SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

Kémia Doktori Iskola

Többfogú komplexképző vegyületek rákellenes és oldatkémiai tulajdonságaik közötti összefüggések vizsgálata

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Kormányosné Pósa Vivien

Témavezető:

Dr. Enyedy Éva Anna

tanszékvezető egyetemi tanár

Szeged

2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések....4
1. Bevezetés....6
2. Irodalmi áttekintés....8
2.1. A vizsgált fémionok jellemzése és biológiai szerepe....8
2.1.1. A vas biológiai szerepe....9
2.1.2. A réz biológiai szerepe....11
2.1.3. A cink biológiai szerepe....13
2.2. A tioszemikarbazonok....14
2.2.1. Farmakológiai aktivitásuk és hatásmechanizmusuk....14
2.2.2. A tioszemikarbazonok koordinációs kémiai sajátságai és komplexképzésük....17
2.3. A 8-hidroxi-kinolinok....18
2.3.1. Szerkezetük, koordinációs kémiai tulajdonságaik és alkalmazásuk....18
2.3.2. A 8-hidroxi-kinolinok biológiai aktivitása és MDR-szelektivitása....20
2.4. A vaskelátorok és a VLX600....23
2.4.1. Legfontosabb vaskelátorok....23
2.4.2. VLX600 koordinációs kémiai tulajdonságai és biológiai aktivitása....25
3. Célkitűzés....28
4. Kísérleti rész....30
4.1. Felhasznált vegyszerek....30
4.2. VLX600 és származékainak előállítása....31
4.3. UV-látható spektrofotometria....32
4.3.1. Egyensúlyi állandók meghatározása....33
4.3.2. Rézkomplexek reakciója redukálószerekkel....35
4.3.3. Lipofilitás, oldhatóság és permeábilitás jellemzése....35
4.4. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia....36
4.5. Spektrofluorimetria....37
4.6. Elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia....38
4.7. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia....39
4.8. Ciklikus voltammetria....40
4.9. Spektroelektrokémiai mérések....41
4.10. Ultraszűrés....41
4.11. *In vitro* citotoxicitási vizsgálatok....42
4.12. Apoptózis indukció vizsgálata....43
4.13. Reaktív oxigénrészecskék termelődésének mérése....44

4.14. További kiegészítő mérések 44
5. Eredmények 48
5.1. (Tio)szemikarbazonok vizsgálata 48
5.1.1. (Tio)szemikarbazon rézkomplex koordinációs módjának hatása az oldatkémiai tulajdonságokra 48
5.1.2. Metil-szubsztituens hatása tioszemikarbazonok oldatkémiai tulajdonságaira 61
5.1.3. N-terminális diszubszitúció hatása COTI-2 típusú tioszemikarbazonok oldatkémiai sajátságaira 67
5.2. 8-hidroxi-kinolinok vizsgálata 79
5.2.1. 8-hidroxi-kinolinok oldatkémiai tulajdonságainak változása a 2-es pozícióban való szubsztitúció hatására 79
5.2.2. 8-hidroxi-kinolinok oldatkémiai tulajdonságainak változása morfolin- és piperidin szubsztituensek hatására 83
5.2.3. Egy vízoldható 8-hidroxi-kinolin-aminosav hibrid kölcsönhatásának vizsgálata létfontosságú fémionokkal 89
5.3. A VLX600 és származékainak vizsgálata 97
5.3.1. A hidrazon-típusú, VLX600 szubsztitúciójának hatása az oldatkémiai tulajdonságokra 97
5.3.2. A hidrazon-típusú, VLX600 szubsztitúciójának hatása a farmakológiai hatásra 109
6. Összefoglalás 113
7. Summary 117
8. Irodalomjegyzék 121
9. Közlemények listája 129
10. Köszönetnyilvánítás 134
Függelék 135

Rövidítések

3AP	triapin, 3-amino-piridin-2-karbaldehid-tioszemikarbazon
8HQ	8-hidroxi-kinolin
AA	aszkorbinsav
ATP	adenozin-trifoszfát
CD	cirkuláris dikroizmus
COTI-2	4-(2-piridinil)-2-(6,7-dihidro-8(5H)-kinolinilidén)hidrazid-1-piperazin-karbonsav
ct-DNS	borjú csecsemőmirigy DNS
$D_{7,4}$	megoszlási hányados pH 7,4-en
DCFH-DA	2′,7′-diklór-fluoreszcein-diacetát
DMF	dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
Dp44mT	di-2-piridilketon-4,4-dimetil-3-tioszemikarbazon
DpC	di-2-piridilketon-4-ciklohexil-4-metil-3-tioszemikarbazon
DSS	4,4-dimetil-4-szilapentán-l-szulfonsav
EB	etídium-bromid
EDTA	dinátrium-etilén-diamin-tetraacetát
ESR	elektronspin-rezonancia
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FTSC	2-formil-piridin-tioszemikarbazon
GSH	glutation
HBSS	’Hanks’ balanced salt solution, Hanks-féle sóoldat
HEPES	4-hidroxi-etil-1-piperazinetánszulfonsav
$HQNO_2$-L-Pro	5-nitro-7-(1-metil-L-prolin)-8-hidroxi-kinolin
K_a	proton disszociációs állandó
MDR	multidrog rezisztencia, multidrog rezisztens
MEM	minimális esszenciális tápközeg
MES	2-(N-morfolino) etánszulfonsav
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid
NHE	normál hidrogénelektród
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
OD	optikai denzitás (sűrűség)
PAMPA	’parallel artificial membrane permeability assay’, párhuzamos mesterséges membrán áteresztőképességi teszt
PARP	poli-ADP-ribóz-polimeráz
PBS	’phosphate buffered saline’, foszfát pufferes sóoldat
P_{eff}	effektív permeábilitás
Pgp	P-glikoprotein
PI	propídium-jodid
PS	foszfatidil-szerin

PTSC	piridin-2-karboxaldehid-N^4,N^4-dimetil-tioszemikarbazon
ROS	reaktív oxigénrészecskék
RR	ribonukleotid-reduktáz
S	termodinamikai oldhatóság
SK	szemikarbazon
SOD1	Cu, Zn szuperoxid dizmutáz
SSC	szalicil-aldehid-szemikarbazon
STSC	szalicil-aldehid-tioszemikarbazon
TBAN	tetrabutil-ammónium-nitrát
TSK	tioszemikarbazon
VLX600	2-[1-(2-[6-metil-5H-[1,2,4]-triazino-[5,6-b]-indol-3-il]-hidrazin-1-ilidén)-etil]-piridin
β	képződési állandó (stabilitási szorzat)
ε'	formál potenciál

1. Bevezetés

A rák a társadalmat igen nagymértékben érintő megbetegedés. Statisztikai adatok szerint 2020-ban közel 20 millió új megbetegedést diagnosztizáltak világszerte [1], ez a szám pedig a becslések alapján 2040-re a 30 millióhoz közelít majd, a demográfiai adatokat figyelembe véve [2]. A rák a szervezet bármely pontján megjelenhet, a leggyakoribb azonban mégis a tüdőben, mellben, petefészekben, vastagbélben, prosztatában, gyomorban, méhnyakon és a májban kialakuló daganat. Sajnos nem csak a felnőtteket érinti ez a súlyos kór, hiszen évente közel 400 ezer gyermeknél is diagnosztizálnak valamilyen ráktípust [3]. A tudomány igyekszik lépést tartani a rákos megbetegedések kezelésében, így egyre több gyógyszer jelenik meg a klinikai használatban, 2020-ban pl. 11 új hatóanyagot engedélyeztettek [4]. A kezelések során még mindig kiemelt szerepet kapnak a platina-tartalmú készítmények (pl. ciszplatin), melyeket minden második kezelés során alkalmaznak, főleg kombinált terápiákban [5]. A rákellenes gyógyszerek alkalmazásakor azonban komoly mellékhatások mellett rezisztencia is fellép(het), ez ösztönzi a további hatóanyagfejlesztést, melynek célja a szelektivitás növelése és a mellékhatások csökkentése. A rákellenes szerek nagyon sokféle úton fejthetik ki biológiai hatásukat, például léteznek különböző alkilezőszerek, antimetabolitok, citotoxikus antibiotikumok, illetve olyan vegyületek is, amelyek enzimek gátlásával érik el a kívánt hatást. Fémionok gyógyászatban betöltött kiemelkedő szerepével azonban nem csupán a fémtartalmú kemoterápiás szerek kapcsán találkozhatunk. Cink-tartalmú metalloproteinek is lehetnek célpontok, olyan inhibitor szubsztrát analógok esetén, amelyek kompetitív módon kötődnek az aktív helyen lévő fémionhoz, ezzel gátolva az enzim működését [6]. Léteznek továbbá olyan lipofil arany-foszfin kationok is, melyek felhalmozódnak a mitokondriumokban, a rákos sejtek magasabb membránpotenciálja miatt, így képesek szelektíven elpusztítani azokat [7].

Doktori munkám során három különböző vegyületcsaláddal foglalkoztam, melyekben az a közös, hogy rákellenes hatásuk a szervezetben található fémionokkal való kölcsönhatásukkal függ össze. Az első csoportba tartoznak a (tio)szemikarbazonok (TSK-ok), melyek legismertebb képviselője a triapin (3AP), ami jelenleg klinikai vizsgálatokban vesz részt előrehaladott méhnyakrák kezelésében [8]. A (tio)szemikarbazonokról ismeretes, hogy endogén fémionokkal (réz-, vas-, és cinkionokkal) képesek komplexet képezni, és vannak olyan klinikai vizsgálatba került TSK-ok (pl. DpC, COTI-2 kódnevűek) melyek biológiai aktivitása összefüggésbe hozható a rézionokkal való komplexképződéssel

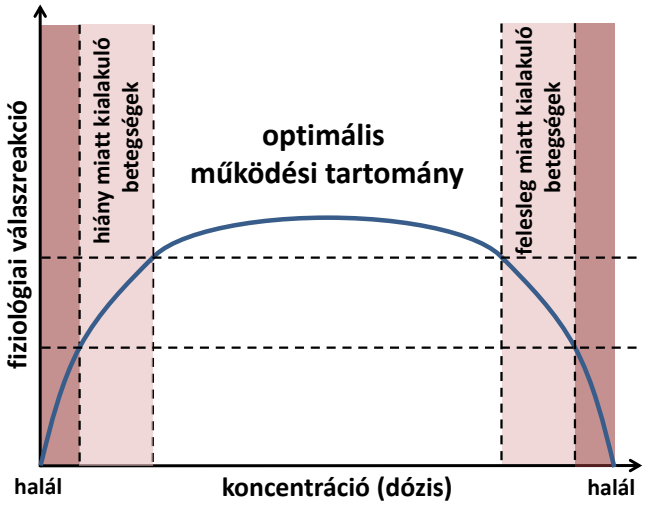
[9]. A másik nagy vegyületcsalád a 8-hidroxi-kinolinok csoportja, melyek szintén kiváló kelátképzők, valamint biológiai aktivitásuk is jelentős, ami a komplexképződésükhöz köthető [10–12]. Például 5,7-dihalo-szubsztitutált-8-hidroxi-kinolinok endogén fémionokkal (pl. réz-, és cinkionokkal) képzett komplexei jelentős citotoxicitást mutattak többféle rákos sejtvonal esetén [11]. Míg az első két csoport esetén inkább a réz(II)ionokkal képzett komplexeknek van erősebb citotoxikus hatása, addig a harmadik vegyületcsalád esetén a vasionokkal való komplexképződés játszik fontos szerepet, ugyanis a háromfogú indol-triazin-alapú VLX600 kódnevű vegyületet (és származékait) vaskelátorként tartják számon [13,14]. A VLX600, hasonlóan a korábban említett vegyületekhez, szintén klinikai vizsgálatokba került rákellenes hatóanyag [15].

Doktori dolgozatomban a kémiai szerkezeti változtatások hatását vizsgáltam a biológiai aktivitásra és az oldategyensúlyi tulajdonságokra, olyan vegyületeknél, ahol a fémionokkal való komplexképződés jelentős szerepet játszik a hatásmechanizmusban. A komplexképződés hatására az oldatkémiai tulajdonságok jelentősen megváltoz(hat)nak, továbbá fontos ismernünk azt is, hogy a ligandumok és a kialakuló komplexek milyen formában vannak jelen a szervezetben. A redoxi tulajdonságok vizsgálata is jelentős szerepet kap, hiszen a kialakult fémkomplexek gyakran redoxi reakciókon keresztül fejthetik ki a biológiai aktivitásukat.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A vizsgált fémionok jellemzése és biológiai szerepe

A réz, a cink és a vas olyan esszenciális nyomelemek, amelyek kulcsszerepet játszanak számos fehérje szerkezetének kialakításában és optimális működésében. Jelenlétük nélkülözhetetlen az emberi szervezet megfelelő működéséhez. Azonban ezek a létfontosságú elemek is mérgezőek lehetnek a túlzott sejten belüli felhalmozódás esetén, ahogyan azt a dózis-hatás diagramon is láthatjuk (1. ábra). Ám nem csak feleslegük okozhat problémát, hanem hiányuk is, ezért is fontos, hogy koncentrációjuk egy meghatározott tartományon belül állandó maradjon, ezzel biztosítva a metalloenzimek és fehérjék megfelelő működését. Az általam vizsgált fémionok a szervezetben igen nagy mennyiségben fordulnak elő, átlagosan mintegy 5 g vas, 2 g cink és 100 mg réz található egy 70 kg-os ember testében [16].



1. ábra: Dózis-hatás görbe [17].

A vas-, és rézionok közös tulajdonsága, hogy a redox aktivitásuk révén hozzájárulhatnak szabad gyökök kialakulásához (pl. közvetlenül katalizálják a hidroxilgyökök képződését hidrogén-peroxidból [18]), ezzel szerepet játszva az apoptózis szabályozásában és indukálásában. Ezzel szemben a redox inaktív cinkion akár közvetlenül, akár a fémion raktározásában résztvevő metallotioneinek indukciója révén védő szerepet játszik az oxidatív károsodással szemben. Csökkentheti a sejtek reaktív oxigénrészecske (ROS) megkötő képességét, vagy akár serkentheti a ROS képződést is úgy, hogy kiszorítja a vas-, és rézionokat a fémtartalmú intracelluláris fehérjékből (melyek utána Fenton-reakción keresztül ROS-t termelnek). Az így kialakult oxidatív stressz pedig hozzájárulhat a sejtkárosodáshoz, végül pedig az apoptózishoz [19].

A fent említett esszenciális fémionoknak igen fontos szerepe van a sejtek megfelelő működésében, így talán nem is annyira meglepő, hogy a rákos sejteknél eltérések tapasztalhatók a különböző fémionok mennyiségében az egészséges sejtekhez képest. Igazolták például, hogy a rákos sejtek, a fokozott sejtosztódás és metabolikus aktivitás következtében megemelkedett vasfelvételt és vasfelhasználást mutatnak. A rézionok szintén fontos kofaktorai számos enzimnek, melyek a sejtnövekedést szabályozzák, valamint katalizálják a reaktív oxigénrészecskék képződését, mely elősegíti a rákos sejtek DNS-mutációját, ezáltal a tumor progresszióját és a sejtnövekedést. Ugyanakkor a túlzott ROS-termelés apoptózist is eredményezhet [20]. A cinkionok egyes enzimek működésben betöltött kiemelkedő szerepük mellett a sejtosztódásban is fontos szerepet játszanak, így a vashoz hasonlóan fokozott cinkfelvétel is tapasztalható a rákos sejteknél. Azonban a helyzet nem ennyire egyszerű, hiszen vannak olyan ráktípusok is, ahol a cinkhiány gátolja az apoptózist, ezáltal a kellően magas cinkszint akár a rákos sejtek pusztulását is eredményezheti [21,22]. Számos próbálkozás irányult endogén fémionokkal való kölcsönhatáson alapuló kezelésekre: például különböző vaskelátorok (pl. deszferrioxamin B), melyek csökkentik a vas elérhetőségét a rákos sejtek számára), vagy fémtartalmú enzimeket gátló vegyületek alkalmazásával. Utóbbi csoportba tartozik például a triapin, mely a ribonukletiod-reduktáz (RR) enzimet képes gátolni a vasionokkal való komplexképzésével. Az irodalmi áttekintésben tovább tárgyalom azokat a vegyületeket, és vegyületcsaládokat, melyek hatékonyak lehetnek a rákos sejtekkel szemben, és hatásmechanizmusuk összefüggésbe hozható endogén fémionokkal való kölcsönhatással.

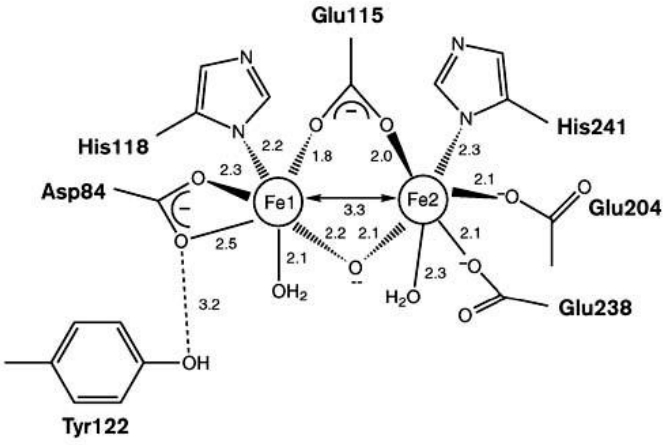
2.1.1. A vas biológiai szerepe

A vas a legnagyobb mennyiségben előforduló átmenetifém az emberi szervezetben. Naponta átlagosan 1–3 mg szívódik fel belőle, és közel azonos mennyiség ürül ki a szervezetből. A teljes vastartalom körülbelül 80%-a a hemoglobinhoz és a mioglobinhoz kötött formában található. A fennmaradó 20% a ferritin és a hemosziderin vastároló fehérjék között oszlik meg. Az enzimatikus folyamatokban néhány száz milligramm vesz részt, és körülbelül 3–4 mg a transzferrinhez kötve kering a vérplazmában [23].

A *thalassaemia* egy a hemoglobin globin láncát érintő örökletes vérképzőrendszeri betegség, mely során a beteg szervezete nem képes a megfelelő hemoglobin előállításra, ennek következtében vérszegénység alakul ki. Leggyakrabban *β-thalassaemia* formájában fordul elő, amikor a hemoglobin β-láncainak csökkent képződése, esetleges hiánya okozza

a betegséget. Legsúlyosabb „major” formája az úgynevezett *Cooley anaemia*, amikor két hemoglobin képződéséért felelős gén is érintett, míg a „minor”, enyhe forma esetén csupán egy. A kialakuló tünetek között olyan súlyos problémák alakulhatnak ki, mint a lép megnagyobbodása, a csontok elvékonyodása/deformitása és növekedési zavar. A kezelések során vérátömlesztést alkalmaznak, mely hatására a szervezetben felhalmozódó vas olyan fontos szervekben rakódik le, mint a máj, vagy a szívizom, ez pedig szívelégtelenséghez, végül halálhoz is vezethet [24]. A túlzott vasfelesleg kialakulásának további oka lehet az úgynevezett hemosziderózis, vagy hemokromatózis, mely genetikai betegség során a szervezetben kórosan felgyülemlett vas májelégtelenséget is okozhat. Mind a vérátömlesztés, mind a genetikai mutáció következtében felgyülemlett vas eltávolítására megoldás jelenthet a kelátterápia, mely során kelátképzőkkel kötik meg a kialakult vasfelesleget (pl. deferaszirox, deferipron, deszferrioxamin B).

Az emberi genom több mint 500 vasfehérjét kódol, melyek legfontosabb feladatai közé tartozik az oxigén szállítása és tárolása, illetve az elektrontranszfer folyamatok közvetítése. A legfontosabb vastartalmú fehérjék közül kiemelhetjük a hemoglobint és a mioglobint, de a hemtartalmú citokróm P450-t is, amely az endoplazmatikus retikulum elektrontranszfer-láncának tagja [25], vagy akár a ribonukleotid-reduktázt, amely a DNS bioszintézisében játszik szerepet. A RR a ribonukleotidok 2'-dezoxiribonukleotidokká történő átalakulásáért felelős enzim, mely két R1 alegységet és két R2 alegységet (2. ábra) tartalmaz. Az R1 alegység felelős a ribonukleotid szubsztrátok megkötéséért, míg az R2 alegység egy tirozil szabad gyököt tartalmaz, amelyet egy nem-hem vascentrum stabilizál [26,27]. Mind a vas, mind a tirozilgyök nélkülözhetetlen a katalitikus aktivitáshoz. Mindezen felül igazolták azt is, hogy a rákos sejtek fokozott vasfelvételt és vasfelhasználást mutatnak, így a vasionokkal való kölcsönhatásnak jelentős szerepe lehet a rák elleni közdelemben, ugyanis a gyors sejtosztódás következtében a DNS-szintézishez, enzimek alkotóelemeként (például a ribonukeotid-reduktáz) jelentős mennyiségű vasra van szükségük [28]. Nem csak a sejtosztódáshoz, de a sejtek intenzívebb metabolikus aktivitása és energiatermelése miatt is (glikolízis, oxidativ foszforiláció) szükséges a nagyobb vasmennyiség. A megnövekedett vasfelvétel érdekében a rákos sejtek esetén megfigyelhető a transzferrin receptorok túlexpessziója, ezáltal ugyanis hatékonyabban képesek felvenni a vasat a vérből.



2. ábra: A vasionok koordinációjának sematikus ábrája az R2 alegységben [29].

A szervezetben a vas +2 és +3 oxidációs állapotban fordulhat elő. Míg a Fe^{3+} „hard" jellegű, ezért oxigén donor atomok felé mutat nagyobb affinitást (hidroxidok, karboxilátok (aszpartát, glutamát)), addig a Fe^{2+} jóval „szoftabb" sajátságú, ezért a kéntartalmú tiolcsoportokkal (cisztein), tioéterekkel, szulfidokkal és nitrogén tartalmú imidazol gyűrűkkel (hisztidin), aminokkal és piridin gyűrűkkel alakít ki szívesebben komplexeket [30]. Mind a Fe^{2+}, mind a Fe^{3+} ionok esetében az oktaéderes koordinációs geometria a leggyakoribb (ferritin és transzfrerrin), azonban ritkán, de előfordulhat tetraéderes koordináció is (például a vas-kén fehérjék esetén is) [31].

2.1.2. A réz biológiai szerepe

A réz a harmadik leggyakoribb átmenetifém az emberi szervezetben. A napi rézszükséglet körülbelül 3–5 mg között mozog. A vashoz hasonlóan, hiánya vérszegénységet eredményez, ám léteznek olyan genetikai betegségek is, melyek szintén a réz anyagcserezavarával függnek össze. Ilyen például a Menkes-kór, mely az ATP7A réz-transzporter fehérjét kódoló gén mutációjához köthető elváltozás. A betegség X-kromoszómához kötött, és recesszíven öröklődő, legsúlyosabban pedig a központi idegrendszert érinti. Mentális és növekedési retardációt eredményez, mely már csecsemőkorban jelentkezik [32]. A réz kóros felhalmozódását Wilson-kórnak nevezzük, mely során a réz a májban, az agyban, a szemben is lerakódik. A betegség kialakulásának oka a réz transzportját és córuloplazminba való integrációját végző fehérje (ATP7B) hibás működése.

A réz nem csupán a kötőszövet képződésében vesz részt, hanem különféle enzimatikus reakciókban is fontos szerepet játszik. A mitokondriális légzési láncban résztvevő citokróm c-oxidáz is egy réztartalmú elektrontranszport enzim, mely két hemet, egy citokróm a-t, egy citokróm a_3-at, továbbá két rézközpontot (Cu_A és Cu_B) is tartalmaz [33]. Fontos még kiemelnünk a Cu,Zn szuperoxid dizmutázt (SOD1), amely a szuperoxid gyökanion hidrogén-peroxiddá és dioxigénné történő átalakításában résztvevő fehérje, ami a réz mellett egy cinkiont is tartalmaz [34].

A szervezetben a réz döntő mennyiségben fehérjékhez kötött formában fordul elő. A szabad rézionok koncentrációja nagyon kicsi, ami gátolja a Fenton-típusú reakció lejátszódását, ugyanis a vegyértékváltó átmenetifémekre (általában a vas-, és rézionokra) jellemző, hogy hozzájárulnak a szabad gyökök kialakulásához [35]:

$$\mathbf{L–M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow L–M^{n+1} + {\cdot}OH + OH^-} \quad (1)$$

$$\mathbf{L–M^{n+1} + R \rightarrow L–M^{n+} + R^+} \quad (2)$$

A hidrogén-peroxid és az átmenetifémion közötti katalitikus Fenton-típusú reakcióban a hidroxilgyök képződését egy redukciós lépés követi. Abban az esetben, ha például a Fe^{3+}-iont $O_2^{\cdot-}$ redukálja, akkor a fenti reakciók összegeként megkapjuk a Haber–Weiss ciklus részét képező teljes reakciót:

$$\mathbf{O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow {\cdot}OH + OH^- + O_2} \quad (3)$$

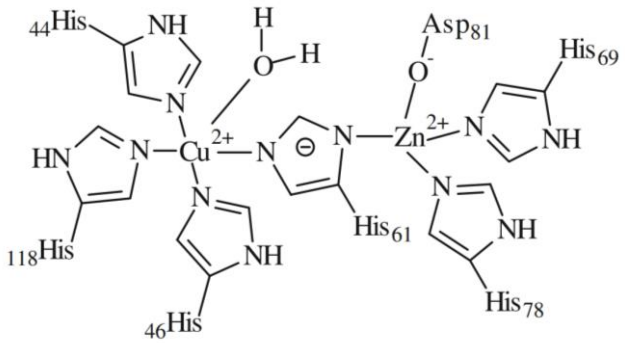
A direkt reakció túl lassú a biológiai rendszerekben, azonban a vaskomplexek segítségével katalizálható, melyben a sebességmeghatározó lépés az első reakció.

A szervezetben a réz +2 és +1 oxidációs állapotban fordulhat elő. A Cu^{2+} esetén a koordináció leggyakrabban torzult vagy szabályos oktaéderes, de lehet síknégyzetes is, míg a Cu^+ esetén a tetraéderes koordinációs geometria a jellemző. A Cu^{2+}-ionok a szervezetben leggyakrabban a hisztidin oldalláncában található imidazolgyűrűhöz, illetve az oxigéntartalmú ligandumok felé mutatnak nagyobb affinitást. Ezzel szemben a Cu^+-ionok a cisztein kéntartalmú oldalláncához (például a szuperoxid-dizmutáz is tartalmaz ilyen kötést), vagy a glutationhoz (GSH) koordinálódnak szívesebben [36].

2.1.3. A cink biológiai szerepe

A cink a második legnagyobb mennyiségben előforduló átmenetifém, kiemelkedően magas koncentrációban található meg az agy vezikulumában, a csontokban és az izmokban [37]. A napi cinkszükséglet körülbelül 15 mg környékén mozog. A megfelelő bevitel hiányában jelentkezhet étvágytalanság, csökken a fertőzésekkel szembeni ellenállás, de fejlődési visszamaradottság és törpenövés is kialakulhat [38]. A legújabb kutatások bizonyították, hogy az inzulinrezisztencia összefüggést mutat a cinkhiány miatti fokozott vasfelszívódással, ami a vas-, és cinktranszporterek közötti kapcsolattal magyarázható [39]. Feleslege csak igen nagy mennyiségben toxikus az emberi szervezetre nézve.

A cinkionok több mint 300 fehérje enzimatikus folyamataiban vesznek részt kofaktorként, mely fehérjék többek között a sejtek növekedéséért, fejlődéséért, differenciálódásáért felelősek. Ide tartoznak például a dehidrogenázok, a polimerázok, a foszfatázok, a kinázok, az anhidrázok, a dizmutázok és a peptidázok is [40]. Az egyik legismertebb cinktartalmú enzim a karboxipeptidáz-A, mely a fehérjék C-terminális peptidkötésének hidrolízisét katalizálja. A már említett szuperoxid-dizmutáz kofaktoraként (3. ábra) a cink szabályozza a szabad gyökök mennyiségét is, ugyanis a kataláz enzimekkel együttműködve védelmet nyújtanak a szuperoxid gyökanionok káros hatása ellen [41].



3. ábra: Cu, Zn-szuperoxid dizmutáz aktív centruma [42].

Fontos szerepet tölt be továbbá a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításában, többnyire cisztein és hisztidin aminosavak oldalláncaihoz koordinálódva, tetraéderes geometria kialakítása mellett. Itt fontos megemlíteni a cinkujj fehérjék jelentőségét is, melyek olyan, 9–10 cinkiont tartalmazó fehérjék, amelyekben a cinkionokhoz 4–4 aminosav oldallánc koordinálódik, tetraéderes elrendeződésben. Ez az elrendeződés stabilizálja az ujj-szerű konformációt, melyben az „ujjak” a DNS-hez tudnak

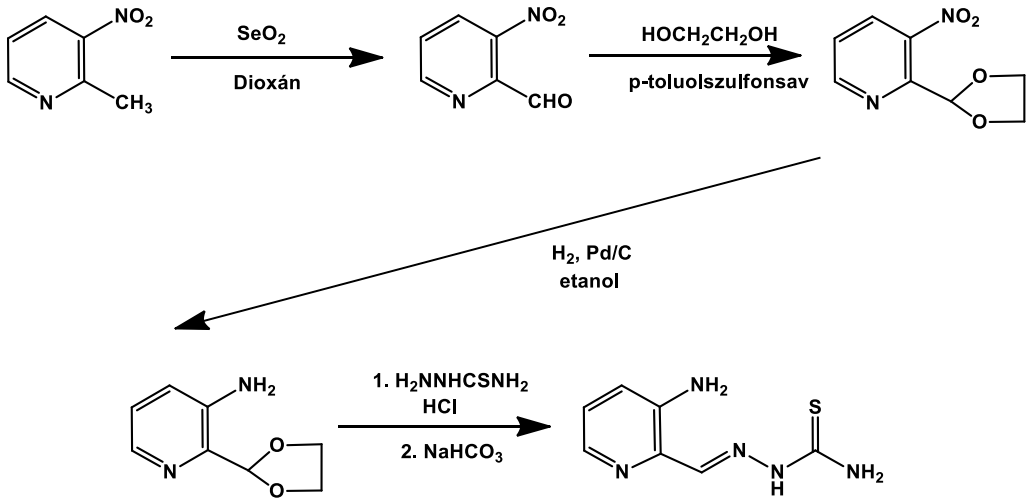
kötődni, biztosítva a szekvencia pontos felismerését [43]. A cinkionok képesek az intracelluláris információ hírvivőjeként és az extracelluláris kommunikáció bemeneteként is viselkedni. Ezzel nem csak a sejten belüli információ továbbításában játszanak fontos szerepet, de a sejtek közötti kommunikációban is.

Koordinációs kémiai tulajdonságait tekintve a cink(II)ion négy, öt vagy hat koordinálódó donoratommal alakít ki jellemzően tetraéderes, négyzetes piramisos, illetve oktaéderes geometriájú komplexeket. A réz(II)ionokhoz hasonlóan a nitrogén és oxigén donoratomokat tartalmazó ligandumok felé mutat nagyobb affinitást, mint például az imidazolgyűrűt tartalmazó aminosavak (hisztidin) vagy a karboxilátok [44,45].

2.2. A tioszemikarbazonok

2.2.1. Farmakológiai aktivitásuk és hatásmechanizmusuk

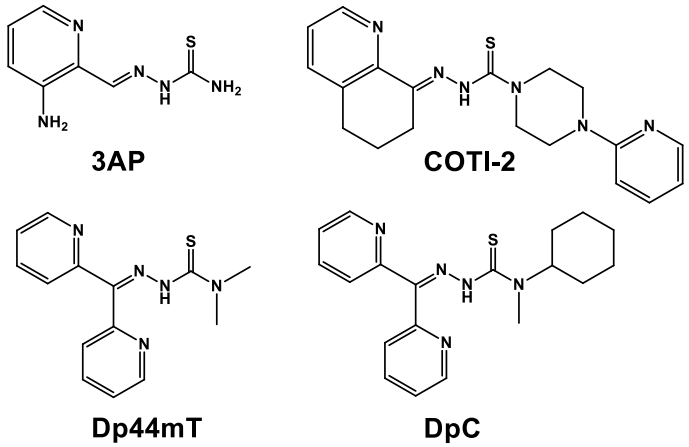
A tioszemikarbazonok nagyon változatos biológiai hatással rendelkező vegyületek, ugyanis léteznek közöttük vírus-, baktérium-, tuberkulózis-, malária-, és rákellenes hatásúak is [46,47]. Előállításuk egy keton vagy egy aldehid tioszemikarbaziddal való kondenzációs reakciójával történik, ahogyan azt láthatjuk a 4. ábrán, a legismertebb képviselőjük, a 3-amino-piridin-2-karbaldehid-tioszemikarbazon, vagyis a triapin (3AP, 5. ábra) esetén.



4. ábra: A klinikai vizsgálatokba került triapin szintézise [48].

Az első rákellenes TSK-ok egyike a 2-formilpiridin-tioszemikarbazon (FTSC) volt, melyet már az 1950-es években alkalmaztak állatkísérletekben a leukémia kezelésére [49]. További fejlesztések vezettek a 3AP kifejlesztéséhez, mely vegyület a feltételezett hatásmechanizmusa alapján a DNS bioszintézisébe avatkozik be, a RR enzim gátlásán

keresztül. A rákos sejtek fokozott sejtosztódása miatt a RR enzim gátlása egy lehetséges célpont lehet a kezelések során [50]. A feltételezett hatásmechanizmus alapján első lépésként az R2 alegységben kialakul egy Fe(II)-3AP komplex, mely ezután reakcióba lép az oxigénnel, így reaktív oxigénrészecskéket hoz létre, mely folyamat végül a tirozilgyök kioltásán keresztül az enzim inaktivitásához vezethet [51]. A 3AP számos klinikai fázis I és fázis II vizsgálatban vett részt, mono- és kombinált (pl. ciszplatinnal) terápiákban egyaránt, jelenleg pedig fázis III vizsgálatai zajlanak vele [52]. Azonban alkalmazása során olyan komoly mellékhatások is felléphetnek, mint a methemoglobinémia, a hipoxia vagy a hányás [53,54]. Ezen problémák olyan további TSK-ok fejlesztését ösztönözték, melyek citotoxikus hatása erősebb, vagy akár szelektívebbek, ezáltal a mellékhatások száma, illetve erőssége is csökkenhet. A CHEMSAS® egy *in silico* számítógépes módszer, amely a molekulaszerkezet ismeretében előrejelzi a biológiai aktivitást. A CHEMSAS® platform segítségével nagy hatékonyságra és alacsony szisztematikus toxicitású vegyületeket terveztek, melyek közül a 4-(2-piridinil)-2-(6,7-dihidro-8(5H)-kinolinilidén)hidrazid-1-piperazin-karbonsavat (COTI-2, 5. ábra) választották ki, aminek antitumor hatását különböző humán rákos sejtvonalak sokféle csoportján vizsgálták.



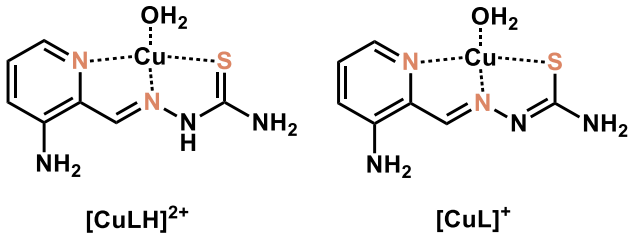
5. ábra: A klinikai vizsgálatokba került TSK-ok (3AP, COTI-2, DpC) és a Dp44mT szerkezeti képlete.

A COTI-2 alkalmazása eredményesnek mutatkozott többek között leukémiás és bőrrákos sejtvonalak esetén, ahol az antiproliferatív hatás már nanomoláris koncentráció mellett is megfigyelhető volt [55]. Jelenleg klinikai fázis I vizsgálatok (NCT02433626) folynak a COTI-2 és annak ciszplatinnal való kombinált terápiájára vonatkozóan [56]. Az előzetes farmakokinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a vegyület 15–90 perc után éri el a maximális koncentrációt a vérben, szájon át történő adagolást követően, felezési ideje

pedig 8–10 óra között van [55]. A klinikai vizsgálatok alapján jól tolerálható. A leggyakoribb mellékhatások az émelygés, hányás, fáradtság és hasi fájdalom, azaz összességében a nagy hatékonyság mellett a mellékhatások erőssége is csökkent a triapinhoz képest [57]. A COTI-2 javasolt hatásmechanizmusa alapján cink-metallochaperon tulajdonságokkal rendelkezik, ugyanis a p53 fehérje működését befolyásolja. A fehérjéhez kötődve konformációs változást indukál, és helyreállítja annak tumorszupresszor aktivitását [58]. Jelenleg a p53-ról ismeretes, hogy kulcsszerepet játszik gyakorlatilag minden ráktípus esetén, és génjének mutációja a rákos esetek több mint 50%-ánál azonosítható [59]. A tioszemikarbazonok további fejlesztése eredményezte az úgynevezett Dp-TSK-ok csoportját, melyek közül a di-2-piridil-keton-4,4-dimetil-3-tioszemikarbazon (Dp44mT, 5. ábra) kiemelkedő és szelektív rákellenes hatást mutatott *in vitro* és *in vivo* kísérletek során is [60]. Az első feltételezések szerint a ligandum a vasionokkal való komplexképződésen, majd a redoxi folyamatok során keletkező reaktív oxigénrészecskéken keresztül fejti ki hatását [61,62]. A Dp44mT továbbfejlesztésével előállított di-2-piridil-keton-4-ciklohexil-4-metil-3-tioszemikarbazon (DpC, 5. ábra) szintén klinikai vizsgálatokba került, azonban a Dp44mT-vel szemben szájon át adva is hatásos, az *in vivo* tolerálhatósága nagyobb, és számos daganattípussal szemben hatékonynak bizonyult [63,64]. Míg a 3AP a vasionokkal való kölcsönhatása révén fejti ki rákellenes hatását, addig ezek a nanomoláris koncentrációban is hatásos TSK-ok (Dp44mT és DpC) a P-glikoprotein (Pgp) általi rezisztenciát is képesek legyőzni, mely folyamat során pozitív töltésűvé válnak, és felhalmozódnak a savas kémhatású lizoszómákban. Az ott található vas-, és rézionokat képesek megkötni, így citotoxikus, redoxaktív komplexeket képeznek, amelyek membránkárosodást, végül pedig sejthalált indukálnak [9,65,66]. Összességében elmondható, hogy az endogén fémionokkal való kölcsönhatás a fent felsorolt esetekben igen fontos szerepet tölt be a rákellenes hatás kifejtésekor. Azonban nem csupán a réz(II)-, vas(III)-, és cink(II)ionokkal való kölcsönhatás vizsgálatára korlátozódik a szakirodalom, ugyanis az előzőek mellett más fémionokkal kialakuló komplexeknek is van biológiai aktivitása. Például a 2-acetil-piridin-TSK-ok Pt(II)-, és Ni(II)-komplexei antibakteriális hatást (is) mutattak [67,68]. A 2-formilpiridin-TSK-oknak és oxovanádium(IV)komplexeiknek szintén erőteljes *in vitro* antibakteriális hatása van [69].

2.2.2. A tioszemikarbazonok koordinációs kémiai sajátságai és komplexképzésük

A TSK alapvázban két donoratom található (N,S), melyekkel semleges és anionos formában is koordinálódhatnak. Az anionos koordináció esetén a hidrazin-NH deprotonálódásával a tion-tiol tautomériának köszönhetően egy tioláto kötési mód jön létre (6. ábra) [70]. Általában a két koordinálódó donoratom mellett egy harmadik koordinációra alkalmas csoportot is tartalmaznak, amely a leggyakrabban fenolos-OH csoport: (O,N,S), vagy piridin nitrogén: (N,N,S), ahogyan az 6. ábrán is látható a 3AP esetén.



6. ábra: Tion-tiol tautoméria következtében megvalósuló koordinációs módok a 3AP réz(II)komplexei esetén.

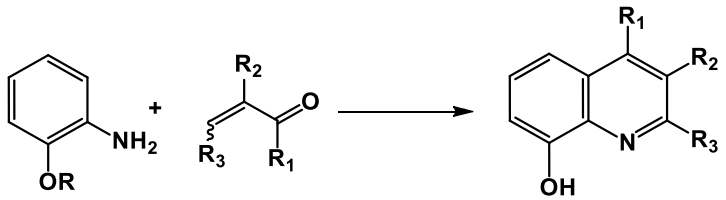
Míg a réz(II)ionokkal a tetragonálisan torzult oktaéderes geometriájú komplexek képződése igen gyakori, és így jellemzően mono-ligandumú komplexek képződnek a háromfogú TSK-okkal, addig a vas-, és cinkionokkal kialakuló szabályos oktaéderes komplexeknél általában biszkomplexek képződését is megfigyelhetjük. A hard Lewis-sav Fe(III)-ion a hard oxigén donorral (is) rendelkező (O,N,S) ligandumok felé mutat nagyobb affinitást, míg a szoftabb (N,N,S) donorkészlet miatt az α-*N*-piridil-TSK-ok egyértelműen a Fe(II)-ionok hatékonyabb komplexképzői [71]. A TSK-ok réz(II)-, vas(II)-, vas(III)-, cink(II)-, nikkel(II)-, platina(II)-, ruténium(II)-, gallium(III)-, vanádium(IV)-, vanádium(V)ionokkal is képesek a komplexképzésre. A komplexképződés jelentősen megváltoztatja a fizikai-kémiai sajátságokat, például a lipofilitást, a töltést (ezáltal hatással lehet a transzportfolyamatokra), de akár eltérő hatásmechanizmust is eredményezhet. Fontos kiemelni, hogy nem csupán maguk a TSK-ok, hanem azok fémkomplexei is mutat(hat)nak biológiai aktivitást. A szilárd formában előállított réz(II)komplexek citotoxicitása az N-terminálisan diszubsztituált α-*N*-piridil-TSK-ok esetén például gyakran nagyobb, mint a szabad ligandumé, míg a nem szubsztituált TSK-nál legtöbbször a ligandum bizonyul aktívabbnak [72,73]. A TSK-ok vas-, és rézionokkal való komplexképződése igen részletesen kutatott terület [62,74–78], hiszen a feltételezett hatásmechanizmus alapján ezen fémionokkal való komplexképződés komoly szerepet

játszik a biológiai aktivitás kialakulásában. Ugyanakkor a komplexek képződési állandóinak meghatározásával foglalkozó közlemények leginkább csak a saját kutatócsoportunkból származnak [79]. Megállapították, hogy a 3AP és a kén más kalkogénatomra történő cseréjével, ill. különböző módon szubsztituált származékai többnyire mono-ligandumú komplexeket képeznek a réz(II)ionokkal, mely komplexekben ($N_{piridin}$,N,S^-)(H_2O), ($N_{piridin}$,N,O^-)(H_2O) és ($N_{piridin}$,N,Se^-)(H_2O) koordinációs módok dominálnak fiziológiás körülmények között (pH = 7,40). A tiokarbonilcsoportban található kén szelénre történő kicserélődése növelte a Cu(II)-komplexek stabilitását, míg az O-3AP kisebb stabilitású Cu(II)-komplexeket képez, mint a 3AP. A vizsgált háromfogú ligandumok Fe(II)- és Fe(III)-ionokkal oktaéderes mono-, és biszkomplexeket képeztek. A ligandumok Fe(II)-kötő képessége a következő sorrendet követi: O-3AP≪ S-Me-3AP < Se-3AP ~ 3AP; míg a Fe(III) komplexek stabilitása a következő: Me-3AP ≪ Se-3AP < O-3AP < 3AP. Az O-3AP és a Me-3AP nem mutatott citotoxikus aktivitást (MES-SA és MES-SA/Dx5) humán méhszarkóma sejteken, feltehetően azért, mert ezek a ligandumok nem képesek mindkét oxidációs állapotban nagy stabilitású komplexeket képezni a vasionokkal, ami szükséges a rákellenes hatás kifejtése során [80]. Doktori munkámban elsősorban a különböző módon szubsztituált TSK-ok réz(II)-, vas(II)-, vas(III)-, és cink(II)ionokkal való komplexképződését vizsgáltam.

2.3. A 8-hidroxi-kinolinok

2.3.1. Szerkezetük, koordinációs kémiai tulajdonságaik és alkalmazásuk

A 8-hidroxi-kinolin (8HQ, oxin) egy biciklusos vegyület, melyet általában kinolin-8-szulfonsavból és 2-aminofenolból állítanak elő Skraup-szintézissel (7. ábra) [81]. Egy fenollal kondenzált piridingyűrűből áll, amelyben a hidroxilcsoport a 8-as pozícióhoz kapcsolódik.

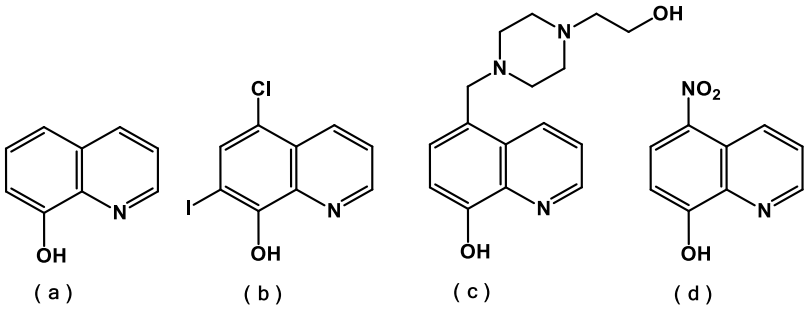


7. ábra: A 8-hidroxi-kinolin előállítása Skraup-szintézissel [81].

A piridingyűrű egy bázikus nitrogénnel rendelkező elektronhiányos molekularészként van jelen, míg a fenolcsoport miatt a vegyület számos kémiai reakcióra és szerkezeti módosulásra érzékeny (aromás elektrofil szubsztitúció, molekuláris

átrendeződések) [82]. A hidroxilcsoportnak a heterociklusos nitrogénhez való közelsége eredményeként a 8HQ és származékai kétfogú komplexképzők, amelyek a fenolát-oxigén, és piridin-nitrogén atomján keresztül képesek koordinációs kötéseket kialakítani. A 8HQ a legtöbb kétértékű átmenetifém-ionnal (Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) és Zn(II)) mono-, és biszkomplexet képez. A kétértékű fémionok 8HQ felé mutatott affinitása illeszkedik a Mn(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II) Irving-Williams-féle stabilitási trendhez [83,84]. Ezért, ahogyan azt a donoratomok ismeretében feltételeznénk, a 8HQ vegyületei a réz(II)-, és cink(II)ionok felé mutatnak kiemelkedő affinitást. Ezzel összefüggésben fontos megemlíteni azt is, hogy bizonyos 8HQ-okat széles körben használnak klasszikus analitikai és elválasztástechnikai módszereknél fémkomplexképzésre [81]. Az alapvegyületet gombaölő szerként használják a mezőgazdaságban, valamint tartósítószerként a textil-, fa- és papíriparban [85]. Mindezek mellett a 8HQ származékok között találhatunk neuroprotektív, rákellenes, HIV-ellenes és gombaellenes szereket is [86–88]. A 8-hidroxi-kinolinok egy további felhasználási területe lehet komplexképző ligandumként való alkalmazása szenzorokban, diagnosztikai szerekben, lumineszcens koordinációs vegyületek (például biokonjugátumok) képzése révén [89].

Az alapvegyület 8-hidroxi-kinolin (**a**, 8. ábra) biológiai tulajdonságainak optimalizálása érdekében számos származékát állítottak már elő. Az alapvázban található hidroxilcsoport erősen aktiváló, orto-/parairányító szubsztituens, ezért az 5-ös és 7-es pozíció könnyen funkcionalizálható aromás elektrofil szubsztitúcióval (pl. szulfonálás, nitrálás, nitrozálás), míg a 2-es vagy 4-es helyzetben nukleofilekkel támadható [10]. A halogénezett származékokat széles körben használják helyi fertőtlenítő szerekként, valamint szisztémásan bél- vagy húgyúti fertőzések kezelésére, de antibakteriális, rákellenes és anti-neurodegeneratív szerekként is vizsgálják őket [90,91]. Legismertebb képviselőjük az 5-klór-7-jód-8-hidroxi-kinolin (**b**, kliokinol, 8. ábra), mely jelenleg bőrfertőzések kezelésére alkalmazott helyi (külső) készítményként kapható. Vizsgálatok folynak a kliokinollal az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór és rosszindulatú daganatok kezelésére is, bár meg kell említeni, hogy nagy dózis vagy hosszabb ideig tartó kezelés esetén neurotoxikus hatása van, a nagyon erős lipofil karaktere miatt [92–94].



8. ábra: A 8-hidroxi-kinolin alapvegyület, valamint származékainkak szerkezeti képlete.

A piperazin-gyűrűt tartalmazó származékok közül fontos megemlíteni az 5-[[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-metil]-8-kinolinolt (**c**, 8. ábra), mely hasonló vasmegkötő képességgel rendelkezik, mint a vastúlterheléses betegségek kezelésére használt deszferrioxamin B. A vegyület ígéretesnek bizonyult számos neurodegeneratív betegség kezelése során, ugyanis a piperazin-gyűrűnek köszönhetően képes átjutni a vér-agy gáton [95]. A nitro-származékok legismertebb képviselője a széles spektrumú antibakteriális szerként ismert 5-nitro-8-hidroxi-kinolin (**d**, nitroxolin, 4. ábra), melyet húgyúti fertőzések kezelésére és megelőzésére használnak. Kiemelkedő vízoldhatóságuk miatt meg kell említenünk a 8-hidroxi-5-kinolin-szulfonsavat (szulfoxin) és a 8-hidroxi-7-jód-5-kinolin-szulfonsavat is, melyek képesek igen stabilis fémkomplexeket képezni, így fontos helyet foglalnak el az analitikai kémiában, például a vas kolorimetriás meghatározásában. Az amin származékok jelentős képviselője a 2-amino-8-hidroxi-kinolin, mely antiproliferatív aktivitással rendelkezik, melyet a rézionok jelenléte akár tízszeresére képes növelni [96].

