DPPH} = 50 μM; c_L = 7-77 μM; oldószer: etanol; l = 1 cm; T = 25,0 °C}

Kigyűjtöttük a különböző arányok esetében a DPPH abszorpciós csúcsához tartozó λ-on (519 nm) mért abszorbancia értékeket (**21.b ábra**) és ez alapján kiszámoltuk a DPPH átalakulásának százalékos értékét. Egy exponenciális függvényt (**22. ábra**) kaptunk, amire a Solver Excel program segítségével polinomot illesztettünk, majd ez alapján meghatároztuk a szabad gyökfogó aktivitást jellemző IC_{50} értékeket (**6. táblázat**). Az IC_{50} ebben az esetben az a koncentráció, amelynél a vegyület a szabad DPPH gyökök számát 50%-ára csökkenti. Akkor ha a legnagyobb alkalmazott koncentrációnál sem értük el az átalakulás 50%-át, extrapolálással határoztuk meg az IC_{50} értéket. A kapott IC_{50} értékeket a trolox értékével összehasonlítva TEAC értékeket (**6. táblázat**) számoltunk.



22. ábra: A DPPH átalakulásának mértéke százalékban kifejezve a ligandum koncentrációjának függvényében, állandó DPPH koncentráció mellett, a HL^{MeMe} ligandum esetében, illetve a Solver Excel program által illesztett polinom (szaggatott vonal). {c_{DPPH} = 50 μM; c_L = 7-77 μM; oldószer: etanol; l = 1 cm; T = 25,0 °C}

6. táblázat: A vizsgált rendszerek, valamint a trolox IC_{50} értékei, illetve az abból számolt TEAC értékek. {c_{DPPH} = 50 μM; c_L = 7-77 μM; oldószer: etanol; T = 25,0 °C}

	IC_{50} / μM	**TEAC**
HL^{HH}	21,82	0,60
HL^{MeMe}	15,55	0,84
HL^{MeMe} - Cu(II) (1:1)	> 100	< 0,13
HL^{HPh}	59,26	0,22
FTSC	> 100	< 0,13
triapin	> 100	< 0,13
trolox	13,04 [a]	-

[a] A trolox IC_{50} értéke irodalmi érték, azonos körülmények között mérve [39].

A TEAC értékek alapján megállapítható, hogy a vizsgált ligandumok (HL^{HH} HL^{MeMe}, HL^{HPh}) antioxidáns hatása nagyobb, mint az FTSC vagy triapiné. Az antioxidáns hatására csökken a ROS-ok koncentrációja, mely megváltoztatja az állandó ROS értéket, ami sejthalálhoz vezethet. A legnagyobb antioxidáns hatással a HL^{MeMe} ligandum rendelkezik, melynek reakciósebessége is a legnagyobb a többihez viszonyítva. Emiatt ennek a ligandumnak a réz(II)komplexét is megvizsgáltuk, azonban a TEAC érték jelentősen lecsökkent, valószínűleg a réz(II)ion oxidáló hatása miatt.

7. Összefoglalás

Diákköri munkám során három (N,N,S) donoratomokat és trimetil-ammónium csoportot tartalmazó tioszemikarbazon oldatkémiai tulajdonágait, réz(II) és vas(II/III)ionokkal való kölcsönhatását tanulmányoztam. Az UV-Vis spektrofotometriás titrálások segítségével proton disszociációs állandókat számítottunk, ez alapján megállapítható egyrészt, hogy a vizsgált FTSC származékok pK_a értéke(i) kisebbek az FTSC pK_a értékeihez képest. Másrészt megfigyelhető, hogy a dimetilezés növeli az első, illetve csökkenti a második deprotonálódási folyamathoz tartozó pK_a értéket. A számolt koncentrációeloszlási görbék segítettek megállapítani, hogy fiziológiás pH-n az uralkodó részecske a HL^+. Ez a pozitív töltésű részecske biztosítja a jó vízoldékonyságot, amit megerősítettek az *n*-oktanol/víz közötti megoszlásos mérés során tapasztaltak is. A ^{1}H NMR spektroszkópia mérések során kapott spektrumok alapján izomerek jelenléte figyelhető meg mindhárom vizsgált ligandum esetében, a Z izomer aránya 10-15%. A Colo205 humán vastagbél karcinóma és A549 adenokarcióma sejtvonalakon végzett citotoxicitás mérések során kapott IC_{50} értékek alapján a ligandumoknak nincs mérhető rákellenes hatása, valószínűleg az erős hidrofil jelleg miatt. Réz(II)komplexeik azonban citotoxikusak voltak a rákos sejtekkel szemben.