2.3.2. A 8-hidroxi-kinolinok biológiai aktivitása és MDR-szelektivitása

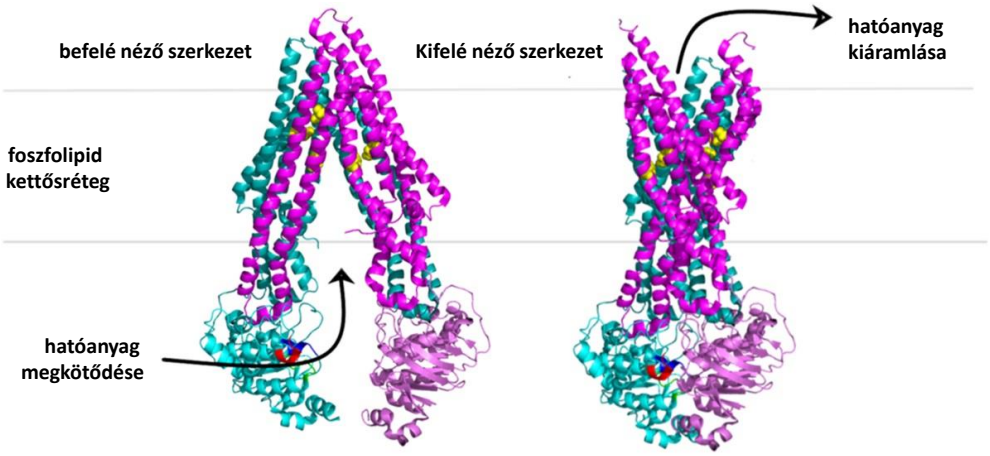
Ahogyan azt fentebb is tárgyaltam, a 8-hidroxi-kinolinok és származékaik igen sokféle farmakológiai hatással bíró vegyületek. Az alapvegyület oxinnak, illetve származékainak vasionokkal kialakított komplexeinek rákellenes hatása (is) van. A citotoxikus hatás egyik oka lehet, hogy a vaskomplex bejut a sejtekbe és károsíthatja a DNS-t, ami az adenozin-trifoszfát (ATP) készletek kimerüléshez, végül pedig sejthalálhoz is vezethet, ugyanis a DNS helyreállításához nagy mennyiségű ATP-re van szükség. Mindezek mellett a vaskomplex más módon is károsíthatja a DNS-t [97]. Ahogyan azt a TSK-ok bemutatásánál is említettem, a ligandumok rákellenes hatása gyakran kapcsolatba hozható a különböző endogén fémionokkal való kölcsönhatásukkal. Nincs ez másként a 8HQ-oknál sem, ahol is a Cu(II)- , Fe(III)-, és Zn(II)-ionokkal való komplexképződés játszik fontos szerepet a citotoxicitás kialakulásában [98]. Például a korábban említett

kliokinol rézkelátorként, valamint réz-, vas-, és cink-ionofórként is kifejtheti hatását [99]. Ezen tulajdonságát felhasználva az Alzheimer-kór kezelésével kapcsolatban is végeztek vele vizsgálatokat, mivel képes lehet befolyásolni a cink(II)-, és réz(II)ionok, valamint az Aβ fehérje közti kölcsönhatást az agyban [100]. A nitroxolin a katepszin B endopeptidáz enzim reverzibilis inhibítoraként ismert, mely enzim részt vesz az extracelluláris mátrix lebontásában, mely folyamat elősegíti a tumor invázióját [101]. Összehasonlítva a kliokinol és a nitroxolin citotoxicitását, elmondható, hogy az utóbbi aktívabbnak bizonyul (IC_{50} = 5,09 és 0,44 μM, ahol IC_{50} az a koncentráció, ahol a kezelt sejtek fele elpusztul), mely aktivitás a sejtekben növekvő ROS-szinthez is köthető. A ligandum nitrocsoportja nitrogén gyökforrásként működik, amely redoxi reakciókat indít el. Ezen reakciók következtében megváltozik az intracelluláris jelátvitel, ami a tumorsejtek növekedésének gátlásához vezethet. A nitroxolin nem cink(II)-ionofór, ugyanis a fent említett hatásokat a réz(II)ionok fokozták, viszont a cinkionok jelenlétében nem tapasztaltak jelentős változást [96]. Az eddig említett ionok mellett biológiai aktivitást figyeltek meg egyes ritkaföldfémekkel, valamint platina(II)-, és palládium(II)ionok esetén is [102–104]. Említésre méltó a szájon át adható és klinikai vizsgálatok alatt álló [trisz(8-kinolinoláto)gallium(III)]-komplex is, melynek hatásmechanizmusa nem teljesen tisztázott, de nem az RR enzim inhibitora, mint más, kisebb stabilitású Ga(III)-komplexnek. Ez a komplex, adhéziós (tapadó) ráksejtekben beindítja a kalpain nevű enzim aktiválását, ami az integrinek mennyiségének csökkenéséhez vezet, és kiváltja a sejthalált [105,106].

A daganatos betegségek kezelésének egyik legnagyobb kihívását a gyógyszerhatóanyagok ellen fellépő rezisztencia jelenti. Az alkalmazott rákellenes gyógyszerre rezisztens sejtek később más, szerkezetileg eltérő hatóanyagokkal szemben is képesek keresztrezisztenciát kialakítani. Ezt nevezzük multidrog rezisztenciának (MDR). A rákos sejtek ellenállóképességének, és az MDR jelenségének hatásmechanizmusában fontos szerepet játszik a hatóanyag aktív kipumpálása a sejtekből [107]. Az ABC-transzporterek, vagy másnéven ATP-függő transzporterek olyan nagy integrált membránfehérjék, amelyek két transzmembrán domént és két nukleotid-kötő domént tartalmaznak. Számos anyag (például metabolitok, szteroidok és gyógyszerek) membránon való átjuttatásáért felelősek [108]. A transzport konformációs változások következtében mehet végbe, melynek energiaigényét az ATP hidrolízise biztosítja. A 2.2.1. fejezetben említett Pgp (melyet az ABCB1 gén kódol) számos vegyülettel szemben biztosít rezisztenciát a rákos sejteknek, ugyanis olyan, gyógyszerrezisztens rosszindulatú

daganatban mutat túlzott expressziót, mint például a petefészekrák, az akut és krónikus mieloid leukémia, és a kissejtes tüdőrák [109–111]. Nem csupán a 8HQ származékoknál, de az előző fejezetben bemutatott TSK vegyületcsalád esetén is nagy jelentősége van az efflux pumpáknak. Az ABCC1 pumpa, a Pgp-vel szemben nem a hidrofób molekulákat, hanem a negatív töltésű szubsztrátokat részesíti előnyben (például szerves anionok), valamint az olyan másodlagos metabolitokat, mint például a glutation. Ez a szubsztrát specifikus ABCC1 pumpa képes lehet felismerni a GSH-t, és a sejten kívülre pumpálni azt, valamint a GSH-nal képződő adduktumokat is, ezzel csökkentve az adduktumokat képző ligandumok citotoxikus hatását [112].

A 9. ábrán két különböző konformációjú Pgp transzportert láthatunk a foszfolipid kettős rétegben. A befelé néző szerkezet (bal) elősegíti a hatóanyag megkötődését, míg a kifelé néző szerkezet (jobb) a sejtből történő kiáramlást az extracelluláris környezetbe, melyet a szűk szerkezetű csatorna tovább támogat [113]. A citotoxikus hatás számos esetben elérhető a sejtekben lévő vas homeosztázisába való beavatkozás révén (például az RR enzim esetén). Bizonyos 8HQ származékok esetén azonban megfigyelték, hogy az intracelluláris vaskészletek kimerítésével közvetlenül képesek gátolni az RR enzim működését, ami a sejtben képződő vaskomplexek Pgp által közvetített kiáramlásának eredménye [111].



9. ábra: Pgp transzporter szerkezete a hatóanyag megkötődése és kiáramlása közben [113].

MDR-szelektivitásnak azt nevezzük, amikor a kemoterápiás szer az MDR rákos sejtekre kifejtett citotoxiikus hatása nagyobb, mint az érzékeny, parentális rákos sejtek esetén. A 8-hidroxi-kinolin gyűrű hetedik pozíciójában lévő CH_2-N alegységet tartalmazó vegyületek MDR-szelektivitást mutatnak, mindemellett kutatócsoporti eredmények alapján

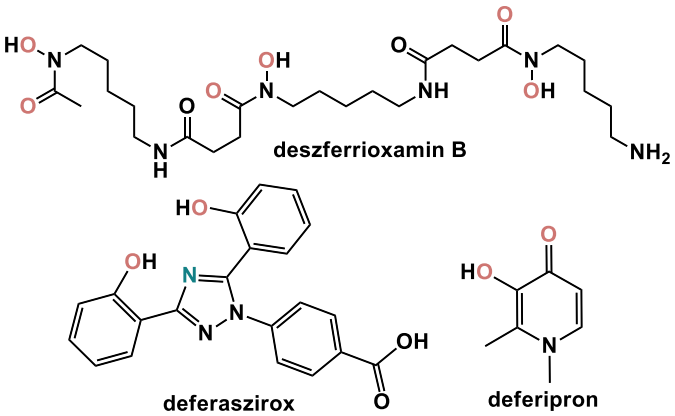
citotoxicitásuk korrelációt mutat az -OH csoport pK_a értékével, és összefügg az esszenciális fémionokkal való komplexképzésükkel is [114]. Az eddigi eredmények azt mutatták, hogy a komplexképzés szükséges, de nem elégséges az MDR-szelektív aktivitáshoz. A MDR szelektivitás növekedését az R5-ös pozícióba történő szubsztituensek beépítésével érték el (például halogének esetén, amelyek növelték mind a toxikus hatást, mind a szelektivitást, ezzel szemben az alkoximetil-csoportok növelték a szelektivitást, de csökkentették a toxicitást). Megállapították azt is, hogy az aromás gyűrű beépítése a metilén hidrogénezett szénatomjára csökkentette a toxikus hatást és a szelektivitást is egyaránt [114]. A szerkezeti változtatások során a különböző atomok cseréje (például a metiléncsoport cseréje oxigén atomra a piperidinil molekularészben) az MDR-szelektivitás lecsökkenését eredményezi. A 8HQ származékok közül azok, amelyek nagyobb affinitást mutattak a réz(II)ionokhoz, nagyobb MDR-szelektív toxikus hatással bírtak. A piperidin-, és morfolincsoportok komplexképző tulajdonságai befolyásolják a toxikus aktivitást, és a komplexképződés során keletkező ROS-k képesek lehetnek hozzájárulni a citotoxikus hatáshoz [115]. A 8HQ ligandumok mellett történő vas(III)ionok adagolásával igazolták azt is, hogy a Pgp növelheti ezen vegyületek által kiváltott vaskiürülésre való érzékenységet, ugyanis a vas hozzáadása megszüntette a szelektív toxicitást, az MDR-sejtek védelmével [115]. A fent említett 8HQ származékoknak azért van kimagasló jelentősége, mivel a Pgp direkt gátlása inhibitorokkal eddig sikertelennek bizonyult az MDR-rezisztens daganatok kezelésekor. Doktori munkám során különböző módon szubszituált (2-es pozícióban történő szubsztitúció; morfolin- és piperidin szubsztituensek, és 7-es pozícióban L-prolin-szubsztituens) 8-hidoxi-kinolinok oldategyensúlyi vizsgálatát végeztem (proton disszociációs folyamatok, komplexképzésük réz- és vasionokkal és a komplexek redoxi tulajdonságai), összehasonlítva biológiai aktivitásukat is egymással.

2.4. A vaskelátorok és a VLX600

2.4.1. Legfontosabb vaskelátorok

A vasionoknak jelentős szerepe van a gyorsan osztódó sejtek növekedésében, ami megteremti az alapot a vaskelátorok rákterápiában való alkalmazásához. Azonban az első vaskelátorokat még nem a rák ellen próbálták alkalmazni, hanem a szervezetben lévő felesleges vas eltávolítására, például a β-thalassaemia esetén. Ezért olyan kelátorokat alkalmaznak a kezelés során, melyek a nem ferritinhez kötött vassal képesek komplexet képezni, amely végül vaskomplex formájában kiürül a szervezetből. Az egyik legismertebb vaskelátor a deszferrioxamin B nevű trisz-hidroxámsav származék (10. ábra), mely hatfogú

ligandumként hatékonyan képes megkötni a vasat 1:1 fémion:ligandum mólarányban. Az oxigén donoratomoknak köszönhetően kiválóan alkalmas a vas(III)ionok szelektív megkötésére, oktaéderes komplexek képződése közben [116]. A kezelés során naponta 20–50 mg vas távozik a szervezetből, azonban alkalmazásának hátránya, hogy rövid plazma felezési ideje miatt folyamatos injekciók alkalmazása szükséges [117]. A napi adagolás kellemetlensége mellett mellékhatások (fájdalom, hányás, hasmenés) is felléphetnek, melyek olyan további vaskelátorok fejlesztéséhez vezettek, mint például a deferaszirox vagy a deferipron (10. ábra).

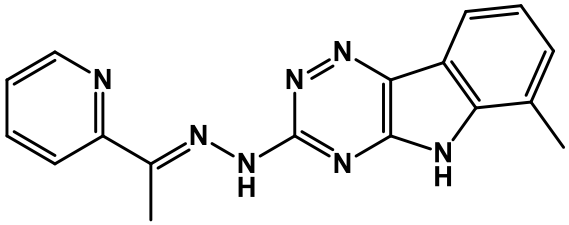


10. ábra: A legismertebb vaskelátorok szerkezeti képlete.

A deferipron, a Ferriprox nevű, szájon át adagolható gyógyszer hatóanyaga (1,2-dimetil-3-hidroxi-piridin-4-on) egy olyan kétfogú kelátképző, mely vasionokkal triszkomplexet képez [118]. A deferaszirox egy N-szubsztituált bisz-hidroxi-fenil-triazol származék, (4-[3,5-bisz(2-hidroxi-fenil)-1H-1,2,4-triazol-1-il]benzoesav) és háromfogú kelátképző, mely biszkomplexek képződése mellett, a Fe(III)-ionok szelektív megkötésével képes a felesleges vas eltávolítására [119]. A 10. ábrán bemutatott vaskelátor molekuláknak a Fe(III)-ionok felé mutatott szelektivitása a Fe(II)-ionhoz képest igen nagy, ami a rendkívül alacsony redoxpotenciál értékükben is megmutatkozik (például a deszferrioxamin B esetén –468 mV [120]). A redoxipár formál potenciálját (ε') ugyanis a különböző oxidációs állapotú fémkomplexek stabilitási állandóinak aránya határozza meg. Így akár a redoxpotenciálok ismeretében is következtethetünk, hogy a vizsgált ligandum melyik oxidációs állanpotú fémion felé mutat nagyobb affinitást (minél negatívabb, annál inkább a +3 forma a preferált).

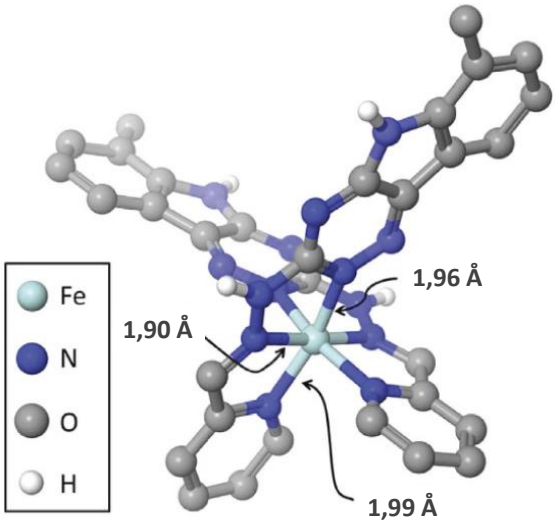
2.4.2. VLX600 koordinációs kémiai tulajdonságai és biológiai aktivitása

Az előző fejezetben bemutatott vegyületekkel ellentétben a 2-[1-(2-[6-metil-5H-[1,2,4]-triazino-[5,6-b]-indol-3-il]-hidrazin-1-ilidén)-etil]-piridin (VLX600) nem egy klasszikus értelemben vett vaskelátor, amelyet a szervezetben feleslegben lévő vas eltávolítására fejlesztettek ki, hanem rákellenes tulajdonságú, ami összefüggésbe hozható a vaskötő képességével. Szintézise egy háromlépéses folyamat (melyet bővebben tárgyalok az eredmények fejezetben), mely során a tioszemikarbazid és a 7-metil-indolin-2,3-dion reakciójával képződő tion származékot tovább reagáltatnak hidrazin-monohidráttal, amit pedig a 2-acetil-piridinnel. Az előállított VLX600 termék a triazino-indolil-hidrazonok csoportjába tartozik. Szerkezetét tekintve, melyet a 11. ábrán láthatunk, közel planáris, merev és kiterjedt konjugált π-elektronrendszerrel bír.



11. ábra: A VLX600 szerkezeti képlete.

A koordinációs kötések kialakításában nitrogén donoratomok vesznek részt, szemben a korábban bemutatott, oxigén atomokban gazdag vaskelátorokkal. EXAFS mérésekkel igazolták, hogy a ligandum a vas(II)ionokkal biszkomplexet képez, amelyben a vas(II)ion hat nitrogént köt meg pszeudo-oktaéderes konfigurációban (12. ábra).



12. ábra: A VLX600 vaskomplexének DFT és EXAFS eredmények által generált modellje [14].

Hatásmechanizmusában fontos szerepet játszik, a korábban már említett megfigyelés, hogy a rákos sejtek megnövekedett vasfelvételt, és vasfelhasználást mutatnak. A VLX600 ugyanis úgy fejti ki hatását, hogy beavatkozik az intracelluláris vasanyagcserébe. Az előző fejezetekben már tárgyaltam az RR enzimet, és annak vastartalmú alegységét, mint potenciális célpontot. Ahogyan az feltételezhető egy vaskelátor esetén, számos vastartalmú enzim működését befolyásolja. Gátolja a citokróm c oxidáz enzim működését, továbbá elvonja a vasionokat a terminális oxidációért felelős mitokondriális elektron transzport lánctól is [13]. A légzési lánc gátlása olyan bioenergetikai katasztrófához vezet, ami a tumorsejtek pusztulását eredményezi. Azt a tényt, hogy a vasionokkal való kölcsönhatás képzi a hatásmechanizmus alapját, azáltal sikerült igazolni, hogy vas(II)-, és vas(III)ionok hozzáadásakor a vegyület citotoxikus aktivitása megszűnt. Mindemellett a VLX600-zal kezelt sejtekben, $FeCl_3$ hozzáadásával sikerült az oxidatív foszforilációt is helyreállítani [14]. A VLX600 vaskomplexek képződése révén képes lehet HIF-1α expressziót indukálni, ugyanis bizonyos vasfüggő enzimek negatívan szabályozzák a HIF-1α fehérje stabilitását [121]. A VLX600 HIF-1α-függő glikolízist indukál a sejtekben, ami a glükózraktár további kimerüléséhez vezethet a daganatokban [13]. Szemben a korábban bemutatott tioszemikarbazonokkal (3AP vagy Dp44mT) a VLX600 nem generál ROS-t.

Jelenleg klinikai fázis I vizsgálatok folynak a VLX600 vaskelátorral, előrehaladott szolid tumorok esetén [122]. A VLX600 aktivitását elsőként humán vastagbél-adenokarcinómában szenvedő egereken mutatták ki [13]. Jelentős tumorellenes aktivitást figyeltek meg 0,5–16 mg/ttkg dózistartományban. Minimális toxicitást tapasztaltak 4,5 mg/ttkg dózisig, továbbá a magasabb dózisoknál az injekció beadásának helyén intolerancia-problémákat írtak le. A klinikai fázis I vizsgálatok alapján nem észleltek dóziskorlátozó toxicitást, tehát a vaskelátor alapjában véve jól tolerálhatónak bizonyult. A VLX600-at intravénásan adagolták a betegeknek, a 28 napos kezelési ciklus alatt heti egy alkalommal. A VLX600 maximális koncentrációja a vérplazmában a kezelés során >2,5 $mmol/dm^3$ volt, míg átlagos tartózkodási ideje 9 óra [15]. A hibás homológ rekombinációs DNS-javítással rendelkező daganatok érzékenyebbek az olyan kemoterápiákra, amelyek a homológ rekombinációt gátolják, valamint poli-ADP-ribóz-polimeráz (PARP)-gátlók. A PARP egy, a sejtekben található olyan fehérje, mely segít a sérült sejteknek önmaguk helyreállításában. A VLX600 PARP-gátló hatást fejt ki, platinavegyületekkel kombinált terápia esetén, petefészekrákos sejtekben, valamint

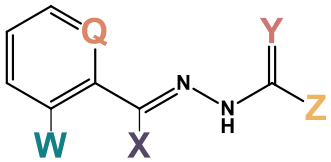
fokozza a platinatartalmú szerek citotoxicitását. A VLX600 gátolja a vasfüggő hiszton-lizin-demetilázokat, így blokkolnak bizonyos javító fehérjéket, köztük a RAD51-et [123]. Ahogyan azt már korábban is említettem, a VLX600 számos vastartalmú enzim működését befolyásol(hat)ja, így felmerülhet a kérdés a specifikusságát illetően, a szervezetben lejátszódó számos vasfüggő folyamat miatt. Mégis úgy tűnik, hogy a VLX600 rendelkezik bizonyos specifikusággal, ugyanis nem zavarta meg a sejtciklust az RR gátlásával [124].

Legújabb szakirodalmi eredmények is azt igazolták, hogy a vaskeláció kiemelkedő szerepet játszik a VLX600 hatásmechanizmusában, ugyanis az oxidatív foszforiláció inhibitoraként, autofágia-függő sejthalált indukált, különböző glioblasztómás sejtvonalakon. Fontos megfigyelés továbbá az is, hogy mindkét folyamat visszafordítható volt a vas extracelluláris hozzáadásával [125]. Doktori munkám során előállítottam a VLX600 vaskelátort, és annak különböző módon szubszituált származékait, majd oldategyensúlyi szempontból összehasonlítottam őket. Vizsgáltam a vaskomplexeik redoxi tulajdonságait, illetve a biológiai aktivitás változását a szubszitúció hatására.

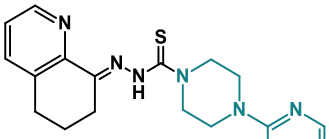
3. Célkitűzés

Doktori munkám során három különböző vegyületcsaláddal foglalkoztam ((tio)szemikarbazonok, 8-hidroxi-kinolinok és a VLX600 és származékai, 13. ábra), melyek rákellenes hatása endogén fémionokkal való komplexképződésükkel függ(het) össze. Míg ilyen típusú vegyületekre számos citotoxicitási adat áll rendelkezésre a szakirodalomban, addig az oldategyensúlyi tulajdonságaikról annál kevesebb. Ezért elsődleges célom átfogó oldategyensúlyi vizsgálatok elvégzése volt, mely során négyféle fémionnal (réz(II)-, vas(II)-, vas(III)-, és cink(II)ionok) való komplexképződést szerettem volna vizsgálni, különböző elektrokémiai és spektroszkópiai módszerek kombinált használatával. Kíváncsi voltam, hogy az egyes vegyületcsaládokon belül a különböző szerkezeti változtatások (pl. koordinációs mód változtatása, metil- vagy egyéb szubsztituensek beépítése) milyen hatással vannak a képződő komplexek összetételére, stabilitására, redoxi tulajdonságaira és a citotoxikus hatásra. A szerkezet és a koordinációs módok jobb megértéséhez a ligandumok (és azok fémkomplexeinek) egykristályainak előállítását is terveztem. Amellett, hogy a vegyületek milyen formában lehetnek jelen a biofluidumokban, fontos ismernünk azok oldhatóságát, lipofilitását, illetve azt, hogy a különböző biológiai membránokon hogyan képesek áthatolni, ugyanis ezek a tulajdonságok alapvetően megszabják a farmakológiai viselkedést. Ennek érdekében a fenti tulajdonságok vizsgálatát terveztem a ligandumok, és azok különböző fémionokkal képzett komplexeik esetén is. A réz(II)-, és vas(III)ionokkal kialakult komplexek redoxi tulajdonságának vizsgálata pontosabb képet adhat a hatásmechanizmusról is, így a komplexek redoxpotenciál értékeinek meghatározása mellett különböző természetes redukálószerekkel való direkt redukciós vizsgálatokat is terveztem. A hatásmechanizmus jobb megértése érdekében DNS-sel való kölcsönhatás vizsgálatát is terveztem bizonyos vegyületek esetén. Célom volt a VLX600 vaskelátor és annak négy különböző módon szubszituált származékának előállítása. Ezekkel a vegyületekkel az előzőekben felsorolt vizsgálatokon kívül biológiai vizsgálatokat is terveztem. Kíváncsi voltam, hogy milyen apoptotikus hatást váltanak ki, illetve, hogy képesek-e reaktív oxigénrészecskék termelésére, valamint a citotoxikus hatásuk hogyan alakul a szerkezeti változtatások hatására.

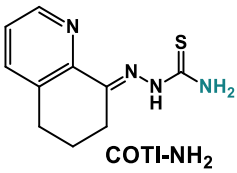
Tioszemikarbazonok és szemikarbazonok



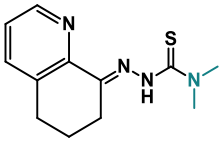
	Q	W	X	Y	Z
3AP	N	NH_2	H	S	NH_2
S-Me-3AP	N	NH_2	H	S-Me	NH_2
O-3AP	N	NH_2	H	O	NH_2
STSC	C-OH	H	H	S	NH_2
SSC	C-OH	H	H	O	NH_2
FTSC	N	H	H	S	NH_2
PTSC	N	H	H	S	N-Me_2
Dp44mT	N	H	piridil	S	N-Me_2
DpC	N	H	piridil	S	N-Me-ciklohexil
H_2NNHMe	N	NH_2	H	S	NH-Me
H_2NNHMe_2	N	NH_2	H	S	N-Me_2
$MeHNNMe_2$	N	NH-Me	H	S	N-Me_2
Me_2NNH_2	N	N-Me_2	H	S	NH_2
Me_2NNHMe	N	N-Me_2	H	S	NH-Me
Me_2NNMe_2	N	N-Me_2	H	S	N-Me_2



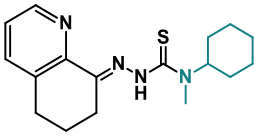
COTI-2



COTI-NH_2

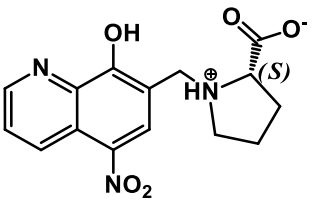


COTI-NMe_2

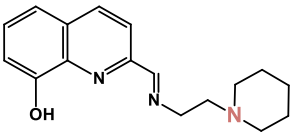


COTI-NMeCy

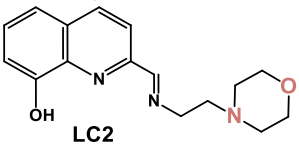
8-hidroxi-kinolinok



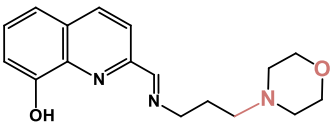
$HQNO_2$-L-Pro



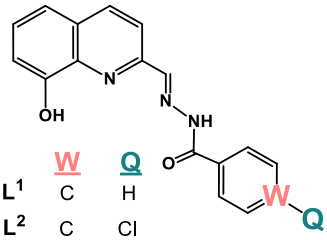
LC1



LC2

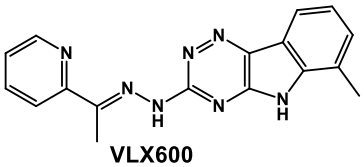


LC3

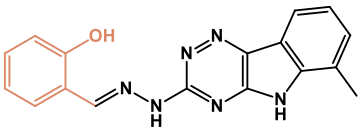


	W	Q
L^1	C	H
L^2	C	Cl
L^3	C	F
L^4	C	Me
L^5	C	O-Me
L^6	C	OH
L^7	C	NH_2
L^8	N	-

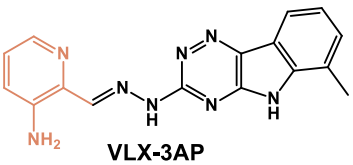
VLX600 származékok



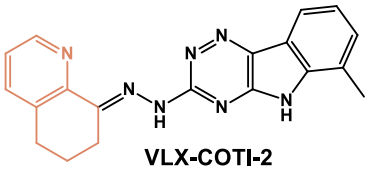
VLX600



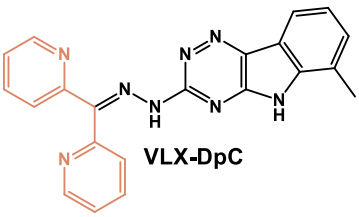
VLX-STSC



VLX-3AP



VLX-COTI-2



VLX-DpC

13. ábra: Doktori munkám során vizsgált ligandumok szerkezeti képlete és jelölése.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált vegyszerek

Az 5-nitro-8-hidroxi-kinolin, 3AP, O-3AP, szalicil-aldehid-szemikarbazon (SSC), szalicil-aldehid-tioszemikarbazon (STSC), Dp44mT, DpC, GSH, 2-etánszulfonsav (MES), borjú csecsemőmirigy DNS (ct-DNS), az aszkorbinsav (AA), a glutation, a minimális esszenciális tápközeg (MEM), a 'Hanks' balanced salt solution' Hanks-féle sóoldat (HBSS), a 2′,7′-diklór-fluoreszcein-diacetát (DCFH-DA), a terc-butil-hidroperoxid, és a propídium-jodid a Sigma-Aldrichtől származnak. A VLX600 a Synthon Lab-tól, a HCl, KOH, KCl, KH-ftalát, dinátrium-etilén-diamin-tetraacetát (EDTA), KH_2PO_4, Na_2PO_4, $K_3[Fe(CN)_6]$, dimetil-szulfoxid (DMSO), deuterált DMSO, dimetil-formamid (DMF), tetrabutil-ammónium-nitrát (TBAN), 4-hidroxietil-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES) a Reanal Laborvegyszergyár Kft.-től volt vásárolva. A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólium-bromid (MTT) az Acros Organics, Geel terméke, míg a fenolvörös-mentes Opti-MEM Gibcotól származik. Ezeket a vegyületeket további tisztítás nélkül használtam fel. Az oldatokat Milli-Q ultratiszta víz felhasználásával készítettem, a törzsoldatok tömeg szerinti beméréssel készültek. Néhány esetben (pl. LC1, LC2 és LC3 ligandumok esetén), kvantitatív NMR-t is alkalmaztam a szilárd anyagok tisztaságának ellenőrzésére. Ezekben az esetekben maltolt használtam referencia vegyületként. A maltolból és a ligandumból tömeg szerinti beméréssel készítettem el az NMR mintát. A spektrumok felvétele után a maltol csúcsintegráljaihoz viszonyítottam a ligandumok csúcsait, ezáltal határozva meg az kérdéses ligandum anyagmennyiségét. A különböző COTI-2 származékokat: COTI-NH_2, COTI-NMe_2, COTI-NMeCy, illetve az FTSC, piridin-2-karboxaldehid-N^4,N^4-dimetil-tioszemikarbazon (PTSC), H_2NNHMe, H_2NNMe_2, $MeHNNMe_2$, Me_2NNH_2, Me_2NNHMe, Me_2NNMe_2 ligandumokat együttműködő partnerünk kutatócsoportjában állították elő (Prof. Bernhard K. Keppler, Dr. Christian R. Kowol, University of Vienna). Az általam vizsgált további 8-hidroxi-kinolinokat partnereink állították elő (Schiff-bázis származékok: Dr. Isabel Correia, University of Lisbon, 5-nitro-8-hidroxi-kinolin: Szatmári István, SZTE, Gyógyszerkémiai Intézet). A VLX600 analógokat (VLX-3AP, VLX-STSC, VLX-DpC, VLX-COTI-2) együttműködő partnerünk kutatócsoportjában magam állítottam elő (Dr. Christian R. Kowol, University of Vienna). A fémion törzsoldatok ($CuCl_2$, $FeCl_3$, $ZnCl_2$) pontos koncentrációját EDTA mérőoldattal határoztam meg, komplexometriás titrálások segítségével. A Fe(II) törzsoldat vaspor és sósav reakciójával készült, oxigéntől elzártan. A szűrés után kapott oldat koncentrációját permanganometriás módszerrel határoztam meg. A

mérések során az oldatok pH-jának beállításához HEPES (10 vagy 20 mM), MES (10 vagy 20 mM), illetve PBS* (12 mM Na_2HPO_4, 3 mM KH_2PO_4, 1,5 mM KCl, 100,5 mM NaCl, melynek pH-ja, kloridion-tartalma és a Na^+ és K^+ ionok mólaránya a vérszérumnak felel meg) puffereket alkalmaztam. A ligandumok esetén minden méréskor friss törzsoldatot készítettem. A ct-DNS törzsoldatnál azonban legalább három napot vártam, hogy feloldódjon, ezután leszűrtem. Az elkészült ct-DNS törzsoldat koncentrációjának meghatározását spektrofotometriásan végeztem, ugyanis a ct-DNS esetén a 260 nm-nél mért abszorbancia megadja a bázisok számát, mely alapján a koncentráció meghatározható [126]. Az alábbi komplexek szilárd formában rendelkezésünkre álltak: S-Me-3AP-Cu(II), LC1-Cu(II), LC1-Zn(II), LC2-Cu(II), LC2-Zn(II), LC3-Cu(II), LC3-Zn(II), VLX600-Cu(II), VLX600-Fe(II), VLX600-Zn(II). Az ezekből készült törzsoldatokat a szilárd vegyület DMSO-ban vagy tiszta vízben való oldásával állítottam elő (attól függően, hogy a mérések vízben vagy 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben történtek). A többi komplex *in situ* oldatban való előállításakor a ligandumhoz adtam a megfelelő fémsót ($CuCl_2$, $ZnCl_2$, $FeCl_2$ vagy $FeCl_3$), a kívánt arányban enyhén savas pH-n a fémionok hidrolízisének elkerülése miatt, majd pár perces várakozást követően állítottam a pH-t többnyire 7,4-es értékre. A komplexek kialakulását UV-látható spektrofotometriás módszerrel ellenőriztem.

4.2. VLX600 és származékainak előállítása

3-Hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol szintézise:

A kereskedelmi forgalomban kapható 6-metil-4,5-dihidro-3H-[1,2,4]-triazino[5,6-b]indol-3-tiont (1,00 g, 4,62 mmol, 1 ekvivalens) szuszpendáltattam hidrazin-monohidrátban (12,5 ml, 99,88 mmol, 54 ekvivalens). Az elegyet 20 órás reflux mellett kevertettem. Halványsárga, szilárd anyag képződött, amelyet szűrtem, vízzel és etanollal mostam, és vákuumban 40 °C-on egy éjszakán át szárítottam. Hozam: 947,6 mg (96%).

A VLX600 szintézise:

3-hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino-[5,6-b]indolt (300 mg, 1,40 mmol, 1 ekvivalens) vízben (3,0 ml) és etanolban (4,5 ml) szuszpendáltattam, és 2-acetil-piridint (0,785 ml, 7,00 mmol, 5 ekvivalens) adtam hozzá. Az elegyet 5 óra reflux mellett kevertettem. Halványsárga, szilárd anyag képződött, amelyet kiszűrtem, majd 40%-os etanol/víz elegyével mostam, és vákuumban 40 °C-on egy éjszakán át szárítottam. Hozam: 437,1 mg (98 %).

A VLX-3AP szintézise:

3-hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino-[5,6-b]indolt (138 mg, 0,64 mmol, 1 ekvivalens) vízben (1,0 ml) és etanolban (3,0 ml) szuszpendáltattam, és terta-butil(2-formilpiridin-3-il)karbamátot (147 mg, 0,64 mmol, 1 ekvivalens), és 0,3 ml cc. HCl-t adtam hozzá. Az elegyet 5 óra reflux mellett kevertettem. Narancssárga, szilárd anyag képződött, amelyet szűrtem, etanollal mostam, és vákuumban 40 °C-on egy éjszakán át szárítottam. Hozam: 194,3 mg (95%).

A VLX-STSC szintézise:

3-hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino-[5,6-b]indolt (100 mg, 0,47 mmol, 1 ekvivalens) vízben (2,6 ml) és etanolban (3,9 ml) szuszpendáltattam, és 2-hidroxi-benzaldehidet (248 µl, 2,34 mmol, 5 ekvivalens) adtam hozzá. Az elegyet 5 óra reflux mellett kevertettem. Halványsárga, szilárd anyag képződött, amelyet szűrtem, 40%-os etanol/víz elegyével mostam, és vákuumban 40 °C-on egy éjszakán át szárítottam. Hozam: 148,7 mg (84%).

A VLX-DpC szintézise:

3-hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino-[5,6-b]indolt (100 mg, 0,47 mmol, 1 ekvivalens) vízben (1,0 ml) és etanolban (1,5 ml) szuszpendáltattam, és di-2-piridilketont (430 mg, 2,34 mmol, 5 ekvivalens), és egy csepp cc. H_2SO_4-t adtam hozzá. Az elegyet 5 óra reflux mellett kevertettem. Narancssárga, szilárd anyag képződött, amelyet szűrtem, vízzel mostam, és vákuumban 40 °C-on egy éjszakán át szárítottam. Hozam: 177,7 mg (84%).

A VLX-COTI-2 szintézise:

3-hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino-[5,6-b]indolt (100 mg, 0,47 mmol, 1 ekvivalens) vízben (1,0 ml) és etanolban (1,5 ml) szuszpendáltattam, és 6,7-dihidrokinolin-8(5H)-ont (343,7 mg, 2,34 mmol, 5 ekvivalens) adtam hozzá. Az elegyet 5 óra reflux mellett kevertettem. Sárga, szilárd anyag képződött, amelyet szűrtem, vízzel mostam, és vákuumban 40 °C-on egy éjszakán át szárítottam. Hozam: 160,4 mg (97%).

4.3. UV-látható spektrofotometria

Az UV-látható spektrofotometria olyan anyagok vizsgálatára alkalmas, melyek 200–800 nm-es hullámhossz közötti fotonok elnyelésére képes kromofór csoportot tartalmaznak. Fémkomplexek esetében elnyelést okozhatnak a ligandum molekulán belüli

elektronátmenetei, a fémion d-d átmenetei, illetve a fémion és a ligandum közötti töltésátviteli (CT) sáv is. Dolgozatomban számos feladat megvalósításakor használtam UV-látható spektrofotometriás módszert, mint például EDTA-val történő ligandum-kiszorítási reakciók követésekor, különböző természetes eredetű redukálószerekkel történő reakciók kinetikai vizsgálatakor, lipofilitási és oldhatósági mérések során, de mindenekelőtt a ligandumok proton disszociációs állandóinak (K_a) meghatározására, és azok endogén fémionokkal való kölcsönhatásának feltérképezésére. A ligandumok vízben való rossz oldhatósága miatt a pH-potenciometriás mérések megvalósítására nem volt lehetőségünk, így az UV-látható spektrofotometria, mint elsődleges módszer, használata mellett döntöttünk, mely során jóval kisebb koncentráció mellett tudtunk proton disszociációs állandókat és stabilitási szorzatokat (β) meghatározni.

A mérésekhez többnyire Agilent Cary 8454, és Hewlett-Packard 8452A típusú diódasoros spektrofotométereket használtam. A mérések során a hőmérséklet 25,0 ± 0,1 °C volt. A pH-titrálásokhoz Metrohm Dosimat 665 típusú automata bürettát, Orion 710A pH-mérőt, illetve Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektródot használtam. Az üvegelektród kalibrálását kálium-hidrogén-ftalát oldatával végeztem (c = 0,05 M). A pH-potenciometriás mérőrendszer kalibrálása az Irving-féle módszerrel történt [127], mely során erős savat titráltam erős bázissal, és ennek segítségével meghatároztam az Irving-féle korrekciós faktort, valamint a vízionszorzatot (pK_w = 13,76 ± 0,01 tiszta víz esetén és pK_w = 14,52 ± 0,05 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyre) a Gran-módszert használó Abu9x nevű programmal [128].

A vas(II)ionokat tartalmazó rendszerek vizsgálatakor egy Jacomex laboratóriumi gloveboxban végeztem a méréseket, ahol az oxigéntartalom végig 1 ppm alatt volt. A vas(II)-törzsoldatot vaspor és HCl reakciója révén állítottam elő, szigorúan oxigénmentes argonatmoszférában. Az oldat koncentrációját pedig permanganometriás titrálással határoztam meg.

4.3.1. Egyensúlyi állandók meghatározása

A különböző pH-n rögzített spektrumok segítségével meghatároztuk a ligandumok proton disszociációs állandóit, a képződő komplexek összetételét és stabilitási szorzatait, valamint a moláris abszorbancia spektrumaikat. A ligandum protonálódását, és a komplexképződést a következő egyenlet (4) írja le, ahol M a fémion, L a ligandum, H a proton; p, q, r pedig a sztöchiometriai együtthatók:

$$pM + qL + rH \rightleftharpoons M_pL_qH_r \quad (4)$$

Felírhatjuk az $M_pL_qH_r$ komplex stabilitási szorzatát is (5):

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r} \quad (5)$$

A kiértékelés során a PSEQUAD programot használtuk [129], mely a következő anyagmérleg, valamint abszorbancia értékekre felírható egyenleteket használja fel a számoláshoz (6–9), ahol n a képződő asszociátumok számát, l az úthosszt, ε pedig a különböző hullámhosszakhoz (λ) tartozó moláris abszorbanciaértékeket jelöli.

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^{n} p_i \beta_{p_iq_ir_i} [M]^{p_i}[L]^{q_i}[H]^{r_i} \quad (6)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^{n} q_i \beta_{p_iq_ir_i} [M]^{p_i}[L]^{q_i}[H]^{r_i} \quad (7)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^{n} r_i \beta_{p_iq_ir_i} [M]^{p_i}[L]^{q_i}[H]^{r_i} \quad (8)$$

$$A_\lambda = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_{[M_pL_qH_r]} l\, [M_pL_qH_r] \quad (9)$$

Az EDTA-kiszorítási mérések állandó pH-n történtek (pH ~6), mely biztosítására MES puffert használtam. Egyedi mintákat készítettem, melyekben a fémion-ligandum mólarány állandó volt, továbbá az ionerősség a többi méréshez hasonlóan I = 0,1 M (KCl), míg az EDTA mennyiségét változtattam. A megfelelő várakozási időt követően, a reakció előzetes időfüggésének mérése alapján két óra elteltével felvettem az UV-látható spektrumokat. A rögzített spektrumokból kiszámítottuk a látszólagos stabilitási állandókat a PSEQUAD program segítségével. Ennek, valamint a ligandum proton disszociációs állandóinak ismeretében számítottuk a $[CuL]^+$ komplex stabilitási szorzatát (β), a 10–11 egyenletek alapján:

$$\beta[CuL]^+ = \beta'[CuL]^+ \times \alpha_H \quad (10)$$

$$\alpha_H = 1 + \frac{[H^+]}{K_a(HL)} + \frac{[H^+]^2}{K_a(HL) \times K_a(H_2L^+))} \quad (11)$$

Ezen állandó felhasználásával a további komplexek stabilitási szorzatai is kiszámíthatók, ha ismertek $[CuLH]^{2+}$ és $[CuL]^+$ pK_a értékei is (12–13):

$$lg\beta[CuLH]^{2+} = lg\beta[CuL]^+ + pK_a[CuLH]^{2+} \quad (12)$$

$$lg\beta[CuL(OH)] = lg\beta[CuL]^+ - pK_a[CuL]^+ \quad (13)$$

4.3.2. *Rézkomplexek reakciója redukálószerekkel*

Szintén UV-látható spektrofotometria segítségével vizsgáltam a réz(II)-, és vas(III)komplexek aszkorbinsavval és glutationnal történő redukciójának időbeli lefutását szigorúan oxigénmentes körülmények között, pH = 7,4-en, HEPES pufferben. Oxigénmentesítés céljából minden oldaton 10–15 percig argont buborékoltattam át, majd az elkészült mintákat argon atmoszféra alatt tároltam a mérés elvégzéséig. A redukciós vizsgálatokhoz tandemküvettát használtam. Az első spektrum felvételéhez a küvetta egyik felébe került a vizsgálni kívánt fémkomplex, míg a másik felébe a redukálószer. Ezután összeráztam a tandemküvetta tartalmát, elindítottam az időmérést, és biztosítottam az oxigénmentes körülményeket azáltal, hogy argont vezettem az oldat fölé: a gumidugókat fecskendőtűkkel átszúrtam. A számítások során a kezdeti sebességek módszerét alkalmaztuk a redukálószer nagy feleslege mellett, és ábrázoltunk az $\ln(A/A_0)$ értékeket az idő függvényében, majd a kezdeti szakasz egyenesének meredeksége megadta a pszeudo-elsőrendű sebességi állandót.

4.3.3. *Lipofilitás, oldhatóság és permeábilitás jellemzése*

A lipofilitás meghatározását a klasszikus *n*-oktanol/víz közti megoszlás alapján végeztem UV-látható spektrofotometriás detektálás mellett, pH = 7,4-en, foszfát puffer alkalmazása mellett. A két fázis elválasztása után felvettem a vizes és az oktanolos fázis, valamint az eredeti törzsoldat spektrumát is. A spektrumok alapján kiszámítottuk a megoszlási hányadost ($D_{7,4}$), az alábbi képletek szerint, attól függően, hogy *n*-oktanolban (14) vagy a vizes foszfát pufferben (15) készült a kiindulási törzsoldatunk:

$$D_{7,4} = \frac{\mathrm{Absz}_{\text{okt.fázis megoszlás után}} / \mathrm{Absz}_{\text{okt.}\mathit{törzsoldat}}}{1 - \mathrm{Absz}_{\text{okt.fázis megoszlás után}} / \mathrm{Absz}_{\text{okt.}\mathit{törzsoldat}}} \cdot \frac{V_{vizes\ fázis}}{V_{oktanolos\ fázis}} \quad (14)$$

$$D_{7,4} = \left[\frac{\mathrm{Absz}_{\text{vizes}\ \mathit{törzsoldat}}}{\mathrm{Absz}_{\text{vizes}\ \mathit{fázis\ a\ megoszlás\ után}}} - 1\right] \cdot \frac{V_{vizes\ fázis}}{V_{oktanolos\ fázis}} \quad (15)$$

A ligandumok és a komplexek termodinamikai oldhatóságát (S) telített vizes oldatokra mértem pH = 7,0-en, 10 mM HEPES pufferben. A vegyületek koncentrációját UV-látható spektrofotometriás módszerrel határoztam meg, a kalibráláshoz pedig ismert koncentrációjú törzsoldatokat használtam 100, 50 és 25% (v/v) DMSO/vizes puffer oldószerelegyben.

A ligandumok és komplexek membrán permeábilitásának feltérképezéséhez úgynevezett PAMPA vizsgálatokat végeztem (*'Parallel Artificial Membrane Permeability Assay'*, azaz párhuzamos mesterséges membrán áteresztőképességi teszt) egy előre bevont Corning Gentest lemezrendszerrel [130]. Ebben a vizsgálatban 15 mM HEPES-t (0,1 M KCl) használtam donor és akceptor puffer oldatként. A kezdeti ligandum törzsoldatokat tiszta vízben (250 μM) készítettem el. A donor fázist a ligandum/komplex, a puffer és a KCl összekeverésével kaptam. A komplexek esetében első lépésként összekevertem a ligandumot és a fémsó oldatot 1:1 mólarányban, majd ezt követte a puffer és a KCl oldat hozzáadása a következő lépésben. A donor lemezt megtöltöttem 300 μl donor oldattal, míg az akceptor lemez 200 μl puffert tartalmazott. A mintákat 25 ^{o}C-on 5 órán át inkubáltam. Végül rögzítettem az UV-látható spektrumokat mind a donor, mind az akceptor fázist esetén. Az effektív permeábilitás (P_{eff}) értékeket Yu és munkatársai [131] által közölt egyenlet alapján számítottuk ki.

4.4. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A fényre jellemző az a tulajdonság, miszerint a haladási irányára merőleges térerősség vektorainak intenzitása periodikus változást mutat. Lineárisan polarizált fényről akkor beszélhetünk, ha a térerősség vektorok egy azonos sík mentén mozognak. Ez a polarizált fény pedig felbontható két azonos intenzitású, de ellentétesen polarizált fénysugárra. A módszer alapját az a jelenség adja, hogy a lineárisan polarizált fény egy optikailag aktív (az egyik cirkulárisan polarizált alkotót nagyobb mértékben elnyelő) anyagon való áthaladás után fázisában és amplitúdójában is különbözni fog a beeső sugártól. Az amplitúdó megváltozása elliptikusan polarizált fényt eredményez, melynek mértékét az ellipticitással (θ) tudjuk leírni (16), ahol b és a az ellipszis kis- és nagytengelyének hossza:

$$\tan \Theta = \frac{b}{a} \quad (16)$$

A mérések során alkalmazott spektrométerekben a mért érték a balra és jobbra cirkulárisan polarizált fénysugarak abszorbanciájának különbsége (ΔA), ám a két mértékegység közti átváltás eredményeként az alábbi összefüggés írható fel (17):

$$\Theta = 32{,}98 \times \Delta A \quad (17) \text{ [132]}$$

Cirkuláris dikroizmus akkor jelentkezik, ha a vegyület királis kromofór csoportokat tartalmaz, vagy, ha a kiralitáscentrum az UV-látható tartományban elnyelő csoportok

egymás közelében vannak. Fémkomplexek vizsgálatakor az optikai aktivitás felléphet a koordinálódó ligandum szerkezetének következtében, a központi fémion aszimmetriája miatt, illetve akirális ligandum koordinációja esetén is, ha a képződő fémkomplex optikailag aktív. A CD sávok az UV-látható abszorpciós sávokhoz hasonlóan karakterisztikusak a koordinációs módra, így információt nyerhetünk a koordinálódó donoratomok típusáról, számáról, illetve a geometriáról is. A CD-spektroszkópiás kísérleteket egy JASCO-J-1500 spektrométerrel, 1 cm-es úthossz alkalmazásával végeztük. A réz(II)ionok koncentrációja 500 μM volt, 1:1 és 1:2 fémion/ligandum mólarány mellett, 30% (v/v) DMSO/víz oldószer elegyben.

4.5. Spektrofluorimetria

A mérés alapját a fotolumineszcencia jelensége képezi, mely során bizonyos vegyületek az UV-látható sugárzás hatására gerjesztődnek, az elnyelt energiát pedig fény formájában sugározzák ki. A módszer előnye nem csupán az, hogy kis koncentrációjú mintákat igényel, de nagy szelektivitással is bír. A méréseket igen híg oldatban kell végezni az esetlegesen fellépő önabszorpció és belső filter hatás elkerülése érdekében, azonban, ha ez mégis jelentős, akkor korrigálni kell a mért intenzitásokat a következő képlet (18) segítségével, ahol az Int_{korr} és az $Int_{mért}$ a korrigált és a mért intenzitás értékek, A_{EX} és A_{EM} pedig az abszorbancia a besugárzás és a detektálás hullámhosszán:

$$Int_{korr} = Int_{mért} \times 10^{\frac{A_{EX}+A_{EM}}{2}} \quad (18)$$ [133]

A módszer alkalmas lehet olyan molekulák vizsgálatára, melyek merev, planáris szerkezetűek, és tartalmaznak többszörösen konjugált kettős kötést, aromás jellegűek. Így a módszer akár az UV-látható spektrofotometriás titrálások analógiájára alkalmas lehet proton disszociációs állandók meghatározására is, továbbá ligandumok fehérjékkel [134], DNS-sel való kölcsönhatásának vizsgálatára.

Az etídium-bromid (EB) egy fluoreszcens molekula, amely a DNS nukleotidbázisai közé képes interkalálódni, mely során az emissziós intenzitás jelentősen növekszik. A mérések során a DNS-t és etídium-bromidot 4:1 mólarányban tartalmazó mintákban változtattam a komplexek koncentrációját. Az emissziós intenzitás csökkenése azt jelenti, hogy a kötött EB koncentrációja is lecsökkent. Erre a legegyszerűbb magyarázat a fémkomplex interkalálódása, és a szabad EB megjelenése, de lehetséges a DNS szerkezetének változása a kölcsönhatás miatt, ami az EB kötődését gátolja a bekövetkező

szerkezeti torzulás által. Szerkezeti átrendeződés is történhet a megkötődés hatására, ami miatt a kötött EB fluoreszcenciája kioltódik, de ekkor nem szabadul fel EB. Mindhárom folyamat a fémkomplex megkötődését jelzi az intenzitás csökkenésén keresztül. A mért spektrumokat SOLVER (Excel) segítségével bontottuk fel, hogy megkapjuk a szabad és kötött EB móltörtjét. Méréseinkhez egy Fluoromax (Horiba Jobin Yvon) típusú fluorimétert használtam, 1 cm úthossz alkalmazásával.

4.6. Elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia

Az elektronspin-rezonancia spektroszkópia paramágneses anyagok esetén alkalmazható szerkezetvizsgáló módszer. Az alapállapot energiaszintjei a külső mágneses tér nélkül, spin szerint degeneráltak, mely azután a külső mágneses térben megszűnik. Ha az anyagot egy a mágneses térre merőlegesen polarizált mikrohullámú térbe helyezzük, és a sugárzás frekvenciája, valamint a mágneses indukció értéke egy jól meghatározott arányt vesz fel, abszorpció mérhető. A molekulákban azonban a párosítatlan elektron kölcsönhatásba kerülhet a molekula mágneses magjaival is, mivel nem csupán a külső mágneses teret érzékeli, így az energiaszintek tovább hasadnak (hiperfinom kölcsönhatás). Szuperhiperfinom kölcsönhatásnak nevezzük azt a kölcsönhatást, amely a nullától eltérő magspinnel rendelkező ligandum magok által létrehozott belső mágneses tér, valamint a párosítatlan elektron között lép fel. Ha a párosítatlan elektron nem gömbszimmetrikus pályán helyezkedik el, akkor a kölcsönhatások irányfüggőek lesznek, így azokat tenzorokkal tudjuk leírni, azonban folyadékban a molekulák gyors forgása miatt a tenzorok irányfüggése megszűnik, és csak a főértékeiknek átlaga mérhető.

A réz(II)ion [Ar]$3d^9$ elektronkonfigurációjú, és egyetlen párosítatlan elektronnal rendelkezik. A Jahn-Teller-effektus értelmében degenerált alapállapotot eredményező molekulaszerkezet nem lehet stabilis, ezért a szimmetria torzul: a z-tengely mentén lévő ligandumok távolabb vagy közelebb kerülnek a központi fémiontól, ami a d-szintek további felhasadásához vezet. A réz(II)komplexek többségében a legstabilisabb állapot a megnyúlt oktaéderes szerkezet, amikor alapállapotban a párosítatlan elektron a $d_{x^2-y^2}$ pályán helyezkedik el. Mivel a réz(II) magspinje 3/2, az átmenethez tartozó egyetlen rezonancia jel négy vonalra hasad (hiperfinom felhasadás). A spektrumban további (szuperhiperfinom) felhasadást okozhatnak az ekvatoriálisan koordinálódó, és nem nulla magspinű donoratomok, mint például a nitrogén.

A spektrumokat különböző pH-értékeken vettük fel egy CW-EPR BRUKER EleXsys E500 spektrométerrel (9,45 GHz, 13 mW, 5 G, 100 kHz), Dr. May Nóra V. (HUN-REN TTK, Budapest) segítségével. A ligandumot és réz(II)ionokat 1:1 és 1:0,5 mólarányban tartalmazó mintákat (c_L = 0,5 mM) 30% (v/v) DMSO/víz elegyben készítettem el. A fagyasztott ESR-spektrumokat 0,2 ml-es mintákra vettük fel, kvarc ESR-csöveket használva (minden mintához 0,05 ml metanolt adtunk, hogy elkerüljük a víz fagyasztáskor történő kristályosodását), 77 K hőmérsékleten. A megfagyasztott minták spektrumainak kiértékeléséhez az EPR programot [135] használtuk, amely pontonkénti értékelést végez, azaz minden spektrumot külön-külön illesztettünk. Mivel a fagyasztott oldatokban a molekulák orientációja a térhez képest rendezetlen, de a helyzetük a mérés során állandó, így a spektrum a különböző orientációjú molekulák spektrumainak összege lesz, az ESR-paraméterek szögfüggése pedig megjelenik a spektrumban (pl. rombos szimmetria esetén az x, y és z irányokban három különböző *g*- és *A*-érték mérhető). A vonalszélességet leíró paramétereket a három irányban külön α, β, γ paraméterekkel illesztettük. A program a jelintenzitás térfüggését az egyes komplexek egyedi spektrumainak illesztésével veszi figyelembe, majd a komponens görbéket összegzi az adott spektrumra számolt koncentrációjuk arányában.

4.7. Mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia

Mágneses magrezonancia spektroszkópia a diamágneses anyagok esetén alkalmazható módszer, mely a mágneses mag és a külső mágneses tér kölcsönhatásának vizsgálatán alapul. Ahogyan az ESR spektroszkópia esetén, itt is nagyban befolyásolja a mag körüli lokális mágneses tér a mért jelet, mely az információt szolgáltatja, azonban ebben az esetben a mag körüli elektroneloszlást egy árnyékolási tényezővel jellemezzük. Ez az árnyékolási tényező más és más különböző kémiai környezetben lévő magok esetén, így azok rezonanciafrekvenciája is eltérő lesz, amely Hz-ben mérhető eltéréseket jelent a spektrumban, létrehozva a finomszerkezetet, amit felhasználhatunk kvalitatív vizsgálatokra, valamint a jelek multiplicitása információt ad a szomszédos magok számáról is, intenzitásuk pedig arányos a jelet adó magok számával, így a jeleket integrálva információt kaphatunk a szerkezetről. ^{1}H NMR spektroszkópiával követni tudtuk a ligandumok deprotonálódási folyamatait is, ugyanis a nem labilis CH protonok jelei függenek a szomszédos csoportok protonáltsági állapotától. A ^{1}H NMR titrálások során a pH változtatása mellett rögzítjük a spektrumokat, így a deprotonálódást érzékelő csúcsok pozíciója szigmoidális görbe szerint változnak a pH-függvényében (a gyors

cserefolyamatnak köszönhetően), melyből a pK_a számolható. Mindezek mellett nem csupán ligandumok proton disszociációs állandóinak meghatározására alkalmas a módszer, hanem a fémkomplex stabilitási állandója is meghatározható a jelek integráljaiból számolt jelarányok felhasználásával a lassú ligandumcsere folyamatoknál, amikor is a komplexekben kötött és szabadon lévő ligandumformákhoz tartozó jelek elkülönülnek a spektrumban.

A méréseket Bruker Ultrashield 500 Plus (500 MHz) típusú műszeren végeztem. Az NMR titrálások során 0,2–1,0 mM-os koncentrációtartományban dolgoztam, 0,1 M KCl ionerősség mellett, továbbá a minták 10% (v/v) D_2O-t tartalmaztak a tiszta vizes mérések esetén, és 30% (v/v) DMSO-d_6-t a 30% (v/v) DMSO-s rendszerek esetén. A ligandum titrálások mellett 1:1 és 1:2 mólarányú Zn(II):ligandum minták is készültek. Referenciaként minden mérés során 4,4-dimetil-4-szilapentán-l-szulfonsavat (DSS) alkalmaztam. Az NMR spektrumok megjelenítéséhez a MestReNova [136], míg az egyensúlyi állandók számításához a PSEQUAD [129] nevű programot használtuk.

4.8. Ciklikus voltammetria

A mérés során a potenciált folyamatosan változtatjuk egy adott pásztázási sebességgel, miközben mérjük az áramot a munkaelektród és a segédelektród között, a potenciált pedig a munka és a referenciaelektród között. Ha csökken a potenciál, az oxidált forma redukálódik, ami miatt áram indul. Ez az áram akkor éri el a maximumot, amikor a feszültség eléri a redukciós potenciált. Ahogy csökken a komplex koncentrációja az elektród felületének közelében, úgy csökken az áram is. Ha a potenciált növelni kezdjük, akkor az előzőekhez képest fordított folyamat játszódik le, tehát az előzőleg képződött forma oxidálódik, ami az anódos áram megjelenését eredményezi a voltammogamon, ami ismét lecsökken, ahogy a koncentráció is csökkenni kezd az elektród közelében. A voltammogramon így alapesetben két csúcs megjelenését várhatjuk, egy katódos (E_p^k) és egy anódos (E_p^a) csúcsét, ahol a potenciálkülönbség felírható a kettő különbségeként (19), ahol n az elektronok számát jelöli. Reverzibilis redoxi párokról beszélhetünk, ha egy elektron átmenetekor a potenciálkülönbség 59 mV.

$$\Delta E = E_p^a - E_p^k = \frac{59}{n} \quad (19)$$

A méréseket egy számítógép vezérelt Autolab-PGSTAT 204 típusú elektrokémiai mérőműszerrel végeztem. Az elektrokémiai rendszer felépítéséhez platina munka-, és

segéd-, valamint Ag/AgCl/ 3 M KCl referencia elektródot használtam. Oxigénmentesítés céljából a mérések előtt minden mintán lúgos pirogallolos mosón átvezetett argont áramoltattam át, 10 percen keresztül. A pásztázási sebességet 5–25 mV/s tartományon belül változtattam. A rendszer állapotát $[Fe(CN)_6]^{3+}$ 0,01 M koncentrációjú kalibráló oldatával ellenőriztem, minden mérés előtt a –2,0 és +5,5 mV-os potenciál tartományban ($K_3[Fe(CN)_6]$ ($E_{1/2}$ = +0,458 V vs. NHE) [137]). A mérendő oldatokat különböző DMF vagy DMSO/víz elegyben készítettem el, 0,1 M-os ionerősség mellett (TBAN vagy KCl) pH = 6–8 tartományban. Általánosságban elmondható, hogy a fémion és a ligandum mólarány a rézkomplexnél 1:1, a vaskomplex esetén 1:2 volt, de egyes rendszereknél ettől eltértem. A mért potenciálokat átszámítottam normál hidrogén elektródra (NHE) +210 mV hozzáadásával.

4.9. *Spektroelektrokémiai mérések*

Az *in situ* UV-látható spektroelektrokémiai méréseket egy Avantes spektrométeren, AvaSpec-UL2048XL-EVO fényforrással felszerelt AvaLight-DHc a spektroelektrokémiai cellakészletben (AKSTCKIT3) végeztem, Pt-mikrostrukturált „honeycomb” munkaelektródal, amelyet a Pine Researchtől vásároltunk (ld. ciklikus voltammetriás mérések). A cella optikai szálakkal volt összekötve a diódasoros spektrofotométerrel egy CUV-UV küvettatartóban. A spektrumok feldolgozására pedig az AvaSoft 8.1.1 szoftvercsomagot használtuk [138].

4.10. *Ultraszűrés*

Az ultraszűrés segítségével vizsgálhatjuk a kismolekulák DNS-sel való kölcsönhatását. A módszer lényege, hogy a makromolekulákhoz kötött, valamint a szabad kismolekulákat elválasszuk egymástól egy membránszűrő segítségével, centrifugális erő hatására. A centrifugálást követően megkapjuk a szűrőn átjutó részt (LMM-„*low molecular mass*”, amely a kismolekulájú, szabad frakció), és a szűrőn fennmaradó részt (HMM-„*high molecular mass*”, amely a makromolekulához kötött frakció). Az elválasztást követően mindkét frakció összetétele vizsgálható UV-látható spektrofotometriával. Az ultraszűréshez egyszer használatos Millipore Amicon Ultra-0.5 (10 kDa) membránszűrőt használtam, a mintákat Eppendorf MiniSpin Plus vagy Sanyo Harrier 18/80 termosztálható centrifugával centrifugáltam 10000 rpm fordulatszámon 10 percig. A mintákat 800 µl térfogatban készítettem el, melyekben a réz(II)komplex koncentrációja 200 µM, a ct-DNS-é 170 µM, az etídium-bromidé 50 µM volt. A minták

pH-ját 7,40-re állítottam be 10 mM HEPES puffer segítségével, 4 mM KCl mellett. A szétválasztott minták LMM frakcióját egy Agilent Cary 8454 spektrofotométerrel vizsgáltam.

4.11. In vitro citotoxicitási vizsgálatok

A dolgozatomban tárgyalt ligandumok és fémkomplexeik sejtosztódás gátló hatását felező hígítással határoztuk meg. MTT módszert alkalmaztunk, mely során azt a tulajdonságát használtuk ki a tetrazóliumsónak, hogy a metabolikusan aktív sejtekben a mitokondriális dehidrogenáz enzim hatására kék színű formazán kristályokká alakul. Az élő sejtek kék színűek lesznek, sárgák pedig a már nem élők, így tehát könnyedén megkülönböztethetők a mikrotiter lemezen. A 96 lyukú lemezeken (Starlab, Hamburg) a második oszlop sejtkontrollként szolgált (100 µl térfogatban sejtek és 100 µl RPMI-1640 tápfolyadék), ami a kezeletlen sejteket jelenti. A lemez első, vagy utolsó oszlopa a tápfolyadék kontrollt jelentette, ahová csak a sejt nélküli tápfolyadékot mértük (100 µl RPMI-1640 tápfolyadék). A harmadik oszloptól kezdve pedig a vizsgált vegyületekből felező hígítási sort készítettünk RPMI-1640 tápfolyadékban, melyből szintén 100 µl-t adtunk a sejtekhez. A citotoxicitási vizsgálatokat kétféle inkubációs idő esetén végeztük el: 72 órás (Colo205, Colo320, MCF-7 és MRC-5 sejtvonalak) és 96 órás (CH1/PA-1, SW480, A549 sejtvonalak) méréseket végeztünk. A 72 órás inkubációs idejű méréseket Dr. Spengler Gabriella és munkatársai (SZTE, Orvosi Mikrobiológai Intézet) végezték, ezért ezeket a továbbiakban nem részletezném (azonban eredményeik értelmezése a dolgozatom részét képezi), míg a következőkben a 96 órás inkubációs időt alkalmazó mérést mutatnám be, mivel ezen méréseket én végeztem a VLX600 és származékai esetén, Dr. Michael Jakupec laboratóriumában a Bécsi Egyetem, Szervetlen Kémia Intézetében. A sejtszámot itt úgy állítottuk be, hogy egy lyuk az A549 sejtvonal esetén 3000, az SW480 esetén 2000, míg a CH1/PA-1 esetén 1000 sejtet tartalmazzon. A lemezeket 37°C hőmérsékleten 5% CO_2 tenzió mellett 96 óráig inkubáltam termosztátban. Az inkubáció után eltávolítottam a tápoldatot, és azt 100 µl MTT-oldattal (5 mg/ml) helyettesítettem, melyet előzőleg 1:7 térfogatarányban hígítottam RPMI 1640 tápközegben (4 mM L-glutaminnal kiegészítve). 4 óra inkubációt követően 150 µl DMSO-val helyettesítettem a tápközeget, hogy feloldjam az életképes sejtek által képződött formazánterméket. Az 550 nm-en (és referenciaként 690 nm-en) mért optikai denzitását (OD) mikrolemez-leolvasóval (ELx808, BioTek, Winoosky, VT, USA) Gen5TM 3.08 szoftverrel (BioTek) végeztem. Meghatároztuk a lemezek optikai denzitását és kiszámítottuk az IC_{50} értéket GraphPad Prism szoftverrel

[139]. Az IC_{50} érték azt a koncentrációt jelöli, ahol a sejtek 50%-a elpusztul a kontrollhoz viszonyítva. A számolások során a viabilitási %-ot (20) ábrázoljuk a koncentráció logaritmusának függvényében, majd a kapott pontsort a GraphPad Prism segítségével illesztve megkapjuk az IC_{50} értéket.

$$viabilitás\ \% = 100 - \left[\frac{OD_{minta} - OD_{tápfolyadék\ kontroll}}{OD_{sejt\ kontroll} - OD_{tápfolyadék\ kontroll}}\right] \times 100 \quad (20)$$

A dolgozatban tárgyalt, de fentiekben nem felsorolt vegyületeknél a citotoxicitást, és egyéb biológiai méréseket együttműködő partnereink végezték: 3AP, Dp44mT, O-3AP, $HQNO_2$-L-Pro (Dr. Spengler Gabriella és kutatócsoportja, SZTE, Orvosi Mikrobiológiai Intézet), STSC, SSC FTSC, PTSC, H_2NNHMe, H_2NNMe_2, $MeHNNMe_2$, Me_2NNH_2, Me_2NNHMe, Me_2NNMe_2, DpC, COTI-2, COTI-NMe_2, COTI-NMeCy, COTI-NH_2 (Dr. Petra Heffeter és kutatócsoportja, Medical University of Vienna), L^{1-8} ligandumok, LC1, LC2 és LC3 (Dr. Isabel Correia, University of Lisbon).

4.12. Apoptózis indukció vizsgálata

A programozott sejthalál, más néven apoptózis kulcsszerepet tölt be a homeosztázis megőrzésében sejt-, és szövetszinten is. A folyamat során általában diszkriminatív, kaszkádszerű változások következnek be, melyek közül kiemelném a foszfatidil-szerin (PS) membrán külső felszínre kerülését, amely a membrán foszfolipidekben történő változások során következik be. Apoptózis indukciót a VLX600 és származékai, illetve a VLX600 különböző fémkomplexei esetében vizsgáltam. A mérések során fluoreszcein-izotiocianát-konjugált (FITC) annexin V foszfolipidkötő fehérjét használtam a PS megkötésére ($\lambda_{ex/em}$ = 495/519 nm), a fluoreszcens jelet pedig áramlási citometriával detektáltam, köszönhetően a fluoreszcens szubsztrátnak. Propídium-jodidos (PI) kettős festést ($\lambda_{ex/em}$ = 535/617 nm) alkalmaztam, mivel azoknál a sejteknél is megfigyelhető a PS áthelyeződés, amelyek nekrotikusak vagy már elpusztultak. A CH1/PA-1 sejteket 24 lyukú lemezekre vittem fel (7×10^4 sejt/lyuk), 600 µl MEM-ben, és 24 órán át inkubáltam őket. Ezután a sejteket különböző koncentrációjú vegyületekkel kezeltem 0,2 µM, 1 µM, 5 µM és 25 µM koncentrációkban 24 órán át. A kezelés után a tápközeget összegyűjtöttem, és a sejteket mostam 37 °C-os 'phosphate buffered saline' (PBS) foszfát pufferes sóoldattal, majd a sejtszuszpenziót is hozzáadtam az előzőleg összegyűjtött tápközeghez, és a sejteket centrifugálással ülepítettem (300 g, 3 perc). A felülúszót eltávolítottam, és a sejtüledéket 1,5 µl FITC-konjugált annexin V-vel újraszuszpendáltam 150 µl úgynevezett „binding

buffer”-ben (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl és 2,5 mM $CaCl_2$), fénytől védve, majd 37 °C-on inkubáltam, 15 percig. A sejteket ezt követően PI-vel festettem (1,0 µl 150 µl „binding buffer”-ben), és a guava easyCyte 8 HT áramlási citométer (Millipore) és az InCyte szoftver [140] segítségével gyűjtöttük és elemeztük az adatokat. Az eredményeket a FlowJo 10.6.1 szoftver [141] használatával számszerűsítettük. Legalább három független kísérletet végeztünk minden esetben. A méréseket Dr. Michael Jakupec (Bécsi Egyetem, Szerveten Kémia Intézet) irányításával tanulmányutam során végeztem.

4.13. Reaktív oxigénrészecskék termelődésének mérése

A reaktív oxigénrészecskék sejtbeli szintjének nyomon követésének első lépéseként az SW480 és CH1/PA-1 sejteket vittem fel 96 lyukú lemezekre ($2{,}5\times10^4$ sejt/lyuk) 100 µl/lyuk térfogatban. 24 órás előinkubálást követően a sejteket 200 µl HBSS sóoldattal (1% FBS-t tartalmazó) mostam, és 100 µl 25 µM DCFH-DA oldattal inkubáltam 45 percig 37 °C-on. Az inkubáció után a DCFH-DA oldatot eltávolítottam, és a sejteket 200 µL HBSS-el mostam. A sejteket kezeltem ligandummal (VLX600), illetve 1 ekv. $CuCl_2$, 0,5 ekv. $ZnCl_2$ és 0,5 ekv. $FeCl_3$ hozzáadása mellett is, vizsgálva a kialakuló komplexek ROS termelő képességét. Négy különböző koncentrációt alkalmaztam a 0,2–25 µM tartományban, a mintákat 200 µl fenolvörös-mentes Opti-MEM-ben (1% FBS-sel) hígítva, három párhuzamos mintát készítve. Vakmintaként 1% FBS-t tartalmazó fenolvörös-mentes Opti-MEM táptalajt használtam, míg a negatív kontroll a nem kezelt sejteket és fenolvörös-mentes tápközeget tartalmazta, a pozitív kontrollok pedig a 200 µM és 400 µM terc-butil-hidroperoxiddal kezelt sejteket tartalmazó minták voltak. A fluoreszcencia emissziót 2 órán keresztül mértem 10 perces időközönként BioTek Synergy HT készülékkel (gerjesztés: 485/20 nm, emisszió: 516/20 nm). Ezeket a méréseket is Dr. Michael Jakupec segítségével végeztem.

4.14. További kiegészítő mérések

A tioszemikarbazonok rézkomplexeinek *DNS hasítási és TopoIIα enziminhibíció méréseit* Gyurcsik Béla munkacsoportja (SZTE, Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék) végezte.

Egykristály röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás: Az általam előállított VLX600 különböző fémionokkal képzett komplexeinek egykristályaiból együttműködő partnereink röntgenkrisztallográfia segítségével pontos szerkezetmeghatározást végeztek egy Stadivari diffraktométer segítségével (University of Vienna). A COTI-2 fémkomplexei esetén az egykristályokat én állítotam elő, a röntgenkrisztallográfiai méréseket együttműködő partnerünk végezte egy Bruker D8 Venture diffraktométer segítségével (University of Vienna). Az LC1-3 fémkomplexeihez tartozó röntgenszerkezeteket szintén együttműködő partnereink határozták meg egy Bruker D8 Quest Eco háromkörös diffraktométer segítségével (University of Lisbon).

Az általam végzett egykristályok növesztése az alábbi módon történt:

- A Cu(II)-COTI-2 komplex esetén metanol lassú párologtatásával állítottam elő a kívánt egykristályokat.

Kiválasztott kötéshosszak (Å) és kötési szögek (°) a Cu-COTI-2 (CCDC: 2015907) esetén: (a C-C egyszeres kötés kötési pontossága 0,0030 Å), két különböző típusú Cu−Cl kötés fordul elő: Cu1−Cl1 2,255(8) Å, Cu1− Cl1′ (1−X,−Y,−Z) 2,748(6) Å. További kiválasztott kötéshosszak (Å) és kötési szögek (°): N1-Cu 2,029(9) Å, N2-Cu 1,961(3), S1-Cu 2,268(2) Å, Cu···Cu 3,52; Cl−Cu1−Cl′ 91,2, Cl−Cu−S 97,8, N1− Cu−N2 80,9, N2−Cu−S 84,2, N1−Cu1−Cl 96,3.

- A VLX600 ligandum esetén a röntgendiffrakciós minőségű egykristályokat etil-acetát metanolba történő gőzdiffúziójával állítottam elő.

Kiválasztott kötéshosszak (Å), kötési és torziós szögek (fok) a VLX600 ligandum (CCDC: 2245577) esetén: C6–N2 1,311(3), N2–N3 1,374(3), N3–C8 1,380(3), C8–N4 1,335(3), C8–N7 1,353(3), N7–N6 1,363(3) Å; ∠C5–C6–N2 127,2(2), C6–N2–N3 119,1(2), N2–N3–C8 118,0(2), N3–C8–N7 113,1(2), N3–C8–N4 118,4(2)°; ∠C5–C6–N2–N3 0,91, N2–N3–C8–N7 -177,76, N2–N3–C8–N4 1,45°.

- A VLX600 komplexei esetén a szilárd formában előállított komplexből növesztettem metanolos oldatából lassú etil-acetát diffúzióval.

Kiválasztott kötéshosszak (Å), kötési és torziós szögek (fok) a VLX600 ligandum vas(II)komplexének (CCDC: 2245566) esetén ($[Fe(II)(LH)_2](NO_3)_2$): Fe–N1 1,9614(18), Fe–N2 1,8814(19), Fe–N7 1,9288(18), C6–N2 1,309(3), N2–N3 1,366(2), N3–C8 1,366(3), C8–N4 1,341(3), C8–N7 1,357(3), N7–N6 1,359(2) Å; ∠N1–Fe–N2 80,51(8), N2–Fe–N7 81,33(8), N1–Fe–N7 161,82(8), C5–C6–N2 110,2(2), C6–N2–N3 122,9(2), ∠N2–N3–C8 113,78(19), N3–C8–N7 114,6(2), N3–C8–N4 118,2(2) °; ∠C5–C6–N2–N3 179,76(17), N2–N3–C8–N7 -2,7(3), N2–N3–C8–N4 176,17(18) °.

Kiválasztott kötéshosszak (Å), kötési és torziós szögek (fok) a VLX600 ligandum réz(II)komplexeinek (CCDC: 2261411 és 2245574) esetén ($[Cu(LH)Cl_2]$ és [Cu(L)ClMeOH]): $[Cu(LH)Cl_2]$: Cu–N1 1,995(3), Cu–N2 1,961(3), Cu–N4 1,997(3), Cu–Cl1 2,2633(11), Cu–Cl2 2,5141(12), C6–N2 1,287(5), N2–N3 1,376(4), N3–C8 1,320(5), C8–N4 1,389(5), C8–N7 1,357(5), N7–N6 1,352(4) Å; ∠N1–Cu–N2 80,38(13), N2–Cu–N4 77,73(13), N1–Cu–N4 155,04(14), C5–C6–N2 113,5(3), C6–N2–N3 121,1(3), N2–N3–C8 108,2(3), N3–C8–N7 118,9(4), N3–C8–N4 121,8(4) °; ∠C5–C6–N2–N3 175,7(3), N2–N3–C8–N7 178,3(4), N2–N3–C8–N4 -0,6(6)°.
[Cu(L)ClMeOH]: Cu–N1 2,0041(17), Cu–N2 1,9588(16), Cu–N7 1,9654(17), Cu–Cl1 2,2458(6), Cu–O2 2,2677(15), C6–N2 1,286(3), N2–N3 1,361(2), N3–C8 1,345(3), C8–N4 1,358(2), C8–N7 1,379(2), N7–N6 1,340(2) Å; ∠N1–Cu–N2 80,12(7), N2–Cu–N7 78,45(7), N1–Cu–N7 157,72(7), C5–C6–N2 113,45(18), ∠C6–N2–N3 122,66(17), ∠N2–N3–C8 110,29(16), N3–C8–N7 118,77(18), N3–C8–N4 116,73(17)°; ∠C5–C6–N2–N3 -179,32, N2–N3–C8–N7 -1,27, N2–N3–C8–N4 178,63 °.

Kiválasztott kötéshosszak (Å), kötési és torziós szögek (fok) a VLX600 ligandum cink(II)komplexének (CCDC: 2245575) esetén ($[Zn(LH)Cl_2]$): Zn–N1 2,200(2), Zn–N2 2,133(2), Zn–N7 2,192(2), Zn–Cl1 2,2434(9), Zn–Cl2 2,2651(9), C6–N2 1,280(3), N2–N3 1,370(3), N3–C8 1,382(3), C8–N4 1,355(3), C8–N7 1,331(3), N7–N6 1,364(3) Å; ∠N1–Zn–N2 73,06(9), N2–Zn–N7 72,56(9), N1–Zn–N7 143,32(9), C5–C6–N2 113,6(3), C6–N2–N3 119,9(2), N2–N3–C8 114,7(2), N3–C8–N7 117,0(2), N3–C8–N4 114,2(3) °; ∠C5–C6–N2–N3 -178,41, N2–N3–C8–N7 -1,19, N2–N3–C8–N4 -179,26°.

Elemanalízis: Az elemanalízis méréseket a VLX600 és származékai esetén egy Eurovector EA 3000 CHNS-O elemanalizátorral végezték (University of Vienna).

Tömegspektrometria: A nagy felbontású tömegspektrumokat a VLX600 és származékai esetén egy Bruker maXis™ UHR ESI repülési idő tömegspektrométerrel mérték (University of Vienna).

Röntgen fotoelektron spektroszkópia (XPS): Az XPS-vizsgálathoz a szilárd mintát a VLX600 ligandum és a $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 2:1 arányú EtOH-ban 3 órán át 50 °C-on történő keverésével állítottam elő. Az XPS méréseket SPECS műszerrel végezték (Szegedi Tudományegyetem, Dr. Samu Gergely F.). A műszer egy PHOIBOS 150 MCD 9 típusú analizátorral volt felszerelve, amely FAT üzemmódban működött.

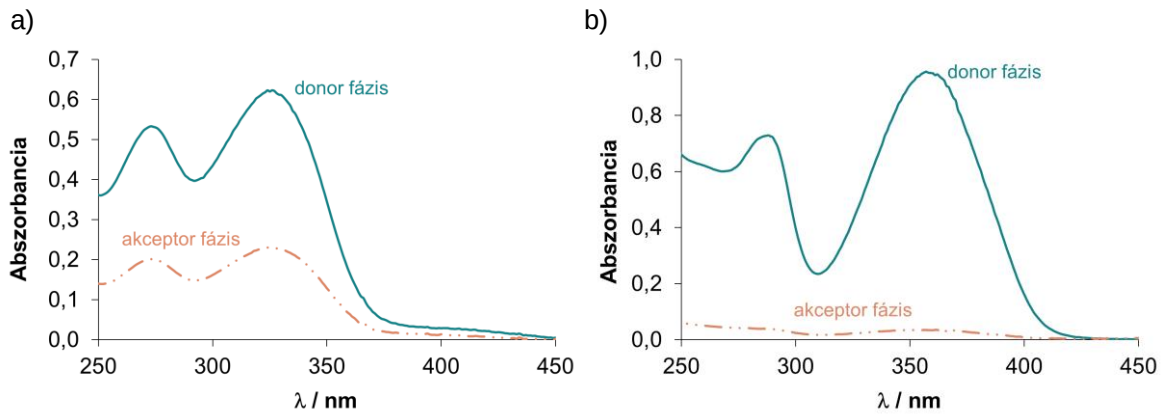
5. Eredmények

5.1. (Tio)szemikarbazonok vizsgálata

5.1.1. (Tio)szemikarbazon rézkomplex koordinációs módjának hatása az oldatkémiai tulajdonságokra

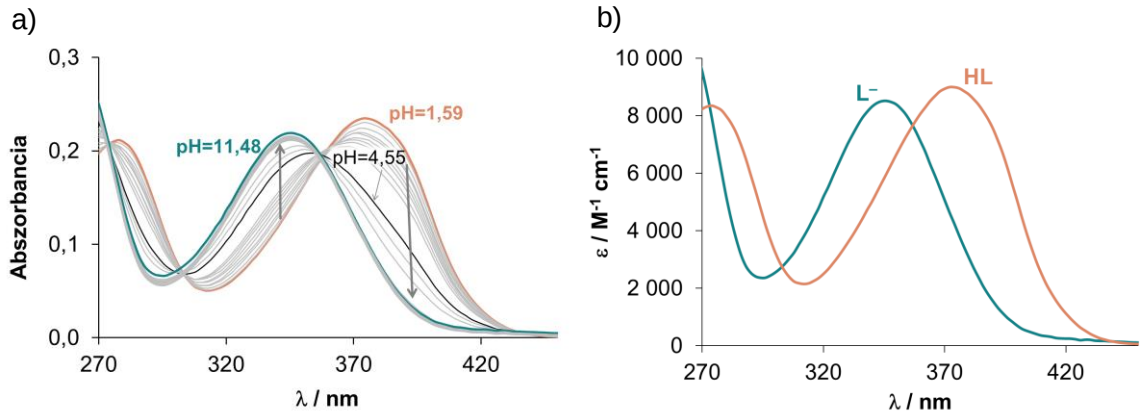
A (tio)szemikarbazonok legismertebb képviselője a 3AP (13. ábra), amely már klinikai vizsgálat (fázis I–III) alatt álló rákellenes gyógyszerjelölt. Ebben a fejezetben a 3AP mellett további (tio)szemikarbazonokat (Dp44mT, O-3AP, STSC, SSC, 13. ábra) vizsgáltunk, amelyek eltérő koordinációs móddal rendelkeznek (13. ábra). Kíváncsiak voltunk, hogy a koordinációs mód változtatása milyen hatással van a (de)protonálódási és réz(II)ionokkal való komplexképződési egyensúlyi folyamatokra, a citotoxicitásra, a DNS-kötő és hasító képességre, valamint a TopoIIα enzim gátlásra. Az (N,N,S), (N,N,O), (O,N,S) és (O,N,O) koordinációs módok hatását vizsgáltuk a fent említett tulajdonságokra összehasonlítható adatok alapján.

A ligandumok termodinamikai oldhatóságát pH=7,40-en és 25 °C-on határoztam meg, és az oldhatóságok (1. táblázat) az alábbi sorrendet mutatták: O-3AP > 3AP > SSC > STSC > Dp44mT. A ligandumok megoszlási hányadosait *n*-oktanol/víz közti megoszlásból számítottuk ki pH=7,40-en (1. táblázat). A $\lg D_{7,4}$ értékeket összevetve elmondható, hogy az O-3AP a leghidrofilebb karakterű, míg a Dp44mT és az SSC a leglipofilebbek. A szerkezeti változtatások hatását vizsgálva megfigyelhetjük, hogy a kén cseréje oxigénre csökkentette, míg a piridin-nitrogén fenolos-OH-ra való cseréje növelte a lipofilitást. A biológiai membránokon történő, passzív transzport révén való áthaladás modellezésére PAMPA vizsgálatokat végeztem. A donor és akceptor fázis elválasztását követően, felvettem azok UV-látható spektrumait (14. ábra), hogy ezekből meghatározzuk az effektív passzív permeábilitási (P_{eff}) értékeket. Sajnos a módszer egyik korlátja, hogy csak a lipofilebb ligandumoknál volt alkalmazható, mint az STSC, 3AP vagy a Dp44mT, ugyanis a kevésbé lipofil vegyületek csak olyan kismértékben jutottak át a membránon, hogy UV-látható spektrofotometriával nem voltak detektálhatóak. A számolt effektív permeábilitásokat az 1. táblázat tartalmazza, melyek összhangban vannak a korábban bemutatott oldhatósági és lipofilitási mérések eredményeivel. A legnagyobb állandó a Dp44mT-t jellemzi, ami alapján ez a ligandum lehet képes leginkább áthatolni passzív transzport segítségével a biológiai membránokon.



14. ábra: a) A Dp44mT és b) 3AP különböző fázisaira rögzített UV-látható spektrumok a PAMPA kísérlet során: donor fázis (folytonos vonal), akceptor fázis (szaggatott vonal). {c_L = 50 uM; pH = 7,40 (c_{HEPES} = 15 mM); T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

Ahhoz, hogy meg tudjuk mondani, hogy egy hatóanyag milyen formában lehet jelen az élő szervezetben, fiziológiás körülmények között, ismernünk kell az aktuális protonáltsági állapotát és töltését, melyeket adott pH-n meg tudunk adni a pK_a értékek ismeretében. A proton disszociációs állandók meghatározását UV-látható spektrofotometriás titrálásokkal végeztem. Bizonyos egyensúlyi állandók már rendelkezésünkre álltak a szakirodalomból, azonban ezek nem tiszta vizes közegre vonatkoztak (a ligandumok korlátozott oldhatósága miatt), hanem 30% (v/v) DMSO/víz oldószerelegyre [80,142,143]. A vegyületek protonált formájukban két disszociábilis protont tartalmaznak, nevezetesen egy hidrazonos-NH- és egy piridínium-NH^+-csoportot (3AP, O-3AP), vagy egy fenolos-OH-t (STSC, SSC), kivéve a Dp44mT-t, amely egy további piridínium-NH^+-csoportot tartalmaz. A felvett UV-látható spektrumok jelentős változásokat mutattak a pH növelésének hatására (pl. O-3AP spektrumai az 15a. ábrán), ami lehetővé tette a pK_a értékek (1. táblázat) és a moláris abszorbancia spektrumok számítását a PSEQUAD szoftverrel [129]. Az O-3AP esetén nem csupán az abszorbancia csökkenését figyelhetjük meg 370 nm környékén a pH emelésével, de a csúcsmaximum eltolódását is. Ez a jelentős változás tette lehetővé, hogy ilyen kis koncentrációk mellett is meg tudjuk határozni a kívánt egyensúlyi állandókat, hiszen az említett oldhatóságbeli problémák miatt a pH-potenciometriás módszert nem tudtuk erre a feladatra használni.



15. ábra: a) Az O-3AP ligandum különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumai, és b) a különböző protonáltságú ligandumrészecskék számolt moláris abszorbancia spektrumai. {c_L = 25 µM; pH = 1,5 – 11,5; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

A meghatározott pK_a értékek alapján elmondható, hogy az általam vizsgált vegyületek semleges formában vannak jelen fiziológiás pH-n (pH = 7,40). Ha összevetjük a 3AP és O-3AP ligandumokat, elmondható, hogy a kén oxigénre történő cseréje nem befolyásolja az első deprotonálódási állandót, ami a kalkogénatomhoz képest távolabbi piridínium-NH^+ csoporthoz tartozik, de jelentősen növeli a pK_2 értékét (hidrazon-NH). A 3AP és STSC összehasonlítása azt mutatta, hogy a hidrazon-NH pK_a értéke az STSC esetén nagyobb a negatívan töltött fenolátocsoport miatt.

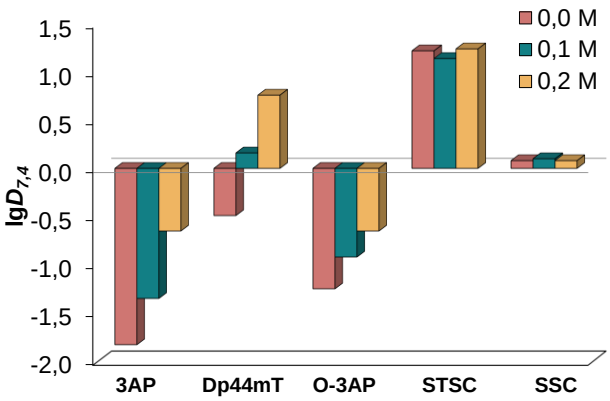
1. táblázat: A vizsgált TSK-ok UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározott pK_a értékei vizes közegben (összehasonlításképpen 30% (v/v) DMSO/H_2O-ban); lg$D_{7,4}$ értékei (*n*-oktanol/víz), termodinamikai oldhatóságai (S) és effektív permeabilitás (P_{eff}) értékei pH 7,40-en.

	közeg	**3AP**	**Dp44mT**	**O-3AP**	**STSC**	**SSC**
lg$D_{7,4}$	*n-oktanol/H_2O*	+0,85[a]	+2,19[c]	+0,22[d]	+1,59[e]	+0,94[g]
pK_1	*H_2O*	4,25±0,01	3,44±0,01	4,26±0,01	8,53±0,01	8,40±0,01
pK_2	*H_2O*	10,58±0,01	10,44±0,01	>11,5	>11,5	>11,5
pK_1	*DMSO/H_2O*	3,92[b]	2,89±0,01	4,23[d]	8,84[f]	9,32[g]
pK_2	*DMSO/H_2O*	10,78[b]	10,80±0,01	>12[d]	12,57[f]	>12[g]
P_{eff} ($\cdot 10^{-6}$ cm s^{-1})	*H_2O*	1,21±0,53	11,6±1,5	<1	5,36[e]	<1
S	*H_2O*	780 µM	29 µM	>27 mM	230 µM	286 µM

[a] Ref. [144]. [b] Ref. [143]. [c] Az értéket a MarvinSketch szoftver segítségével becsültük meg [145]. [d] Ref. [80], A 2-piridínium-NH^+ molekularész pK_a értéke túl alacsony volt. [e] Ref. [142]. [f] Ref. [146]. [g] Ref [147].

Ahogyan azt korábban ismertettem, a szakirodalomban ismert, hogy a rézionok fontos szerepet játszanak a tumorok kialakulásában, illetve az áttétek képződésében is, sőt a daganatos betegségben szenvedők vérszérumában megemelkedett rézszint figyelhető meg [148,149]. Számos hatásmechanizmust feltételeztek már a (tio)szemikarbazonok esetén, melyek többségében a ribonukleotid-reduktáz enzim inhibícióját emelik ki. Bár ez egy vastartalmú enzim (ahogyan azt részletesen bemutattam az irodalmi összefoglalóban), azonban a réz(II)ionokkal való komplexképződés során képződő reaktív oxigénrészecskék is fontos szerepet játszhatnak a rákellenes hatás kifejtésében [150]. A fentieken túl az is ismert, hogy a (tio)szemikarbazonok a réz(II)ionokkal kiemelkedő stabilitású komplexeket képeznek [151]. A képződő komplexekben az α-*N*-piridil-tioszemikarbazonok háromfogú koordinációs móddal alakítanak ki stabilis komplexeket [143]. A képződő rézkomplexek olyannyira stabilisak, hogy gyakorlatilag a teljes vizsgált pH tartományban (2 – 11,5) dominánsak, disszociációjuk szinte elhanyagolható a vizsgált koncentrációtartományban, viszont pH-tól függően $[CuLH]^{2+}$, $[CuL]^{+}$ ill. [CuL(OH)] formában vannak jelen az oldatban, ha a Cu(II)-ligandum mólarány 1:1. A korábban meghatározott stabilitási szorzatok alapján a réz(II)ion 100%-ban ligandumhoz kötött állapotban van jelen az oldatban, 1:1 fémion-ligandum mólarány mellett széles pH-tartományban 25 μM koncentrációban. Az STSC szintén nagy stabilitású rézkomplexet képez [142,144], de csak mono-ligandumú komplexek jönnek létre ligandum feleslegnél is.

A ligandumokhoz hasonlóan, első lépésként meghatároztuk a réz(II)komplexek lipofilitását, azonban itt már három különböző kloridionkoncentráció mellett (16. ábra). A korábbi szakirodalmi adatok alapján [144] feltételezhető, hogy fiziológiás pH-n a mono-ligandumú $[CuL]^{+}$ komplex a domináns, 1:1 fémion-ligandum mólarányú mintákban, mely a 3AP, Dp44mT és O-3AP esetén egyszeresen pozitív töltésű, emiatt a (gyengén) koordinálódó Cl^{-}-ionok koncentrációjának jelentős hatása van a meghatározott $\lg D_{7,4}$ értékekre. Minél nagyobb Cl^{-} koncentrációt alkalmaztunk, a lipofil jelleg annál inkább megnövekedett. Ezzel szemben a semleges töltésű [CuL] komplexeknél (STSC és SSC) nem tapasztaltunk jelentős változást. Kloridionok távollétében azt találtuk, hogy a semleges komplexek lipofilebbek, mint a pozitív töltésűek, a vártnak megfelelően. Mindezek mellett elmondható, hogy az STSC komplexe bizonyult a leglipofilebbnek, míg a 3AP komplexe a leghidrofilebb tulajdonságú.



16. ábra: A Cu(II) – ligandum (1:1) rendszerek lg$D_{7,4}$ értékei különböző kloridion-koncentrációk (0; 0,1 és 0,2 M KCl) mellett. {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 50 μM; pH = 7,40; T = 25 °C}

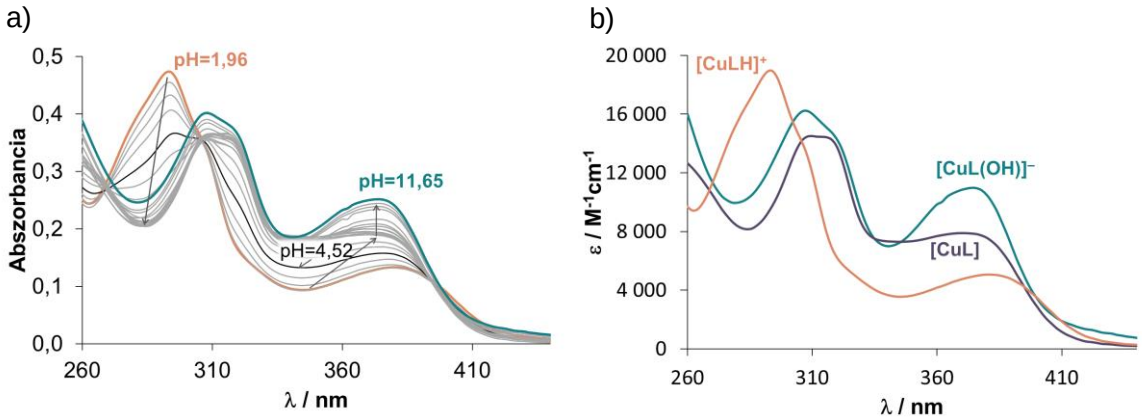
A komplexek PAMPA vizsgálatakor kapott P_{eff} étékek az 1. táblázatban láthatók. A 3AP, O-3AP és SSC réz(II)komplexei túl hidrofilnek bizonyultak a mérés kivitelezéséhez, így ezekben az esetekben csak egy határértéket tudtunk megadni, mely $P_{eff} < 1 \times 10^{-6}$ cm × s^{-1}. A Dp44mT esetén, ugyanezen állandó 6,4 ± 0,2 × 10^{-6} cm × s^{-1}-nek, míg az STSC esetén 1,5 × 10^{-6} cm × s^{-1}-nek adódott. A legnagyobb permeábilitás a Dp44mT-nél pedig ugyancsak összefüggésben van, a már előzőleg bemutatott lipofilitás értékekkel.

A vizsgált komplexek nagy stabilitása miatt, vizes közegben nem törekedtünk a képződési állandók közvetlen meghatározására. Először a stabilis réz(II)komplexek deprotonálódási folyamatait tanulmányoztuk vizes közegben, és a proton disszociációs állandóik meghatározása UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével történt. A fémiont és a ligandumot 1:1 mólarányban tartalmazó mintákat titráltam, így határoztuk meg a savas pH-n képződő $[CuLH]^{2+}$ és a bázikus pH-tartományban deprotonálódó $[CuL]^{+}$ komplexek pK_a-ját (2. táblázat).

Példaként a Cu(II) – STSC 1:1 mólarányú rendszer spektrumait ábrázoltam a 17a. ábrán, ami egyértelműen két folyamatot mutat. A spektrumok alapján meghatároztuk a komplexek proton disszociációs állandóit, illetve a 17b. ábrán látható számolt egyedi moláris abszorbancia spektrumokat. A pH=2-n felvett spektrum egyértelműen jelentős komplexképződést mutat ($[CuLH]^{+}$).

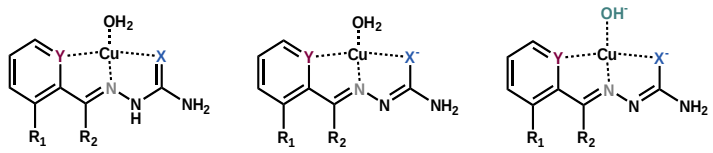
2. táblázat: UV-látható spektrofotometriás titrálással, illetve EDTA kiszorításos mérésekkel meghatározott egyensúlyi állandók (lg*K'*, lg*K* és pK_a) a vizsgált ligandumok Cu(II)-ionokkal való komplexképződési és deprotonálódási folyamataihoz. { T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

	3AP	***Dp44mT***	***O-3AP***	***STSC***	***SSC***
lg *K'* (pH = 5,9)	12,88±0,06	14,89±0,01	–	11,94±0,08	–
lg *K*	6,99±0,08	8,99±0,02	0,30±0,02	8,67±0,07	2,59±0,04
Cu^{2+} + HL ⇌ [CuL] + H^+					
pK_a	2,51±0,08	2,34±0,02	4,24±0,07	4,27±0,07	7,65±0,04
[CuLH] ⇌ [CuL] + H^+					
pK_a	8,64±0,08	8,79±0,03	10,84±0,03	10,97±0,02	>11,5
[CuL] ⇌ [CuLH$_{-1}$] + H^+					



17. ábra: a) A Cu(II) – STSC (1:1) rendszer különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumai és b) a kompexek számolt moláris abszorbancia spektrumai. {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 25 μM; pH = 1,7 – 11,6; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

Az izobesztikus pontok megjelenése a pH=2–6 pH tartományban egyetlen egyensúlyi folyamatra utalnak, ami a [CuLH] deprotonálódásához köthető (18. ábra), mely során a koordinált ligandum hidrazonos-NH csoporton történik a proton disszociáció. A [CuLH] komplexek pK_a értékei (2. táblázat) azt mutatják, hogy az α-*N*-piridil TSK-ok (3AP, Dp44mT) hidrazonos-NH csoportjainak deprotonálódása kisebb pH-n, míg az STSC komplex esetén nagyobb pH-n megy végbe. A tiokarbonil részben a S → O csere növeli a [CuLH] komplex pK_a értékét. Széles pH-tartományban (5–9) a spektrumok nem változnak, majd a bázikus pH-tartományban a következő az egyensúlyi folyamat során a [CuL(H_2O)] forma alakul át [CuL(OH)] formává (18. ábra), és a meghatározott állandók az első folyamathoz hasonló trendet mutatnak.



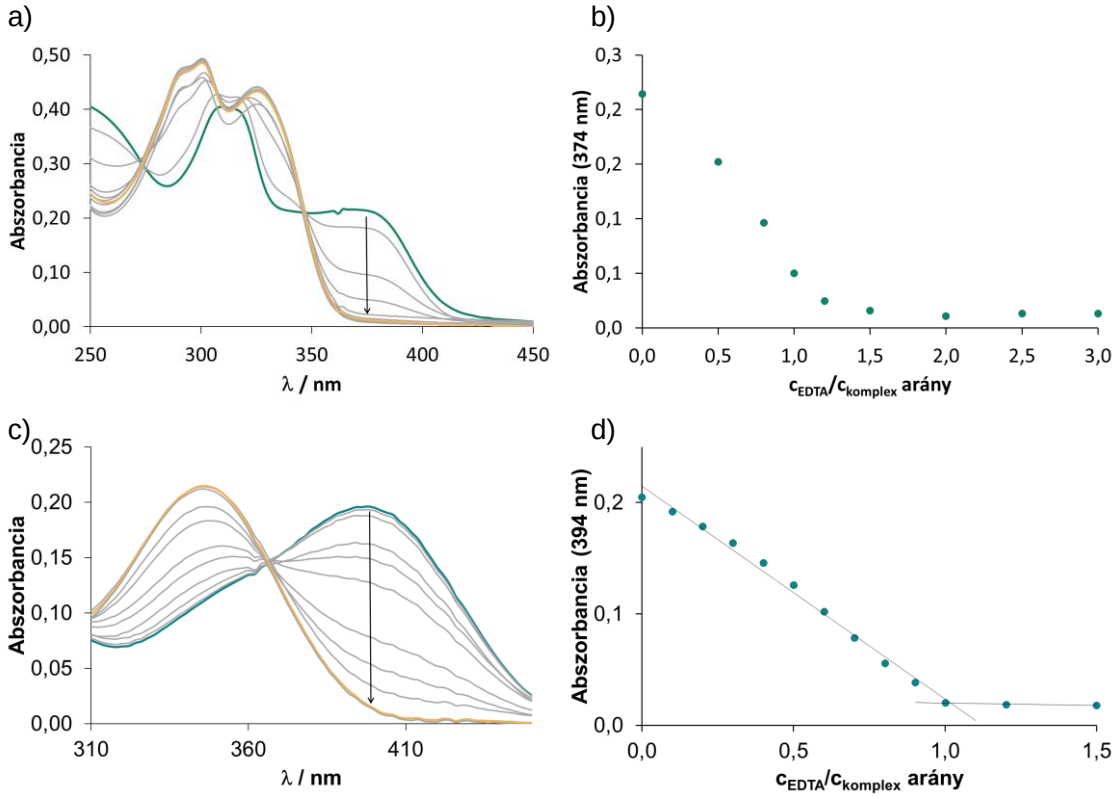
	Y	X	R_1	R_2	(Y,N,X)(H_2O)	(Y,N,X^-)(H_2O)	(Y,N,X^-)(OH^-)
3AP	N	S	NH_2	H	**$[CuLH]^{2+}$**	**$[CuL]^+$**	**[CuL(OH)]**
Dp44mT	N	S	H	piridil	**$[CuLH]^{2+}$**	**$[CuL]^+$**	**[CuL(OH)]**
O-3AP	N	O	NH_2	H	**$[CuLH]^{2+}$**	**$[CuL]^+$**	**[CuL(OH)]**
STSC	CO^-	S	H	H	**$[CuLH]^+$**	**[CuL]**	**$[CuL(OH)]^-$**
SSC	CO^-	O	H	H	**$[CuLH]^+$**	**[CuL]**	**$[CuL(OH)]^-$**

18. ábra: Javasolt koordinációs módok a vizsgált ligandumok réz(II)komplexeiben.

Mivel a $[CuL]^{+/0}$ komplex nagy stabilitása miatt kialakulása kvantitatívnak tekinthető, és széles pH-tartományban (4,5–9) domináns, így erre a komplexre határoztuk meg látszólagos stabilitási állandókat (*K*') EDTA-val történő kiszorítási reakciók során vizes közegben. A reakció követéséhez UV-látható spektrofotometriát alkalmaztunk. A pH-t 5,9-nek választottuk, mert ezen a pH-n biztosan a [CuL] komplex a domináns részecske. A mérések elvégzése előtt a kompetíciós folyamat kinetikájára vonatkozólag megállapítottuk, hogy két órára van szükség az egyensúly beállásához. A réz(II)-EDTA komplex (látszólagos) stabilitási állandója ismert a szakirodalomban [152]. A 19a. ábrán jól látszik, hogy növekvő EDTA koncentráció hatására a Cu(II) – STSC rendszer esetén az abszorbancia jelentősen lecsökken 374 nm környékén (ahol az átmenet a S → Cu(II) töltésátviteli sávhoz tartozik). Fontos kiemelni, hogy az Cu(II)-EDTA komplex elnyelése a vizsgált hullámhossztartományban (300 – 500 nm) elhanyagolható, csak a HL és $[CuL]^{+/0}$ formáknak van számottevő moláris abszorbanciája. A csökkenést továbbá jól szemlélteti a 19b. ábra is, ahol az aktuális abszorbancia/kezdeti abszorbancia százalékos értékét ábrázoltam az EDTA/komplex mólarányának függvényében. A rögzített spektrumok segítségével számítottuk ki a látszólagos stabilitási állandókat a PSEQUAD program segítségével. Ennek, valamint a ligandum proton disszociációs állandóinak ismeretében számítottuk ki a $[CuL]^{+/0}$ komplex stabilitási szorzatát. A meghatározott látszólagos stabilitási állandók a 2. táblázatban találhatók. A számolt koncentráció eloszlási görbék alapján elmondható, hogy fiziológiás körülmények között a $[CuL]^{+/0}$ komplex domináns, kivéve az SSC réz(II)komplexénél, ahol a [CuL] mellett $[CuLH]^+$ is jelen van.