Mivel a réz(II)komplexek aktívak a rákos sejtekkel szemben, megvizsgáltuk oldatbeli stabilitásukat és redoxi tulajdonságaikat. Az UV-Vis spektrofotometriás és az együttműködésben elvégzett ESR spektroszkópiás mérések együttes felhasználásával jellemeztük a komplexek oldatbeli stabilitását és szerkezetét. Az ESR spektroszkópia eredményei alapján csak mono-komplexek képződnek, így az elfogadott speciációs modell $[CuLH]^{3+}$, $[CuL]^{2+}$ és $[CuLH_{-1}]^+$ részecskéket tartalmaz. A számolt pCu értékek alapján a komplexek disszociációja fiziológiás pH-n kisebb, mint 1%. Ezen pCu értékek sokkal kisebbek, mint a rokonvegyületek esetében, ez alapján a képződő réz(II)komplex kisebb stabilitású. Ennek oka, hogy valószínűleg a trimetil-ammónium csoport jelenléte lecsökkenti a réz(II)ionkötő-képességet. Kíváncsiak voltunk, hogy a vasionokhoz való affinitás is lecsökken-e, ennek vizsgálatakor azonban nem várt eredményeket tapasztaltunk. A vasionok jelenlétében felvett spektrumok nem, vagy csak minimálisan különböztek a ligandum spektrumától, tehát a vizsgált rendszerekben nem volt jelen mérhető mennyiségű komplex. A TSK-ok rákellenes hatásmechanizmusa azonban a vasionokkal való komplexképződésen alapul, így arra következtetünk, hogy ez is okozhatja a ligandumok inaktivitását a vizsgált rákos sejtvonalon.

Mivel a TSK-ok rézkomplexeinek valószínűsített hatásmechanizmusa gyakran az intracelluláris réz(II)ion redukciójának hatására végbemenő ROS termelődésen alapul, így fontos a komplexek redoxi tulajdonságainak megismerése. A CV mérések során kapott voltammogramok elemzésével nyert félértékpotenciálok alapján a redoxireakciók irreverzibilesek, illetve a vizsgált származékok erősebb oxidáló hatásúak, mint a referenciavegyület (FTSC) komplexei. Ez alapján a réz(II)komplexek redukcióját vártuk GSH-nal. A GSH-nal és a gyengébb redukáló hatású aszkorbáttal is a reakciók valóban lejátszódtak, a redoxi reakció pillanatszerű volt. A reakció lejátszódása után oxigéngázt buborékoltattunk a mintába, spektrális változást azonban nem tapasztaltunk. Ez megerősíti a CV mérések során tapasztalt irreverzibilitást. A ligandumok szabad gyökfogó hatását vizsgálva, azt tapasztaltuk, hogy a reakciók sebessége eltérő, míg az *N*,*N*-dimetil szubsztituált származék esetében 12 perc alatt állt be az egyensúly, addig a fenilcsoportot tartalmazó származék esetében 20 óra sem volt elég ehhez. A TEAC értékek alapján a vizsgált ligandumok antioxidáns hatása jóval nagyobb, mint a vizsgált rokonvegyületeké (FTSC, triapin). A vizsgált réz(II)komplex esetében a TEAC érték jelentős csökkenését tapasztaltuk, melynek oka valószínűleg a réz(II)ion oxidáló hatása.

Összességében elmondható, hogy javult a vizsgált FTSC származékok vízoldhatósága a trimetil-ammónium-csoport jelenlétének hatására. Ugyanakkor a csoport jelenléte lecsökkentette a vegyületek fémionkötő-képességet, így kisebb stabilitású réz(II)komplexek képződtek, a vasionokkal pedig nem képződött stabilis komplex. Ezek az oldatkémiai tulajdonságok segítik megérteni, hogy a ligandumoknak miért nincs mérhető rákellenes hatása.

A jövőben tervezünk további FTSC származékokat vizsgálni, melyeknél a trimetil-ammónium-csoport más pozícióban helyezkedik el a piridin-gyűrűn. Ezáltal kiderülhet, hogy valóban a szomszédos pozíció okozza-e a ligandumok jóval gyengébb fémionkötő-képességét.

8. Irodalomjegyzék

[1] A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Antioxid. Redox Sig., 2013, 18, 973–1006.

[2] M.N.M. Milunović, O. Palamarciuc, 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, 2020, 10, 1213

[3] Eurostat - World Cancer Day: 1 in 4 deaths caused by (2022.11.07.) https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/edn-20200204-1

[4] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, Dalton Trans., 2018, 47, 6645–6653.

[5] Y. Jung, S.J. Lippard, Chem. Rev., 2007, 107, 1387–1407.

[6] T.C. Johnstone, K. Suntharalingham, S. J. Lippard, Chem. Rev., 2016, 116, 3436-3486.

[7] L. Kelland, Nat. Rev. Cancer, 2007, 8, 573–584.

[8] M. Galanski, Recent Pat. Anticancer Drug Discov., 2006, 1, 285–295.

[9] C. Monneret, Ann. Pharm. Fr., 2011, 69, 286–295.

[10] M.A. Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Dalton Trans., 2008, 183–194.

[11] J.R. Dilworth, R. Hueting, Inorg. Chim. Acta, 2012, 389, 3–15.

[12] T.S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, Coord. Chem. Rev., 2009, 253, 977–1055.

[13] H. Beraldo, D. Gambino, Mini-Rev. Med. Chem., 2004, 4, 31–39.