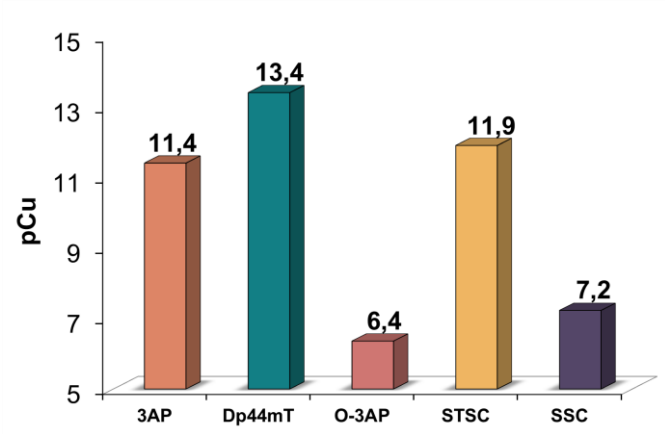
Az SSC és O-3AP ligandumok réz(II)komplexeinek stabilitása azonban jelentősen eltért az eddig tárgyaltaktól, ugyanis a titrálások során, az induló pH-n felvett spektrum megegyezett a szabad ligandum spektrumával, azaz nem a már kezdetben kialakult

komplex deprotonálódását követhettük nyomon a pH változtatásával, hanem magát a komplexképződést. Ebből kifolyólag a kapott állandók közvetlenül titrálásból származnak, nem EDTA-kiszorításos mérésekből (2. táblázat). (Ezen ligandumok esetén egyébként kvantitatív kiszorítást tapasztaltunk az EDTA adagolásának hatására a komplexek sokkal kisebb stabilitása miatt, 19c-19d. ábra).



19. ábra: a) UV-látható spektrumok különböző komplex:EDTA mólarányok mellett, b) az abszorbancia változása az EDTA:komplex koncentrációarányának függvényében a Cu(II) – STSC rendszer esetén, és c–d) az O-3AP rendszer esetén. {$c_L = c_{Cu(II)} = 25$ µM; $c_{EDTA} = 0 – 150$ µM; pH = 5,9 (5 mM MES); $T = 25$ °C; $I = 0,10$ M (KCl); $\ell = 1,0$ cm}

A pH = 5,9-n kapott lg*K'* látszólagos stabilitási állandókat összevetve (2. táblázat) elmondható, hogy a tioszemikarbazonok komplexei szignifikánsan nagyobb stabilitást mutatnak a szemikarbazonok (SK) komplexeihez képest. Ahhoz, hogy össze tudjuk hasonlítani a vegyületek réz(II)-kötő képességét pH = 7,4-en, pCu értékeket számoltunk 10 µM fémion- és ligandum koncentrációt választva (20. ábra). A későbbiekben is pCu értékeket fogok használni a komplexek stabilitásának összehasonlításához, ugyanis ligandumok különböző bázicitása és a képződő komplexek eltérő sztöchiometriája miatt a képződési állandók nem hasonlíthatóak össze közvetlenül.

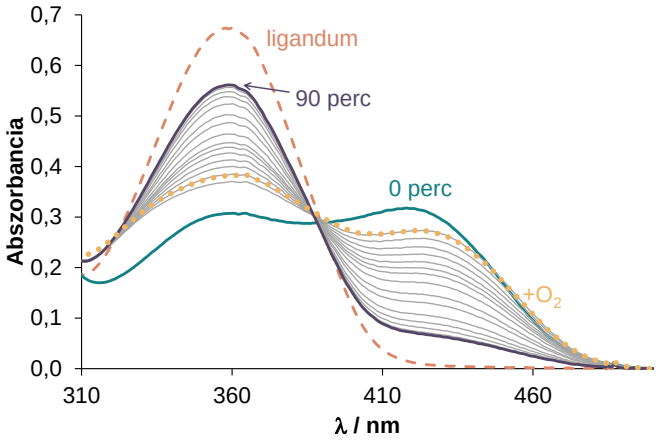


20. ábra: pCu (–lg[Cu(II)]) értékek Cu(II)-ligandum (1:1) rendszerek esetén számítva, fiziológiás pH-n, vízben. {$c_L = c_{Cu(II)} = 10$ µM; pH = 7,40; T =25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

A pCu az oldatban lévő szabad fémion (ezesetben réz(II)) egyensúlyi koncentrációjának tízes alapú negatív logaritmusát jelöli, adott körülmények között. A számítások során felhasználtuk az előzőleg meghatározott egyensúlyi állandókat, melyek segítségével koncentráció eloszlási görbéket számoltunk. A nagyobb pCu érték a ligandum erősebb réz-megkötő képességét jelzi az adott pH-n. A meghatározott adatok alapján a Dp44mT rendelkezik a legerősebb, míg az O-3AP a leggyengébb réz(II)-kötő képességgel. A koordinációs módokat összevetve pedig az alábbi sorrendet kaptuk a réz(II)-affinitást tekintve: $(N,N,S^-) > (N,N,O^-) > (O^-,N,S^-) > (O^-,N,O^-)$.

A TSK-ok réz(II)komplexeinek biológiai aktivitása összefüggésben van a sejten belüli redukálószerekkel való redoxi reakcióval. A glutation például képes redukálni a réz(II)-TSK komplexeket réz(I)komplexekké, amelyek újraoxidációja során ROS termelődik [153]. Doktori munkám során a réz(II)-TSK-ok GSH-nal való reakcióját követtem nyomon UV-látható spektrofotometriás mérések során, pH= 7,4-n (50 mM HEPES), anaerob körülmények között. A vizsgálatok során a redukálószert nagy feleslegben alkalmaztuk, hogy spektrálisan mérhető változást érjünk el, és így meg tudjuk határozni a tapasztalati sebességi állandókat a kezdeti sebességek módszerével úgy, hogy ábrázoltuk az $\ln(A/A_0)$ értékeket az idő függvényében, majd a kezdeti szakaszra egyenest illesztettünk, melynek meredeksége adta a tapasztalati sebességi állandót. A GSH a várakozásoknak megfelelően valóban képes redukálni a 3AP (21. ábra), Dp44mT, O-3AP, SSC és STSC komplexekit, azonban a reakciósebesség tekintetében jelentős különbségeket figyeltünk meg. Ahogyan a 21. ábrán is látható a 3AP réz(II)komplexe esetén is, a GSH hatására a spektrum a szabad ligandum spektrumának irányába változik, ahogyan az idővel felszabadul a képződő réz(I)komplexből. Oxigén hatására pedig visszakaptuk a kezdeti

réz(II)komplexre jellemző spektrumot, ami reverzibilis folyamatra utal. A tapasztalati sebességi állandók (k_{obs}) 0,11 perc^{-1} (3AP) és 2,12 × 10 $^{-3}$ perc^{-1} (Dp44mT) adódtak tiszta vizes oldatban, 50 ekvivalens GSH mellett, míg k_{obs} = 0,11 perc^{-1} volt az STSC esetén 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben, hasonló körülmények mellett. A fent felsorolt, viszonylag lassú reakciókkal szemben az O-3AP réz(II)komplexénél sokkal gyorsabb redoxi reakciót figyeltünk meg, hasonlóan az SSC-hez. Összességében tehát a TSK-ok réz(II)-komplexei lassabban reagálnak a GSH-nal, mint az SK-ok komplexei, és a reakció sebessége a következő: O-3AP ~ SSC > STSC, 3AP > Dp44mT.

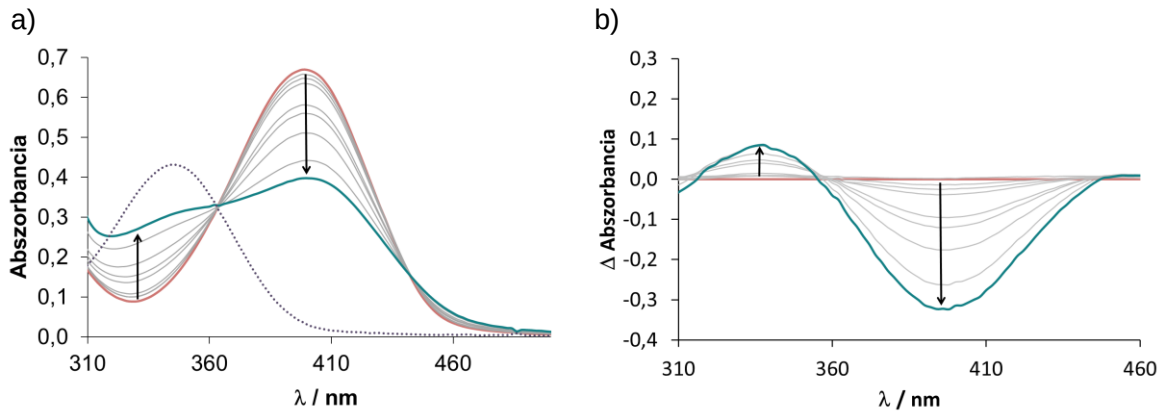


21. ábra: A Cu(II) – 3AP (1:1) rendszer UV-látható spektrumainak időfüggése 50 ekvivalens GSH hatására anaerob körülmények között, valamint a szabad ligandum spektruma (szaggatott vonal) és az oxigén buborékoltatásának hatása (pontozott vonal).{c_L = 25 μM; $c_{Cu(II)}$ = 25 μM; c_{GSH}= 1,25 mM; pH = 7,4; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

Feltételezik, hogy az α-*N*-piridil TSK-ok réz(II)komplexeinek nem a DNS az elsődleges célpontja, ám a SK-ok és szalicilaldehid származékok, valamit azok komplexei esetében még nyitott kérdés a hatásmechanizmusukat illetően. Ezért mindenképpen fontosnak tartottuk a DNS-sel való kölcsönhatásuk vizsgálatát is. A választott (T)SK-ok rézkomplexei legalább egy szabad koordinációs hellyel rendelkeznek, ami lehetőséget biztosít a DNS donor atomjainak a megkötődésére. A réz(II)komplexek több módon is kötődhetnek a DNS-hez: koordinációs kötés révén háromkomponensű adduktumot hozhatnak létre (vagy az eredeti ligandum a makromolekulára cserélődik), vagy nem kovalens kölcsönhatással interkalálódhatnak is.

UV-látható spektrofotometriával követtük a réz(II)komplexek és a ct-DNS kölcsönhatását 7,4 pH-n (10 mM HEPES pufferben), 4 mM Cl^- koncentráció mellett, hiszen a sejtmagban is ennyi a kloridionok koncentrációja [154]. A mérések során egyedi

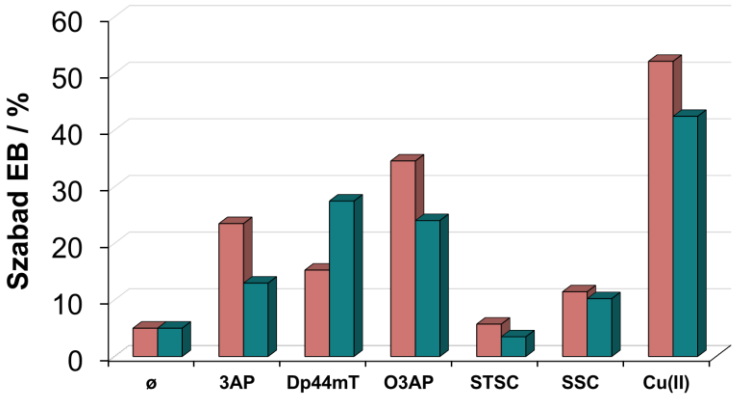
mintákat készítettem, ahol a komplex koncentrációja állandó volt, az egyre növekvő ct-DNS mennyisége mellett. A kölcsönhatást igen gyors kinetika jellemezte, így nem volt szükség hosszabb várakozási időre a minták összeállítását követően. A vizsgált réz(II)komplexek eltérő módon viselkedtek. A 22a. ábrán látható Cu(II)–O-3AP (1:1) rendszer UV-látható abszorpciós spektruma 0–40 ekvivalens ct-DNS adagolásának hatására, illetve a szabad ligandum spektruma is összehasonlításhoz. (Ebben a hullámhossz-tartományban a ct-DNS-nek nincs elnyelése.) Megfigyelhető, hogy a spektrum jelentősen megváltozott a makromolekula adagolásának hatására, és ezzel párhuzamosan a szabad ligandumra jellemző sáv növekedését tapasztaltuk, ami a ligandum kiszorítására enged következtetni. A jelentős mértékű változást jól szemlélteti a 22b. ábra, ahol az abszorbancia különbségeket ábrázoltam az adagolás hatására. A 3AP és Dp44mT ligandumok komplexeinél a CT sávok batokróm eltolódása következett be, ami a koordinációs mód megváltozására utalhat, míg az STSC és SSC komplexeknél csupán kisebb mértékű változást tapasztaltunk, miszerint ezeknél a komplexeknél, ha van is kölcsönhatás a ct-DNS-sel, az a koordinációs szférát nem befolyásolja.



22. ábra: a) Cu(II) – O-3AP (1:1) rendszer UV-látható abszorpciós spektruma 0-40 ekv. ct-DNS adagolásának hatására, illetve a szabad ligandum spektruma (pontozott vonal). b) Különbség abszorbancia spektrumok ugyanazon rendszer esetén (a Cu(II)-O3AP, és a ct-DNS korábban rögzített megfelelő spektrumának kivonásával számítható ki a komplexet és a ct-DNS-t is tartalmazó minta spektrumából). {$c_{komplex}$ = $c_{ligandum}$ = 50 μM; $c_{ct\text{-}DNS}$ = 0–2000 μM (nukleotidokban); pH = 7,40 (10 mM HEPES); T = 25 °C; I = 4 mM (KCl); ℓ = 1,0 cm}

A kölcsönhatás pontosabb feltérképezése érdekében etídium-bromiddal kompetíciós vizsgálatokat is végeztünk. Az etídium-kation (E^+) a ct-DNS-hez kötődve jelentős fluoreszcens intenzitás növekedést mutat, majd legegyszerűbb esetben a komplex adagolásának hatására azt várjuk, hogy ez az intenzitás lecsökken, ahogy az általunk vizsgált vegyület kiszorítja az etídiumiont a ct-DNS-ből, mely szabad formában jelenik

meg. Először UV-látható spektrofotometria segítségével vizsgáltuk a kölcsönhatást, mely során az EB spektrumát követtük 3,4 ekvivalens ct-DNS és 0–4 ekvivalens réz(II)komplexek (vagy $CuCl_2$) jelenlétében. Jelentős spektrális változást tapasztaltunk a 3AP, Dp44mT és O-3AP esetén, így a spektrumok felbontásával megbecsültük a ct-DNS-hez kötött és szabad EB mennyiségét (23. ábra).



23. ábra: Szabad EB mennyiségek a ct-DNS–EB–réz(II) komplex rendszerekben, különböző módszerekkel meghatározva: UV-látható spektrofotometriával (rózsaszín) és ultraszűréssel (zöld). A $CuCl_2$ hatása és a kompetítor nélküli oszlop (ø). {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 200 μM; $c_{ct\text{-}DNS}$ = 170 μM; c_{EB} = 50 μM; c_{HEPES} = 10 mM; c_{KCl} = 4 mM; pH = 7,40; T = 25 °C}

Ezt követően a mintákat ultraszűrés segítségével kis és nagy molekulatömegű frakciókra osztottam, majd felvettem az UV-látható spektrumaikat, ebből pedig a szabad EB mennyiségeket kiszámítottuk (23. ábra). Látható, hogy a kétféle módszerrel kapott adatok nem mutatnak teljes kvantitatív egyezést, köszönhetően annak, hogy mindkét kísérleti módszernek megvannak a korlátai. Míg az ultraszűrés során az LMM frakció képes adszorbeálódni a szűrőre, addig az UV-látható spektrofotometria módszere csak közvetett adatokat szolgáltat a kölcsönhatásról. Így csupán sorrendet tudtunk felállítani a vizsgált vegyületek réz(II)komplexekei között a ct-DNS-hez való kötődés erősségére vonatkozóan, mely a következő: (O-3AP) > 3AP, Dp44mT > SSC > STSC. Az STSC gyakorlatilag nem volt képes kiszorítani az interkalálódott EB-ot, míg további érdekesség, hogy a $CuCl_2$ önmagában is az E^+ teljes kiszorítását okozta a ct-DNS-ről, ahogy azt már korábban is leírták [155]. Így azt is feltételezhetjük, hogy az O-3AP esetén tapasztalt változás valójában a szabad réz(II)ionokhoz köthető, a kialakuló komplex kis stabilitása és az így bekövetkező akár teljes disszociációja miatt.

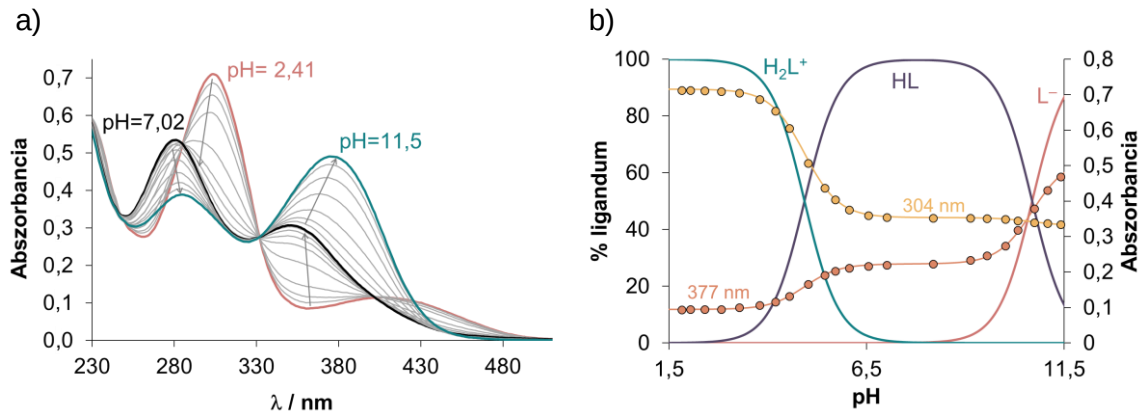
In vitro DNS hasítási vizsgálatok is történtek (Dr. Gyurcsik Béla kutatócsoportjának (SZTE, MAKT) segítségével), melyek során plazmid DNS-t alkalmaztak szubsztrátként, és képesek voltak elkülöníteni a nyílt cirkuláris, lineáris, és szuperhelikális fragmenseket agaróz gélelektrofotézis segítségével. A kísérletek során megállapították, hogy a szabad ligandumok nem mutattak DNS hasítást (kivéve az SSC, mely esetén kis aktivitást tapasztaltak). Megismételték a vizsgálatokat réz(II)komplexek esetén is, ahol az O-3AP és SSC ligandumok réz(II)komplexe esetén már DNS károsodást figyeltek meg. Ezekben az esetekben a szuperhelikális DNS átalakult nyílt cirkuláris formába, sőt egy napos inkubáció után a lineáris forma is megjelent, továbbá a DNS fragmentációját is kimutatták (f1. ábra), míg a többi vizsgált komplex nem okozott DNS hasítást. Ebben az esetben is felvetődik az O-3AP és SSC ligandumok réz(II)komplexeinek kis stabilitásának kérdése, így feltételezhetjük, hogy a DNS-hasítás a szabad réz(II) jelenlétéhez köthető. A DNS hasítási vizsgálatokat elvégezték GSH jelenlétében is. Míg a 3AP és STSC esetén erős DNS fragmentációt figyeltek meg a GSH jelenlétében, addig az O-3AP, SSC és Dp44mT komplexek kisebb DNS károsító képességet mutatott, ami feltehetően a GSH-nal való reakciójuk eltérő sebességével és reverzibilitásával függ össze. Emellett TopoIIα enziminhibíciós vizsgálatok is történtek, melyekből kiderült, hogy a szabad ligandumok nem mutatnak enzimgátló hatást, míg a réz(II)komplexeik teljes inhibíciós hatást mutattak (f2. ábra). Ahogyan a korábbiakban is, itt is fontos kiemelni a $CuCl_2$ saját hatását, mely felelős lehet a kis stabilitású komplexek aktivitásáért.

További együttműködés keretein belül, Dr. Spengler Gabriella és munkatársai (SZTE) vizsgálták a ligandumok, illetve azok réz(II)komplexeinek *in vitro* citotoxicitását is, három különböző sejtvonalon (Colo-205-humán vastagbélrák, Colo-320-multidrug rezisztens humán vastagbélrák, és MRC-5-normál humán embrionális tüdőfibroblaszt), kolorimetriás MTT mérések segítségével. Az általuk meghatározott IC_{50} és szelektivitási index (S.I.) értékeket az f1. táblázat tartalmazza. Néhány vizsgált ligandum citotoxicitását már korábban közölték számos sejtvonal esetén [146,156], azonban szerettünk volna pontosabb összehasonlításra lehetőséget teremteni azonos körülmények használatával. A korábbi eredményekkel jó egyezést mutatva megállapítottuk, hogy a Dp44mT és a 3AP rendelkezik a legnagyobb aktivitással, míg az O-3AP, STSC és SSC kevésbé voltak citotoxikusak. A csökkent citotoxicitás feltehetően annak a következménye, hogy O-donorok révén nagyobb a vas(III)ionoka felé mutatott affinitásuk, így nem képesek a vas(II)-, és vas(III)ionokat is egyformán megkötni, mely a feltételezett hatásmechanizmus

szerint szükséges az RR enzim gátlásához. A ligandumok hatása szelektívnek bizonyult a Colo-205 és Colo-320 rákos sejteken, a normál, nem rákos sejtekhez képest. A réz(II)ionokkal való komplexképződés minden esetben növelte a rákellenes hatást, kivéve a 3AP esetén. Kiemelném az STSC komplex esetén a lecsökkent IC_{50} értékét, mely feltehetően a képződő semleges komplex kiemelkedően nagy lipofilitásához és membrán permeábilitásához köthető. Fontos megfigyelés még, hogy az O-3AP komplex és a szabad $CuCl_2$ citotoxicitása nagyjából azonos, ami a képződő komplex kis stabilitásával függhet össze.

5.1.2. Metil-szubsztituens hatása tioszemikarbazonok oldatkémiai tulajdonságaira

Az 5.1.1. fejezetben tárgyalt különböző koordinációs módok mellett további szerkezeti változtatások is befolyásolják az oldatkémiai tulajdonságokat, és viszonylag kisebb szerkezeti módosításoknak is jelentős lehet a hatása. Ebben a fejezetben a különböző pozícióban metilezett származékokat hasonlítom össze proton disszociációs állandóikon, réz(II)ionokkal való komplexképzésükön, GSH-nal való reakciójukon, valamint biológiai aktivitásukon keresztül. Elsőként a ligandumok (FTSC, PTSC, H_2NNHMe, H_2NNMe_2, $MeHNNMe_2$, Me_2NNH_2, Me_2NNHMe, Me_2NNMe_2, DpC és S-Me-3AP, 13. ábra) pK_a értékeit határoztuk meg UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével, melyeket vizes közegben végeztem. A titrálások során kapott reprezentatív spektrumsorozatot, illetve az abból számolt egyedi moláris abszorbancia értékeket a négyszeresen, azaz mind a terminális mind a piridin-gyűrűn lévő amincsoporton, metilezett (Me_2NNMe_2) ligandum esetén a 24. ábrán láthatjuk.



24. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok és b) a számolt koncentráció eloszlási görbék, valamint a mért pH-függő abszorbancia értékek és illesztésük a Me_2NNMe_2 ligandum esetén. {c_L = 40 μM; pH = 2,4 – 11,9; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

A vizes közegben végzett titrálások alól kivételt jelent a DpC, ahol a korlátozott vízoldhatóság miatt DMSO-t adtam a rendszerhez (5% és 30% (v/v)), majd az így meghatározott állandók segítségével extrapoláltunk, hogy megkapjuk a vízre vonatkozó állandókat. Összehasonlításképp további ligandumok (3AP és H_2NNMe_2) esetén is feltüntettem a 30% (v/v) DMSO/víz elegyre vonatkozó adatokat (3. táblázat).

3. táblázat: A vizsgált ligandumok és réz(II)komplexeik UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározott pK_a értékei, valamint az EDTA kiszorítási reakcióval meghatározott látszólagos ($\lg\beta'$) stabilitási szorzatok a $[CuL]^+$ komplexekre pH = 5,90-n {T = 25 °C, I = 0,10 M (KCl)}, tiszta vizes közegben (kivétel: *5% (v/v) DMSO/H_2O, **30% (v/v) DMSO/H_2O)

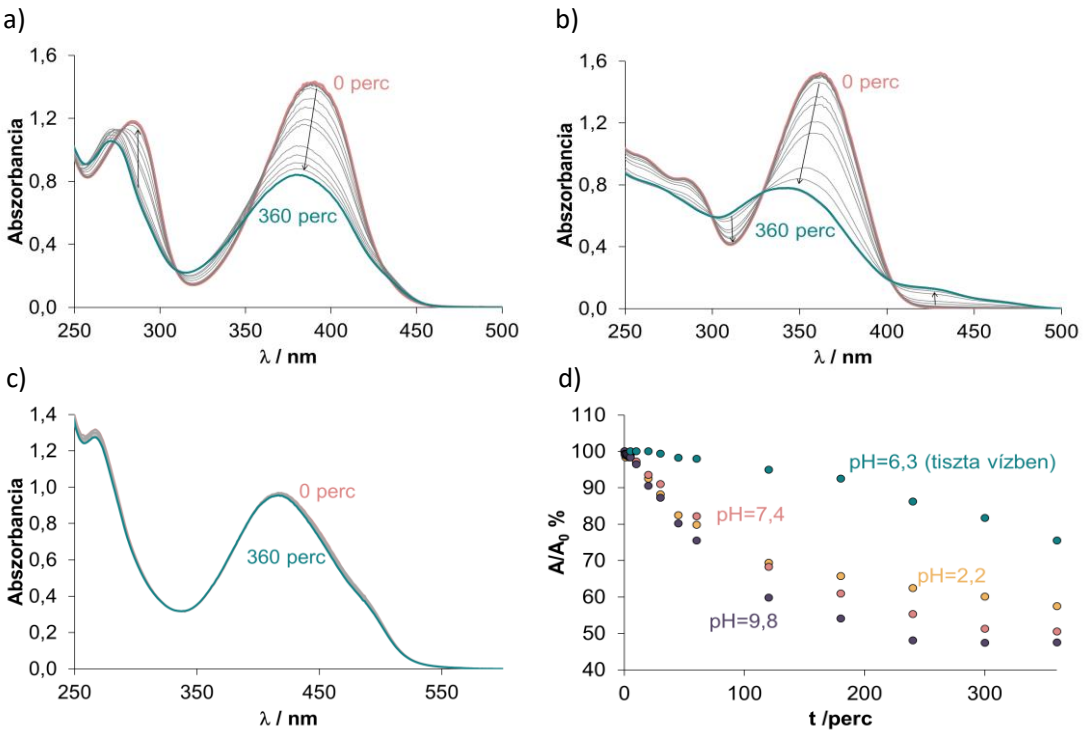
ligandum	pK_a (H_2L^+)	pK_a (HL)	pK_a $[CuLH]^{2+}$	pK_a $[CuL]^+$	$\lg\beta'_{5,9}$ $[CuL]^+$
H_2NNMeH	4,40±0,01	11,03±0,01	2,54±0,01	8,62±0,01	12,58±0,02
H_2NNMe_2	4,64±0,01	10,09±0,01	2,51±0,02	8,65±0,07	14,12±0,01
$MeHNNMe_2$	4,87±0,01	9,87±0,01	2,64±0,02	8,19±0,02	14,15±0,03
Me_2NNH_2	4,43±0,01	10,87±0,01	2,31±0,02	8,53±0,01	13,27±0,03
Me_2NNMeH	4,53±0,02	10,98±0,07	2,57±0,02	8,11±0,02	13,35±0,02
Me_2NNMe_2	4,93±0,01	10,69±0,01	2,51±0,01	8,78±0,01	14,72±0,07
FTSC	3,48±0,01	10,72±0,01	2,08±0,02	8,70±0,04	≤ 11,2
PTSC	3,61±0,01	10,22±0,01	2,09±0,01	8,56±0,01	14,64±0,01
S-Me-3AP	4,96±0,05	–	–	–	7,38±0,02
DpC*	3,47±0,01	10,71±0,01	–	–	–
DpC**	3,03±0,06	11,38±0,06	2,13±0,03	9,46±0,02	11,67±0,02
DpC	3,50	10,67	2,45	8,36	–
3AP [a**]	3,92	10,78	2,34	9,67	–
H_2NNMe_2 [a**]	4,31	10,29	1,93	9,49	–

[a] Ref. [149].

Megfigyelhető, hogy két, jól elkülöníthető deprotonálódási folyamat játszódik le, mely jellemző volt az összes vizsgált ligandum esetén. A DpC második piridíniumcsoportjának pK_a értéke nem határozható meg az alkalmazott körülmények között, ugyanis az csak meglehetősen savas körülmények mellett deprotonálódik. A meghatározott állandókat a 3. táblázat tartalmazza. A 3-AP és Dp44mT vonatkozó adatait

az 1. és 2. táblázatok tartalmazzák. Összevetve a kapott egyensúlyi állandókat, elmondható, hogy míg a monometilezésnek csupán kis hatása van a meghatározott deprotonálódási állandókra, addig az N-terminális dimetilezés eredményeként megfigyelhetjük, hogy az első pK_a nagyobbnak, míg a második kisebbnek mutatkozott. Ezt jól szemlélteti a FTSC és PTSC, vagy akár a 3AP és H_2NNMe_2 ligandumpárok összehasonlítása. A piridin-gyűrű amincsoportjának dimetilezése mindkét állandót kissé megnövelte, ahogyan azt a 3AP és Me_2NNH_2 összevetésével láthatjuk. Elmondható, az is, hogy mindegyik vizsgált ligandum semleges formában van jelen fiziológiás pH-n.

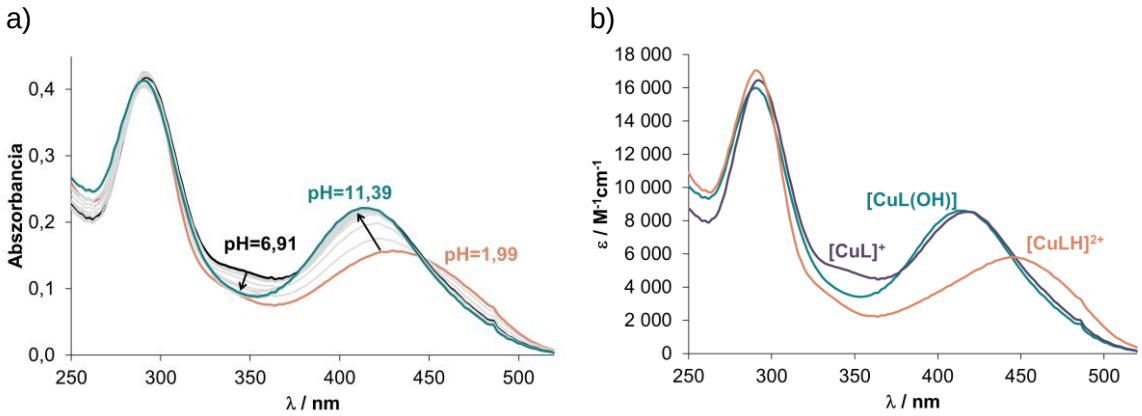
Fontos megfigyelés, hogy az S-Me-3AP oldatának tárolása során (tiszta DMSO törzsoldat) idővel merkaptán szagot tapasztaltam, ami feltehetően a CH_3SH eliminációjához köthető. Rögzítettem a ligandum UV-látható spektrumait az idő függvényében, különböző pH-kon (pH = 2,2 és 9,8; 1% (v/v) DMSO/víz elegy), melyek alapján megfigyelhető, hogy a folyamat felgyorsul a pH növelésével (25a–b. ábra), míg vízben (pH = 6,3) a bomlás jelentősen lassabb volt (25d. ábra), ami lehetővé tette az egyensúlyi állandó meghatározását.



25. ábra: a) Az S-Me-3AP időfüggő UV-látható spektrumai különböző pH-értékeknél: pH = 2,2; b) pH = 9,8, valamint c) az S-Me-3AP-Cu(II) komplex spektrumának időfüggése, és d) a ligandum abszorbancia értékeinek változása (A/A_0-ként) a különböző pH-értékeknél valamint vízben (puffer és KCl nélkül, pH = 6,3). {$c_L = c_{komplex}$ = 100 μM; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm; 1% (v/v) DMSO}

A meghatározott egyensúlyi állandót összevetve a 3AP adataival, látható, hogy a kénatomon történő metilezés kissé megnövelte a piridínium-NH pK_a értékét. Ezen ligandum esetén a hidrolízise miatt nem volt lehetőségünk teljeskörű vizsgálatot végezni a réz(II)ionokkal való komplexképződésre vonatkozóan. Azonban rendelkezésünkre állt a szilárd formában előállított réz(II)komplex (mely oldatának UV-látható spektruma időben is állandónak bizonyult, 25c. ábra), így csupán EDTA-kiszorítási vizsgálatot végeztünk.

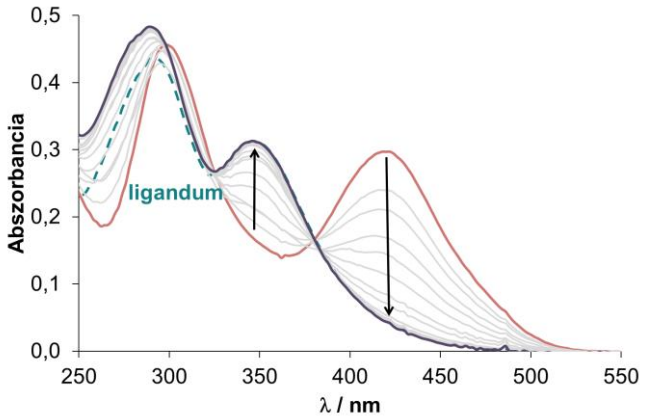
A ligandumokat (az S-Me-3AP kivételével) és $CuCl_2$-t 1:1 mólarányban tartalmazó mintát titráltam, hogy meghatározzam a képződő komplexek proton disszociációs állandóit. Ezen spektrofotometriás titrálás során kapott spektrumokat és a számolt moláris abszorbancia spektrumokat láthatjuk a 26. ábrán a Me_2NNH_2 – Cu(II) rendszer esetén. Minden réz(II)komplexre két egyensúlyi állandót határoztunk meg (3. táblázat), a pH = 2,1–2,6 tartományban történő deprotonálódási folyamatra, azaz a $[CuLH]^{2+}$-hoz tartozót, valamint a $[CuL]^+$ esetén a pH = 8,1 – 8,8 közötti adatokat használva. Megfigyelhető, hogy a $[CuL]^+$ komplexre kapott állandó körülbelül 8 nagyságrenddel alacsonyabb, mint a megfelelő szabad HL ligandum proton disszociációs állandója, ami a Cu(II)-ionhoz való koordinációhoz köthető.



26. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok, és b) a számolt moláris abszorbancia spektrumok a Me_2NNH_2 – Cu(II) rendszer esetén. {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 25 μM; pH = 2,0 – 11,4; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

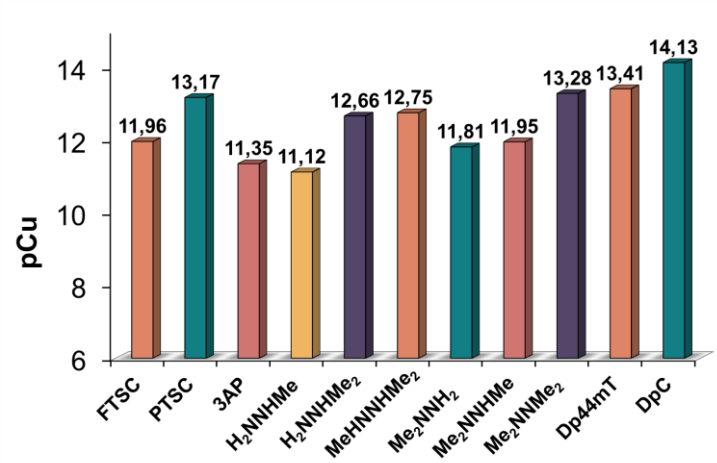
A nagy stabilitású $[CuL]^+$ komplex kialakulása miatt, ahogy korábbiakban is, EDTA-kiszorítási vizsgálatokat végeztünk, hogy meghatározzuk a látszólagos stabilitási állandókat, majd ezek segítségével kiszámítsuk a stabilitási szorzatokat (3. táblázat) a proton disszociációs állandók ismeretében. A növekvő EDTA mennyiség hatására csökkenést figyelhetünk meg 422 nm-en (27. ábra), ami a S→Cu töltésátviteli sávhoz

rendelhető, valamint a ligandumra jellemző spektrumot kapjuk vissza. A komplexek pK_a értékei, és a látszólagos állandók segítségével kiszámolt stabilitási szorzatok segítségével kapott koncentráció eloszlási görbék alapján fiziológiás pH-n a $[CuL]^+$ komplex a domináns részecske.



27. ábra: UV-látható spektrumok az Cu(II) – Me_2NNMeH rendszer esetén különböző komplex EDTA mólarányok mellett, és szabad ligandum spektruma (szaggatott). {$c_L = c_{Cu(II)}$ = 26 μM; pH = 5,9 (5 mM MES); c_{EDTA} = 0 – 374 μM; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

A ligandumok réz(II)kötő képességének összehasonlítása pCu értékek alapján történt (28. ábra). A metilezés (bármely részén is történt a molekulának) kis mértékben, míg a dimetilezés nagyobb mértékben növelte a stabilitást.

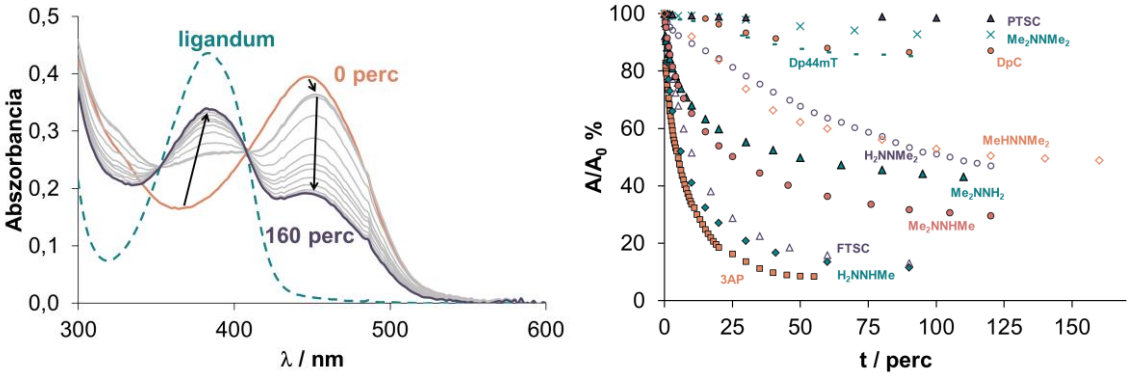


28. ábra: pCu (−lg[Cu(II)]) értékek Cu(II)-ligandum (1:1) rendszerek esetén számítva, fiziológiás pH-n. {$c_L = c_{Cu(II)}$ = 1 μM; pH = 7,40; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

Érdekesség, hogy a legerősebb rézkötő képességgel azok a vegyületek rendelkeztek, melyek IC_{50} értéke a nM-os koncentráció tartományba esett (f2. táblázat), nevezetesen a DpC, Dp44mT, Me_2NNMe_2 és a PTSC. Ezeknek a ligandumoknak a Cu(II)-

komplexei is jelentős aktivitást mutattak a vizsgálat sejtvonalakon, és jellemzően citotoxikusabbak voltak a komplexek, mint a ligandumaik önállóan.

A képződő Cu(II)-komplexek redoxi reaktivitását GSH mellett aszkorbinsavval vizsgáltuk spektrofotometriásan. Az AA-val való vizsgálatok során nem tapasztaltunk időben spektrális változást, ami arra utal, hogy az alkalmazott körülmények között az AA nem képes redukálni ezeket a komplexeket. Ez nem is meglepő, hiszen a pH = 7,0-n +0,06 V a dehidro-L-aszkorbát/AA rendszer formál potenciál értéke [157]. Ezzel szemben a GSSG/GSH rendszer esetén jóval negatívabb értéket mértek: –0,26 V. A GSH, erősebb redukálószerként képes volt redukálni az általunk vizsgált Cu(II)-komplexeket, azonban a reakciósebességek tekintetében jelentős különbségeket tapasztaltunk (29b. ábra). Ahogyan azt 29a. ábrán is láthatjuk a Cu(II) – $MeHNNMe_2$ (1:1) rendszer esetén, a csúcsmaximum kissé eltolódik az összekeverés utáni első spektrum esetén, ami feltehetően GSH-t tartalmazó vegyes ligandumú komplex képződéséhez köthető [153].



29. ábra: a) A Cu(II) – $MeHNNMe_2$ (1:1) rendszer UV-látható spektrumainak időfüggése 50 ekvivalens GSH hatására anaerob körülmények között, valamint a szabad ligandum spektruma (szaggatott vonal), és b) a csúcsmaximumon mért abszorbancia csökkenés a különböző Cu(II)-komplexek esetén az idő függvényében. {c_L = 25 μM; $c_{Cu(II)}$ = 25 μM; c_{GSH} = 1,25 mM; pH = 7,4; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm } Jelölések: 3AP (■), H_2NNHMe (♦), FTSC (Δ), Me_2NNHMe (●), Me_2NNH_2 (▲),H_2NNMe_2 (○), $MeHNNMe_2$ (◊),Dp44mT (-), DpC (●), Me_2NNMe_2 (×), PTSC (▲)

Ezután az abszorbancia jelentős csökkenését figyelhetjük meg az idő előrehaladtával, mely változás iránya a szabad ligandum spektrumának irányába tart. Ez feltehetően a kialakult Cu(I)-komplex kis stabilitásához köthető, mely során felszabadul a ligandum a komplexből a nagy feleslegben jelenlévő GSH miatt, ami viszont stabilis komplexet képez a Cu(I)-ionnal. A reakció nem vezetett a Cu(II)-komplexek teljes

redukciójához, ugyanis nem kaptuk vissza teljesen a ligandum spektrumát, ám minden esetben a spektrum állandósulásáig, azaz a redoxi egyensúlyi helyzet beállásáig vizsgáltuk a folyamatot.

Hasonló változást tapasztaltunk a többi vizsgált komplexnél is. A reakciósebességek változatosságának szemléltetésére kiszámítottuk a tapasztalati sebességi állandókat (k_{obs}, 4. táblázat). Megfigyelhető, hogy minél nagyobb a sebességi állandó, tehát minél gyorsabb a redukció, annál kisebb pCu érték tartozik a ligandumhoz. Azaz minél stabilisabb a kialakuló Cu(II)-komplex, annál lassabban redukálódik a GSH által. További összefüggés figyelhető meg a citotoxicitás értékeket vizsgálva (f2. táblázat), ugyanis az is elmondható, hogy minél lassabb a reakció a GSH-nal, annál nagyobb a rákellenes hatás.

4. táblázat: Tapasztalati sebességi állandók (k_{obs}) a vizsgált Cu(II)-komplexek GSH-nal való reakciója esetén, UV-látható spektrofotometriás detektálás mellett vizes közegben {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 25 μM; c_{GSH} = 1,25 mM; T = 25 °C, I = 0,10 M (KCl)}.

ligandum	k_{obs}/ perc^{-1}	**ligandum**	k_{obs}/ perc^{-1}
FTSC	$4{,}13 \times 10^{-2}$	**Me_2NNH_2**	$4{,}47 \times 10^{-2}$
PTSC	$4{,}30 \times 10^{-4}$	**Me_2NNMeH**	$3{,}90 \times 10^{-2}$
3AP	$1{,}10 \times 10^{-1}$	**Me_2NNMe_2**	$6{,}97 \times 10^{-4}$
H_2NNMeH	$7{,}70 \times 10^{-2}$	**Dp44mT**	$2{,}12 \times 10^{-3}$
H_2NNMe_2	$1{,}60 \times 10^{-2}$	**DpC**	$2{,}30 \times 10^{-3}$
$MeHNNMe_2$	$1{,}12 \times 10^{-2}$		

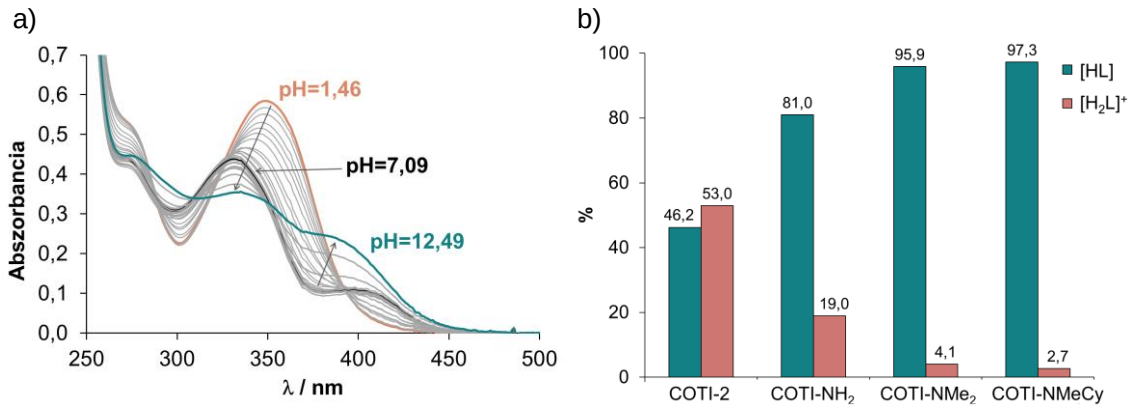
5.1.3. N-terminális diszubszitúció hatása COTI-2 típusú tioszemikarbazonok oldatkémiai sajátságaira

A koordinációs mód variálódásán, és a metil-szubsztituens beépítésén túl kíváncsiak voltunk, hogy a különböző típusú *N*-terminális diszubszitúció milyen hatással van az α-*N*-tioszemikarbazonok oldatkémiai tulajdonságaira. Ennek vizsgálatához a COTI-2-t és annak különböző származékait (13. ábra) választottuk, ugyanis ez a vegyület már klinikai fázis I vizsgálatokban vesz részt, és igen hatásosnak bizonyult egyes szolid tumorok (nőgyógyászati rosszindulatú daganatok, epiteliális tüdőrák) kezelésére. Három különböző COTI-2-vel rokon vegyületet vizsgáltunk: COTI-NH_2, ami egy szubsztituálatlan modell vegyület, és annak *N*-terminálisan dimetilezett származéka, a COTI-NMe_2, és a ciklohexil- és metil szubszituensek tartalmazó COTI-NMeCy, a Dp44mT ill. a DpC ligandumokhoz hasonlóan. Nem csupán ezen vegyületek oldategyensúlyi vizsgálatát végeztük el, hanem feltérképeztük a különböző endogén

fémionokkal (Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} és Zn^{2+}) való komplexképzésüket is, valamint a képződő vas- és rézkomplexek redoxi tulajdonságait is jellemeztük. Ezen túlmenően biológus együttműködő partnerekkel vizsgáltuk a vegyületek *in vitro* rákellenes hatását, és az oldategyensúlyi eredmények erős támogatásával javaslatot tettünk a rezisztencia folyamatok lehetséges hatásmechanizmusára.

A ligandumok vizsgálatát az előző vegyületcsaládokhoz hasonlóan végeztük, azonban itt 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben dolgoztam a titrálások során, a ligandumok korlátozott vízoldhatósága miatt. Az előzetesen a SwissADME program [158] segítségével számolt, illetve a kísérleti úton meghatározott termodinamikai oldhatósági adatokat, és lipofilitás értékeket az 5. táblázat tartalmazza. Ezen értékek alapján a következő sorrend állítható fel a vegyületek oldhatóságát tekintve: COTI-2 < COTI-NMeCy << COTI-NMe_2 < COTI-NH_2. Az erőteljes lipofil sajátság miatt csupán a COTI-NH_2 ligandumnál tudtunk megoszlási állandót meghatározni, a többi esetben a programmal becsült értéket adtam meg. Hasonlóan, a membrán permeábilitási vizsgálatok során sem kaptunk kvantitatív adatokat minden vegyületre, csak a COTI-NMe_2 és COTI-NH_2 ligandumokra, azonban a két értéket összevetve jól látszik a nagyobb lipofilitású származék nagyobb membrán permeábilitása.

A ligandumok protonált formái két disszociábilis protont tartalmaznak, nevezetesen a dihidrokinolínium-NH^+-t és a hidrazon-NH-t, valamint a COTI-2 ezen kívül még egy piridínium-NH^+-t is tartalmaz. Reprezentatív példaként a COTI-NMeCy UV-látható spektrofotometriás titrálásának eredményei láthatók a 30. ábrán.



30. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok, és b) az egyes ligandum formákra számolt százalékos eloszlás pH = 5,0-n a különböző ligandumokra. {c_L = 20 μM; pH = 1,5 – 12,5; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm; 30% (v/v) DMSO/H_2O}

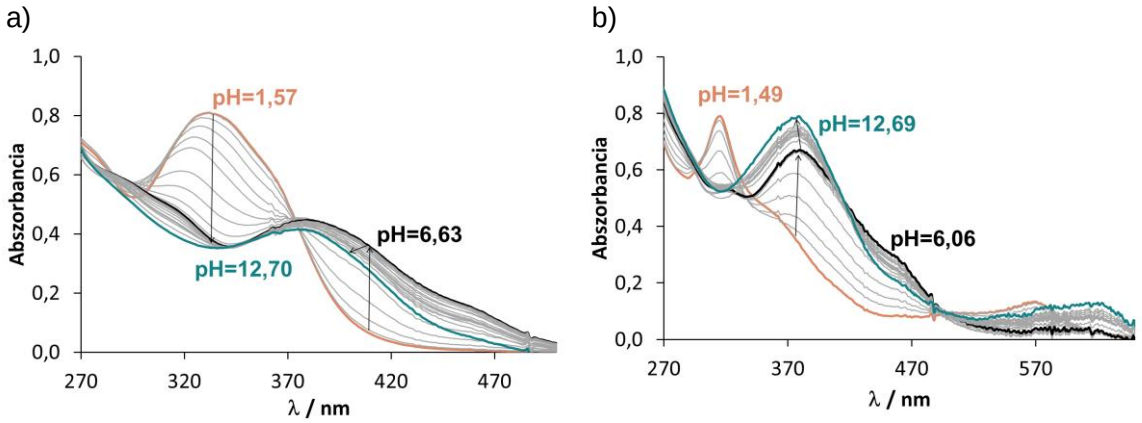
A titrálások során meghatározott proton disszociációs állandókat az 5. táblázat tartalmazza. Össszevetve a 3AP a korábban meghatározott proton disszociációs állandóival, elmondható, hogy az első deprotonálódási folyamat a dihidrokinolínium-NH^+-hez, míg a második a hidrazon-NH-csoportokhoz rendelhető. A COTI-2 piridínium-NH^+-hez tartozó pK_a sorrendben a második deprotonálódási folyamathoz köthető. A meghatározott állandók segítségével számolt koncentráció eloszlási görbék alapján elmondható, hogy a vizsgált ligandumok pH = 7,4-en semleges formában vannak, illetve, hogy ezen a pH-n 100%-ban [HL] formában vannak jelen. Ezzel szemben, kisebb pH-n (30b. ábra) jól láthatók a különbségek az egyes ligandumok közt, azok különböző protonáltsági formáik százalékos eloszlását tekintve.

5. táblázat: A vizsgált ligandumok UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározott pK_a értékei 30% (v/v)-os DMSO/H_2O elegyben; becsült és mért termodinamikai oldhatóságai (*S*); lg$D_{7,4}$ értékei (*n*-oktanol/víz) és effektív permeábilitás (P_{eff}) értékei pH 7,40-n.

	COTI-2	**COTI-NH_2**	**COTI-NMe_2**	**COTI-NMeCy**
pK_a (H_3L [a])	3,23 ± 0,01	–	–	–
pK_a (H_2L [a])	5,08 ± 0,01	4,39 ± 0,01	3,65 ± 0,01	3,47 ± 0,01
pK_a (HL [a])	10,97 ± 0,01	12,22 ± 0,01	12,09 ± 0,01	12,40 ± 0,01
S (szám., μM) [b]	5,6	954	324	31
S (mért., μM)	0,41	737	417	3,9
lg $D_{7,4}$ (szám.) [c]	+2,99	+1,43	+1,88	+3,68
lg $D_{7,4}$ (mért)	–	+1,64 ± 0,01	–	–
P_{eff} ($\times 10^{-6}$cm s^{-1})	–	6,7 ± 0,7	16,0 ± 0,1	–

[a] Mivel az L, teljesen deprotonált forma töltése változó az egyes ligandumoknál, a töltéseket az egyszerűség kedvéért nem tüntettem fel. [b]A SwissADME [158] program segítségével becsült állandók. [c]A MarvinSketch programmal meghatározott állandók [159].

A ligandumokhoz hasonlóan, a különböző endogén fémionokkal végzett vizsgálatok is 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben történtek. A 31. ábrán láthatjuk a Fe(III) – COTI-2 (1:2) és Fe(II) – COTI-NMe_2 (1:2) egyensúlyi rendszerek pH-függő abszorpciós spektrumait, illetve az abból számolt moláris abszorbancia spektrumokat. A Fe(II)-ionokat tartalmazó rendszereket oxigénmentes körülmények között vizsgáltam. A vizsgált ligandumok mono-, és biszkomplexeket képeznek a vasionokkal, hasonlóan a már bemutatott α-*N*-piridil tioszemikarbazonokhoz. A 31c. és 31d. ábrák jól szemléltetik a 615 nm környékén kialakuló, Fe(II)-komplexekre jellemző sávot.



31. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok az Fe(III) – COTI-2 (1:2), és b) Fe(II) – COTI-NMe_2 (1:2) rendszer esetén.{c_L = 30 µM; $c_{Fe(II)}$ = 15 µM; pH = 1,5 – 12,7; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 2,0 cm; 30% (v/v) DMSO/H_2O}

A COTI-2 esetén protonált mono-, és biszkomplexek képződését is le tudtuk írni ($[Fe(III)LH]^{3+}$,$[Fe(II)LH]^{2+}$, $[Fe(II)L_2H_2]^{2+}$ és $[Fe(II)L_2H]^{+}$), ahol a proton a piridínium-NH^+-csoporthoz tartozik, ami nem vesz részt a koordinációban (6. táblázat). Ahhoz, hogy összehasonlítsuk a ligandumok különböző vasionok felé mutatott affinitását, pFe értékeket számítottunk (6. táblázat), továbbá a pFe(III)* számításakor a különböző Fe(III)-hidroxido-komplexek képződését is figyelembe vettük (mint ligandumhoz nem kötött részecskéket).

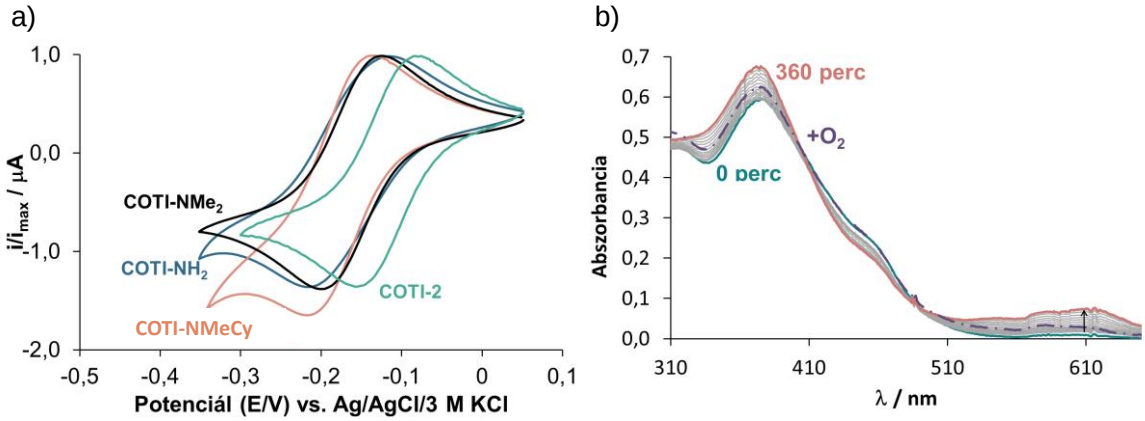
6. táblázat: A Fe(II) és Fe(III) komplexek stabilitási szorzatai (lgβ), valamint formál potenciál értékek (E') a vas(III/II)ion–ligandum (1:2) rendszerek esetén [a].

	COTI-2	COTI-NH_2	COTI-NMe_2	COTI-NMeCy
lgβ $[Fe(III)LH]^{3+}$	21,16 ± 0,03	–	–	–
lgβ $[Fe(III)L]^{2+}$	18,02 ± 0,03	20,00 ± 0,09	17,25 ± 0,02	17,06 ± 0,02
lgβ $[Fe(III)L_2]^{+}$	29,98 ± 0,06	32,29 ± 0,08	32,77 ± 0,03	32,20 ± 0,03
lgβ $[Fe(II)LH]^{2+}$	21,00 ± 0,03	–	–	–
lgβ $[Fe(II)L]^{+}$	18,28 ± 0,06	17,36 ± 0,06	17,62 ± 0,03	18,66 ± 0,03
lgβ $[Fe(II)L_2H_2]^{2+}$	41,18 ± 0,06	–	–	–
lgβ $[Fe(II)L_2H]^{+}$	36,74 ± 0,09	–	–	–
lgβ $[Fe(II)L_2]$	30,63 ± 0,09	31,21 ± 0,09	31,33 ± 0,09	31,04 ± 0,03
pFe(III)	18,6	18,5	19,2	18,0
pFe(III)*	10,6	10,4	11,1	9,9
pFe(II)	19,3	17,4	17,8	16,9
E' vs. NHE (V)	+0,11	+0,06	+0,06	+0,05

[a] Az UV-látható spektrofotometriás titrálás során alkalmazott mérési körülmények: T = 25 °C, I = 0,10 M (KCl), 30% (v/v) DMSO/H_2O. A pM (= –lg [szabad fémion]) értékeket c_{Fe} = 1 µM, c_L = 10 µM és pH = 7,40 esetén számoltuk. A ciklikus voltammetriás mérések körülményei: c_L = 1 mM, c_{Fe} = 0.5 mM pH = 7,40 (10 mM HEPES), T = 25 °C, I = 0,1 M (TBAN), 90% (v/v) DMSO/H_2O, 0,01 V/s pásztázási sebesség.

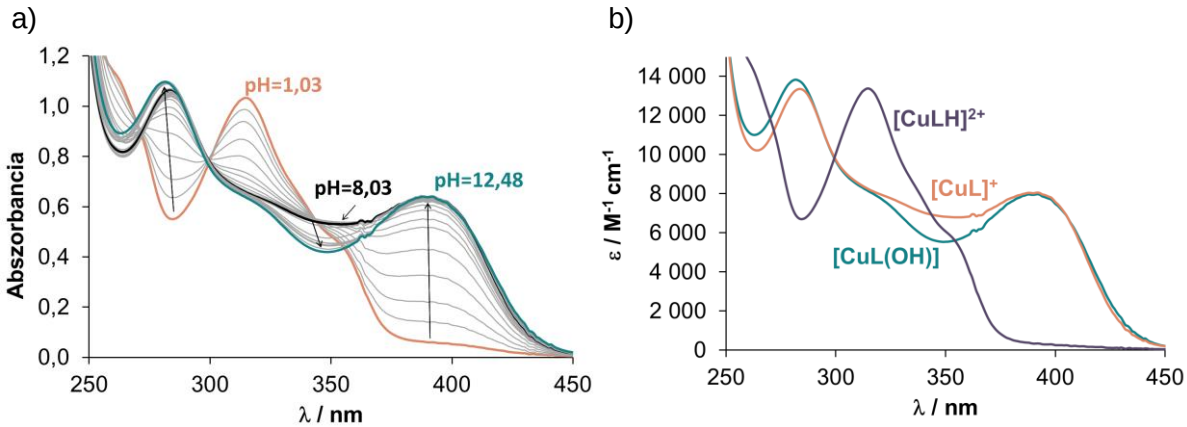
A pFe értékek alapján a COTI-2 mutatta a legnagyobb, míg a COTI-NMeCy származék a legkisebb affinitást a Fe(II)-ionok felé. A Fe(III)-ionoknál szintén a COTI-NMeCy ligandum rendelkezett a legalacsonyabb értékkel, ám ebben az esetben a legmagasabbal a COTI-NMe_2. Ahhoz, hogy feltérképezzük ezen tioszemikarbazonok vaskomplexeinek redoxi tulajdonságait, ciklikus voltammetriás méréseket végeztem. A voltamogrammok alapján reverzibilis redoxi folyamatok játszódnak le, melyek során kapott formál potenciál értékeket a 6. táblázat tartalmazza. A COTI-NMeCy, COTI-NMe_2 és COTI-NH_2 származékokra nagyon hasonló értékeket kapunk, míg a COTI-2 esetén ez valamivel magasabbnak bizonyult. Ez összhangban van a már korábban leírtakkal, miszerint a COTI-2, szemben a többi származékkal, a Fe(II)-ionok felé mutat valamivel nagyobb affinitást.

Ezután vizsgáltam a Fe(III)-komplexek közvetlen redukcióját két természetes redukálószerrel, a GSH-nal és AA-val. A redukálószer hozzáadása után abszorbancia növekedés figyelhető meg 610 nm környékén, mely a Fe(II)-komplexre jellemző elnyelési sáv (32. ábra). Ezután oxigént buborékoltattam az oldatba, mely eredményeképp az abszorbancia lecsökkent, ám nem kaptam vissza teljesen a kiindulási spektrumot. A reakció minden esetben lassú volt, és nem tapasztaltunk jelentős eltéréseket a különböző komplexeknél a reakciósebességekben sem. Az AA-val lejátszódó reakció még lassabbnak bizonyult, mint a GSH-nal, a reakcióidő nagyjából a kétszeresének adódott.



32. ábra: a) Normált ciklikus voltamogrammok a vas-tioszemikarbazon (1:2) rendszerek esetén 10 mV/s pásztázási sebesség mellett {c_L = 1 mM; $c_{Fe(III)}$ = 0,5 mM; pH = 7,4 (10 mM HEPES); T = 25 °C; I = 0,10 M (TBAN); 90%(v/v) DMSO/H_2O}, valamint b) Fe(III) – COTI-NMe_2 (1:2) rendszer UV-látható spektrumainak időfüggése 300 ekvivalens GSH hatására anaerob körülmények között. {c_L = 60 µM; $c_{Fe(III)}$ = 30 µM; c_{GSH}= 9 mM; pH = 7,4; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); 5%(v/v) DMSO/H_2O; ℓ = 1,0 cm}

A további UV-látható spektrofotometriás titrálások során megállapítottuk, hogy a Cu(II)-ionokkal − a vasionokkal ellentétben − csak monokomplexek képződtek, még ligandum felesleg mellett is. A képződő, igen nagy stabilitású komplexek már savas pH-tartományban kialakulnak, képződési állandóikat közvetlenül nem tudtunk meghatározni, csak a komplexek pK_a értékeit. Két folyamatot figyelhettünk meg a pH növelésének hatására (33. ábra), mely során a második (ami csak a vegyes hidroxido-komplex képződéséhez tartozik) jóval kisebb mértékű spektrális változással jár.



33. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok, és b) a számolt moláris abszorbancia spektrumok a COTI-NH_2 – Cu(II) rendszer esetén. {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 80 μM; pH = 1,0 – 12,5; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm; 30%(v/v) DMSO/H_2O}

Hasonló változásokat mutattak a többi rendszer pH-függő spektrumai is, kivéve a COTI-2-t, ahol csak egy egyensúlyi állandót tudtunk meghatározni (7. táblázat), ami a nem koordinálódó piridínium-NH^+-hez tartozik. A számolt koncentráció eloszlási görbék szerint széles pH-tartományban a $[CuL]^+$ komplex a domináns, így erre határoztuk meg a látszólagos stabilitási állandókat az EDTA-kiszorítási mérések során. Az így kapott látszólagos stabilitási állandókat felhasználva kaptuk a 7. táblázatban szereplő stabilitási szorzatokat, melyekből számolt pCu értékek alapján az alábbi stabilitási sorrendet állíthatjuk fel a Cu(II)-komplexekre pH = 7,4-n: COTI-NH_2 < COTI-NMe_2 < COTI-NMeCy < COTI-2. Összegezve elmondható, hogy az *N*-terminális diszubsztitúció növekvő stabilitást eredményezett ezen COTI-2 származékokkal.

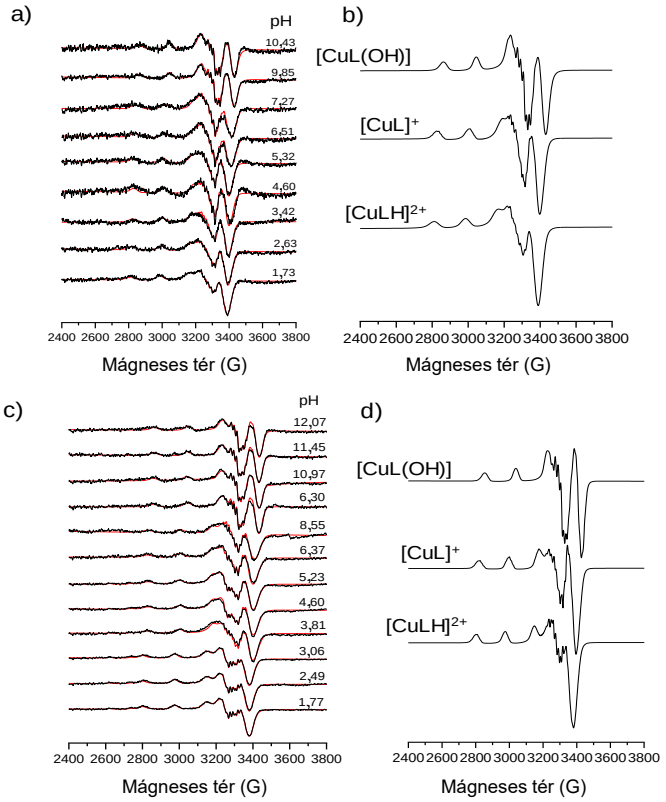
7. táblázat: A Cu(II) és Zn(II)-komplexek pK_a értékei és látszólagos stabilitási állandói (lg$\beta_{5.9}'$ és lgβ), formál potenciál értékek (E') a rézion–ligandum (1:1) rendszerre.[a]

	COTI-2	**COTI-NH$_2$**	**COTI-NMe$_2$**	**COTI-NMeCy**
pK_a[CuLH]$^{2+}$	4,66 ± 0,01	2,24 ± 0,03	1,40 ± 0,02	1,26 ± 0,01
pK_a[CuL]$^{+}$	–	8,84 ± 0,04	>8	>8
lg$\beta_{5,9}'$ [CuL]$^{+}$ [b]	13,06 ± 0,02	10,59 ± 0,08	12,23 ± 0,05	12,56 ± 0,09
lgβ [CuL]$^{+}$ [c]	18,19	16,92	18,42	19,08
pCu	15,6	13,1	14,7	15,0
***E*' vs. NHE (V)**	−0,19	−0,17	−0,24	−0,22
lgβ [ZnLH]$^{2+}$	18,54 ± 0,02	–	–	–
lgβ [ZnL]$^{+}$	12,85 ± 0,02	14,07 ± 0,04	13,02 ± 0,04	12,94 ± 0,04
lgβ [ZnL$_2$]	23,23 ± 0,08	25,42 ± 0,04	25,24 ± 0,08	26,32 ± 0,09
pZn	11,9	11,6	11,7	12,1

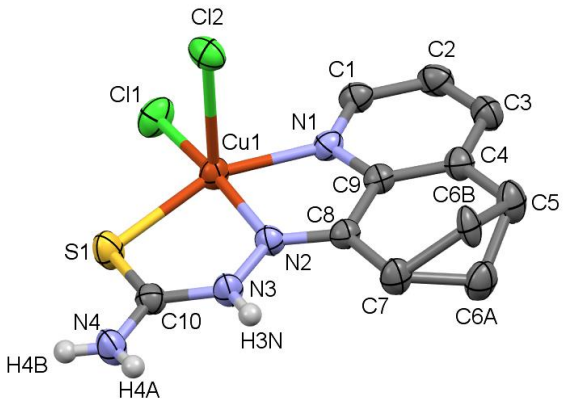
[a]Az UV-látható spektrofotometriás titrálás során alkalmazott mérési körülmények: T = 25,0 °C, I = 0,10 M (KCl), 30% (v/v) DMSO/H$_2$O. A pM (= –lg [szabad fémion]) értékeket c_M = 1 μM, c_L = 10 μM és pH = 7,40 esetén számoltuk. A ciklikus voltammetriás mérések körülményei: c_L = c_M = 1 mM, pH = 7,40 (10 mM HEPES), T = 25 °C, I = 0,1 M (TBAN), 90% (v/v) DMSO/H$_2$O, 0,01 V/s pásztázási sebesség. [b]UV-látható spektrofotometriás EDTA-kiszorítási vizsgálatok során kapott állandók (pH = 5,90), lgβ' = 9,47 a 3AP [CuL]$^+$ komplexére [143]. [c]β [CuL]$^+$ = β' [CuL]$^+$ × α_H, α_H = 1 + [H$^+$]/K_a (HL) + [H$^+$]^2/(K_a(HL) × K_a(H$_2$L$^+$)); [H$^+$] = 10$^{-5,90}$ M.

A koordinációs mód vizsgálatára ESR spektrumokat rögzítettünk különböző pH-kon, két választott ligandum esetén (COTI-2 és COTI-NH$_2$), amelyeket a 34. ábrán láthatunk. A mérések során fagyasztott mintákkal dolgoztunk 77 K-en. A két vizsgált ligandum réz(II)komplexeit három komponens spektrum segítségével tudtuk leírni: [CuLH]$^{2+}$, [CuL]$^+$ és [CuL(OH)], a kapott ESR paramétereket a 8. táblázat tartalmazza.

Hasonlóság figyelhető meg, ha a COTI-NH$_2$ adatait összevetjük a 3AP komplexeinek paramétereivel (f3. táblázat), ami alapján [CuLH]$^{2+}$ komplexre (N,N,S)(H$_2$O), [CuL]$^+$ esetén (N,N,S$^-$)(H$_2$O) és a [CuL(OH)]-ra (N,N,S$^-$)(OH$^-$) koordinációs módot javasoltunk. Ezt megerősítették az általam előállított egykristály röntgenkrisztallográfiai adatai a COTI-NH$_2$ komplexére (35. ábra), melyben a semleges ligandum koordinálódik a [CuLH]$^{2+}$ komplexben. Ugyanezen koordinációs módokat feltételeztük a többi réz(II)komplexnél is.



34. ábra: a–b) Kísérleti (fekete) és szimulált (piros) fagyasztott ESR spektrumok, valamint a különböző komplexeire kapott számított spektrumok a Cu(II)–COTI-2, és c–d) Cu(II)–COTI-NH_2 rendszerekben. A spektrumokat a maximális intenzitásra normáltuk. {$c_{Cu(II)} = c_L$ = 20 μM (COTI-2); $c_{Cu(II)} = c_L$ = 80 μM (COTI-NH_2); T = 77 K; 30% (v/v) DMSO/H_2O}



35. ábra: [Cu(COTI-NH_2)Cl_2]·CH_3OH ORTEP-nézete 50%-os valószínűségi szinten. A szénatomokhoz kötött hidrogénatomokat és a metanol oldószert az áttekinthetőség kedvéért nem mutatom.

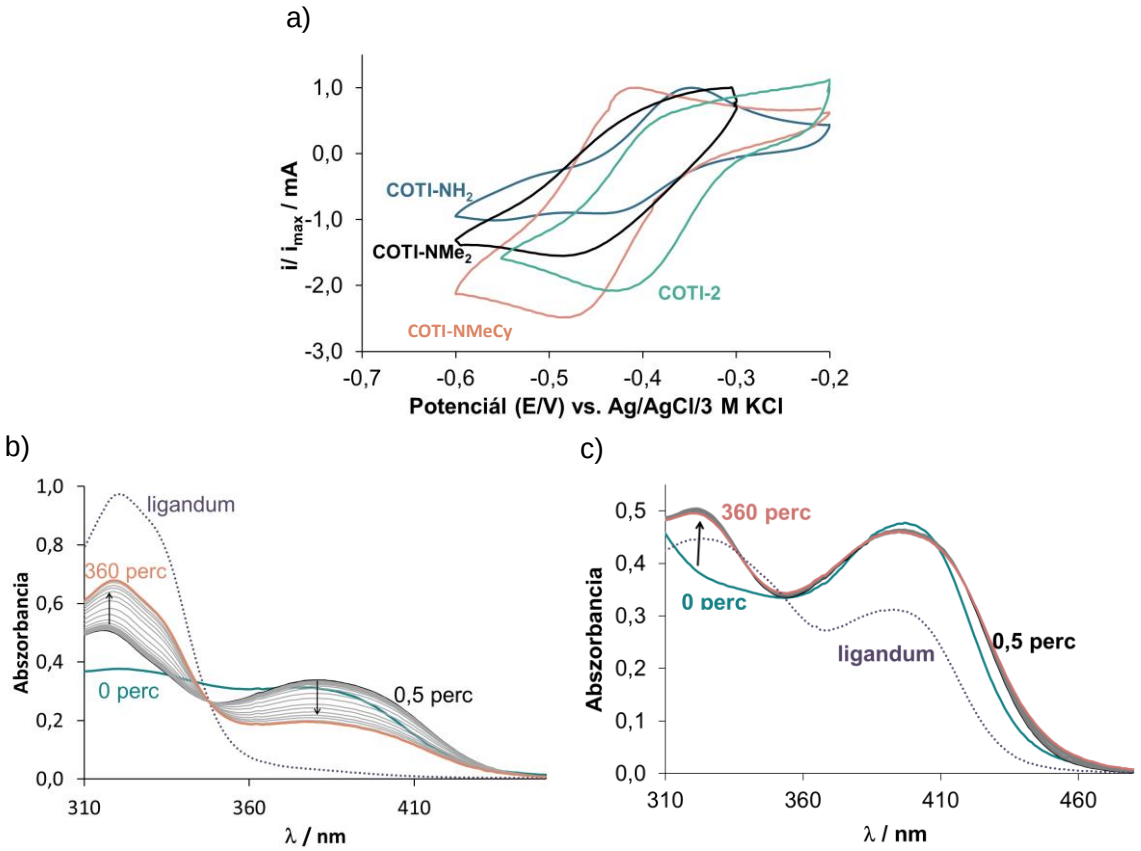
8. táblázat: A vizsgált COTI-NH_2 és COTI-2 réz(II)komplexeire kapott anizotróp ESR paraméterek 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben 77 K-en [a].

	g_x	g_y	g_z	A_x (G)	A_y (G)	A_z (G)	a_{Nx} (G)	a_{Ny} (G)	a_{Nz} (G)
Cu^{2+}	2,080	2,080	2,412	8,0	8,0	113,2	–	–	–
HL=COTI-NH_2									
$[CuLH]^{2+}$	2,051	2,025	2,199	18,9	24,1	168,6	16,4	9,8	10,0
							11,5	16,5	10,4
$[CuL]^{+}$	2,051	2,020	2,180	20,8	29,2	174,0	14,2	7,9	11,9
							8,6	16,8	11,6
[CuL(OH)]	2,040	2,025	2,147	24,7	13,2	181,6	16,2	10,7	7,7
							14,5	16,8	10,8
HL=COTI-2									
$[CuLH]^{2+}$	2,050	2,029	2,188	17,8	38,8	170,6	15,6	12,1	12,0
							9,9	16,2	14,1
$[CuL]^{+}$	2,053	2,022	2,171	18,6	24,8	174,7	13,2	7,7	12,0
							7,2	18,5	12,9
[CuL(OH)]	2,040	2,025	2,145	26,9	16,7	179,2	16,2	10,7	7,7
							14,5	16,8	10,8

[a] A kísérleti hiba g esetén ±0,001, A és a_N esetében ±1 G volt.

Hasonlóan a vaskomplexek redoxi tulajdonságainak vizsgálatához, a rézkomplexekkel is végeztünk ciklikus voltammetriás méréseket, illetve direkt redukciós méréseket, a korábban leírt körülmények között. A mért ciklikus voltammogrammok (36a. ábra) reverzibilis redox folyamatokra utalnak, melyekhez tartozó formál potenciál értékeket a 7. táblázat tartalmazza. Ezek az értékek a fiziológiás körülményekre vonatkozó oxidált/redukált GSSG/GSH rendszer potenciáltartományába esnek (−0,26 V) [160].

Egymással összevetve a meghatározott potenciál értékeket az alábbi sorrend állítható fel: COTI-NMe_2 < COTI-NMeCy < COTI-2 < COTI-NH_2. A GSH-nal való közvetlen redoxi reakció vizsgálata során elsőként egy vegyes ligandumú komplex képződését figyeltük meg, melyet lassú reakció követett a COTI-NH_2 esetén (36b. ábra). Míg a többi ligandum esetén, a vegyes ligandumú komplex kialakulása után már nem tapasztaltunk jelentős változást az alkalmazott körülmények között (36c. ábra), ami arra utal, hogy a GSH nem volt képes redukálni a komplexeket (ami a redox potenciál értékek alapján nem meglepő). Ha a redukció végbement, az a szabad ligandum megjelenését és a Cu(I)-GSH komplex kialakulását eredményezte, hasonlóan, mint a korábban bemutatott ligandumcsaládok esetén.

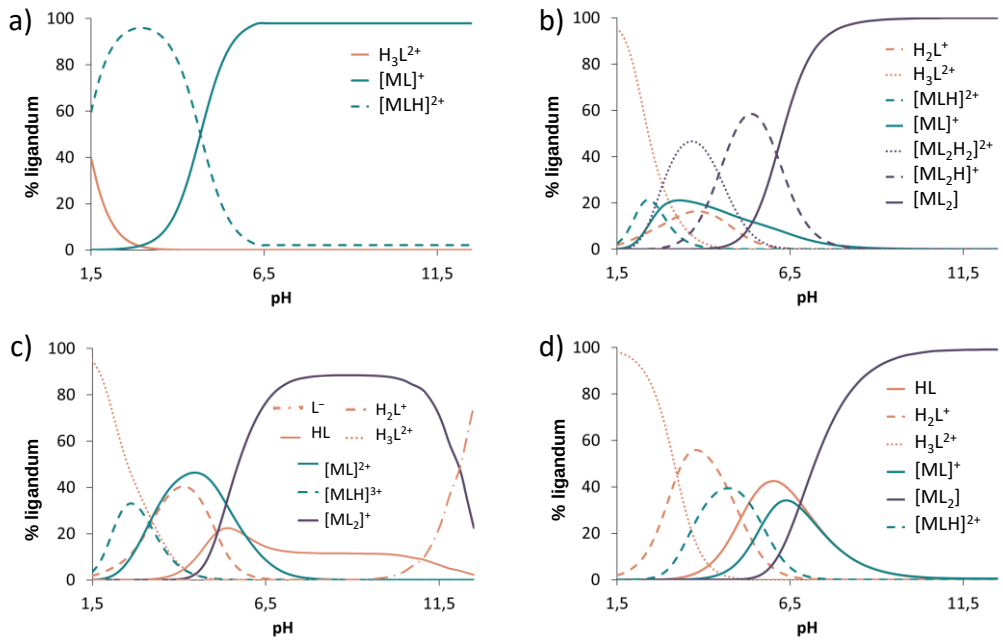


36. ábra: a) Normált ciklikus voltamogrammok a rézion-tioszemikarbazon (1:1) rendszerek esetén 10 mV/s pásztázási sebesség mellett {c_L = 1 mM; $c_{Cu(II)}$ = 1 mM; pH = 7,4 (10 mM HEPES); T = 25 °C; I = 0,10 M (TBAN); 90% (v/v) DMSO/H_2O}, b) Cu(II) – COTI-NH_2 (1:1) és c) Cu(II) – COTI-NMe_2 (1:1) rendszerek UV-látható spektrumainak időfüggése 300 ekvivalens GSH hatására anaerob körülmények között, valamint a szabad ligandum spektruma (pontozott vonal). {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 30 μM; c_{GSH} = 9 mM; pH = 7,4; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); 5%(v/v) DMSO/H_2O; ℓ = 1,0 cm}

A vas(III)komplexekkel ellentétben az AA, mely gyengébb redukálószer, egyik réz(II)komplexet sem tudta redukálni. A képződő GSH-tartalmú vegyes ligandumú komplexeknek igen fontos jelentősége van a hatásmechanizmus, illetve a fellépő rezisztencia szempontjából, hiszen, ahogyan azt már korábban tárgyaltam az ABCC1 pumpa képes lehet felismerni és a sejten kívülre pumpálni a képződő adduktumokat. Együttműködő biológus partnereink és a saját oldatkémiai eredményeink alapján elmondható, hogy míg a COTI-2 (valamint a másik kettő *N*-terminálisan diszubsztituált származék) stabilis vegyes ligandumú komplexet képez a GSH-nal, ezáltal a pumpa képes felismerni, ami rezisztenciát eredményez, addig a COTI-NH_2 esetén a ligandum a redukció során felszabadul a komplexből, így az ABCC1 transzporter már nem juttatja ki a sejtből, ezáltal nem alakul ki rezisztencia.

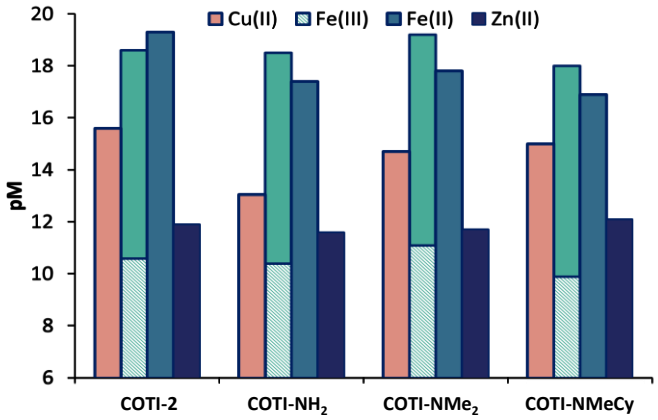
Mivel a Zn(II)-ion fiziológiás körülmények között nem vált oxidációs állapotot, redoxi folyamatokra vonatkozó vizsgálatokat nem végeztünk. Spektrofotometriás titrálások segítségével feltérképeztük a ligandumok cink(II)-kötő képességét, ahogyan azt a többi fémion esetén is tettük. A spektrumok elemzésével meghatároztuk a képződő $[ZnLH]^{2+}$, $[ZnL]^{+}$ és $[ZnL_2]$ komplexek stabilitási állandóit, melyet az 7. táblázat tartalmaz. Szemben a réz(II)komplexekkel, ebben az esetben biszkomplex képződését is leírtuk.

Ahhoz, hogy jobban össze tudjuk hasonlítani a ligandumok különböző fémionok felé mutatott affinitását, koncentráció eloszlási görbéket (37. ábra), illetve azokból pM értékeket is számítottunk (38. ábra). Megfigyelhetjük, hogy fiziológiás pH-n a hidrazinos-NH deprotonálódásával kialakuló mono- ($[CuL]^{+}$) és biszkomplexek ($[ML_2]^{+/0}$) a dominánsak.



37. ábra: Számított koncentráció eloszlási görbék a) Cu(II):COTI-2 = 1:1, b) Fe(II):COTI-2 = 1:2, c) Fe(III):COTI-2 = 1:2, és d) Zn(II):COTI-2 = 1:2 rendszer esetén. {$c_L = c_{Cu(II)} = 1$ μM; $c_{Fe(II)} = c_{Fe(III)} = c_{Zn(II)} = 0{,}5$ μM; $T = 25$ °C; $I = 0{,}10$ M (KCl); 30% (v/v) DMSO/H_2O}

Két különböző mintázatot figyelhetünk meg: elsőként a COTI-2 esetét, ahol a vas(II)komplex volt a legnagyobb stabilitású, ezt követték a vas(III)-, réz(II)-, és cink(II)komplexek. A másik csoportot a COTI-NMe_2, COTI-NH_2 és COTI-NMeCy alkották, amelyek a legnagyobb affinitást a vas(III)ionhoz, majd a vas(II)ionhoz, ezután a réz(II)-, végül pedig a cink(II)ionok felé mutatták. A +2 vagy +3 oxidációs állapotú ligandumok vassal szembeni preferenciája a redoxi potenciál értékekben is tükröződik (6. táblázat).



38. ábra: pM (–lg[M]) értékek Cu(II)-ligandum (1:1), Zn(II)-ligandum (1:1), Fe(II)-ligandum (1:2) és Fe(III)-ligandum (1:2) rendszerek esetén számítva, fiziológiás pH-n, 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben. Fe(III): világoszöld oszlop jelenti a Fe(III)ionok hidrolízisének figyelembevételével, míg a sötétzöld jelenti a hidroxido-komplexek figyelembevétele nélkül számolt pM értékeket. {$c_L = c_{Cu(II)} = c_{Zn(II)} = 1$ µM; $c_{Fe(II)} = c_{Fe(III)} = 0,5$ µM; pH = 7,40; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

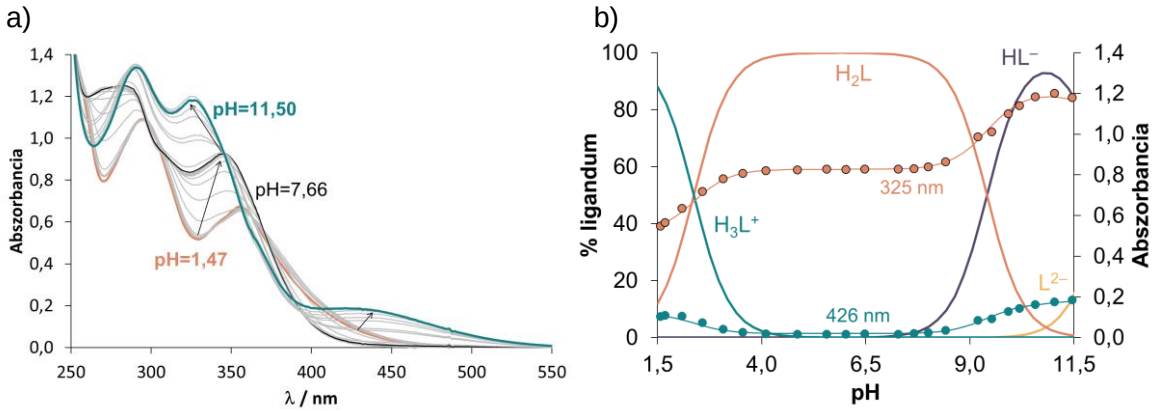
A ligandumok és réz(II)komplexeik citotoxicitásának feltérképezése érdekében, együttműködő partnereink meghatározták azok IC_{50} értékeit (f4. táblázat) SW480 vastagbél-adenokarcinóma sejteken, valamint a TSK-rezisztens SW480/Coti és SW480/Tria sejteken egyaránt. Az SW480/Coti sejteknél a rezisztencia az ABCC1, míg az SW480/Tria sejteknél az ABCB1 pumpák túlzott expresszióján alapul [161]. A COTI-2 valamivel aktívabbnak bizonyult, mint a 3AP a SW480 sejteken, ezzel szemben a COTI-NH_2 citotoxicitása jelentősen csökkent a 3AP-hez képest. A terminális diszubsztitúció hatását vizsgálva megállapítható, hogy a COTI-NMe_2 volt a legaktívabb (11-szer kisebb IC_{50} értékkel). Azonban a COTI-NMeCy származék esetén a diszubsztitúció az aktivitást a COTI-2 kiindulási vegyület szintjére csökkentette. A réz(II)ionokkal való komplexképződés fokozta a TSK-ok citotoxicitását, különösen a COTI-2 és a COTI-NMeCy esetében (7-8-szoros aktivitásnövekedés). Ahogyan már korábban is említettem a COTI-2 egy ABCC1 szubsztrát (míg a COTI-NH_2 nem az), továbbá a réz(II)komplexe GSH-nal stabilis adduktumot képez. Ezek alapján azt vártuk, hogy a diszubsztituált származékok is réz(II)-GSH adduktumokat képeznek a sejtben, így az ABCC1 is felismeri őket. Ez teljesült is a COTI-NMeCy származék esetén, azonban meglepő módon a COTI-NMe_2 nagyon aktív volt az SW480/Coti sejtekkel szemben. Együttműködő partnereink által, egy ismert ABCC1-túlexpresszáló sejtmodellben (GLC-4/adr) végzett további kísérletek alátámasztották, hogy a COTI-2-vel és a COTI-NMeCy ligandummal ellentétben az ABCC1 expressziója csak kis mértékben befolyásolja a COTI-NMe_2 hatékonyságát.

5.2. 8-hidroxi-kinolinok vizsgálata

5.2.1. 8-hidroxi-kinolinok oldatkémiai tulajdonságainak változása a 2-es pozícióban való szubsztitúció hatására

A szakirodalomban jól ismert, hogy a 8-hidroxi-kinolin különböző származékainak antiproliferatív hatása kapcsolatban áll endogén fémionokkal való komplexképződéssel is. Doktori munkám során arra voltam kíváncsi, hogy a 2-es pozícióban való szubsztitúciónak (H, Cl, F, Me, O-Me, OH, NH_2 csoportok) milyen hatása van az oldategyensúlyi tulajdonságokra, illetve a biológiai aktivitásra az L^1–L^8 ligandumok esetén (13. ábra).

A ligandumok oldhatóságát a 9. táblázatban foglaltam össze, a lipofilitást jellemző megoszlási hányadosaikkal együtt. Jól látható, hogy a vizsgált ligandumok erős lipofil karakterrel és igen kis vízoldhatósággal rendelkeznek, az adatok között azonban nincs érdemi különbség. A proton disszociációs állandók meghatározásához UV-látható spektrofotometriás titrálásokat végeztem, viszonylag kisebb koncentrációk mellett, 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben, a vegyületek korlátozott oldhatósága miatt. Reprezentatív spektrumsorozatot mutat az 39a. ábra az L^7 ligandumra, melyekből számolt proton disszociációs állandókat a 9. táblázat tartalmazza.



39. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok, b) és a számolt koncentráció eloszlási görbék, valamint a mért pH-függő abszorbancia értékek és illesztésük 325 és 426 nm-en az L^7 ligandum esetén. {c_L = 50 μM; pH = 1,5 – 11,5; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm; 30% (v/v) DMSO/H_2O}

Elmondható, hogy az L^6 ligandum kivételével minden esetben három proton disszociációs állandót tudtunk meghatározni (hidroxil-, kinolínium NH^+ és benzohidrazid-NH-csoportokra vonatkozóan), míg az L^6 egy további disszociálni képes, fenolos OH csoportot is tartalmaz. A legkisebb pK_a a kinolínium NH^+-hez tartozik, ezt követi a

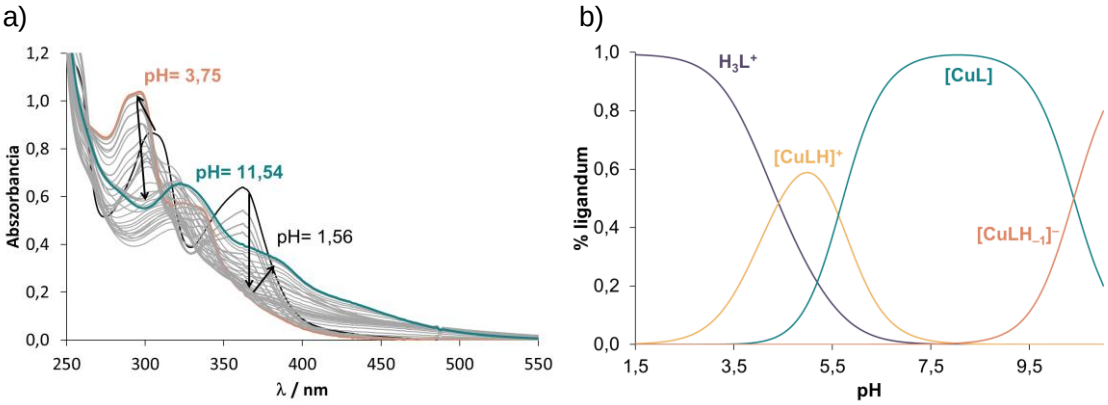
hidroxil-, és vegül a benzohidrazid-NH deprotonálódása a pH növekedésével. Összességében elmondható, hogy az általunk vizsgált szubsztituensek csak minimális hatást gyakorolnak a hidroxil-, és kinolínium-NH^+ csoportokhoz tartozó proton disszociációs állandókra. Ezzel szemben az elektronszívó klór és fluor szubsztituensek csökkentik a benzohidrazid-NH pK_a értékét, az elektrondonor metil- és metoxilcsoportok növelik azt. Az L^6 eltérően viselkedett a bázikus pH-tartományban, mivel egy átfedő folyamatban valószínűleg a fenolos OH is deprotonálódott, így a benzohidrazid-NH pK_a értéke nem határozható meg pontosan, mivel disszociációja meglehetősen bázikus pH-tartományban megy végbe (pH > 12). Hasonlóan az L^6-hoz, mind az L^7, mind az L^8 tartalmaznak egy további, savas pH-tartományban disszociálni képes protont. Mivel az ammónium- (L^7) és a piridínium-nitrogén (L^8) deprotonálása feltételezhetően ugyanabban a pH-tartományban megy végbe, mint a kinolínium-NH^+-é, az első egyensúlyi állandót nem lehet egyértelműen a különböző csoportokhoz rendelni. Megállapítottuk a kapott pK_a értékek alapján, hogy fiziológiás körülmények között (pH = 7,4) az L^1 – L^5, $L^{7,8}$ ligandumok semleges H_2L formájukban vannak jelen az oldatban (ahogyan azt a 39b. ábra is jól szemlélteti), míg az L^6 esetén a H_2L domináns forma mellett megjelenik az anionos HL^- is (12%-ban, a fenolos OH deprotonálódása miatt).

9. táblázat: A vizsgált ligandumok UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározott pK_a értékei 30% (v/v)-os DMSO/H_2O elegyben; termodinamikai oldhatóságai (S); lg$D_{7,4}$ értékei (n-oktanol/víz) pH 7,40-n.

ligandum	pK_a (H_3L [a])	pK_a (H_2L [a])	pK_a (HL [a])	pK_a (L [a])	S (μM)	lg $D_{7,4}$
L^1	2,24 ± 0,03	9,51 ± 0,03	11,45 ± 0,03	–	3,7	+1,49 ± 0,01
L^2	2,11 ± 0,03	9,39 ± 0,03	11,01 ± 0,03	–	<1	+1,77 ± 0,02
L^3	2,10 ± 0,03	9,45 ± 0,03	11,18 ± 0,03	–	<1	+1,70 ± 0,09
L^4	2,18 ± 0,03	9,61 ± 0,03	11,67 ± 0,03	–	1,7	+1,9 ± 0,1
L^5	2,34 ± 0,03	9,61 ± 0,03	11,71 ± 0,03	–	2,0	>2
L^6	2,33 ± 0,03	8,29 ± 0,03	9,65± 0,03	>12	2,1	+1,85 ± 0,09
L^7	2,37 ± 0,03	9,41 ± 0,03	12,25± 0,03	–	1,4 ± 0,1	–
L^8	2,61 ± 0,03	8,95 ± 0,03	11,14 ± 0,03	–	2,1 ± 0,2	–

[a]A töltéseket az egyszerűség kedvéért nem tüntettem fel.

UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével vizsgáltuk a réz(II)ionokkal való komplexképződési egyensúlyi folyamatokat három kiválasztott ligandum esetén (L^1, L^5 és L^6), 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben. A különböző pH-kon rögzített spektrumokat, illetve az abból számolt moláris abszorbancia spektrumokat a képződő komplexekre az L^1 – Cu(II) rendszerre a 40. ábrán láthatjuk. A meghatározott stabilitási szorzatokat és a belőlük számolt proton disszociációs állandókat a 10. táblázat tartalmazza.



40. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok, c) valamint a számított koncentráció eloszlási görbék az L^1:Cu(II) = 1:1 rendszer esetén. {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 50 μM; pH = 3,7 – 11,5; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm; 30% (v/v) DMSO/H_2O}

Megfigyelhető, hogy az L^1 ligandummal $[CuLH]^+$, [CuL], és $[CuLH_{-1}]^-$ típusú komplexek képződnek, hasonlóan az L^5-höz, míg $[CuLH_{-2}]^{2-}$ képződését is leírtuk az L^6 ligandummal. A $[CuLH]^+$ komplexben feltehetően (O^-,N) koordináció jön létre, míg a benzohidrazid NH protonált állapotban van. Megfigyelhetjük, hogy a $[CuLH]^+$ komplexre jóval kisebb pK_a értéket határoztunk meg, mint a ligandum benzohidrazid NH csoportja esetén (pK_{a3} az L^1 és L^5 esetén, pK_{a4} pedig az L^6 esetén). A $[CuLH]^+$ deprotonálódásával létrejövő [CuL] komplexben nagy valószínűséggel a benzohidrazid imidazol N-je szintén részt vesz a koordinációban az (O^-,N) donoratomok mellett. A $[CuLH_{-1}]^-$ nagy valószínűséggel egy vegyes hidroxido-komplex ($[CuLOH]^-$, melyben az $[(O^-,N,N^2_{im});OH^-]$ koordinációs módot javasoltunk az L^1 és L^5 ligandumoknál, míg az L^6-tal további OH-csoport deprotonálódásával jön létre a [CuL]. $[CuLH_{-2}]^{2-}$ vegyes hidroxido-komplex csak az L^6 esetén képződött.

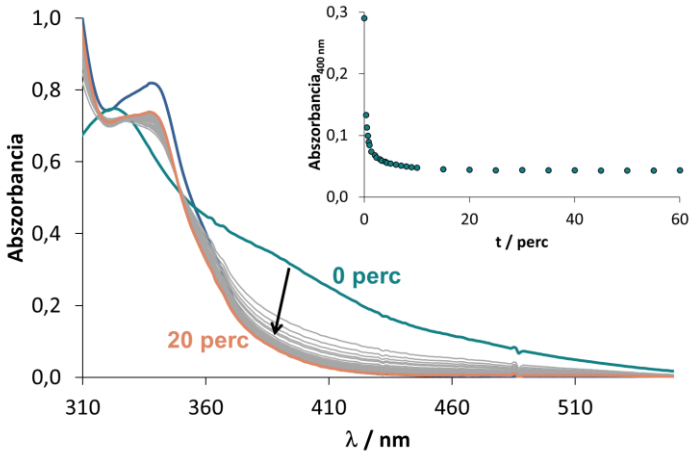
A számított koncentráció eloszlási görbék (40b. ábra) alapján elmondható, hogy fiziológiás pH-n a [CuL] komplex a domináns. A pCu értékek (10. táblázat) alapján, az L^1 és L^5 ligandumoknak hasonló rézkötő képessége van, míg az L^6 valamivel kisebb stabilitású komplexeket képez a másik két ligandumhoz hasonlítva. Ez arra utal, hogy a benzohidrazid N^2_{im} nem vesz részt a koordinációban.

10. táblázat: A réz(II)komplexekre meghatározott stabilitási szorzatok (lgβ), pK_a értékek, formál potenciál (E'), valamint pCu értékek a réz:ligandum (1:1) rendszer esetén.

	L^1	L^5	L^6
lgβ [CuLH]$^+$	23,41±0,02	22,75±0,05	16,91±0,03
lgβ [CuL]	17,79±0,02	18,26±0,04	11,67±0,03
lgβ [CuLH$_{-1}$]$^-$	7,39±0,03	7,18±0,04	2,50±0,03
lgβ [CuLH$_{-2}$]$^{2-}$	–	–	–7,40±0,04
pK_a [CuLH]$^+$	5,62	4,49	5,24
pK_a [CuL]	10,40	11,08	9,17
pCu^a	8,96	9,03	7,26

$^a c_L = c_{Cu(II)}$ = 1 μM; pH=7,40

A kiválasztott vegyületek (L^1, L^5 és L^6) rézkomplexeinek redoxi tulajdonságait ciklikus voltammetriával vizsgáltuk 9:1 (v/v) DMSO:HEPES (pH=7,4; 0,1 M TBAN) oldószerelegyben. A komplexekre kapott formál potenciál értékek a +377 és −395 mV *vs.* NHE potenciáltartományba estek, ami magasabb, mint a GSSG/GSH (−260 mV [160]) és a dehidro-L-aszkorbinsav/AA (+50 mV [157]) redoxi párok redoxi potenciáljai. A rézkomplexek és a GSH ill. AA között lejátszódó redoxi reakciót spektrofotometriásan követtem nyomon, anaerob körülmények között (pH=7,4, 5% (v/v) DMSO/H_2O). A redukálószerek hozzáadását követően jelentős spektrális változásokat figyeltem meg, abban a hullámhossztartományban, ahol a redukálószer és annak komplexei nem nyelnek el fényt. A redoxi reakciók körülbelül 20−60 percen belül elérték az egyensúlyi állapotot (41. ábra). Ahogyan korábbi vegyületcsaládoknál már kiemeltem, ebben az esetben is a szabad ligandum felszabadulását figyeltük meg, ami a keletkezett réz(I)komplex disszociációjához köthető, mely során stabilis réz(I)komplex jön létre a GSH-nal (vagy AA-val), a szabad ligandum megjelenése mellett [153]. A lejátszódó reakciók sebességét tekintve megállapítottuk, hogy a redoxi reakció a GSH-nal minden esetben gyorsabb az aszkorbinsavhoz képest, és a komplexek reakciósebessége a következő tendenciát mutatták: $L^1 \sim L^6 > L^5$.



41. ábra: A Cu(II) – L^6 (1:1) rendszer UV-látható spektrumainak időfüggése 100 ekvivalens GSH hatására anaerob körülmények között, valamint a beszúrt ábrán 400 nm-en mért abszorbancia értékek az idő függvényében ábrázolva. {c_L = $c_{Cu(II)}$ = 40 μM; c_{GSH} = 4 mM; pH = 7,4; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); 5% (v/v) DMSO/H_2O; ℓ = 1,0 cm}

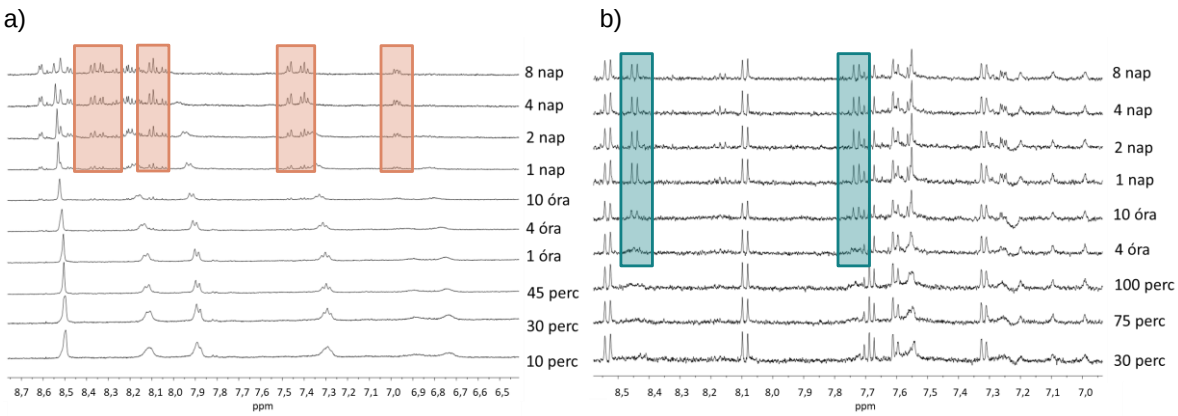
Együttműködő partnereink vizsgálták a szabad ligandumok és réz(II)komplexek citotoxicitását melanoma (A-375), illetve a tüdő adenokarcinóma (A-549) sejtvonalakon és az így kapott IC_{50} értékek 0,78–50 μM koncentrációtartományban vannak. Mérték a sejtek életképességét, 72 órás inkubációt követően. A szabad ligandumokhoz képest (IC_{50} = 12,3–50 μM felett) minden réz(II)komplex nagyobb citotoxicitású (IC_{50} = 2,0–16,0 μM). Egyetlen kivétel az L^6 réz(II)komplexe, melynek citotoxicitása mindkét sejtvonalon alulmaradt a többi komplexhez képest (azonban még mindig aktívabbnak bizonyult, mint maga a ligandum) (f5. táblázat). Továbbá elmondható, hogy a vizsgált réz(II)komplexek (L^6 kivételével) magasabb citotoxicitást mutattak, mint a pozitív kontrollként választott ciszplatin.