[14] R.W. Brockman, J.R. Thomson, M.J. Bell, H.E. Skipper, Cancer Res., 1956, 16, 167–170.

[15] 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., 2015, 100, 255–260.

[16] M. Uppsten, M. Färnegårdh, V. Domkin, U. Uhlin, J. Mol. Biol., 2006, 359, 365–377.

[17] J. Shao, B. Zhou, A.J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, Mol. Cancer Ther., 2006, 5, 586–592.

[18] W. Han, L. Noodleman, Dalton Trans., 2009, 6045–6057.

[19] 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., 2016, 59, 6739–6752.

[20] P.J. Jansson, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, J. Med. Chem., 2010, 53, 5759–5769.

[21] D.B. Lovejoy, P.J. Jansson, U.T. Brunk, J. Wong, P. Ponka, D.R. Richardson, Cancer Res., 2011, 71, 5871–5880.

[22] A. Sîrbu, O. Palamarciuc, M.V. Babak, J.M. Lim, K. Ohui, E.A. Enyedy, S. Shova, D. Darvasiová, P. Rapta, W.H. Ang, V.B. Arion, Dalton T., 2017, 46, 3833–3847.

[23] B.M. Zeglis, V. Divilov, J.S. Lewis, J. Med. Chem., 2011, 54, 2391–2398.

[24] C.R. Kowol, P. Heffeter, W. Miklos, L. Gille, R. Trondl, L. Cappellacci, W. Berger, B.K. Keppler, J. Biol. Inorg. Chem., 2012, 17, 409–423.

[25] C.R. Kowol, R. Berger, R. Eichinger, A. Roller, M.A. Jakupec, P.P. Schmidt, V.B. Arion, B. K. Keppler, J. Med. Chem., 2007, 50, 1254–1265.

[26] 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.

[27] S. Adsule, V. Barve, D. Chen, F. Ahmed, Q.P. Dou, S. Padhye, F.H. Sarkar, J. Med. Chem., 2006, 49, 7242–7246.

[28] M.N.M. Milunovic, É.A. Enyedy, N.V. Nagy, T. Kiss, R. Trondl, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, R. Krachler, G. Novitchi, V.B. Arion, Inorg. Chem., 2012, 51, 9309–9321.

[29] F. Bacher, É.A. Enyedy, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, G.M. Bognár, R. Trondl, M.S. Novak, E. Klapproth, T. Kiss, V.B. Arion, Inorg. Chem., 2013, 52, 8895–8908.

[30] H.M. Irving, M.G. Miles, L.D. Petit, Anal. Chim. Acta, 1967, 38, 475–482.

[31] G. Gran, Acta Chem. Scand., 1950, 4, 559–577.

[32] L. Zékány, I. Nagypál, Computational Methods for the Determination of Stability Constants, Plenum Press, New York, 1985, 291–353.

[33] S. Zhang, K.S. Lovejoy, J.E. Shima, L.L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J.W. Gray, X. Chen, S.J. Lippard, K.M. Giacomini, Cancer Res., 2006, 66, 8847–8857.

[34] 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., 2020, 33, 395–414.

[35] É.A. Enyedy, M.F. Primik, C.R. Kowol, V.B. Arion, T. Kiss, B.K. Keppler, Dalton Trans., 2011, 40, 5895–5905.

[36] I. Puigdomenech, Medusa, https://www.kth.se/che/medusa (2022.11.06.)

[37] O. Dömötör, N.V. May, K. Pelivan, T. Kiss, B.K. Keppler, C.R. Kowol, É.A. Enyedy, Inorg. Chim. Acta, 2018, 472, 264–275.

[38] V. Pósa, B. Hajdu, G. Tóth, O. Dömötör, C.R. Kowol, B.K. Keppler, G. Spengler, B. Gyurcsik, É.A. Enyedy, J. Inorg. Biochem., 2022, 231, 111786.

[39] T.V. Petrasheuskaya, F. Kovács, G. Spengler, N.V. May, É. Frank, É.A. Enyedy, J. Mol. Struc., 2022, 1261, 132858.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Enyedy Éva Anná**nak (tanszékvezető, egyetemi docens) a lehetőségért, hogy a SZTE TTIK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén, az MTA-SZTE Lendület Funkcionális Fémkomplexek Kutatócsoportban végezhettem el a Tudományos Diákköri munkámhoz szükséges méréseket. Hálával tartozom a lelkiismeretes témavezetésért, a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségért, és hogy általa közelebb kerülhettem dolgozatom témájának megértéséhez.

Köszönöm külföldi együttműködő partnereinknek, **Prof. Bernhard K. Kepplern**ek **és Dr. Vladimir B. Arion**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.

Köszönettel tartozom **Marótiné Szokolai Hajnalká**nak és **Szűcsné Tóth Katalin**nak az útbaigazításért és a gyakorlati munkám során nyújtott segítőkész tanácsaikért.

Továbbá köszönöm a kutatócsoport összes tagjának, hogy bármikor bizalommal fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel, kiemelve **Kovács Hildát** és **Pósa Vivien**t.