5.2.2. 8-hidroxi-kinolinok oldatkémiai tulajdonságainak változása morfolin- és piperidin szubsztituensek hatására

A nitrogén tartalmú heterociklusok fontos részei lehetnek a különböző gyógyszermolekuláknak, melyek közül a legelterjedtebbek a piperidin, a piridin és a morfolin származékok. Antioxidáns, gyulladáscsökkentő, antimikrobiális, rákellenes, antidiabetikus, tuberkulózis-ellenes és antidepresszáns hatással is rendelkezhetnek, míg a korábban is tárgyalt 8-hidroxi-kinolinok szintén rákellenes hatással bírnak [86]. Az általam vizsgált ligandumok piperidin (LC1) vagy morfolin (LC2 és LC3) molekularészeket tartalmaztak, melyeket különböző hosszúságú szénlánc kapcsolt a 8-hidroxi-kinolin

részhez. Együttműködő partnereink állították elő a ligandumokat, illetve azok cink(II)-, és réz(II)komplexeit (f3.,f4. ábra). Az általam vizsgált vegyületek Schiff-bázisok, ami miatt vízben oldva hidrolizálódhatnak a pH-től függően.

Mielőtt rátérnék az oldategyensúlyi sajátságok vizsgálatára, első lépésként kíváncsiak voltunk a stabilitásukra, ezért DMSO-d_6-ban és 30% (v/v) DMSO-d_6/H_2O elegyben (pH = 4-en, 8 napon keresztül) követtem a ligandumok ^{1}H NMR spektrumainak változását az idő függvényében (42. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy 10 órán keresztül a spektrumok szinte változatlanok maradtak mindkét közegben, de ezt követően új csúcsok jelentek meg, valamint az azometin csoporthoz tartozó sáv jelintenzitása lecsökkent. Ezen megfigyelések hatására a ligandumokból minden mérés előtt új törzsoldatot készítettem, hogy elkerüljem a bomlásból származó mérési hibát. Ezzel szemben, a különböző fémionokkal képzett komplexek esetén nem tapasztaltunk jelentős spektrális változást egy hét elteltével sem, ami feltehetően annak köszönhető, hogy a fémionok koordinációja stabilizálja a Schiff-bázisokban lévő C=N imin kötést.



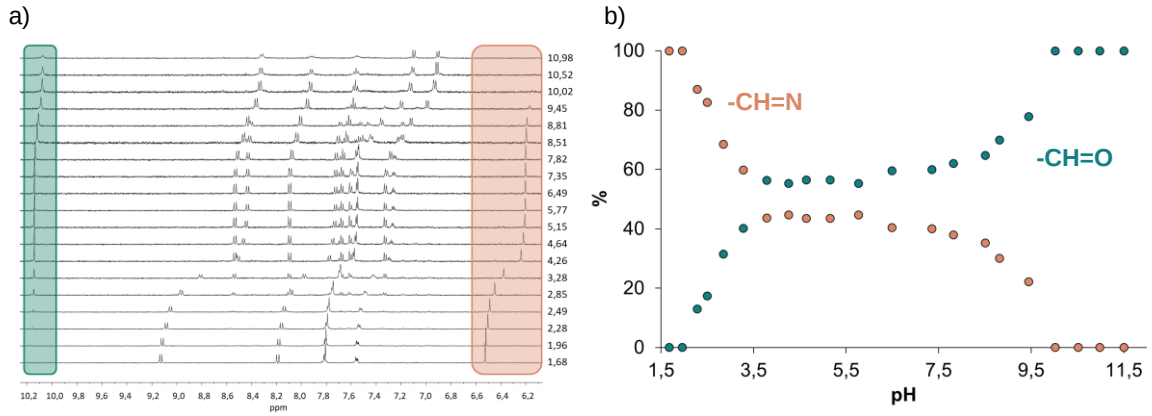
42. ábra: a) Az LC3 ^{1}H NMR-spektruma DMSO-ban, és b) 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben.

Meghatároztuk a ligandumok és a komplexek megoszlási hányadosát és oldhatóságát fiziológiás körülmények között (11. táblázat). Az oldhatóságok tekintetében, a szabad ligandumokra azok részleges bomlása miatt nem áll rendelkezésre megbízható adat (az alkalmazott 24 órás kevertetési idő miatt), míg a jóval rövidebb várakozási időt (2–3 óra) igénylő megoszlási állandó meghatározása már nem jelentett problémát. A komplexek vízoldhatósága mérsékeltnek bizonyult (S ~ 0,7–1,8 mM), kivéve a $Zn(LC3)_2$-t, amely alacsonyabb a többihez képest. A szabad ligandumok mérsékelten lipofil jellegűek, míg komplexeik lipofilebbek.

11. táblázat: A vizsgált ligandumok és komplexeik lg$D_{7,4}$ értékei és termodinamikai oldhatósága.

	lg$D_{7,4}$	$S_{7,4}$ (μM)
LC1	+0,63 ± 0,10	–
LC2	+0,64 ± 0,06	–
LC3	+0,76 ± 0,09	–
Cu(LC1)$_2$	+1,52 ± 0,07	1221
Cu(LC2)$_2$	+1,48 ± 0,07	1675
Cu(LC3)$_2$	+1,4 ± 0,10	1821
Zn(LC1)$_2$	+2,22 ± 0,08	694
Zn(LC2)$_2$	+0,86 ± 0,09	1674
Zn(LC3)$_2$	+1,69 ± 0,04	87

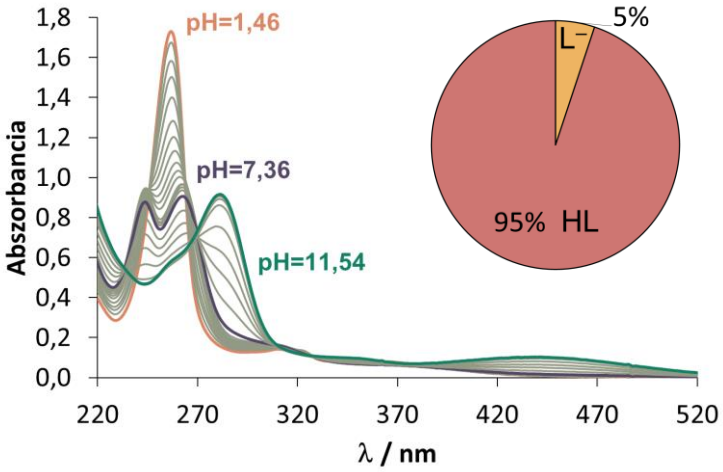
A ligandumok proton disszociációs állandóit UV-látható spektrofotometriás és ^{1}H NMR titrálásokkal szerettük volna meghatározni. Az LC2 pH-függő ^{1}H NMR spektrumait mutatja a 43. ábra, ahol látható, hogy a pH növelésével az azometin protonhoz rendelt csúcs (-CH=N) intenzitása lecsökkent, és a képződött aldehid -CH=O protonjához rendelt új csúcs jelent meg pH > 2,5-nél, ami pH > 10-nél dominánssá is vált. Ez a megfigyelés megerősítette az ligandumok lassú hidrolízisét, így az NMR adatokból nem számoltunk pK_a értékeket.



43. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett ^{1}H NMR spektrumok az LC2 ligandum esetén, b) és a -CH=N és -CH=O protonok csúcsintenzitása a pH függvényében. {c_L = 415 μM; pH = 1,7 – 11,0; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); 10% (v/v) D_2O/H_2O}

A ligandumok proton disszociációs állandóinak meghatározásához UV-látható spektrofotometriás titrálásokat végeztem, melyek jóval rövidebb időt, illetve kisebb koncentrációt igényeltek a ^{1}H NMR titrálásokkal szemben, azonban még így sem tekinthetünk el teljes bizonyossággal a hidrolízistől.

Ezeknek a vegyületek a protonált formái három disszociálni képes protonnal rendelkeznek, nevezetesen a heterociklus kinolínium-nitrogénnel (N_qH^+), fenolos OH-val és amin-nitrogénnel (NH^+). Mivel ez utóbbi a kromofor résztől távolabb esik, így a deprotonálódását a vártnak megfelelően nem kísérte jelentős spektrumváltozás. Az LC1 reprezentatív UV-látható spektrumait mutatja be a 44. ábra.



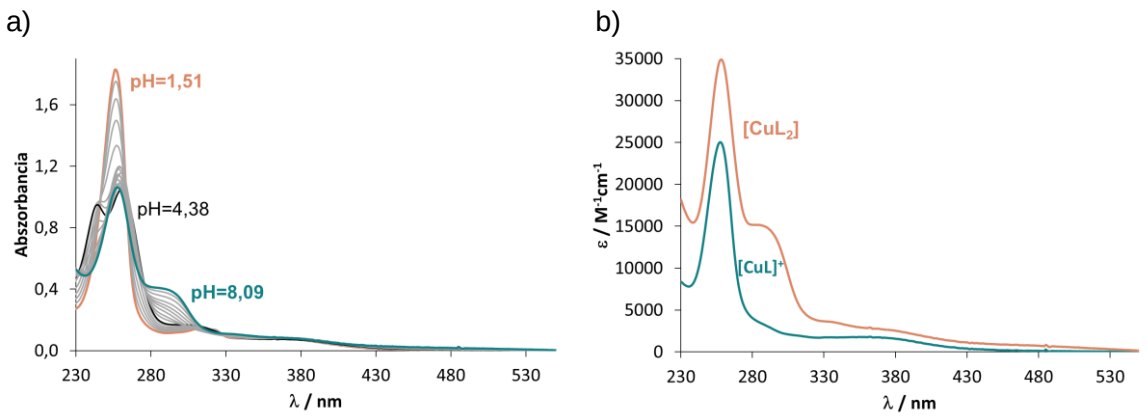
44. ábra: Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok az LC1 ligandum esetén, a beszúrt kördiagram mutatja a különböző protonáltságú ligandum formákra számolt százalékos eloszlást pH = 7,4-n. {c_L = 60 µM; pH = 1,5 – 11,5; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

Két jól elkülönülő folyamatot láthatunk, továbbá az izobesztikus pontok jelenléte azt erősíti, hogy a Schiff-bázis bomlása nem jelentős, hiszen csak két részecske tart egyensúlyt az egyes deprotonálódási lépések folyamán. A meghatározott proton disszociációs állandókat a 12. táblázat tartalmazza, amelyben az első pK_a a kinolínium nitrogénhez, míg a második a hidroxilcsoporthoz tartozik. A pK_a értékek nagyon hasonlóak mindhárom vizsgált ligandumnál, azonban kisebbek, mint 8-hidroxi-kinolin állandói (pK_1= 4,99 és pK_2=9,51 [112]), ami feltehetően az azometin stabilizáló mezomer hatásához köthető. Bár a különböző pH-kon rögzített ^{1}H NMR spektrumokat nem használtuk az állandók meghatározásához, egy harmadik deprotonálódási folyamatot megfigyelhettünk a pH=5–7 közti tartományban a metiléncsúcsok változásának köszönhetően, amely folyamat valószínűleg morfolínium-nitrogén deprotonálódásához köthető. A meghatározott egyensúlyi állandók alapján kijelenthetjük, hogy fizilógiás pH-n a vizsgált ligandumok döntően semleges formában vannak jelen.

12. táblázat: Az LC1, LC2 és LC3 ligandumok UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározott proton disszociációs állandói (K_a), valamint komplexeik stabilitási szorzatai (β). {T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

	LC1	LC2	LC3
pK_a (N_qH^+)	2,80 ± 0,03	2,83 ± 0,03	2,77 ± 0,03
pK_a (OH)	8,77 ± 0,03	8,84 ± 0,03	8,78 ± 0,03
lgβ $[CuL]^+$	8,36 ± 0,01	7,98 ± 0,02	8,34 ± 0,01
lgβ $[CuL_2]$	15,60 ± 0,02	15,77 ± 0,03	15,57 ± 0,01
lgβ $[ZnL]^+$	6,90 ± 0,03	6,86 ± 0,04	6,87 ± 0,01
lgβ $[ZnL_2]$	14,42 ± 0,01	14,32 ± 0,02	13,68 ± 0,04

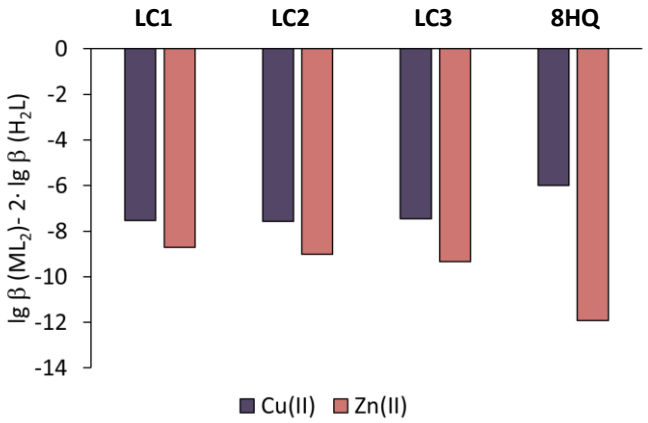
A fémkomplexek vizsgálatához szintén UV-látható spektrofotometriás titrálásokat végeztünk, különböző fémion:ligandum mólarányok mellett. Egy ilyen reprezentatív spektrumsorozatot és az abból számolt moláris abszorbancia spektrumokat láthatunk a 45. ábrán. A titrálási adatok elemzésével megállapítottuk, hogy mind a réz(II)-, mind a cink(II)inokkal, mono- és biszkomplexek képződnek, a fémion:ligandum aránytól függően (12. táblázat).



45. ábra: a) Az LC2 – Zn(II) rendszer különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumai, b) és a számolt moláris abszorbancia spektrumok. {c_L = 58 µM; $c_{Zn(II)}$ = 32 µM; pH = 1,5 – 8,1; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

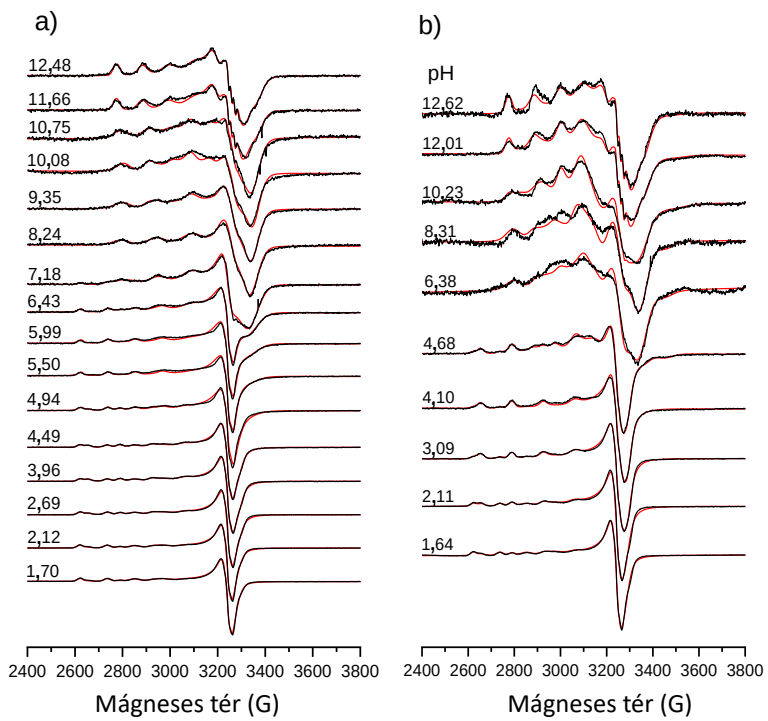
Ahhoz, hogy össze tudjuk hasonlítani a különböző komplexek stabilitását, származtatott stabilitási állandókat számítottunk a biszkomplexekre, amikor is figyelembe vettük a ligandumok protonálódási állandóit (46. ábra), azaz a ligandumok deprotonált formáinak protonok felé mutatott affinitásának különbségeit. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy összességében a réz(II)komplexek nagyobb stabilitásúak, mint a cink(II)komplexek.

Összehasonlítva a kapott egyensúlyi állandókat az alapvegyületre, azaz a 8-hidroxi-kinolinra számolttal [112], megállapítható, hogy ezeknek a ligandumoknak a réz(II)komplexei kisebb stabilitásúak, míg a cink(II)komplexeik stabilitása nagyobb, mint az alapvegyület esetén képződött komplexek stabilitása. A cink(II)komplexek nagyobb stabilitása valószínűleg a ligandumok háromfogú koordinációjának következménye, amit a röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat is igazolt (f3.ábra)



46. ábra: A biszkomplexek stabilitási szorzatai korrigálva a ligandumok protonálódási állandóival. {c_L = 60 μM; $c_{Cu(II)} = c_{Zn(II)}$ = 30 μM; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

Anizotróp ESR spektrumokat is felvettünk pH-titrálással a réz(II) − LC2 és réz(II) − LC3 kémiai rendszereknél 30% (v/v) D_2O/H_2O oldószerelegyben, ahol az alacsony hőmérséklet (77 K) következményeként protonált komplexek kialakulását is megfigyeltük, a dimer komplexek megjelenése mellett. A réz(II) − LC3 rendszerre rögzített ESR spektrumok láthatók a 47. ábrán 1:1 és 1:2 fém-ligandum arányoknál, a kapott ESR paramétereket pedig az f6. táblázatban gyűjtöttem össze. Érdekesség, hogy mindkét vizsgált rendszerben a pH-függő ESR spektrumok intenzitása bizonyos tartományokban jelentős csökkenést mutatott (1:1 aránynál pH ~ 6 felett, 1:2 aránynál pedig már pH ~ 2 felett), ami oligomerizációra/dimerizációra utal.



47. ábra: Kísérleti (fekete) és szimulált (piros) fagyasztott ESR spektrumok az a) Cu(II) – LC3 $\{c_{Cu(II)} = c_L = 25\ \mu M\}$, és b)$\{c_{Cu(II)} = 23\ \mu M;\ c_L = 50\ \mu M\}$ rendszer esetén, 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben.

Együttműködő partnereinknek köszönhetően információt nyerhettünk a szabad ligandumok és komplexeik biológiai aktivitásáról, az A375 humán melanoma sejtvonalon (f7. táblázat). Általánosságban elmondható, hogy minden vegyület jelentős antiproliferatív aktivitást mutatott (IC_{50} < 25,8 μM), azonban a komplexképzésnek egyértelmű hatása van a biológiai aktivitásra, ugyanis a képződő komplexek citotoxikusabbak, mint a ligandumok. Megfigyelhető továbbá az is, hogy a réz(II)komplexek rákellenes hatása erősebb a megfelelő cink(II)komplexekhez képest, ami feltehetően a redox aktivitásukkal hozható összefüggésbe.

5.2.3. Egy vízoldható 8-hidroxi-kinolin-aminosav hibrid kölcsönhatásának vizsgálata létfontosságú fémionokkal

Ahogyan azt korábban részletesen bemutattam, a 8-hidroxi-kinolin váz hetedik pozíciójában lévő metilén-amincsoport fontos szerepet játszik az MDR-szelektivitás szempontjából [98,114,115,162]. Számos 8HQ származék vízben igen rosszul oldódik, ami akadályozza az *in vivo* alkalmazást, ennek megoldására alkalmas lehet egy ikerionos forma kialakítása. Ebben a fejezetben egy új, kiváló vízoldékonyságú, nitro-szubsztituált 8-

hidroxi-kinolin Mannich-bázis aminosav származék oldategyensúlyi vizsgálatának eredményeit tárgyalom, rákellenes tulajdonságainak bemutatása mellett.

Első lépésként meghatároztuk az 5-nitro-7-(1-metil-L-prolin)-8-hidroxi-kinolin ($HQNO_2$-L-Pro, 13. ábra) ligandum proton disszociációs állandóit UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével. A teljesen protonált vegyületben négy funkciós csoport képes deprotonálódni, nevezetesen a COOH, a kinolínium-NH^+, az OH és a prolin-NH^+, azonban a vizsgált pH-tartományban csak két egyensúlyi állandót tudtunk meghatározni megfelelő pontossággal (13. táblázat), ugyanis a COOH és a kinolínium-NH^+ csoportok deprotonálódása igen savas körülmények (pH < 2) között megy végbe egymással átfedve. A ligandumban lévő nitrocsoportnak erős elektronszívó és negatív mezomer effektusa is van, ezért, ha összehasonlítjuk az alapvegyület 8HQ pK_a értékeit (13. táblázat), megfigyelhetjük, hogy mindkét pK_a jelentős mértékben csökken a szubsztituens hatására. A $HQNO_2$-L-Pro pK_a értékei a nitroxolin ($HQNO_2$) állandóihoz képest is kisebb, a protonált prolin nitrogén elektronszívó hatása miatt. További csökkenést eredményez a $HQNO_2$-L-Pro ligandum esetén az O^- és az $N_{prolin}H^+$ csoportok között létrejövő hidrogénhíd-kötés kialakulása, ami ugyanakkor a várthoz képest bázikusabb pH értékek felé tolja el a $N_{prolin}H^+$ deprotonálódását. A meghatározott proton disszociációs állandók alapján kijelenthetjük, hogy a ligandum fiziológiás pH-n ikerionos formában van jelen, továbbá a hidroxilcsoport teljesen deprotonált, ezért a vegyület 100%-ban egyszeresen negatív töltésű.

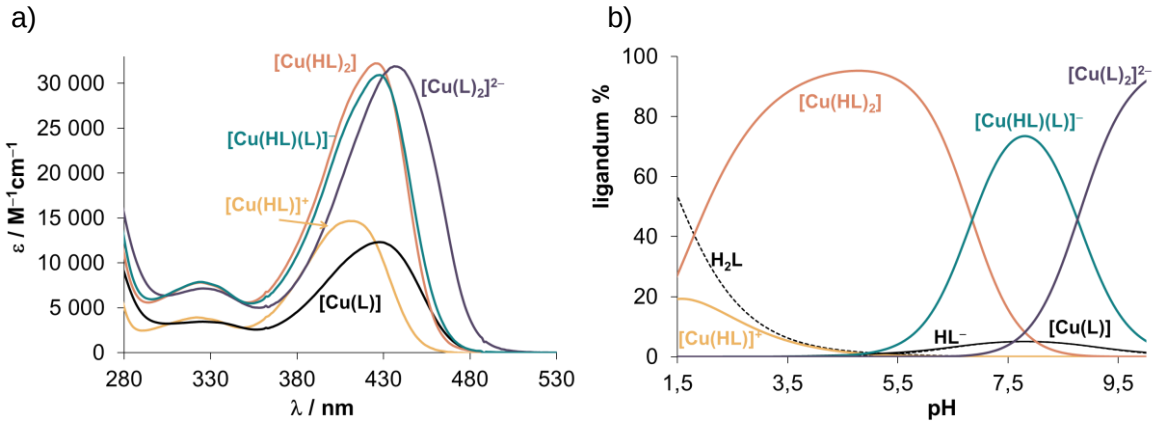
13.táblázat: A $HQNO_2$-L-Pro UV-látható spektrofotometriás titrálások segítségével meghatározott proton disszociációs állandói { T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}.

	pK_a($N_{kinolínium}H^+$)	**pK_a(OH)**	**pK_a($N_{prolin}H^+$)**
$HQNO_2$-	< 2	5,43 ± 0,03	10,75 ± 0,03
$HQNO_2$	2,73[a]	6,30[a]	-
8HQ	4,99[b]	9,51[b]	-

[a]Tanszéki nem publikált adat, [b]Ref. [112]

Ezen 8HQ ligandum komplex képződési egyensúlyi folyamatait tanulmányoztuk esszenciális fémionokkal (réz(II)-, cink(II)-, vas(II)-, és vas(III)) elsődlegesen spektrofotometria segítségével, emellett cirkuláris dikroizmus-, és ESR-titrálásokat végeztünk a réz(II)komplexek esetén, illetve ^{1}H NMR titrálásokat a cink(II)komplexek vizsgálatára, valamint ciklikus voltammetriával térképeztük fel a vas- és rézkomplexek redoxi tulajdonságait.

UV-látható spektrofotometriás titrálásokat végeztem különböző réz(II):ligandum arányok esetén, mely során meghatározott moláris abszorbancia spektrumokat, illetve az számolt képződési állandókból számolt koncentráció eloszlási görbéket a 48. ábrán láthatjuk. A mért spektrumok alapján (N,O$^-$) koordinációval rendelkező mono- ([Cu(HL)]$^+$ és [Cu(L)]), és biszkomplexek ([Cu(LH)$_2$], [Cu(LH)(L)]$^-$ és [Cu(L)$_2$]$^{2-}$) képződését írtuk le. A meghatározott stabilitási állandókat a 14. táblázat tartalmazza. A protonált komplexekben a proton a ligandum prolin-nitrogénjén található.



48. ábra: a) A HQNO$_2$-L-Pro – Cu(II) rendszer különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumai alapján számolt moláris abszorbancia spektrumok, és b) koncentráció eloszlási görbék az HQNO$_2$-L-Pro – Cu(II) (2:1) rendszerre. {c_L = 40 μM; $c_{Cu(II)}$ = 20 μM; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

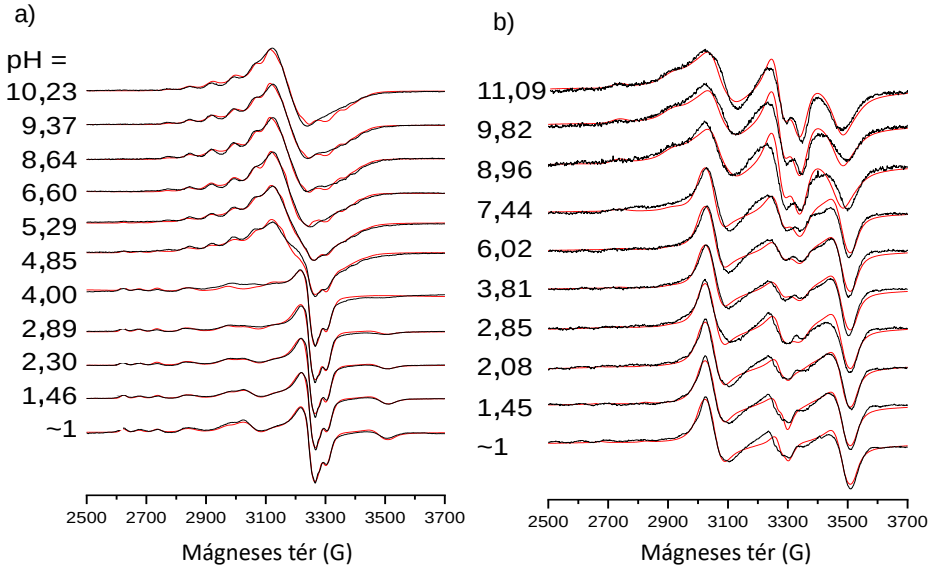
14. táblázat: A HQNO$_2$-L-Pro különböző fémionokkal képződő komplexeinek UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározott stabilitási szorzatai (lgβ) { T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}.

lgβ	Cu(II)	Zn(II)	Fe(III)	Fe(II)
[M(HL)]	19,40 ± 0,03	17,36 ± 0,03	19,75 ± 0,03	16,52 ± 0,03
[M(L)]	14,45 ± 0,03	–[a]	–	8,39 ± 0,03
[M(HL)$_2$]	38,60 ± 0,03	33,71 ± 0,06	38,76 ± 0,03	32,74 ± 0,03
[M(HL)(L)]	31,75 ± 0,03	–[a]	–	–
[M(L)$_2$]	22,99 ± 0,03	–[a]	–	–
[M(HL)$_3$]	–	–	55,66 ± 0,03	47,60 ± 0,06
pM[b]	13,58	8,15	6,36	7,30

[a]A spektrumokat csak pH < 8 alatt használtuk a számításokhoz. A komplexek töltéseit az egyszerűség kedvéért nem tüntettem fel. [b]{c_L = 10 μM; c_M = 1 μM; pH = 7,40; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

További CD spektroszkópiás és ESR titrálásokat végeztünk (30% (v/v) DMSO/H$_2$O oldószerelegyben), hogy betekintést nyerjünk a réz(II)ion koordinációs környezetébe. A

fagyasztott minták ESR spektrumai (49. ábra) alapján kapott anizotróp ESR paramétereket az 15. táblázat tartalmazza.



49. ábra: a) Kísérleti (fekete) és szimulált (piros) fagyasztott ESR spektrumok Cu(II) – $HQNO_2$-L-Pro 1:1, és b) 1:2 arányú rendszerre. {c_L = 500 μM; $c_{Cu(II)}$ = 500 μM vagy 250 μM; 30% (v/v) DMSO/H_2O; T = 77 K; I = 0,10 M (KCl)}

15. táblázat: A Cu(II) – $HQNO_2$-L-Pro rendszerre meghatározott anizotróp ESR paraméterek 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben 77 K-n. A csatolási állandók 10^{-4}cm^{-1} egységben vannak listázva.

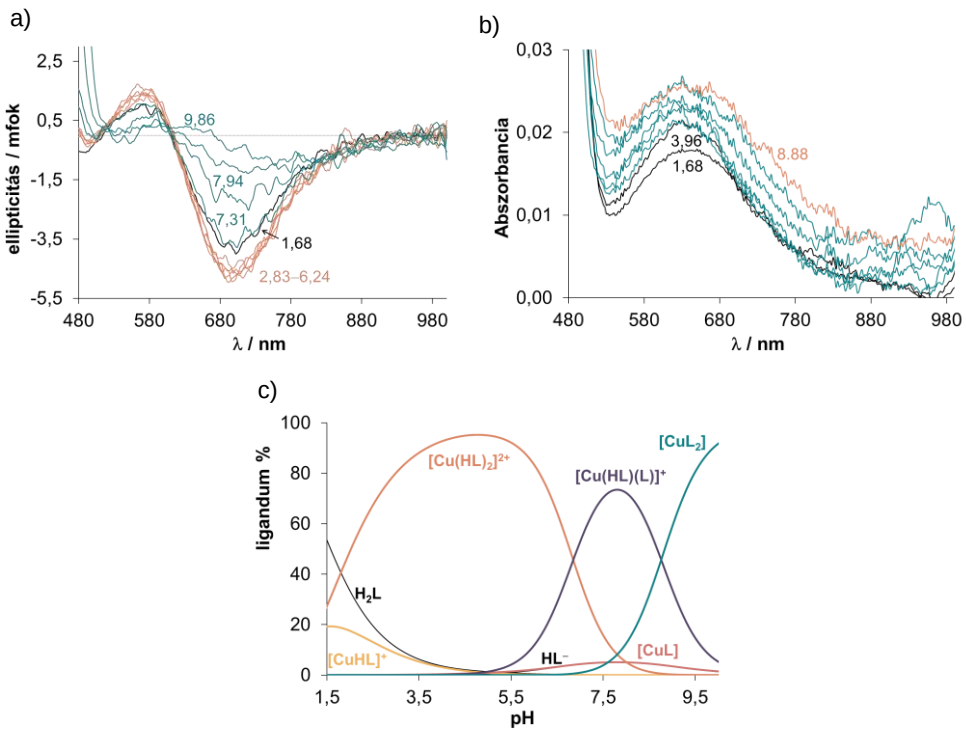
	$g_{x,y}$	g_z	$A_{x,y}$/G	A_z/G	χ(°)	β(°)	D(G)	$d_{Cu\text{-}Cu}$(Å)	$g_{o,szám}$ [b]
$[Cu(aq)]^{2+}$	2,081	2,424	13	110,6					2,195
monomer I	2,065	2,323	15	148					2,151
monomer II	2,060	2,245	20	175					2,151
kétmagvú III	2,069 2,138	2,182	40 9	170	37	–13	75	6,5	2,129
kétmagvú I	2,055	2,245	20	160	0	0	280	4,1	2,118
kétmagvú II [c]	2,060	2,245	20	175	13	–16	267	4,3	2,122

[a]A kísérleti hiba ±0,002 volt a g_x és a g_y , ±0,001 a g_z, ± 2 G az A_x és A_y, ±1 G az A_z esetén. [b]A számolás az alábbi egyenlet alapján történt: $g_{0,szám}$ = $(g_x+g_y+g_z)/3$. [c] A szimulációhoz a II monomer g- és A-értékeit használtuk.

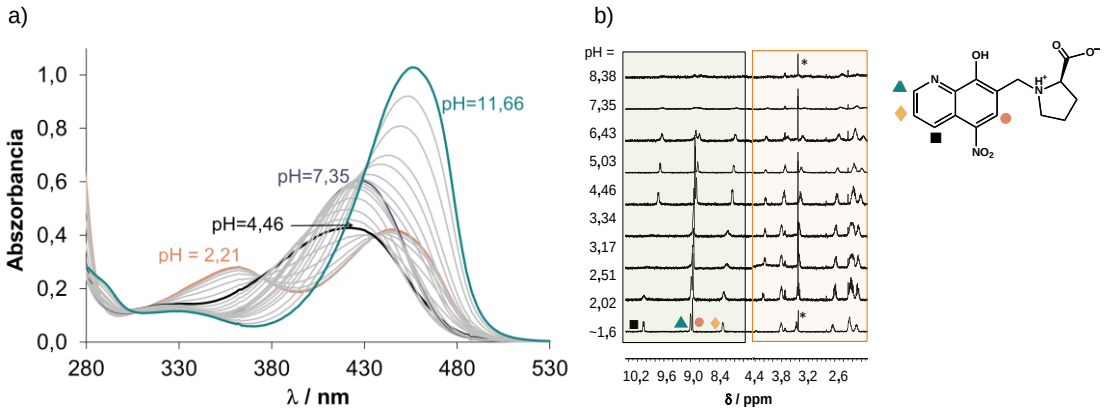
A mono- és biszkomplexeknek megfelelő I-es és II-es monomerek mellett három kétmagvú komplexet is leírtunk (I, II, III). Az I-es kétmagvú komplex pH < ~4,5 esetén, 1:1 fém:ligandum arány mellett, az I-es monomerrel együtt képződik. A II-es kétmagvú komplex csak 1:2 fém:ligandum arány esetén képződik pH > 8 felett, míg a III-as 1:1 arány esetén pH > 4 felett. A monomer és a kétmagvú komplexek egyensúlyban vannak a teljes pH-tartományban 1:2 arány esetén, valamint 1:1 arány mellett, ha a pH < ~4,5.

A CD-spektrumok (50. ábra) gyenge intenzitású negatív sávot mutattak a $[Cu(HL)]^+$ és $[Cu(LH)_2]$ képződésének pH-tartományában, a negatív csúcs pedig sokkal erősebbé válik 1:1 fém:ligandum arány mellett a [Cu(L)] képződésekor. Ez arra utal, hogy a királis prolin donorcsoportjai részt vesznek a koordinációs kötés kialakításában a kétmagvú részecskék képződésekor.

A $HQNO_2$-L-Pro cink(II)ionokkal való komplexképződését UV-látható és ^{1}H NMR spektroszkópiával is vizsgáltuk (51. ábra). Az UV-látható spektrumok bázikus pH-tartományban egyre inkább a szabad ligandum spektrumaihoz hasonlítottak, ami a komplex disszociációjára utal. Így a pH < 8 tartományban felvett spektrumok alapján határoztuk meg a $[Zn(HL)]^+$ és $[Zn(HL)_2]$ komplexek stabilitási állandóit (14. táblázat), azonban ezen állandók alapján nem feltételezhető a komplex disszociációja a bázikus tartományban. A pH-függő ^{1}H NMR spektrumok is komplexképződésre utalnak a teljes pH-tartományban (51. ábra).



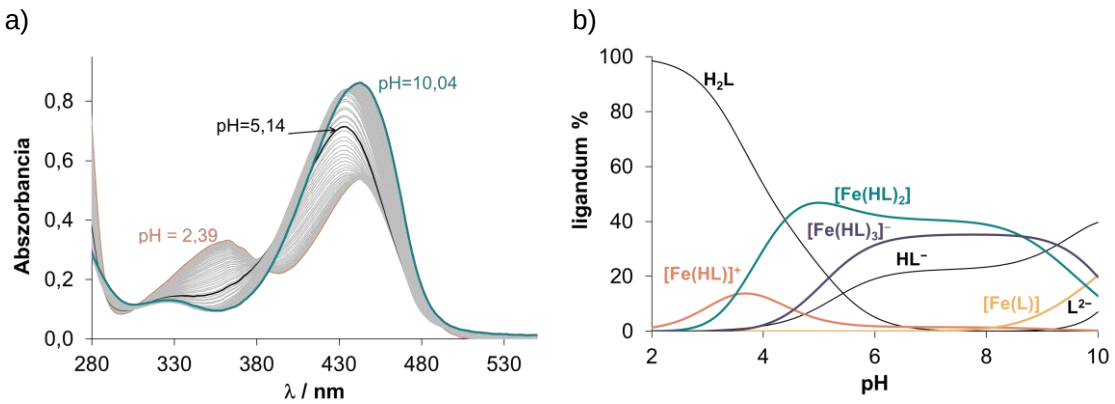
50. ábra: a) A Cu(II) – $HQNO_2$-L-Pro rendszerre felvett CD spektrumok pH = 1,6 – 10 tartományban. A spektrumok a Cu(II) – HQNO2-L-Pro 1:2 fém: ligandum aránynál, 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben. b) Ugyanerre a rendszerre mért látható abszorpciós spektrumok az 1:2 fémion:ligandum mólaránynál, valamint c) a megfelelő koncentráció eloszlási görbék. {c_L = 500 µM; $c_{Cu(II)}$ = 250 µM; 30% (v/v) DMSO/H_2O; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}



51. ábra: a) A Zn(II) − $HQNO_2$-L-Pro (1:2) rendszer UV-látható spektrumai különböző pH-értékeken. {c_L = 40 μM; $c_{Zn(II)}$ = 20 μM} b) Ugyanezen rendszer pH-függő ^{1}H NMR spektrumai. {c_L = 500 μM; $c_{Zn(II)}$ = 250 μM; I = 0,10 M KCI; T = 25 °C; 10% (v/v) D_2O/H_2O} A * az oldószercsúcsot jelöli.

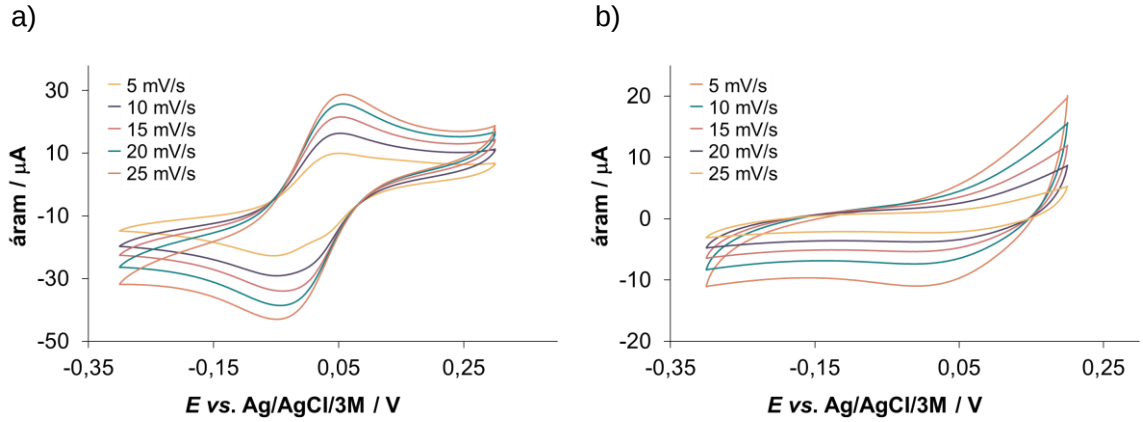
Vonalkiszélesedést tapasztaltunk pH = 2–4 között az aromás régióban, a $[Zn(HL)]^+$ monokomplex és a szabad ligandum a gyors ligandumcsere folyamata miatt. Valószínűleg a $[Zn(HL)]^+$ komplexben a ligandum a 8-hidroxi-kinolin rész (N,O) donoratomjain keresztül koordinálódik, ezért a prolin protonjaihoz tartozó csúcsok nem szélesednek ki. Éles jelek láthatók pH = 4–6,4 között a $[Zn(HL)_2]$ komplex egyedüli jelenléte miatt. Széles vonalak jelennek meg pH > 7-nél az aromás és alifás régióban is. A jelek látszólagos eltűnését nem csapadékképződés okozta, és a komplex disszociációját is kizárhatjuk, mivel nem tapasztaltuk a szabad ligandumhoz tartozó jeleknek kialakulását a pH növelésével. Így feltehetően a tapasztalt jelintenzitás csökkenés egy szerkezeti átrendeződés következménye, mely komplexben a prolin rész koordinálódik a cink(II)ionhoz.

UV-látható spektrofotometriás titrálást végeztünk a vas(II)-, és vas(III)ionokkal való komplexképződés vizsgálatára (52. ábra). A vas(II)komplexek esetén a titrálásokat szigorúan anaerob körülmények között (laboratóriumi 'glove box'-ban) végeztük. Az abszorpciós spektrumok alapján mono-, bisz- és trisz-komplexek képződését tudtuk leírni mindkét rendszer esetén, mely komplexekre meghatározott állandókat a 14. táblázat tartalmazza. Az [Fe(HL)], $[Fe(HL)_2]$, $[Fe(HL)_3]$ komplexekben az (N,O) koordinációt feltételezzük a spektrumok elemzése alapján, ahol a proton a nem koordinálódó prolin-nitrogénen található.



52. ábra: a) A $HQNO_2$-L-Pro – Fe(II) (3:1) rendszer különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumai, valamint b) ezen rendszerhez tartozó koncentráció eloszlási görbék. {c_L = 200 µM; $c_{Fe(II)}$ = 67,4 µM; ℓ = 0,226 cm; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl)}

Az $HQNO_2$-L-Pro különböző fémionok felé mutatott affinitásának összevetéséhez pM értékeket számoltunk (14. táblázat), és pH = 7,4-n az alábbi sorrendet kaptuk: Cu(II) > Zn(II) > Fe(II) > Fe(III). Mivel a vas(III)ion erősen hidrolizál ilyen körülmények között, míg pH = 5 esetén, ahol a hidrolízis kisebb mértékű, a fémkötés tendenciája a következő: Cu(II) > Fe(III) > Zn(II) > Fe(II). A vas-, és rézkomplexek redoxi tulajdonságainak jellemzésére ciklikus voltammetriás méréseket végeztünk (53. ábra), melyek során a voltammogramokat pH = 7,4-n, 1:3 fémion:ligandum mólarány mellett rögzítettem a vaskomplex esetén, míg a rézkomplex esetén az arány 1:2 volt. A vaskomplex voltammogramjai reverzibilis folyamatokat mutattak, míg a rézkomplexnél az irreverzibilis redoxi átalakulás miatt csak a katódos csúcspotenciálok értékét tudtuk megadni (16. táblázat).



53. ábra: a) Ciklikus voltamogrammok a $HQNO_2$-L-Pro – Fe(III) (3:1), és b) $HQNO_2$-L-Pro – Cu(II) (2:1) rendszerek esetén különböző pásztázási sebességek mellett. {c_L = 1,5 mM vagy 1 mM; $c_{Fe(III)}$ = 0,5 mM; $c_{Cu(II)}$ = 0,5 mM; pH = 7,4 (10 mM HEPES); T = 25 °C; I = 0,10 M (TBAN)}

A Fe(III)/Fe(II) redoxi párra számított formál potenciál értékek (16. táblázat) jelentősen pozitívabbak, mint a referencia vegyület 8HQ esetén mért értékek ($E_{1/2}$ = -230 mV *vs.* NHE [nem publikált tanszéki adat], ami azt jelenti a $HQNO_2$-L-Pro ligandumnak nagyobb a Fe(II)-ionok felé mutatott affinitása, mint az oxinnak, aminek szerepe lehet az MDR-szelektív tulajdonságuk különbségében.

16. táblázat: A $HQNO_2$-L-Pro – Fe(III) (3:1) és $HQNO_2$-L-Pro – Cu(II) (2:1) rendszerek esetén meghatározott elektrokémiai adatok. {c_L = 1,5 mM vagy 1 mM; $c_{Fe(III)}$ = 0,5 mM; $c_{Cu(II)}$ = 0,5 mM; pH = 7,4 (10 mM HEPES); T = 25 °C; I = 0,10 M (TBAN)}

pásztázási sebesség (mV/s)	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**
$HQNO_2$-L-Pro – Fe(III)					
E_a (V)	0,039	0,041	0,043	0,046	0,046
E_k (V)	–0,045	–0,029	–0,026	–0,033	–0,038
ΔE (V)	0,084	0,070	0,069	0,079	0,085
$E_{1/2}$ (V)	–0,003	0,006	0,008	0,007	0,004
$E_{1/2}$ vs. NHE (V)	+0,207	+0,216	+0,218	+0,217	+0,214
$HQNO_2$-L-Pro – Cu(II)					
E_k (V)	0,043	0,018	0,023	0,025	0,006

A $HQNO_2$-L-Pro ligandum és komplexeinek *in vitro* citotoxicitását együttműködő partnereink vizsgálták gyógyszerérzékeny humán méhszarkóma MES-SA és annak Pgp pozitív MDR sejtvonalán (MES-SA/Dx5), 144 órás inkubációs idővel. A meghatározott IC_{50} értékeket az f8. táblázat tartalmazza. Összehasonlításképp a HQCl ligandum esetén is meghatározták a citotoxicitást. A $HQNO_2$-L-Pro ligandum alacsony/közepes aktivitást mutatott a vizsgált rákos sejtvonalakon, valószínűleg az erős hidrofil karaktere miatt, ugyanakkor az MDR-szelektív sejtvonalon (MES-SA/Dx5) kisebb a kapott IC_{50} érték, ami arra utal, hogy ez a vegyület is MDR-szelektív, hasonlóan más HQ Mannich bázishoz, melyben 7-es pozícióban egy CH_2-N csoport, 5-ös pozícióban pedig egy erősen elektronszívó (többnyire halogén) szubsztituens van [115]. A különböző endogén fémionokkal kialakuló komplexek esetén megfigyeltük az aktivitás növekedését.

5.3. A VLX600 és származékainak vizsgálata

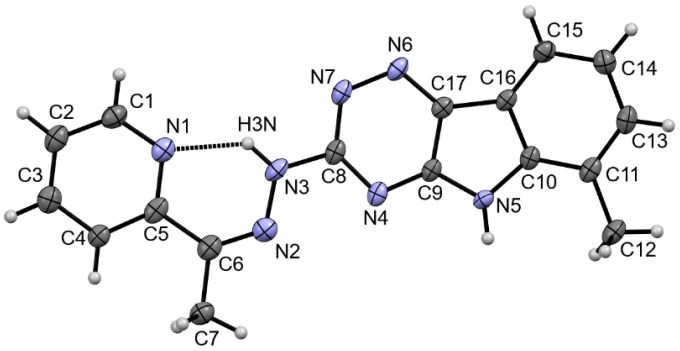
5.3.1. A hidrazon-típusú, VLX600 szubsztitúciójának hatása az oldatkémiai tulajdonságokra

A VLX600 vaskelátor molekula, mely klinikai fázis I vizsgálatokba került és így részletesen vizsgálták már a farmakológiai hatását, azonban a szakirodalomban az oldategyensúlyi tulajdonságairól kevés szó esett. Fontosnak tartottuk a különböző vasionok mellett más endogén fémionokkal való komplexképződés vizsgálatát is, ugyanis a szervezetbe kerülve a VLX600 ideális liganduma lehet például a cink(II)-, és réz(II)ionoknak is. Vizsgáltuk továbbá, hogy az egyes fémionokkal történő komplexképződésnek milyen hatása van a redoxi tulajdonságokra és a rákellenes hatásra. Előállítottam a VLX600 ligandumot, illetve annak négy különböző származékát, melyek olyan molekularészekkel rendelkeznek, mint a már klinikai vizsgálatokba került α-*N*-piridil-tioszemikarbazonok (3AP, DpC és COTI-2) ill. az STSC. Kíváncsiak voltunk, hogy a különböző szerkezeti változtatások milyen hatással lesznek a fizikai-kémiai és biológiai tulajdonságokra.

A VLX600 szintézise egy háromlépéses folyamat, mely első lépéseként a tioszemikarbazid és a 7-metilindolin-2,3-dion reakciójával 6-metil-4,5-dihidro-3H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-tion származék képződik. Ezen utóbbi vegyület kereskedelmi forgalomban is kapható, és jóval olcsóbb, mint maga a VLX600, így ezen tion felhasználásával kezdtem a szintézist. A tion származékot tovább reagáltattam hidrazin-monohidráttal (90 ºC, 20 óra reflux), így előállítva a hidrazin köztiterméket, ami a 2-acetil-piridinnel a VLX600-at eredményezte. Az utolsó kondenzációs reakció eredményeként kiváló hozammal sikerült előállítanom a kívánt terméket. A további VLX600 származékok esetén különböző aldehideket és ketonokat használtam fel a hidrazin közti termékkel való reakció során, hogy előállítsam a kívánt vegyületeket (17. táblázat). Továbbá H_2O/etanol elegyből sikerült előállítanom a VLX600 ligandum egykristályát, melynek szerkezetét röntgenkrisztallográfia segítségével határozták meg (54. ábra). Az előállított ligandumok karakterizálása ^{1}H és ^{13}C NMR spektroszkópiásan történt (az adatok az f9. táblázat tartalmazza).

17. táblázat: A VLX600 és származékainak előállításához használt reaktánsok és reakciókörülmények.

Termék	Reaktáns	Körülmények	Hozam (%)
VLX600	2-acetil-piridin	H_2O/etanol elegy, 90 ºC, 5 óra reflux	94
VLX-3AP	terta-butil(2-formilpiridin-3-il)karbamát	H_2O/etanol elegy, cc. HCl, 90 ºC, 5 óra reflux	95
VLX-STSC	2-hidroxibenzaldehid	H_2O/etanol elegy, 90 ºC, 5 óra reflux	84
VLX-DpC	di-2-piridilketon	H_2O/etanol elegy, pár csepp cc. H_2SO_4, 90 ºC, 5 óra reflux	84
VLX-COTI-2	6,7-dihidrokinolin-8(5H)-on	H_2O/etanol elegy, 90 ºC, 5 óra reflux	97



54. ábra: A VLX600 egykristály röntgenkrisztallográfiás módszerrel meghatározott szerkezete HL×3H_2O formában (a vízmolekulákat az áttekinthetőség kedvéért nem mutatom).

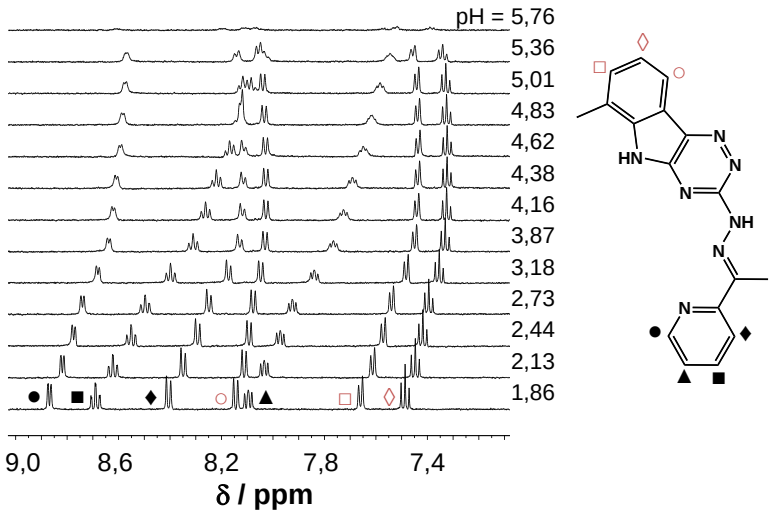
A ligandumok termodinamikai oldhatósági adatait a 18. táblázat tartalmazza. Megfigyelhetjük, hogy igen csekély vízoldhatóság jellemzi az összes ligandumot, így további vizsgálataim során 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben dolgoztam. A proton disszociációs állandókat UV-látható spektrofotometriával határoztuk meg. A vizsgálat pH-tartományban három deprotonálódási folyamatot figyeltünk meg, melyekre meghatározott egyensúlyi állandókat a 18. táblázat mutatja. A VLX600 megoszlási hányadosának meghatározásakor, fiziológiás pH-n, *n*-oktanol/puffer közti megoszlás során a ligandum szinte teljes mennyisége az *n*-oktanolos fázisban maradt az alkalmazott (1:10) térfogatarány ellenére is. Ezek alapján a vegyület annyira lipofil, hogy csak egy határértéket tudtunk megbecsülni ($\lg D_{7,4} > +2,8$). Membrán permeabilitási vizsgálatot is végeztem, hogy jellemezzem a VLX600 passzív diffúzióval történő membrán-áthatoló képességét. A meghatározott $P_{\text{effektív}} = 2,6\ (\pm 0,1) \times 10^{-6}\ \text{cm}^{-1}\text{s}^{-1}$ állandó nagy sejtmembrán-áthatoló képességre utal.

Sajnos a VLX-DpC és VLX-COTI-2 származékokra nem tudtunk proton disszociációs állandókat meghatározni, a pH > 5 tartományban képződő csapadék zavaró hatása miatt. Megfigyelhető, hogy a VLX-3AP szubszituens esetén az aminocsoport beépülése nem eredményez jelentős változást az állandókban, míg a hidroxilcsoport hatására mindhárom pK_a megnövekedett. A VLX600 protonált formájának négy disszociálni képes csoportja van, nevezetesen a piridínium-nitrogén (NH^+), az 1,2,4-triazin (N_2H^+), a hidrazon (NH) és az indol (NH) nitrogének, azonban ahhoz, hogy a meghatározott állandókat az egyes csoportokoz tudjuk rendelni, további mérésekre volt szükség.

18. táblázat: A VLX600 és származékainak pK_a értékei UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározva 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben, valamint termodinamikai oldhatóság értékeik pH = 7,4-n ($S_{7,4}$). {I = 0,1 M KCl; T = 25 °C}

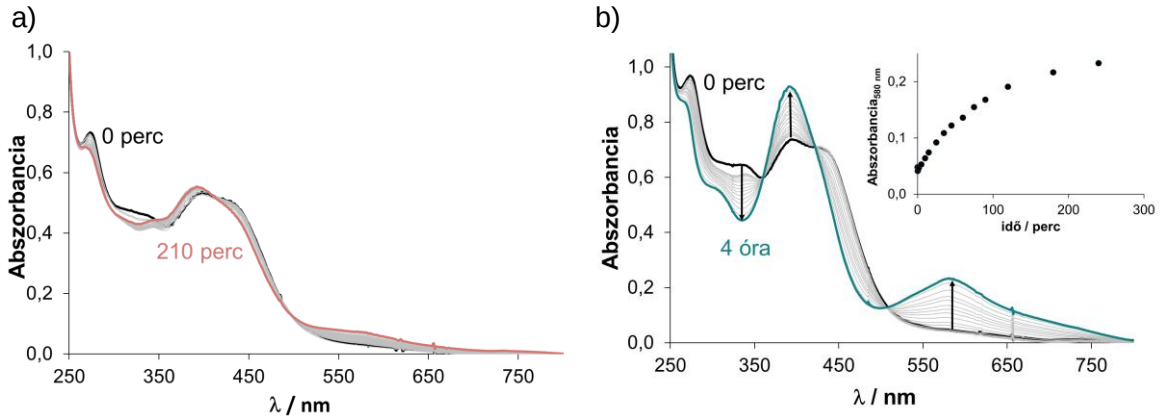
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	$S_{7,4}$ (µM)
VLX600	2,64 ± 0,03	4,86 ± 0,03	10,32 ± 0,03	2,15 ± 0,03
VLX-3AP	2,63 ± 0,03	4,46 ± 0,03	10,44 ± 0,03	2,08 ± 0,02
VLX-STSC	3,29 ± 0,03	5,98 ± 0,03	11,53 ± 0,03	1,71 ± 0,04
VLX-DpC	–	–	–	2,69 ± 0,03
VLX-COTI-2	–	–	–	2,58 ± 0,06

Rögzítettem ^{1}H NMR spektrumokat is a VLX600 ligandum esetén, azonban a csapadékképződés miatt azokat csak pH < 6-ig lehetett felhasználni. A vizsgálat pH-tartományban két deprotonálódási folyamatot figyelhettünk meg, melyek során a pH növelésére az összes aromás CH proton jele érzékeny volt (55. ábra). A piridin-, és az indolgyűrű protonjaihoz tartozó csúcsok azonban eltérő eltolódást mutattak, ugyanis az indolgyűrű protonjaihoz tartozó jelek a kisebb ppm értékek lefelé tolódtak el (pH = 4-ig), majd nem mutattak további változást. Ezzel szemben a piridin-gyűrű protonjaihoz tartozó csúcsok még pH = 4 felett is további eltolódást mutattak. Ezen megfigyelések alapján a két kisebb pK_a érték nagy valószínűséggel piridínium-nitrogénhez (NH^+) és a 1,2,4-triazin (N_2H^+) nitrogénjeihez tartozik. A legnagyobb állandó pedig a hidrazonnak (NH) tulajdonítható, míg az indol (NH) nitrogén deprotonálódása pH > 12 tartományban megy végbe. A kapott egyensúlyi állandók felhasználásával számított koncentráció eloszlási görbék alapján kijelenthető, hogy a semleges HL forma a domináns fiziológiás pH-n.



55. ábra: A VLX600 ^{1}H-NMR-spektruma (7,1–9,0 ppm) különböző pH-értékeknél, valamint a VLX600 molekula teljesen protonált állapotban (H_3L^{2+}), ahol a szimbólumok jelölik az egyes csúcsokat. {c_{VLX600} = 1 mM; 30% (v/v) DMSO-d_6/H_2O, I = 0,1 M KCl}

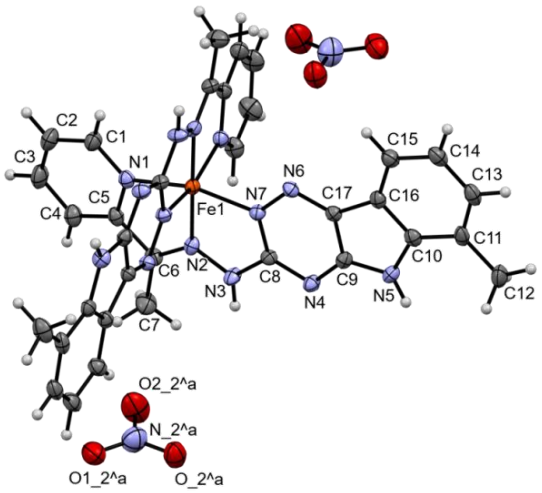
Mivel a VLX600 vaskelátorként tartják számon a szakirodalomban, így természetesen első lépésként a vasionokkal való kölcsönhatást vizsgáltuk, UV-látható spektrofotometriás titrálásokkal, 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben. A vas(III)ionokkal való mérések során a komplexképződést követően egy időfüggő folyamatot tapasztaltunk, amelyet jól szemléltet az 56. ábra (pH = 7,4 és pH = 6,0).



56. ábra: a) A Fe(III) – VLX600 (1:2) rendszer UV-látható spektrumának időfüggése pH = 6-on (50 mM MES), és b) pH = 7,4-en (50 mM HEPES). Beszúrt ábra: 580 nm-en (●) mért abszorbancia értékeket mutatja az idő függvényében. {c_{VLX600} = 40 μM; $c_{Fe(III)}$ = 20 μM; 30% (v/v) DMSO/H_2O; I = 0,10 M KCI; ℓ = 1 cm; T = 25 °C}

Azt feltételezzük, hogy redoxi reakció megy végbe, ugyanis ~580 nm-en abszorbancia növekedést figyelhetünk meg, amely a VLX600 vas(II)komplexeire jellemző.

Továbbá elmondható, hogy a redoxi reakció sebessége a pH növelésével növekszik, ugyanis valószínűleg a OH^- ion redukálja a vas(III)komplexet (ahogyan azt a szakirodalomban más vaskomplexeknél, pl. 1,10'-fenantrolin, is megfigyelték [163,164]) így a reakciósebesség megnő annak koncentrációjának növekedésével. Így az időfüggő folyamatok miatt nem lehetett meghatározni a vas(III)komplexek stabilitási szorzatait, azonban sikerült előállítanunk a VLX600 vaskomplexének egykristályát vas(III)-sóból kiindulva, mely röntgenkrisztallogáfiai módszerrel meghatározott szerkezete igazolja a vas(II)ionok felé mutatott nagyobb affinitást. Ugyanis a $FeCl_3$ és VLX600 1:2 fémion:ligandum mólarányú keveréke (metanolban, etil-acetát lassú diffúziójával), aerob körülmények között vas(II)-tartalmú, $[Fe(II)(HL)_2](NO_3)_2$ komplexet eredményezett (57. ábra).

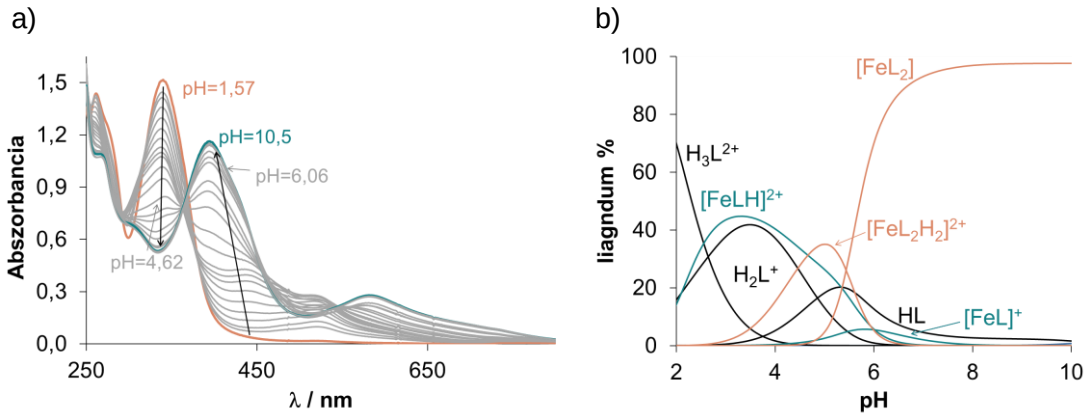


57. ábra: A $[Fe(II)(LH)_2](NO_3)_2$ egykristály röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezete (a vízmolekulákat az egyértelműség kedvéért kihagytam). A tércsoport szimmetriája miatt a két VLX600 ligandum kötési paraméterei azonosak.

A komplex oktaéderes koordinációt mutat, ahol a VLX600 háromfogú ligandumként koordinálódik a fémionhoz a piridin, az 1,2,4-triazin, és a hidrazon nitrogéneken keresztül, további két nitrát ellenionnal. A vas(II)komplex képződését továbbá XPS mérések is igazolták.

Anaerob körülmények között a vas(II)–VLX600 rendszerre felvett UV-látható spektrumok segítségével (58a. ábra) meghatározott stabilitási szorzatokat a 19. táblázat tartalmazza. A különböző fémion:ligandum mólarányok esetén végzett mérések eredményei alapján mono-, és biszkomplexek képződését írtuk le. A kialakuló komplexekben (N,N,N) koordinációt feltételezünk, a protonált komplexekben pedig a

proton a hidrazon nitrogénen található ($[FeLH]^{2+}$ és $[FeL_2H_2]^{2+}$). A koncentráció eloszlási diagram (58b. ábra) alapján megállapítottuk, hogy a semleges $[FeL_2]$ biszkomplex a domináns fiziológiás körülmények között. Meghatároztuk a stabilitási szorzatokat a VLX-3AP ligandum vas(II)komplexei esetén is, melyet szintén a 19. táblázat tartalmaz. Összevetve a VLX600-hoz tartozó egyensúlyi állandókkal, megfigyelhetjük, hogy a 3AP származék esetén kisebb értékeket kaptunk. Tekintve, hogy a ligandumok pK_a értékei között nincs ekkora különbség, ez egyértelműen a VLX-3AP vas(II)komplexeinek kisebb stabilitását jelenti.

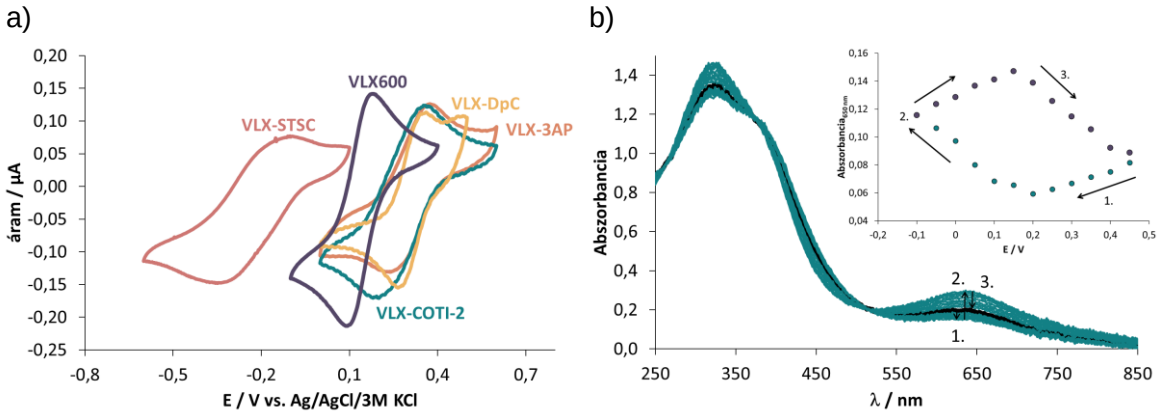


58. ábra: a) A Fe(II) – VLX600 (1:2) rendszer UV-látható spektruma különböző pH-értékek esetén, szigorúan anaerob körülmények között. b) A meghatározott képződési állandók (lgβ) segítségével számított koncentráció eloszlási görbék. {c_{VLX600} = 50 µM; $c_{Fe(II)}$ = 25 µM; 30% (v/v) DMSO/H_2O; I = 0,10 M KCI; ℓ = 0,5 cm; T = 25 °C}

19. táblázat: A VLX600 különböző fémionokkal képződő komplexeinek UV-látható spektrofotometriás titrálással meghatározott stabilitási állandói (lgβ). { T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); 30% (v/v) DMSO/H_2O}

lgβ	Fe(II)	VLX-3AP-Fe(II)	Cu(II)	Zn(II)
$[MLH]^{2+}$	18,84 ± 0,01	16,82 ± 0,03	20,63 ± 0,07	17,37 ± 0,06
$[ML]^{+}$	14,31± 0,01	11,93 ± 0,03	16,36 ± 0,07	10,51 ± 0,06
$[MLH_{-1}]$	–	–	5,81 ± 0,07	2,53 ± 0,06
$[ML_2H_2]^{2+}$	33,91 ± 0,06	–	–	33,22 ± 0,06
$[ML_2H]^{+}$	–	–	–	26,41 ± 0,03
$[ML_2]$	24,00 ± 0,03	21,36 ± 0,03	–	17,97 ± 0,05

Ciklikus voltammetriás méréseket végeztünk a redoxi tulajdonságok jellemzésére. A különböző ligandumok vaskomplexeire mért voltammogramok (59a. ábra) alapján reverzibilis folyamatról beszélhetünk, amely állítást igazolja a spektroelektrokémiai mérés is (59b. ábra). A beszúrt ábrán jól látható, hogy a 650 nm-en mért abszorbancia értékeket ábrázolva a potenciál függvényében, valóban reverzibilis redoxi folyamatot kapunk. A voltamogrammokat összevetve elmondható, hogy nem csupán a VLX600, de a VLX-származékok esetén is reverzibilis az elektrokémiai folyamat.



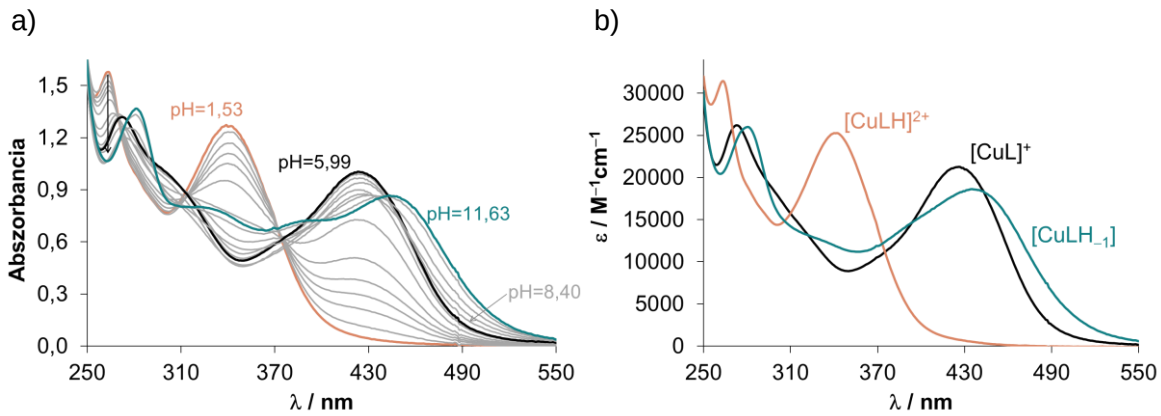
59. ábra: a) A VLX600 származékok vaskomplexeinek ciklikus voltammogramja 25 mV/s pásztázási sebesség mellett, Ag/AgCl/3 M KCl referenciaelektród és Pt munka- és ellenelektródokkal szemben. {c_{VLX600} = 1 mM; $c_{Fe(III)}$ = 0,5 mM; 60% (v/v) DMF/puffer (pH = 7,4); I = 0,10 M TBAN; ℓ = 1,7 mm; T = 25 °C}, b) A vaskomplexek UV-látható spektrumának változása a potenciálváltozás következtében. A beszúrt ábra a 650 nm-en kigyűjtött abszorbancia értékeket mutatja a potenciál függvényében. {c_{VLX600} = 0,5 mM, $c_{Fe(III)}$ = 0,25 mM; 90% (v/v) DMF/puffer (pH = 7,4); I = 0,10 M TBAN; ℓ = 1,7 mm; T = 25 °C}

A szakirodalomban fellelhető elektrokémiai adatok alapján [14] a VLX600 esetén számított formál potenciál érték (20. táblázat) igazolja az eddigi állításunkat, miszerint a ligandumnak erősebb az affinitása vas(II)ionok felé, mint a vas(III)ionokhoz. A VLX600 származékok vaskomplexei esetén szintén pozitív formál potenciált kaptunk, valamint nagyobbat, mint az alapvegyület esetén, azonban a VLX-STSC analógnál negatív értéket figyelhetünk meg, amit a voltammogramok is jól szemléltetnek. Ennek magyarázata abban keresendő, hogy ez a ligandum (O,N,N) koordinációs móddal rendelkezik, szemben a többi ligandum (N,N,N) koordinációjával, és ez az O/N csere a hard Lewis savakkal való kölcsönhatásnak kedvez.

20. táblázat: A különböző VLX600 származék – vas (2:1) rendszerek esetén meghatározott formál potenciál értékek 60% (v/v) DMF/pufferelt vizes oldatban. {c_{VLX600} = 1 mM; $c_{Fe(III)}$ = 0,5 mM; 60% (v/v) DMF/puffer (pH = 7,4); I = 0,10 M TBAN; T = 25 °C}

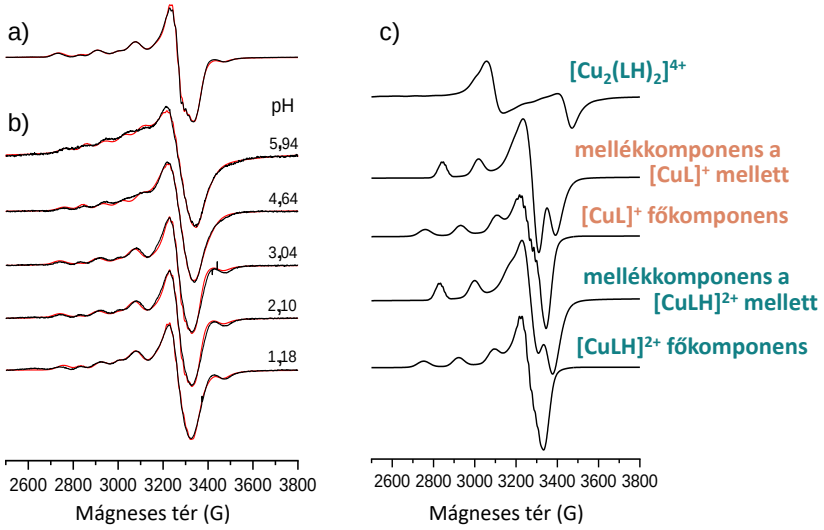
	$E_{1/2}$ / mV	$E_{1/2}$ vs NHE / mV
VLX600	+134	+360
VLX-3AP	+312	+522
VLX-STSC	−233	−23
VLX-DpC	+305	+515
VLX-COTI-2	+275	+485

Ahogyan azt korábban is említettem, a VLX600 nem csak a vasionoknak, hanem például a réz(II)-, és cink(II)ionoknak is ideális liganduma lehet, ezért a komplexképződés vizsgálatára itt is UV-látható spektrofotometriás titrálásokat végeztem, 30% (v/v) DMSO/H_2O oldószerelegyben. Az 1:1 fémion:ligandum mólarányhoz tartozó UV-látható spektrofotometriás titrálás spektrumait, illetve az abból számolt moláris abszorbancia spektrumokat a 60. ábrán mutatom be. A vas(II)komplexszel szemben a réz(II)ionokkal csupán monokomplexek képződtek, még ligandum felesleg mellett sem tudtuk biszkomplexek képződését leírni. A $[CuLH]^{2+}$ és $[CuL]^{+}$ moláris abszorbancia spektruma jelentősen eltér egymástól, valószínűleg a hidrazon-nitrogén deprotonálódása miatt. A [CuL(OH)] komplex a $[CuL]^{+}$ komplexből jön létre a koordinált víz deprotonálódásával. A koncentráció eloszlási görbék alapján a $[CuL]^{+}$ komplex a domináns fiziológáis körülmények között.



60. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok, és b) a számolt moláris abszorbancia spektrumok a VLX600–Cu(II) rendszer esetén. {c_L = 50 µM; $c_{Cu(II)}$ = 50 µM; 30% (v/v) DMSO/H_2O; pH = 1,5 – 11,6; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

Anizotróp ESR spektrumkat rögzítettünk különböző pH-kon (77 K), hogy betekintést nyerjünk a fémion körüli koordinációs környezetbe. A csapadékképződés miatt csak pH < 6-ig tudtuk kiértékelni a spektrumokat. Az ESR spektrumok (61b. ábra) bonyolult speciációt mutattak. A kapott anizotróp ESR paramétereket a 21. táblázat tartalmazza. Savasabb pH-kon a $[CuLH]^{2+}$ főkomponens mellett további két mellékkomponens is megjelent (61c. ábra).



61. ábra: a) A DMSO-ban oldott szilárd Cu(II)-komplex ESR spektruma, b) a Cu(II) – VLX600 rendszer fagyasztott ESR spektruma különböző pH-értékeken, 30% (v/v) DMSO/H_2O-ban, valamint c) a mért spektrumok szimulációjával kapott számított komponens ESR spektrumok. {c_L = 0,5 mM; $c_{Cu(II)}$ = 0,33 mM; I = 0,10 M (KCl); T = 77 K}

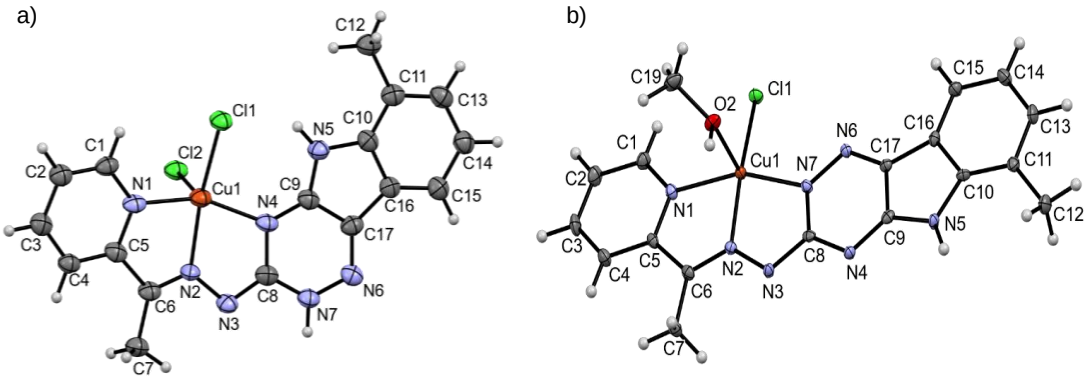
Az egyik ilyen mellékkomponens a $[Cu_2(LH)_2]^{4+}$, míg a többi mellékkomponensről azt feltételezzük, hogy a $[CuLH]^{2+}$ izomer formája. Hasonlóképp két izomert találtunk a $[CuL]^{+}$ komplex képződési pH-tartományában. Az izomerképződés a ligandum imin-énamin tautomerizációjának a következménye, de kötési izomerek képződése is lehetséges. Azonban az izomerek együttes megjelenése oldatban nem valószínű, mivel az UV-látható spektrumon jól elkülönülő izobesztikus pontokat figyeltünk meg.

21. táblázat: A VLX600 – Cu(II) komplexeinek anizotróp ESR-paraméterei. [a]A csatolási állandók: 10^{-4} cm^{-1} egységben. {I = 0,1 M KCl; T = 77 K; 30% (v/v) DMSO/H_2O}

	$g_\perp$	$g_\parallel$	$A_\perp$ ($\times 10^{-4}cm^{-1}$)	$A_\parallel$ ($\times 10^{-4}cm^{-1}$)	a^N_0 ($\times 10^{-4}cm^{-1}$)	$g_{0,szám.}$ [b]
$[CuLH]^{2+}$ főkomponens	2,064	2,241	12	174	16, 13, 13	2,123
Mellékkomponens a $[CuLH]^{2+}$ mellett	2,060	2,185	5	168		2,102
$[Cu_2(LH)_2]^{4+}$ [c]	2,056	2,247	10	178		2,120
$[CuL]^+$főkomponens	2,060	2,233	19	175	16, 13, 13	2,117
Mellékkomponens a $[CuL]^+$ mellett	2,050	2,170	14	172		2,090

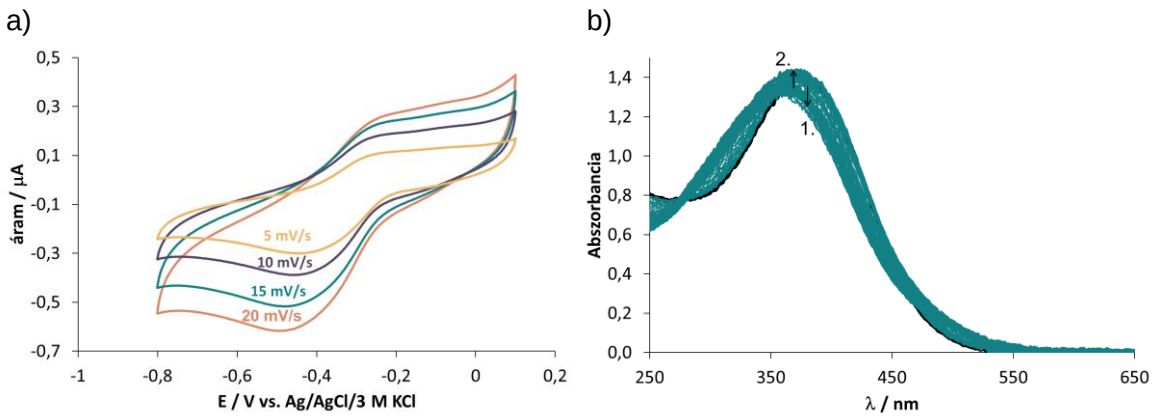
[a]A kísérleti hiba ±0,002 volt a $g_\perp$, ±0,001 a $g_\parallel$, ± 2×10^{-4} cm^{-1} a $A_\perp$, ±1 $\times10^{-4}$ cm^{-1} az $A_\parallel$ esetén. [b]A számolás az alábbi egyenlet alapján történt: $g_{0,szám}$ = $(2g_\perp+g_\parallel)/3$. [c]A szimulációhoz a $[CuLH]^{2+}$ komplex g- és A ESR paramétereit használtuk, dipoláris csatolás = 240 G, távolság $(Cu\text{-}Cu)_{szám.}$ = 4,4 Å.

Sikeresen előállítottam a VLX600 rézkomplexének egykristályát, metanolos oldatból dietil-éter lassú diffúziójával, melyhez tartozó $[Cu(LH)Cl_2]$ komplex röntgen szerkezetét a 62a. ábrán láthatjuk, és egyértelműen az (N,N,N) koordinációs módot figyelhetjük meg. A négyzetes piramisos geometria kialakítása során a koordinációban a piridin nitrogén, az 1,2,4-triazin-rész és a hidrazon nitrogén (N4) vesz részt, valamint két klorido ligandum. Valószínűleg ez a komplex jelenti az ESR-mérések során a $[CuLH]^{2+}$ komplexet. Emellett sikerült előállítanom az egykristályt metanolos oldatból etil-acetát lassú diffúziójával is, ahol [Cu(L)ClMeOH] komplexként kristályosodott ki (62b. ábra). Ebben az esetben a réz(II)ion egy deprotonált VLX600 ligandummal és egy kloridionnal közel sík rendszert alkot. A metanol a négyzetes piramisos geometriában a komplex ötödik koordinációs helyén találhatjuk.



62. ábra: a) A $[Cu(LH)Cl_2]$ és b) a [Cu(L)ClMeOH] komplexek egykristály röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezete (a vízmolekulákat az egyértelműség kedvéért kihagytam).

A vaskomplexek vizsgálatához hasonlóan, a VLX600 rézkomplexeinek redoxi tulajdonságait ciklikus voltammetriás és spektroelektrokémiai mérések segítségével jellemeztem (63. ábra), és az így kapott elektrokémiai adatokat a 22. táblázat tartalmazza a különböző pásztázási sebességek esetén. A vaskomplexszel ellentétben itt irreverzibilis folyamatról beszélhetünk, hiszen a voltamogrammokon is jól látható, hogy az anódos áram mindig jóval kisebbnek bizonyult, mint a katódos áram.



63. ábra: a) A VLX600 rézkomplexének ciklikus voltammogramjai különböző pásztázási sebességek mellett, Ag/AgCl/3 M KCl referenciaelektród és Pt munka- és ellenelektródokkal szemben. {c_{VLX600} = $c_{Cu(II)}$ = 1 mM; 60% (v/v) DMF/puffer (pH=7,4); I = 0,10 M TBAN; ℓ = 1,7 mm; T = 25 °C}. b) A rézkomplex UV-látható spektrumának változása a potenciálváltozás következtében. {c_{VLX600} = 0,5 mM, $c_{Cu(II)}$ = 0,5 mM; 90% (v/v) DMF/puffer (pH = 7,4); I = 0,10 M TBAN; ℓ = 1,7 mm; T = 25 °C}

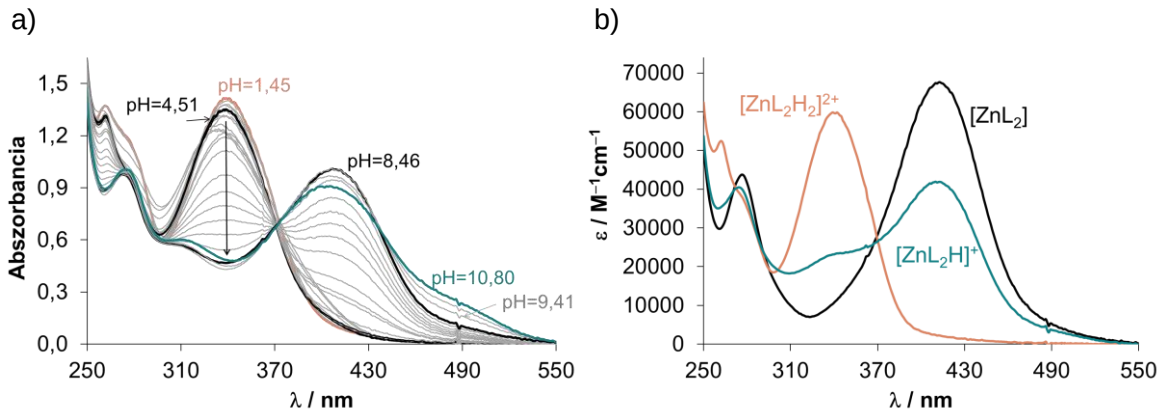
A 63b. ábrán láthatjuk a rézkomplexre felvett spektroelektrokémiai mérés eredményét. A vaskomplexek formál potenciál értékeihez képest jóval negatívabb

értékeket kaptunk a VLX600-rézkomplex esetén, ami pedig a réz(II)ionokkal szembeni nagyobb affinitásra utalhat a réz(I)ionokhoz képest.

22. táblázat: A réz–VLX600 (1:1) rendszer esetén meghatározott elektrokémiai adatok. {c_{VLX600} = 1,0 mM, $c_{Cu(II)}$ = 1,0 mM; T = 25 °C; I = 0,1 M (TBAN); referenciaelektród: Ag/AgCl/3 M KCl; munka- és ellenelektród: Pt; 60% (v/v) DMF/puffer; pH = 7,4}

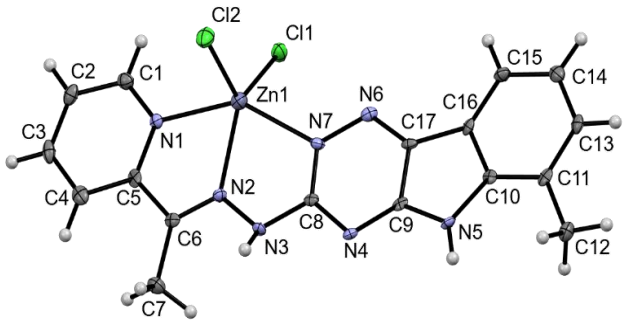
pásztázási sebesség / mV/s	5	10	15	20
E_k / mV	–408	–415	–425	–437
E_a / mV	–259	–266	–269	–266
ΔE / mV	149	149	156	171
$E_{1/2}$ / mV	–333	–341	–347	–352
$E_{1/2}$ / mV vs. NHE	–111	–119	–125	–130

A cink(II) – VLX600 rendszer UV-látható spektrofotometriás titrálásai során (64a. ábra) mono- és bisz komplexek képződését mutattuk ki (19. táblázat), melyekhez tartozó egyedi moláris abszorbancia spektrumokat az 64b. ábrán láthatjuk. A protonált komplexekben ($[ZnLH]^{2+}$ és $[ZnL_2H_2]^{2+}$), valamint a negatív töltésű ligandumot tartalmazó komplexekben ($[ZnL]^+$, $[ZnL_2H]^+$ és $[ZnL_2]$) hasonló koordinációs módok valószínűek, ugyanúgy, ahogy a vaskomplexeknél tapasztaltuk.



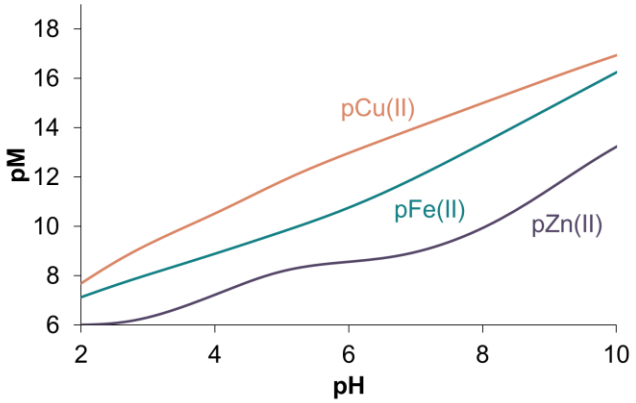
64. ábra: a) Különböző pH-értékeken felvett UV-látható spektrumok, és b) a számolt moláris abszorbancia spektrumok a VLX600–Zn(II) rendszer esetén. {c_L = 51 µM; $c_{Zn(II)}$ = 25 µM; 30% (v/v) DMSO/H_2O; pH = 1,5 – 10,8; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); ℓ = 1,0 cm}

A koordinációs módok feltérképezése érdekében előállítottuk a $[Zn(LH)Cl_2]$ komplex egykristályát, metanolos oldatból etil-acetát lassú diffúziójával (65. ábra). Ebben a komplexben a VLX600 imin tautomer formában kötődik a protonált hidrazon NH-en keresztül, amely hasonló a vaskomplex négyzetes piramisos szerkezetéhez. A $[Zn(LH)Cl_2]$ molekulák között nem képződnek intra- vagy intermolekuláris hidrogénkötések.



65. ábra: A $[Zn(LH)Cl_2]$ egykristály röntgendiffrakciós módszerrel meghatározottszerkezete (a vízmolekulákat az egyértelműség kedvéért elhagytam).

A különböző esszenciális fémionokkal képződött komplexek stabilitási állandóit összevetve megállapítható, hogy a réz(II)komplexek képződési állandója a legnagyobb, míg a vas(II)- és cink(II)komplexeké kisebb stabilitást mutat. Mivel különböző típusú komplexek képződnek, nehéz megállapítani, hogy a VLX600 mely fémion felé mutat nagyobb affinitást. Ennek érdekében különböző pH-értékeken pM értékeket számítottunk (66. ábra), mely a következő sorrendet állítja fel pH = 7,4 esetén: Cu(II) > Fe(II) > Zn(II). Azonban intracelluláris körülmények között, ahol a réz túlnyomórészt réz(I)-formában van jelen, nagyon valószínűséggel a vas(II)ionokkal alakul ki a kölcsönhatás.



66. ábra: pM(−lg[M]) értékek a VLX600 Cu(II)-, Zn(II)-, és Fe(II)-komplexei esetén.
{c_L = 10 μM; c_M = 1 μM; T = 25 °C; I = 0,10 M (KCl); 30% (v/v) DMSO/H_2O}

5.3.2. A hidrazon-típusú, VLX600 szubsztitúciójának hatása a farmakológiai hatásra

A VLX600, valamint annak különböző fémionokkal képzett komplexeinek, továbbá a VLX-származékok *in vitro* citotoxikus aktivitását három különböző humán rákos sejtvonalon (A549, CH1/PA-1, SW480) vizsgáltam. Kolorimetriás MTT vizsgálat segítségével határoztam meg az IC_{50} értékeket, a ligandumok, illetve a VLX600 esetén

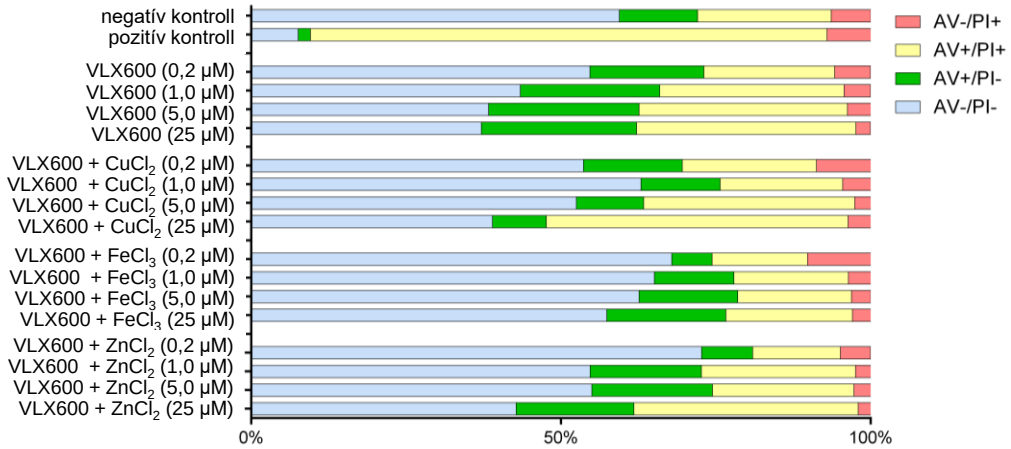
még három fémionnal (Cu(II)-, Fe(III)-, Zn(II)-ionokkal) képzett komplexe esetén is. A kapott eredményeket a 23. táblázat foglalja össze.

23. táblázat: *In vitro* citotoxicitás az A549 (nem kissejtes tüdőrák), CH1/PA-1 (petefészek karcinóma), SW480 (vastagbél karcinóma) sejtvonalakon, a ligandumokra, valamint a VLX600 esetében különböző fémsók jelenlétében mérve (μM-ban kifejezve), 72 órás inkubáció után.

	IC_{50} / μM		
	A549	**CH1/PA-1**	**SW480**
VLX600	0,16 ± 0,03	0,039 ± 0,003	0,16 ± 0,01
VLX600 – $CuCl_2$	0,16 ± 0,02	0,037 ± 0,012	0,37 ± 0,08
VLX600 – $ZnCl_2$ (2:1)	0,16 ± 0,03	0,029 ± 0,005	0,19 ± 0,03
VLX600 – $FeCl_3$ (2:1)	0,27 ± 0,07	0,054 ± 0,012	0,27 ± 0,04
$CuCl_2$	142 ± 16	28 ± 5	154 ± 21
$ZnCl_2$	123 ± 9	66 ± 3	125 ± 16
$FeCl_3$	> 200	> 200	> 200
VLX-3AP	0,43 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,30 ± 0,04
VLX-COTI-2	0,15 ± 0,01	0,042 ± 0,08	0,26 ± 0,08
VLX-DpC	0,24 ± 0,03	0,060 ± 0,006	0,26 ± 0,02
VLX-STSC	> 50	0,47 ± 0,08	0,78 ± 0,26

A VLX600 erős citotoxikus hatást mutatott a mikromoláris koncentrációtartományban minden kezelt rákos sejtvonalon. A legerősebb antiproliferatív aktivitást a petefészek karcinoma sejtek (CH1/PA-1) esetén tapasztaltuk, míg másik két sejtvonalon az IC_{50} értékek körülbelül egy nagyságrenddel nagyobbak. A komplexképződés hatásának vizsgálatához a mérések előtt összekevertem a VLX600-at a megfelelő arányban az adott fémsóval, és csak ezután kezeltem a sejteket az *in situ* képződött komplexek oldatával. A fémionok jelenlétében a szabad ligandumhoz hasonló IC_{50} értékeket kaptunk, nem eredményezett aktivitásnövekedést a komplexképződés. Az előzőekben tárgyalt oldatkémiai vizsgálatok eredményei alapján a különböző fémionokkal protonált komplexek alakulnak ki pH = 7,4-n (100% $[CuL]^+$; 52% $[ZnL_2H]^+$, 19% $[ZnL_2H_2]^{2+}$, 19% $[ZnL]^+$; ~100% $[Fe(III)L_2]^+$, ami lassan csökken a redoxi folyamat miatt), ami korlátozott sejtfelvételt eredményez. A fémsók citotoxikus hatása önmagában elhanyagolható, vagy legalább 2-3 nagyságrenddel alacsonyabb, mint a ligandumoké. A különböző VLX-származékok aktivitását összevetve a VLX600 IC_{50} értékével, elmondható, hogy a várakozással ellentétben nem növekedett a citotoxicitás az új szubsztituensek beépítésének hatására, azonban erős aktivitással rendelkeznek az új vegyületek is.

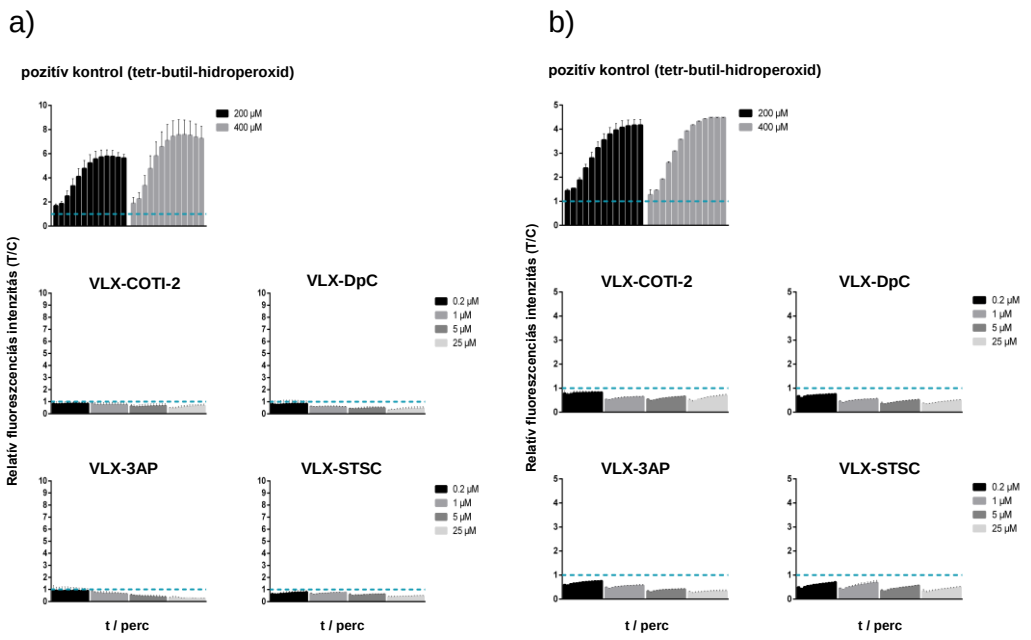
Áramlási citometriával vizsgáltam az apoptózis indukciót a VLX600 és különböző fémionokkal képzett komplexei estetén, a CH1/PA-1 sejtvonalon (amely a leginkább kemoszenzitív sejtvonalnak bizonyult a három közül) vizsgáltuk. FITC annexin V foszfolipidkötő fehérjét használtam a foszfatidil-szerin megkötésére, továbbá propídium-jodidos kettős festést alkalmaztam. A nekrotikus sejtek (AV^-/PI^+), késői apoptotikus sejtek (AV^+/PI^+), korai apoptotikus sejtek (AV^+/PI^-) és életképes sejtek (AV^-/PI^-) százalékos arányát mutatja a 67. ábra, különböző koncentrációk esetén.



67. ábra: Apoptózis/nekrózis indukciója négy különböző koncentráció esetén. Teszteltem a VLX600-at önmagában, továbbá 1 ekvivalens $CuCl_2$ és $ZnCl_2$ és 0,5 ekvivalens $FeCl_3$ jelenlétében. A sejtszámot áramlásos citometriával detektáltam a CH1/PA-1 sejtvonalon. Annexin V-FITC és PI (pozitív kontroll: 1-P) segítségével kettős festést alkalmaztam.

Megfigyelhető, hogy a VLX600 koncentrációfüggő módon korai és késői apoptózist indukál. A fémionok hozzáadásával azonban a korai és késői apoptotikus események összege jelentősen csökkent, különösen a vas(III) esetében.

A szakirodalomban már ismert, hogy a VLX600 nem rendelkezik reaktív oxigénrészecske-termelő képességgel, azonban kíváncsiak voltunk, hogy vajon ez az új vegyületek esetén is így van-e, illetve, hogy a komplexképződésnek milyen hatása van a VLX600 esetén a ROS-termelésre. Mértük a fluoreszcencia emissziót 2 órán keresztül, DCFH-DA-val végzett kísérletek során, két különböző sejtvonalon (CH1/PA-1 és SW480), négy különböző koncentráció mellett (68. ábra).



68. ábra: a) Reaktív oxigénrészecskék termelődésének vizsgálata a különböző VLX600 származékok esetében a CH1/PA-1, és b) SW480 sejtvonalakon, két óra elteltével, négy különböző koncentráció (0,2–25 µM) mellett.

Azt tapasztaltuk, hogy a réz(II)-, cink(II)-, és vas(III)ionok jelenlétében sem volt megfigyelhető ROS képződés, 2 óra elteltével sem. A VLX600 származékok esetén is elvégeztük a kísérleteket, azonban egyik sejtvonal esetén sem tapasztaltunk ROS termelődést, hasonlóan a VLX600-hoz, mely erősíti azt a tényt, hogy az új származékok sem ilyen módon fejtik ki rákellenes hatásukat.

6. Összefoglalás

Doktori munkám során három olyan vegyületcsaláddal foglalkoztam, melyek közös tulajdonsága, hogy rákellenes hatásuk endogén fémionokkal való kölcsönhatásukon alapul. Dolgozatomban különböző (tio)szemikarbazonok, 8-hidroxi-kinolinok és indol-triazin-alapú háromfogú ligandumok oldatkémiai tulajdonságait tanulmányoztam. Vizsgáltuk a szerkezeti változtatások hatását az oldategyensúlyi sajátságokra, és azok rákellenes tulajdonságokkal való kapcsolatát. Mivel mindhárom vegyületcsoport citotoxicitása a különböző fémionokkal (pl. réz(II)-, vas(II)-, vas(III), és cink(II)) való kölcsönhatással hozható összefüggésbe, ezért a ligandumok oldatkémiai jellemzése mellett a komplexképzés vizsgálatára is jelentős hangsúlyt fektettünk. A képződő komplexek redoxi tulajdonságait is feltérképeztük, hiszen a szervezetben lejátszódó redoxi reakciók is fontos szerepet játszhatnak a biológiai hatás kifejtésekor.

A (tio)szemikarbazonok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a koordinálódó donoratomok változtatásának jelentős hatása van az oldategyensúlyi tulajdonságokra. A kén oxigénre történő cseréje nem befolyásolta a kalkogénatomtól távolabb elhelyezkedő piridínium-NH^+-csoport pK_a értékét, de jelentősen növelte a hidrazon-NH-csoportét. Az általunk vizsgált, különböző koordinációs móddal rendelkező vegyületeket összevetve elmondható, hogy a Dp44mT rendelkezik a legerősebb, míg az O-3AP származék a leggyengébb réz(II)-kötő képességgel. A réz(II)-affinitás a következő módon alakult az egyes koordinációs módok esetén: $(N,N,S^-) > (N,N,O^-) > (O^-,N,S^-) > (O^-,N,O^-)$. Nem csupán a fémkomplexképzést befolyásolta a koordinációs módok változtatása, de a termodinamikai oldhatóságot is. A meghatározott pK_a értékek alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált vegyületek semleges formában vannak jelen fiziológiás pH-n, illetve ezen körülmények között oldhatóságuk az alábbi sorrendet mutatta: O-3AP > 3AP > SSC > STSC > Dp44mT. A réz(II)komplexekek DNS-hez való kötődésének erősségére vonatkozóan az alábbi sorrendet állítottuk fel: (O-3AP) > 3AP, Dp44mT > SSC > STSC, ahol az O-3AP esetén tapasztalt változás a szabad réz(II)ionokhoz volt köthető, míg az STSC nem volt képes a kiszorításra.

A különböző módon szubszituált tioszemikarbazonok vizsgálata során megállapítottuk, hogy míg a monometilezésnek csupán kis hatása volt a meghatározott proton disszociációs állandókra, addig az N-terminális dimetilezés eredményeként megfigyelhettük, hogy az első pK_a nagyobbnak, míg a második kisebbnek mutatkozott. A

piridin-gyűrű amincsoportjának dimetilezése mindkét állandót kissé megnövelte, továbbá a kénatomon történő metilezés kis növekedést eredményezett a piridínium-NH-csoporthoz tartozó pK_a értékében. Ugyanezt tapasztaltuk a réz(II)ionokkal való komplexképződés vizsgálatakor, ahol a metilcsoport beépítése csak kis mértékben, míg a dimetil szubsztituens jelenléte nagyobb mértékben növelte a stabilitást. A réz(II)komplexek redoxi reakcióinak vizsgálata során megfigyeltük, hogy minél gyengébb a ligandum rézkötő képessége, annál gyorsabb a komplexek glutationnal való redukciója, és annál kisebb a mért citotoxicitás.

A klinikai tesztelés alatt álló COTI-2, és származékainak vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a termodinamikai oldhatóság az alábbi sorrendet mutatja: COTI-2 < COTI-NMeCy << COTI-NMe_2 < COTI-NH_2. A ligandumok mono-, és biszkomplexeket képeznek a vasionokkal és a cinkkel, míg a rézionokkal csupán monokomplex képződik, melyek stabilitása az alábbi sorrendet mutatta: Fe(II) > Cu(II) > Zn(II) > Fe(III). Mind az aszkorbinsavval, mind a glutationnal végzett vizsgálatok során azt figyeltük meg, hogy a vas(III)komplexek redukálódtak. A réz(II)komplexek esetén első lépésben egy vegyes ligandumú komplex képződött, majd a COTI-NH_2 esetén ezt egy lassú reakció követte, míg a többi ligandum réz(II)komplexénél nem tapasztaltunk jelentős változást. Ezen megfigyelésnek nagy jelentősége van a rezisztencia hatásmechanizmusának feltérképezése szempontjából, hiszen az ABCC1 pumpa szubsztrát specifikus a GSH-ra, ami azt jelenti, hogy a képződő Cu(II)-ligandum-GSH vegyes ligandumú komplexet is képes lehet felismerni és a sejten kívülre pumpálni. A COTI-NH_2 ligandumot (ahol a vegyes ligandumú komplex képződését követően a redukció során a ligandum felszabadult a komplexből) nem képes felismerni a pumpa, ezzel szemben a COTI-2 (valamint a másik kettő *N*-terminálisan diszubsztituált származék) Cu(II)-komplexének GSH-nal képzett adduktumát effluxálni tudja, ami rezisztenciát eredményez.

A 8-hidroxi-kinolinok esetén is vizsgáltuk különböző szubsztituensek hatását az oldategyensúlyi tulajdonságokra L^1 – L^6 ligandumok körében, mely során megállapítottuk, hogy az elektronszívó klór- és fluor szubsztituensek csökkentik a benzohidrazid-NH pK_a értékét, addig az elektrondonor metil- és metoxicsoportok növelik azt. A ligandumok Cu(II)-kötő képességét összevetve azt találtuk, hogy az L^1 és L^5 hasonló erősséggel rendelkezik, míg az L^6 valamivel kisebb stabilitású komplexeket képez. Ez arra utalhat, hogy a benzohidrazid-nitrogén nem vesz részt a koordinációban. Az L^1, L^5 és L^6 ligandumok rézkomplexeinek direkt redoxi reakciójának vizsgálata során megállapítottuk,

hogy mind az aszkorbinsav, mind a glutation képes redukálni a komplexeket. A redukció során a szabad ligandum felszabadulását tapasztaltuk, ami a keletkezett Cu(I)-komplex disszociációjához köthető, így stabilis Cu(I)-komplex jön létre a redukálószerrel. A redoxi reakció glutationnal volt gyorsabb, a reakciósebességek pedig a következő tendenciát mutatták az adott komplexeknél: $L^1 \sim L^6 > L^5$.

Az LC1–3 ligandumok komplexképződésének vizsgálatakor a réz(II)-, és cink(II)ionokkal mono- és biszkomplex képződését tudtuk leírni. Mindemellett elmondható, hogy a vizsgált ligandumok réz(II)komplexei jóval nagyobb stabilitásúak, mint a cink(II)komplexek. Összehasonlításképp az is elmondható, hogy ezeknek a ligandumoknak a réz(II)komplexei kisebb, míg a cink(II)komplexeik stabilitása nagyobb, mint az alapvegyület (oxin) esetén képződött komplexeké. Ahogyan azt az előző 8-hidroxi-kinolin vegyületcsaládnál is megfigyeltük, a szabad ligandumok mérsékelten lipofil jellegűek, míg komplexeik lipofilebbnek bizonyultak.

A kiemelkedő vízoldhatóságú $HQNO_2$-L-Pro ligandum esetén a meghatároztuk a Cu(II)-, Zn(II)-, Fe(II)-, és Fe(III)-ionokkal képzett komplexek összetételét és stabilitási szorzatait, melyek alapján fiziológiás pH-n között a ligandum különböző fémionok felé mutatott affinitás a következő trendet mutatta: Cu(II) > Zn(II) > Fe(II) > Fe(III). Míg a ligandum vas(III)-, és vas(II)komplexeiben az (N,O) koordinációt feltételezzük, addig a cink(II) és réz(II)komplexek esetén a prolin molekularész is koordinálódik. A képződő komplexek redoxi tulajdonságainak feltérképezése során megállapítottuk, hogy a ligandum vaskomplexe esetén reverzibilis, míg a rézkomplexe esetén irreverzibilis redox folyamatok játszódnak le. A vaskomplex esetén meghatározott magas formál potenciál érték a Fe(II)-felé mutatott nagyobb affinitásra utal.

Sikeresen előállítottam a VLX600 vaskelátort, illetve annak négy különböző, tioszemikarbazonok szerkezete által inspirált származékát. A különböző endogén fémionokkal való kölcsönhatás feltérképezése azt mutatta, hogy a VLX600 Fe(III)-ionokkal való komplexképződése során az idő előrehaladtával redoxi reakció történik, mely során Fe(II)-komplex keletkezett. A redukciót a kapott Fe(II)-iont tartalmazó egykristály röntgenkrisztallográfiás vizsgálata is igazolta. A Fe(II)-, és Zn(II)-ionokkal mono- és biszkomplexek, míg Cu(II)-ionokkal csak monokomplexek képződését tudtuk leírni. A VLX600 vaskomplexének redoxi tulajdonságait vizsgálva viszonylag nagy pozitív formál potenciál értéket határoztunk meg, ami a ligandum Fe(II)-ionok felé mutatott

nagyobb affinitására utal. Ezzel szemben a rézkomplex esetén viszonylag kisebb értékeket kaptunk, ami pedig Cu(II)-ionokkal szembeni nagyobb affinitást jelzi a Cu(I)-ionokkal szemben. A VLX600, és származékainak *in vitro* citotoxikus aktivitását három különböző típusú humán rákos sejtvonalon vizsgáltuk, továbbá a VLX600 esetén különböző endogén fémionok (Cu(II), Zn(II), és Fe(III)) jelenlétében is. Mind a ligandumok, mind a komplexek erős citotoxikus hatást mutattak. További vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a VLX600 koncentrációfüggő apoptózist képes indukálni, viszont az apoptotikus események százalékos aránya csökkent a fémionok jelenlétében.

7. Summary

In my PhD work, three families of compounds were investigated that have in common that their anticancer effect is based on their ability to bind to endogenous metal ions. I have studied the solution chemical properties of various (thio)semicarbazones, 8-hydroxyquinolines and indole-triazine-based tridentate ligands with a particular focus on the effect of structural modifications on their solution chemical properties and anticancer activity. Since the cytotoxicity of all three groups of compounds is based on the complexation with copper(II), iron(II), iron(III) or zinc(II) ions, I investigated their complex formation equilibria and the redox properties of the formed complexes in addition to the solution chemical characterization of the ligands.

While investigating the solution chemical properties of (thio)semicarbazones, we found that changing the coordinating donor atoms has a significant effect on the solution chemical properties. Replacing sulfur with oxygen did not affect the pK_a value of the pyridinium-NH^+ group located further from the chalcogen atom. On the other hand, the pK_a value of the hydrazone-NH moiety significantly increased. Comparing compounds with different coordination modes, it can be said that Dp44mT showed the strongest, while the O-3AP derivative the weakest copper(II)-binding affinity. Cu(II)-affinity of the ligands showed the following trend for the different coordination modes: $(N,N,S^-) > (N,N,O^-) > (O^-,N,S^-) > (O^-,N,O^-)$. Altering the coordination modes affected not only the formation of metal complexes, but also the thermodynamic solubilities. Based on the determined pK_a values, the tested compounds were present in their neutral form at physiological pH. Their aqueous solubility changed in the following order under these conditions: O-3AP > 3AP > SSC > STSC > Dp44mT. The binding strength of copper(II) complexes to DNA showed the following order: O-3AP > 3AP, Dp44mT > SSC > STSC, where the change observed in the case of O-3AP was related to free copper(II) ions released from the complex due to its low stability, while STSC was unable to displace the intercalator ethidium bromide.

In the case of differently substituted thiosemicarbazones, we found that monomethylation has only a small effect on the determined proton dissociation constants, while the *N*-terminal dimethylation results in an increased p$K_{a,1}$ value and decreased p$K_{a,2}$. Dimethylation of the amine group of the pyridine ring slightly increased both pK_a constants. Additionally, methylation on the sulfur atom resulted in a small increase in the pK_a constant of the pyridinium-NH group. During the investigation of the complex

formation with copper(II) ions, the methyl group slightly increased the stability, while the presence of the dimethyl substituent increased the stability furthermore significantly. When examining the redox reactions of copper(II) complexes, we observed that the weaker the copper-binding ability of the ligand, the faster the reduction of complexes with glutathione and the lower the cytotoxicity.

When examining COTI-2, the clinically investigated drug, and its derivatives we found that the thermodynamic solubility changes in the following order: COTI-2 < COTI-NMeCy << COTI-NMe_2 < COTI-NH_2. All ligands form mono- and bis-ligand complexes with iron(II/III) ions and zinc(II), while only mono complexes were identified with copper ions. The stability of these complexes resulted in the following trend: Fe(II) > Cu(II) > Zn(II) > Fe(III). We observed when running additional measurements in the presence of ascorbic acid and glutathione that the Fe(III) complexes were reduced. For the Cu(II) complexes, it was found that in the first step a mixed-ligand complex is formed with glutathione. This was followed by a slow reaction in the case of COTI-NH_2, but no significant changes were observed with the Cu(II) complexes of the other *N*-terminally disubstituted ligands. The observation was of great importance to understand the resistance mechanism of the Cu(II) complexes, namely the ABCC1 pump substrate is specific for GSH, which means that it can also recognize the Cu(II)-ligand-GSH ternary complex and efflux it from the cell. The COTI-NH_2 ligand (where, after the formation of the mixed complex the ligand is released during reduction) cannot be recognized by the efflux pump. Contrastingly, COTI-2 (as well as the other two *N*-terminally disubstituted derivatives) formed mixed-ligand complex with GSH, which is recognized by ABCC1, resulting in drug resistance.

In the case of 8-hydroxyquinolines, we also examined the effect of different substituents on the solution equilibrium properties of ligands L^1 – L^6. The electron-withdrawing chlorine and fluorine substituents reduced the pK_a value of benzohydrazide-NH, while the electron-donating methyl and methoxy groups increased it. Comparing the Cu(II)-binding affinity of the ligands, we found that L^1 and L^5 have similar binding strength, while L^6 forms complexes with slightly lower stability. This may indicate that the benzohydrazide nitrogen is not involved in the coordination. Ascorbic acid and glutathione can reduce the copper complexes with L^1, L^5 and L^6 ligands as evidenced in the direct redox reaction experiments. The free ligand was released during the reduction process due to the dissociation of the formed Cu(I)-complex. Thus, a stable Cu(I)-complex was formed

with the reducing agent. The redox reaction was faster with glutathione, and the reaction rates showed the following trend: $L^1 \sim L^6 > L^5$.

During the complex formation of LC1–3 ligands, we have found the formation of mono- and bis complexes with Cu(II) and Zn(II) ions. In addition, it can be said that the Cu(II) complexes of the investigated ligands are much more stable than the Zn(II) complexes. As a comparison, the stability of the Cu(II) complexes of these ligands is lower, while the stability of their Zn(II)-complexes is higher than that of the complexes formed in the case of 8HQ. As we also observed with the previous family of 8-hydroxyquinoline compounds, the free ligands are moderately lipophilic, while their complexes show higher lipophilicity.

Stability constants of the complexes formed with Cu(II), Zn(II), Fe(II), and Fe(III) ions were determined for the highly water-soluble $HQNO_2$-L-Pro ligand. The affinity of the ligand towards different metal ions at physiological pH showed the following trend: Cu(II) > Zn(II) > Fe(II) > Fe(III). In the case of the Fe(III) and Fe(II) complexes, (N,O) coordination mode is assumed, while in Zn(II) and Cu(II) complexes, the proline moiety is also coordinated. While mapping the redox properties of the complexes, we observed that reversible redox processes take place in the case of the iron complexes. In contrast, the redox process was irreversible in the case of the copper complexes. The high formal potential value determined for the iron complex indicates a higher affinity towards Fe(II) ions.

I synthesized the iron chelator VLX600 and its four different derivatives inspired by the chemical structure of thiosemicarbazones. The investigation of the interaction with various endogenous metal ions showed that during the complex formation of VLX600 with Fe(III) ions, a redox reaction occurs over time, in which its Fe(II) complex was formed. The reduction was also confirmed by X-ray crystallography. The formation of mono- and bis complexes with Fe(II) and Zn(II) ions was described, while only mono complexes were formed with Cu(II) ions. In the case of the iron complexes of VLX600, a high positive formal potential value was determined, which indicates the stronger affinity of the ligand towards Fe(II) ions. On the other hand, for the copper complex, relatively smaller values were obtained, indicating a greater affinity of VLX600 to Cu(II) ions than to Cu(I) ions. The *in vitro* cytotoxic activity of VLX600 and its derivatives was investigated on three different types of human cancer cell lines. In the case of VLX600, the effect of various

endogenous metal ions (Cu(II), Zn(II), and Fe(III)) was also investigated. Both the free ligands and complexes showed strong cytotoxic effect. Additionally, it was also found that VLX600 can induce concentration-dependent apoptosis, but the percentage of apoptotic events decreased in the presence of metal ions.

8. Irodalomjegyzék

[1] https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0 (2025.01.20.)

[2] https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype (2025.01.20.)

[3] https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer-in-children (2025.01.20.)

[4] https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2020 (2025.01.20.)

[5] K. D. Mjos, C. Orvig, *Chemical Reviews*, 114 (**2014**) 4540–4563.

[6] K. A. McCall, C. C. Huang, C. A. Fierke, *Journal of Nutrition*, 130.5 **(2000**) 1437S–1446S.

[7] M. J. McKeage, L. Maharaj, S. J. Berners-Price, *Coordination Chemistry Reviews*, 232 (**2002**) 127–135.

[8] https://clinicaltrials.gov/study/NCT02466971 (2025.01.20.)

[9] D. B. Lovejoy, P. J. Jansson, U. T. Brunk, J. Wong, P. Ponka, D. R. Richardson, *Cancer Research*, 71 (**2011**) 5871–5880.

[10] V. Oliveri, G. Vecchio, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 120 (**2016**) 252–274.

[11] Y. C. Liu, J. H. Wei, Z. F. Chen, M. Liu, Y. Q. Gu, K. B. Huang, Z. Q. Li, H. Liang, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69 (**2013**) 554–563.

[12] A. Barilli, C. Atzeri, I. Bassanetti, F. Ingoglia, V. Dall'Asta, O. Bussolati, M. Maffini, C. Mucchino, L. Marchiò, *Molecular Pharmaceutics*, 11 (**2014**) 1151–1163.

[13] X. Zhang, M. Fryknäs, E. Hernlund, W. Fayad, A. De Milito, M. H. Olofsson, V. Gogvadze, L. Dang, S. Påhlman, L. A. K. Schughart, L. Rickardson, P. D′Arcy, J. Gullbo, P. Nygren, R. Larsson, S. Linder, *Nature Communications*, 5 (**2014**) 3295.

[14] M. Fryknäs, X. Zhang, U. Bremberg, W. Senkowski, M. H. Olofsson, P. Brandt, I. Persson, P. D'Arcy, J. Gullbo, P. Nygren, L. K. Schughart, S. Linder, R. Larsson, *Scientific Reports*, 6 (**2016**) 38343.

[15] K. Mody, A. S. Mansfield, L. Vemireddy, P. Nygren, J. Gulbo, M. Borad, *Investigational New Drugs*, 37 (**2019**) 684–692.

[16] W. Maret, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (**2016**) 66.

[17] M. A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 195 (**2019**) 120–129.

[18] H. Lee, H.-J. Lee, D.L. Sedlak, C. Lee, *Chemosphere*, 92 (**2013**) 652–658.

[19] A. Formigari, P. Irato, A. Santon, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146 (**2007**) 443–459.

[20] E. J. Ge, A. I. Bush, A. Casini, P. A. Cobine, J. R. Cross, G. M. DeNicola, Q. P. Dou, K. J. Franz, V.M. Gohil, S. Gupta, S. G. Kaler, S. Lutsenko, V. Mittal, M. J. Petris, R. Polishchuk, M. Ralle, M. L. Schilsky, N. K. Tonks, L. T. Vahdat, L. Van Aelst, D. Xi, P. Yuan, D. C. Brady, C. J. Chang, *Nature Reviews Cancer*, 22 (**2022**) 102–113.

[21] A. S. Prasad, F. W. J. Beck, D.C. Snell, O. Kucuk, *Nutrition and Cancer*, 61 (**2009**) 879–887.

[22] E. Ho, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15 (**2004**) 572–578.

[23] D. M. Zou, W. L. Sun, *Chinese Medical Journal*, 130 (**2017**) 866–871.

[24] R. Galanello, R. Origa, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5 (**2010**) 1–15.

[25] K. Günther, Biochemistry of Iron, Diet for Iron Deficiency, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, **2023**, 7–27.

[26] M. Kolberg, K. R. Strand, P. Graff, K. Kristoffer Andersson, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1699 (**2004**) 1–34.

[27] M. Thelander, A. Gräslund, L. Thelander, *Journal of Biological Chemistry*, 260 (**1985**) 2737–2741.

[28] S. V. Torti, F. M. Torti, *Nature Reviews Cancer*, 13 (**2013**) 342–355.

[29] D. T. Logan, X. D. Su, A. Åberg, K. Regnström, J. Hajdu, H. Eklund, P. Nordlund, *Structure*, 4 (**1996**) 1053–1064.

[30] A. Steinbrueck, A. C. Sedgwick, J. T. Brewster, K. C. Yan, Y. Shang, D.M. Knoll, G. I. Vargas-Zúñiga, X. P. He, H. Tian, J. L. Sessler, *Chemical Society Reviews*, 49 (**2020**) 3726–3747.

[31] S. A. Cotton, *Coordination Chemistry Reviews*, 8 (**1972**) 185–223.

[32] A. N. Prasad, S. Levin, C. A. Rupar, C. Prasad, *Brain and Development*, 33 (**2011**) 866–876.

[33] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science*, 269 (**1995**) 1069–1074.

[34] P. Mondola, S. Damiano, A. Sasso, M. Santillo, *Frontiers in Physiology*, 7 (**2016**) 594.

[35] H. C. Sutton, C.C. Winterbourn, *Free Radical Biology and Medicine*, 6 (**1989**) 53–60.

[36] R. R. Conry, Copper: Inorganic & Coordination Chemistry, *Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition*, Wiley, **2005**.

[37] M. Vašák, D. W Hasler, *Current Opinion in Chemical Biology*, 4 (**2000**) 177–183.

[38] A. S. Prasad, *Advances in Nutrition*, 4 (**2013**) 176–190.

[39] T. Himoto, T. Nomura, J. Tani, H. Miyoshi, A. Morishita, H. Yoneyama, R. Haba, H. Masugata, T. Masaki, *Biological Trace Element Research*, 163 (**2015**) 81–88.

[40] Z. Gáspár, A. Egresi, G. Lengyel, A. Blázovics, J. Tőke, K. Hagymási, *Orvosi Hetilap*, 161 (**2020**) 917–923.

[41] A. Karmakar, A. K. Das, N. Ghosh, P. C. Sil, Antioxidants Effects in Health, Elsevier (**2022**) 139–166.

[42] I. Szilágyi, O. Berkesi, M. Sipiczki, L. Korecz, A. Rockenbauer, I. Pálinkó, *Catalysis Letters*, 127 (**2009**) 239–247.

[43] N. P. Pavletich, C. O. Pabo, *Science*, 261 (**1993**) 1701–1707.

[44] A. Krężel, W. Maret, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 611 (**2016**) 3–19.

[45] K. Patel, A. Kumar, S. Durani, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1774 (**2007**) 1247–1253.

[46] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4 (**2004**) 31–39.

[47] G. Pelosi, *The Open Crystallography Journal*, 3 (**2010**) 16–28.

[48] M. C. Liu, T. C. Lin, A. C. Sartorelli, *Journal of Medicinal Chemistry*, 35 (**1992**) 3672–3677.

[49] R. W. Brockman, J. R. Thomson, M. J. Bell, H. E. Skipper, *Cancer Research*, 16 (**1956**) 167–170.

[50] A. M. Tsimberidou, Y. Alvarado, F. J. Giles, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2 (**2002**) 437–448.

[51] J. Shao, B. Zhou, A. J. Di Bilio, L. Zhu, T. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (**2006**) 586–592.

[52] https://clinicaltrials.gov/search?term=triapine&aggFilters=phase:3 (2025.01.20.)

[53] J. J. Knox, S. J. Hotte, C. Kollmannsberger, E. Winquist, B. Fisher, E. A. Eisenhauer, *Investigational New Drugs*, 25 (**2007**) 471–477.

[54] C. A. Kunos, E. Chu, J. H. Beumer, M. Sznol, S. P. Ivy, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79 (**2017**) 201–207.

[55] K. Y. Salim, S. Maleki Vareki, W. R. Danter, S. San-Marina, J. Koropatnick, *Oncotarget*, 7 (**2106**) 41363–41379.

[56] https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02433626 (2025.01.20.)

[57] S. N. Westin, W. Nieves-Neira, C. Lynam, K. Y. Salim, A. D. Silva, R. T. Ho, G. B. Mills, R. L. Coleman, F. Janku, D. Matei, *Cancer Research*, 78 (**2018**) CT033–CT033.

[58] A. Lindemann, A. A. Patel, N. L. Silver, L. Tang, Z. Liu, L. Wang, N. Tanaka, X. Rao, H. Takahashi, N. K. Maduka, M. Zhao, T. C. Chen, W. Liu, M. Gao, J. Wang, S. J. Frank, W. N. Hittelman, G. B. Mills, J. N. Myers, A. A. Osman, *Clinical Cancer Research*, 25 (**2019**) 5650–5662.

[59] W. G. Z. Ling Bai, *Journal of Cancer Molecules*, 2 (**2006**) 141–153.

[60] J. Yuan, D. B. Lovejoy, D. R. Richardson, *Blood*, 104 (**2004**) 1450–1458.

[61] P. J. Jansson, C. L. Hawkins, D. B. Lovejoy, D. R. Richardson, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104 (**2010**) 1224–1228.

[62] D. R. Richardson, P. C. Sharpe, D. B. Lovejoy, D. Senaratne, D. S. Kalinowski, M. Islam, P. V. Bernhardt, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (**2006**) 6510–6521.

[63] Y. Xu, M. Zeng, D. Yu, J. Ren, F. Li, A. Zheng, Y. Wang, C. Chen, Z. Tao, *Oncology Letters*, 15.5 (**2018**) 7999–8004 .

[64] Z. L. Guo, D. R. Richardson, D. S. Kalinowski, Z. Kovacevic, K. C. Tan-Un, G. C. F. Chan, *Journal of Hematology & Oncology*, 9 (**2016**) 1–16.

[65] N. A. Seebacher, D. R. Richardson, P. J. Jansson, *Cell Death & Disease*, 7 (**2016**) e2510–e2510.

[66] P. J. Jansson, T. Yamagishi, A. Arvind, N. Seebacher, E. Gutierrez, A. Stacy, S. Maleki, D. Sharp, S. Sahni, D. R. Richardson, *Journal of Biological Chemistry*, 290 (**2015**) 9588–9603.

[67] D. Kovala-Demertzi, M. A. Demertzis, J. R Miller, C. Papadopoulou, C. Dodorou, G. Filousis, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 86 (**2001**) 555–563.

[68] N. C. Kasuga, K. Sekino, C. Koumo, N. Shimada, M. Ishikawa, K. Nomiya, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 84 (**2001**) 55–65.

[69] A. Maiti, A. K. Guha, S. Ghosh, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 33 (**1988**) 57–65.

[70] T. S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coordination Chemistry Reviews*, 253 (**2009**) 977–1055.

[71] R. G. Pearson, *Journal of the American Chemical Society*, 85 (**1963**) 3533–3539.

[72] C. R. Kowol, P. Heffeter, W. Miklos, L. Gille, R. Trondl, L. Cappellacci, W. Berger, B. K. Keppler, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17 (**2012**) 409–423.

[73] P. J. Jansson, P. C. Sharpe, P. V. Bernhardt, D. R. Richardson, *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (**2010**) 5759–5769.

[74] B. M. Paterson, P. S. Donnelly, *Chemical Society Reviews*, 40 (**2011**) 3005.

[75] M. Carcelli, M. Tegoni, J. Bartoli, C. Marzano, G. Pelosi, M. Salvalaio, D. Rogolino, V. Gandin, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 194 (**2020**) 112266.

[76] A. B. M. Ibrahim, M. K. Farh, P. Mayer, *Inorganic Chemistry Communications*, 94 (**2018**) 127–132.

[77] N. K. Singh, A. A. Kumbhar, Y. R. Pokharel, P. N. Yadav, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 210 (**2020**) 111134.

[78] X. G. Bai, Y. Zheng, J. Qi, *Frontiers in Pharmacology*, 13 (**2022**) 1018951.

[79] Enyedy É. A., Rákellenes fémkomplexek oldatkémiája és farmakokinetikai viselkedésüket befolyásoló tulajdonságaik, Akadémiai nagydoktori mű, Szegedi Tudományegyetem, **2019**.

[80] É. A. Enyedy, N. V. May, V. F. S. Pape, P. Heffeter, G. Szakács, B. K. Keppler, C. R. Kowol, *Dalton Transactions*, 49 (**2020**) 16887–16902.

[81] M. Albrecht, M. Fiege, O. Osetska, *Coordination Chemistry Reviews*, 252 (**2008**) 812–824.

[82] H. Saadeh, K. Sweidan, M. Mubarak, *Molecules*, 25 (**2020**) 4321.

[83] C. Sgarlata, V. Oliveri, J. Spencer, *European Journal of Inorganic Chemistry* (**2015**) 5886–5891.

[84] M. Di Vaira, C. Bazzicalupi, P. Orioli, L. Messori, B. Bruni, P. Zatta, *Inorganic Chemistry*, 43 (**2004**) 3795–3797.

[85] D. Torgeson, Agricultural and Industrial Applications Environmental Interactions, *Elsevier*, **2012**.

[86] M. I. Fernández-Bachiller, C. Pérez, G. C. González-Muñoz, S. Conde, M. G. López, M. Villarroya, A. G. García, M. I. Rodríguez-Franco, *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (**2010**) 4927–4937.

[87] Y. Yang, Z. Zhou, Z. Z. Wei, Q. P. Qin, L. Yang, H. Liang, *Dalton Transactions*, 50 (**2021**) 5828–5834.

[88] P. Shah, L. F. Abadi, S. Gaikwad, D. Chaudhari, V. Kushwah, S. Jain, K. K. Bhutani, S. Kulkarni, I. P. Singh, *Chemistry Select*, 3 (**2018**) 10727–10731.

[89] R. H. Friend, R. W. Gymer, A. B. Holmes, J. H. Burroughes, R. N. Marks, C. Taliani, D. D. C. Bradley, D. A. Dos Santos, J. L. Brédas, M. Lögdlund, W. R. Salaneck, *Nature*, 397 (**1999**) 121–128.

[90] K. H. Neldner, *International Journal of Dermatology*, 16 (**1977**) 267–273.

[91] O. Olaleye, T. R. Raghunand, S. Bhat, C. Chong, P. Gu, J. Zhou, Y. Zhang, W. R. Bishai, J. O. Liu, *Tuberculosis*, 91 (**2011**) S61–S65.

[92] L. W. Hung, K. J. Barnham, *Future Medicinal Chemistry*, 4 (**2012**) 955–969.

[93] S. Wilkins, C. L. Masters, A. I. Bush, R. A. Cherny, D. I. Finkelstein, Clioquinol Protects Against Cell Death in Parkinson's Disease Models In Vivo and In Vitro, **2009**, 431–442.

[94] A. D. Schimmer, *Current Cancer Drug Targets*, 11 (**2011**) 325–331.

[95] D. Ben Shachar, N. Kahana, V. Kampel, A. Warshawsky, M.B.H. Youdim, *Neuropharmacology*, 46 (**2004**) 254–263.

[96] H. Jiang, J. E. Taggart, X. Zhang, D. M. Benbrook, S. E. Lind, W. Q. Ding, *Cancer Letters*, 312 (**2011**) 11–17.

[97] P. Leanderson, C. Tagesson, *Carcinogenesis*, 17 (**1996**) 545–550.

[98] V. F. S. Pape, N. V. May, G. T. Gál, I. Szatmári, F. Szeri, F. Fülöp, G. Szakács, É. A. Enyedy, *Dalton Transactions*, 47 (**2018**) 17032–17045.

[99] V. Prachayasittikul, V. Prachayasittikul, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, *Drug Design, Development and Therapy*, (**2013**) 1157–1178.

[100] A. Budimir, N. Humbert, M. Elhabiri, I. Osinska, M. Biruš, A. M. Albrecht-Gary, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 (**2011**) 490–496.

[101] B. Mirković, B. Markelc, M. Butinar, A. Mitrović, I. Sosič, S. Gobec, O. Vasiljeva, B. Turk, M. Čemažar, G. Serša, J. Kos, *Oncotarget*, 6 (**2015**) 19027–19042.

[102] Q. Y. Yang, Q. Q. Cao, Y. L. Zhang, X. F. Xu, C. X. Deng, R. Kumar, X. M. Zhu, X. J. Wang, H. Liang, Z. F. Chen, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 211 (**2020**) 111175.

[103] Q. P. Qin, Z. F. Chen, J. L. Qin, X. J. He, Y. L. Li, Y. C. Liu, K. B. Huang, H. Liang, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92 (**2015**) 302–313.

[104] F. Mohammadi, H. Mansouri-Torshizi, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38 (**2020**) 3059–3073.

[105] B. Kubista, T. Schoefl, L. Mayr, S. van Schoonhoven, P. Heffeter, R. Windhager, B. K. Keppler, W. Berger, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36 (**2017**) 1–13.

[106] É. A. Enyedy, O. Dömötör, K. Bali, A. Hetényi, T. Tuccinardi, B. K. Keppler, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20 (**2015**) 77–88.

[107] L. A. Garraway, P. A. Jänne, *Cancer Discovery*, 2 (**2012**) 214–226.

[108] M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates, *Nature Reviews Cancer*, 2 (**2002**) 48–58.

[109] M. M. Gottesman, J. Ludwig, D. Xia, G. Szakács, *Discovery Medicine*, 6 (**2009**) 18–23.

[110] A. Tamaki, C. Ierano, G. Szakacs, R. W. Robey, S. E. Bates, *Essays in Biochemistry*, 50 (**2011**) 209–232.

[111] M. Cserepes, D. Türk, S. Tóth, V. F. S. Pape, A. Gaál, M. Gera, J. E. Szabó, N. Kucsma, G. Várady, B. G. Vértessy, C. Streli, P. T. Szabó, J. Tovari, N. Szoboszlai, G. Szakács, *Cancer Research*, 80 (**2020**) 663–674.

[112] G. Szakács, M. D. Hall, M. M. Gottesman, A. Boumendjel, R. Kachadourian, B. J. Day, H. Baubichon-Cortay, A. Di Pietro, *Chemical Reviews*, 114 (**2014**) 5753–5774.

[113] I. I. Ahmed Juvale, A. A. Abdul Hamid, K. B. Abd Halim, A. T. Che Has, *Heliyon*, 8 (**2022**) e09777.

[114] V. F. S. Pape, R. Palkó, S. Tóth, M. J. Szabó, J. Sessler, G. Dormán, É. A. Enyedy, T. Soós, I. Szatmári, G. Szakács, *Journal of Medicinal Chemistry*, 65 (**2022**) 7729–7745.

[115] V. F. S. Pape, A. Gaál, I. Szatmári, N. Kucsma, N. Szoboszlai, C. Streli, F. Fülöp, É. A. Enyedy, G. Szakács, *Cancers*, 13 (**2021**) 154.

[116] G. Crisponi, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic, Iron chelation for iron overload in thalassemia, De Gruyter, **2019**, 49–86.

[117] H. J. Cui, H. He, A. L. Yang, H. J. Zhou, C. Wang, J. K. Luo, Y. Lin, T. Tang, *PLOS ONE*, 10 (**2015**) e0127256.

[118] A. Piga, S. Roggero, I. Salussolia, D. Massano, M. Serra, F. Longo, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1202 (**2010**) 75–78.

[119] J. L. Stumpf, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 64 (**2007**) 606–616.

[120] K. N. Raymond, G. Müller, B. F. Matzanke, Complexation of iron by siderophores a review of their solution and structural chemistry and biological function, Structural Chemistry, **1984**, 49–102.

[121] M. Ivan, T. Haberberger, D. C. Gervasi, K. S. Michelson, V. Günzler, K. Kondo, H. Yang, I. Sorokina, R. C. Conaway, J. W. Conaway, W. G. Kaelin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (**2002**) 13459–13464.

[122] https://clinicaltrials.gov/study/NCT02222363?intr=VLX600&rank=1 (2025.01.20.)

[123] T. L. Ekstrom, N. M. Pathoulas, A. M. Huehls, A. Kanakkanthara, L. M. Karnitz, *Molecular Cancer Therapeutics*, 20 (**2021**) 1561–1571.

[124] Y. Aye, M. Li, M. J. C. Long, R. S. Weiss, *Oncogene*, 34 (**2015**) 2011–2021.

[125] L. Reisbeck, B. Linder, G. Tascher, S. Bozkurt, K. J. Weber, C. Herold-Mende, S. J. L. van Wijk, R. Marschalek, L. Schaefer, C. Münch, D. Kögel, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 325 (**2023**) C1451–C1469.

[126] S. R. Gallagher, Quantitaion of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy, Current Protocols in Molecular Biology, New York, **1994**.

[127] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Petit, *Analytica Chimica Acta*, 38 (**1967**) 475–482.

[128] G. Gran, *Acta Chemica Scandinavica*, 4 (**1950**) 559–577.

[129] D. L. Leggett: Computational Methods for the Determination of Formation Constants, Pleunum Press, New York, **1985** 291–353 (L. Zékány, I. Nagypál)

[130] X. Chen, A. Murawski, K. Patel, C. L. Crespi, P. V. Balimane, *Pharmaceutical Research*, 25 (**2008**) 1511–1520.

[131] H. Yu, Q. Wang, Y. Sun, M. Shen, H. Li, Y. Duan, *PLOS ONE*, 10 (**2015**) e0116502.

[132] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1751 (**2005**) 119–139.

[133] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy, Springer, Boston, **2006,** 27–61.

[134] T. Peters, Genetics, Biochemistry genetics and Medical Applications, All about albumin, Academic Press, **1996**.

[135] A. Rockenbauer, L. Korecz, *Applied Magnetic Resonance*, 10 (**1996**) 29–43.

[136] https://mestrelab.com/download/mnova (2025.01.20.)

[137] J. I. Wirgau, I. Spasojević, H. Boukhalfa, I. Batinić-Haberle, A. L. Crumbliss, *Inorganic Chemistry*, 41 (**2002**) 1464–1473.

[138] https://www.avantes.com/products/software/avasoft (2025.01.20.)

[139] https://graphpad-prism.software.informer.com/5.0 (2025.01.20.)

[140] https://www.merckmillipore.com/HU/hu/20130828_204624 (2025.01.20.)

[141] https://flowjo.software.informer.com/10.6 (2025.01.20.)

[142] É. A. Enyedy, É. Zsigó, N. V. Nagy, C. R. Kowol, A. Roller, B. K. Keppler, T. Kiss, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012 (**2012**) 4036–4047.

[143] É. A. Enyedy, N. V. Nagy, É. Zsigó, C. R. Kowol, V. B. Arion, B. K. Keppler, T. Kiss, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010 (**2010**) 1717–1728.

[144] S. Kallus, L. Uhlik, S. van Schoonhoven, K. Pelivan, W. Berger, É. A. Enyedy, T. Hofmann, P. Heffeter, C. R. Kowol, B. K. Keppler, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 190 (**2019**) 85–97.

[145] Marvin, Version 18.23.0, ChemAxon (**2018**).

[146] T. V. Petrasheuskaya, M. A. Kiss, O. Dömötör, T. Holczbauer, N. V. May, G. Spengler, A. Kincses, A. Čipak Gašparović, É. Frank, É. A. Enyedy, *New Journal of Chemistry*, 44 (**2020**) 12154–12168.

[147] É. A. Enyedy, G. M. Bognár, N. V. Nagy, T. Jakusch, T. Kiss, D. Gambino, *Polyhedron*, 67 (**2014**) 242–252.

[148] D. Denoyer, S. Masaldan, S. La Fontaine, M.A. Cater, *Metallomics*, 7 (**2015**) 1459–1476.

[149] M. V. Babak, D. Ahn, *Biomedicines*, 9 (**2021**) 852.

[150] K. Malarz, A. Mrozek-Wilczkiewicz, M. Serda, M. Rejmund, J. Polanski, R. Musiol, *Oncotarget*, 9 (**2018**) 17689–17710.

[151] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini, *Medicinal Research Reviews*, 30 (**2010**) 708–749.

[152] J. Felcman, *Talanta*, 30 (**1983**) 565–570.

[153] A. Santoro, B. Vileno, Ò. Palacios, M.D. Peris-Díaz, G. Riegel, C. Gaiddon, A. Krężel, P. Faller, *Metallomics*, 11 (**2019**) 994–1004.

[154] A. M. Pizarro, A. Habtemariam, P. J. Sadler, Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes, in: **2010**: pp. 21–56.

[155] S. J. Atherton, P.C. Beaumont, *The Journal of Physical Chemistry*, 90 (**1986**) 2252–2259.

[156] 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, *Journal of Medicinal Chemistry*, 59 (**2016**) 6739–6752.

[157] C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (**2006**) 891–904.

[158] http://www.swissadme.ch (2025.01.20.)

[169] http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch (2025.01.20.)

[160] F. Q. Schafer, G. R. Buettner, *Free Radical Biology and Medicine*, 30 (**2001**) 1191–1212.

[161] W. Miklos, K. Pelivan, C. R. Kowol, C. Pirker, R. Dornetshuber-Fleiss, M. Spitzwieser, B. Englinger, S. van Schoonhoven, M. Cichna-Markl, G. Koellensperger, B. K. Keppler, W. Berger, P. Heffeter, *Cancer Letters*, 361 (**2015**) 112–120.

[162] A. Füredi, S. Tóth, K. Szebényi, V. F. S. Pape, D. Türk, N. Kucsma, L. Cervenak, J. Tóvári, G. Szakács, *Molecular Cancer Therapeutics*, 16 (**2017**) 45–56.

[163] G. Nord, O. Wernberg, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 10 (**1975**) 845–849.

[164] E. C. Constable, C. E. Housecroft, *Molecules*, 24 (**2019**) 3951.

9. Közlemények listája

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10069341

A dolgozat alapját képző közlemények:

1. Sonja Hager, Veronika F.S. Pape, **Vivien Pósa**, Bianca Montsch, Lukas Uhlik, Gergely Szakács, Szilárd Tóth, Nikolett Jabronka, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Éva A. Enyedy,* Petra Heffeter*
High copper complex stability and slow reduction kinetics as key parameters for improved activity, paraptosis induction and impact on drug-resistant cells of anticancer thiosemicarbazones
ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 33 (2020) 395–414.
D1, IF: 8,401; doi: 10.1089/ars.2019.7854, független hivatkozások száma: 13

2. Kateryna Ohui, Iryna Stepanenko,* Iuliana Besleaga, Maria V. Babak, Radu Stafi, Denisa Darvasiova, Gerald Giester, **Vivien Pósa**, Éva A. Enyedy, Daniel Vegh, Peter Rapta, Wee Han Ang, Ana Popović-Bijelić, Vladimir B. Arion*
Triapine derivatives act as copper delivery vehicles to induce deadly metal overload in cancer cells
BIOMOLECULES 10 (2020) 1336.
Q2, IF: 4,879; doi: 10.3390/biom10091336, független hivatkozások száma: 6

3. Julia H. Bormio Nunes, Sonja Hager, Marlene Mathuber, **Vivien Pósa**, Alexander Roller, Éva A. Enyedy, Alessia Stefanelli, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, Petra Heffeter*, Christian R. Kowol*
Cancer cell resistance against the clinically investigated thiosemicarbazone COTI-2 is based on formation of intracellular copper complex glutathione adducts and ABCC1-mediated efflux
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY 63 (2020) 13719–13732.
D1, IF: 7,446; doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01277, független hivatkozások száma: 34

4. **Vivien Pósa**, Bálint Hajdu, Gábor Tóth, Orsolya Dömötör, Christian R. Kowol, Bernhard K. Keppler, Gabriella Spengler, Béla Gyurcsik, Éva A. Enyedy*
The coordination modes of (thio)semicarbazone copper(II) complexes strongly modulate the solution chemical properties and mechanism of anticancer activity
JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 231 (2022) 1111786.
Q1, IF: 3,9; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111786, független hivatkozások száma: 24

5. Nádia Ribeiro, Ipek Bulut, **Vivien Pósa**, Baris Sergi, Giuseppe Sciortino, João Costa Pessoa, Luisa B. Maia, Valeria Ugone, Eugenio Garribba, Éva A. Enyedy, Ceyda Acilan,* Isabel Correia*
Solution chemical properties and anticancer potential of 8-hydroxyquinoline hydrazones and their oxidovanadium(IV) complexes
JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 235 (2022) 111932.
Q1, IF: 3,9; doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111932, független hivatkozások száma: 13

6. **Vivien Pósa**, Alessia Stefanelli, Julia H. B. Nunes, Sonja Hager, Marlene Mathuber, Nóra V. May, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol*, Éva A. Enyedy*, Petra Heffeter*
Thiosemicarbazone derivatives developed to overcome COTI-2 resistance
CANCERS 14 (2022) 4455.
Q1, IF: 5,2; doi: 10.3390/cancers14184455, független hivatkozások száma: 16

7. Tamás Pivarcsik, **Vivien Pósa**, Hilda Kovács, Nóra V. May, Gabriella Spengler, Szonja P. Pósa, Szilárd Tóth, Zeinab Nezafat Yazdi, Csilla Özvegy-Laczka, Imre Ugrai, István Szatmári, Gergely Szakács, Éva A. Enyedy*
Metal complexes of a 5-nitro-8-hydroxyquinoline-proline hybrid with enhanced water solubility targeting multidrug resistant cancer cells
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 24 (2023) 593.
D1, IF: 4,9; doi: 10.3390/ijms24010593, független hivatkozások száma: 6

8. Nádia Ribeiro, Ipek Bulut, Baris Sergi, **Vivien Pósa**, Gabriella Spengler, Giuseppe Sciortino, Vânia André, Liliana P. Ferreira, Tarita Biver, Valeria Ugone, Eugenio Garribba, João Costa Pessoa, Éva A. Enyedy,* Ceyda Acilan Ayhan,* Isabel Correia*
Promising anticancer agents based on 8-hydroxyquinoline hydrazone copper(II) complexes
FRONTIERS IN CHEMISTRY 11 (2023) 1106349.
Q1, IF: 3,8; doi: 10.3389/fchem.2023.1106349, független hivatkozások száma: 10

9. Leonor Côrte-Real, **Vivien Pósa**, Matilde Martins, Raquel Colucas, Nóra V. May, Xavier Fontrodona, Isabel Romero, Filipa Mendes, Catarina Pinto Reis, Maria Manuela Gaspar, João Costa Pessoa, Éva A. Enyedy*, Isabel Correia*
Cu(II) and Zn(II) complexes of new 8-hydroxyquinoline Schiff bases: Investigating their structure, solution speciation and anticancer potential
INORGANIC CHEMISRTY 62 (2023) 11466–11486.
Q1, IF: 4,3; doi: 10.1021/acs.inorgchem.3c01066, független hivatkozások száma: 12

10. **Vivien Pósa**, Anja Federa, Klaudia Cseh, Dominik Wenisch, Gabriella Spengler, Nóra V. May, Norbert Lihi, Gergely F. Samu, Michael A. Jakupec, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol,* Éva A. Enyedy*
A comparative study on complexation of the anticancer iron chelator VLX600 with essential metal ions
INORGANIC CHEMISTRY 63 (2024) 2401-2417.
Q1, IF: 4,3; doi: 10.1021/acs.inorgchem.3c03259, független hivatkozások száma: 1

ΣIF=51,026

Az értekezésben nem tárgyalt közlemények:

1. Teresa Żołek, Éva A. Enyedy, Kinga Ostrowska, **Vivien Pósa**, Dorota Maciejewska*
Drug likeness predictions of 5-hydroxy-substituted coumarins with high affinity to 5-HT1A and 5-HT2A receptors
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 115 (2018) 25–36.
Q1, IF: 3,532; doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.011

ΣIF=3,532
ΣΣIF=54,558

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások, poszterek:

1. **Vivien Pósa**, Sonja Hager, Veronika F. S. Pape, Gergely Szakács, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Petra Heffter, Éva A. Enyedy (poszter)
Redox properties and solution stability of copper complexes formed with various methylated Triapine derivatives
International Symposium on Metal Complexes, 2019.06.11–14., Hajdúszoboszló/Debrecen, Magyarország

2. Éva A. Enyedy, **Vivien Pósa**, Orsolya Dömötör, Nóra V. May, Sonja Hager, Petra Heffeter, Veronika F.S. Pape, Gergely Szakács, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol (előadás)
Impact of structural modifications of the α-N-pyridyl thiosemicarbazone scaffold on solution properties, copper binding and cytotoxicity
International Symposium on Metal Complexes, 2019.06.11–14., Hajdúszoboszló/Debrecen, Magyarország

3. **Pósa Vivien**, Julia H. Bormio Nunes, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Enyedy Éva A. (előadás)
A COTI-2 és származékainak oldatkémiai vizsgálata: komplexképződés vas(III)- és réz(II)ionokkal
XLIII. Kémiai Előadói Napok, 2020.10.27–28. (online), Szeged, Magyarország

4. Sonja Hager, Julia H. Bormio Nunes, Marlene Mathuber, **Vivien Pósa**, Alexander Roller, Éva A. Enyedy, Alessia Stefanelli, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Petra Heffeter (poszter)
Elucidating mechanisms of resistance against the anticancer thiosemicarbazone COTI-2 by structural modifications and metal complex formation
COST Action 17104 (STRATAGEM) WG3, Meeting - International Online Symposium on "New Therapeutic Tools Against Preclinical Models of Multidrug Resistant Tumors", 2020.11.04. (online)

5. **Vivien Pósa**, Nóra V. May, Julia H. Bormio Nunes, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Éva A. Enyedy (poszter)
A comparative solution equilibrium study on the interactions of Cu(II), Fe(II/III) and Zn(II) with COTI-2 and its derivatives
International Symposium Thermodynamics of Metal Complexes, 2021.06.16–18. (online) Białystok, Lengyelország

6. **Vivien Pósa**, Bálint Hajdu, Gábor Tóth, Orsolya Dömötör, Christian R. Kowol, Bernhard K. Keppler, Gabriella Spengler, Béla Gyurcsik, Éva A. Enyedy (poszter)
Effects of variations in coordination modes of copper(II) complexes of (thio)semicarbazones on solution chemical and biological properties
4th Annual Conference, New diagnostic and therapeutic tools against multidrug resistant tumours, 2021.09.06–08., Prága, Csehország

7. Alessia Stefanelli, **Vivien Pósa**, Julia H. Bormio Nunes, Sonja Hager, Marlene Mathuber, Alexander Roller, Nóra V. May, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, Chrsitian R. Kowol, Éva A. Enyedy, Petra Heffeter (poszter)
Thiosemicarbazone derivatives developed to overcome COTI-2 resistance
4th Annual Conference, New diagnostic and therapeutic tools against multidrug resistant tumours, 2021.09.06–08., Prága, Csehország

8. Julia H. Bormio Nunes, Sonja Hager, Marlene Mathuber, **Vivien Pósa**, Alexander Roller, Éva A. Enyedy, Alessia Stefanelli, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Petra Heffeter (poszter)
Resistance against the thiosemicarbazone COTI-2 is based on formation of intracellular copper complex glutathione adducts and ABCC1-mediated efflux
4th Annual Conference, New diagnostic and therapeutic tools against multidrug resistant tumours, 2021.09.06–08., Prága, Csehország

9. **Pósa Vivien**, Julia. H. Bormio Nunes, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, May Nóra V., Petra Heffeter, Enyedy Éva A. (előadás)
A COTI-2 tioszemikarbazon és származékainak endogén fémionokkal való kölcsönhatásának oldatkémiai vizsgálata
Koordinációs Kémiai Munkabizottsági ülés, 2021.12.03 (online), Szeged, Magyarország

10. **Pósa Vivien,** Tusa László Gy., Spengler Gabriella, May Nóra V., Christian R. Kowol, Enyedy Éva A. (előadás)
A rákellenes VLX600 vaskelátor endogén fémionokkal való kölcsönhatásának oldatkémiai vizsgálata
55. Komplexkémiai Kollokvium és Koordinációs Kémiai Munkabizottsági ülés, 2022.05.25–27, Debrecen, Magyarország

11. **Vivien Pósa**, Nóra V. May, Gabriella Spengler, Szonja Pósa, Szilárd Tóth, Gergely Szakács, Imre Ugrai, István Szatmári, Petra Nagy, Éva A. Enyedy (poszter)
Investigation of the interaction of a water-soluble 8-hydroxyquinoline amino acid hybrid with essential metal ions
International Symposium on Metal Complexes, 2022.05.06–08., Valencia, Spanyolország

12. **Vivien Pósa**, Alessia Stefanelli, Julia H. Bormio Nunes, Sonja Hager, Marlene Mathuber, Nóra V. May, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Petra Heffeter, Éva A. Enyedy (poszter)
Solution chemistry studies of the interaction of COTI-2 and its derivatives with endogenous metal ions
16th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2022.07.17–21., Grenoble, Franciaország

13. Nádia Ribeiro, Ipek Bulut, **Vivien Pósa**, Baris Sergi, Éva A. Enyedy, Ceyda Acilan, Tarita Biver, João Costa Pessoa, Isabel Correia (poszter)
Characterization and interaction with biomolecules of CuII and VIVO complexes of new 8-hydroxyquinoline Schiff bases
16th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2022.07.17–21., Grenoble, Franciaország

14. Éva A. Enyedy, **Vivien Pósa**, Inna Safyanova, János P. Mészáros, Tamás Pivarcsik, Nóra V. May, Gabriella Spengler, Szonja Pósa, Szilárd Tóth, Gergely Szakács, Oszkár Csuvik, István Szatmári (előadás)
Water-soluble 8-hydroxyquinoline-amino acid hybrids and their interaction with various metal ions: relationship between solution chemistry and cytotoxicity
16th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2022.07.17–21., Grenoble, Franciaország

15. **Vivien Pósa**, Leonor Corte-Real, Isabel Romero, Mariana Figueira, Catarina Pinto Reis, Maria M. Gaspar, João Costa Pessoa, Isabel Correia, Éva A. Enyedy (poszter)
Solution studies on the interaction of three new Schiff base 8-hydroxyquinolines with essential metal ions
3rd European NECTAR Conference, 2022.08.24–26., Ljubljana, Szlovénia

16. Nádia Ribeiro, Ipek Bulut, **Vivien Pósa**, Baris Sergi, Giuseppe Sciortino, João Costa Pessoa, Tarita Biver, Valeria Ugone, Eugenio Garribba. Éva A. Enyedy, Ceyda Acilan, Isabel Correia (poszter)
New 8-hydroxyquinoline benzohydrazones: solution behaviour, metal complexation (Cu^{II} and $V^{IV}O$) and anticancer properties
3rd European NECTAR Conference, 2022.08.24–26., Ljubljana, Szlovénia

17. Alessia Stefanelli, **Vivien Pósa**, Julia H. Bormio Nunes, Sonja Hager, Nóra V. May, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Éva A. Enyedy, Petra Heffeter (poszter)
COTI-2 derivatives developed to overcome ABCC1 resistance
9th FEBS Special Meeting on ABC Proteins-ABC2023, 2023.02.26–03.03., Innsbruck, Ausztria

18. **Vivien Pósa**, Alessia Federa, Klaudia Cseh, Dominik Wenisch, Gabriella Spengler, Nóra V. May, Michael A. Jakupec, Bernhard K. Keppler, Christian R. Kowol, Éva A. Enyedy (előadás)
A comparative study on complexation and biological activity of the anticancer iron chelator VLX600 and its derivatives with essential metal ions
International Symposium on Metal Complexes, 2023.06.11–14., Urbino, Olaszország

19. Éva A. Enyedy, Tamás Pivarcsik, **Vivien Pósa**, Hilda Kovács, Éva Frank, Isabel Correia, Iztok Turel, Gabriella Spengler (poszter)
Modulation of the anticancer and solution chemical properties of 8-hydroxyquinolines and oligopyridines via metal complexation
4th European NECTAR Conference, and Final Action Meeting, 2024.02.26–27, Milazzo, Olaszország

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Enyedy Éva Annának, a Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék vezetőjének, és egyben témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított doktori értekezésem elvégzéséhez a tanszéken, továbbá, hogy segítette munkámat, valamint azt, hogy változatos tématerületeken fejleszthettem tudásom.

Köszönettel tartozom a felsorolt együttműködő partnereinknek a közös munkáért:
Dr. Spengler Gabriella, Dr. May Nóra V., Dr. Isabel Correia, Dr. Christian R. Kowol, Dr. Michael A. Jakupec, Dr. Petra Heffeter, Dr. Nádia Ribeiro, Anja Federa, Dr. Cseh Klaudia, Dominik Wenisch, Dr. Leonor Côrte-Real, Dr. Sonja Hager.

Továbbá hálás vagyok a szakmai támogatásért, és a közös munkáért a Bioszervetlen Kutatócsoport és a Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék tagjainak, kiemelve Dr. Dömötör Orsolyát, Dr. Gyurcsik Bélát és Dr. Jakusch Tamást.

Köszönöm hallgatóimnak, Tusa László Györgynek és Nagy Petrának, akik laboratóriumi munkájukkal segítették a mérések elvégzését.

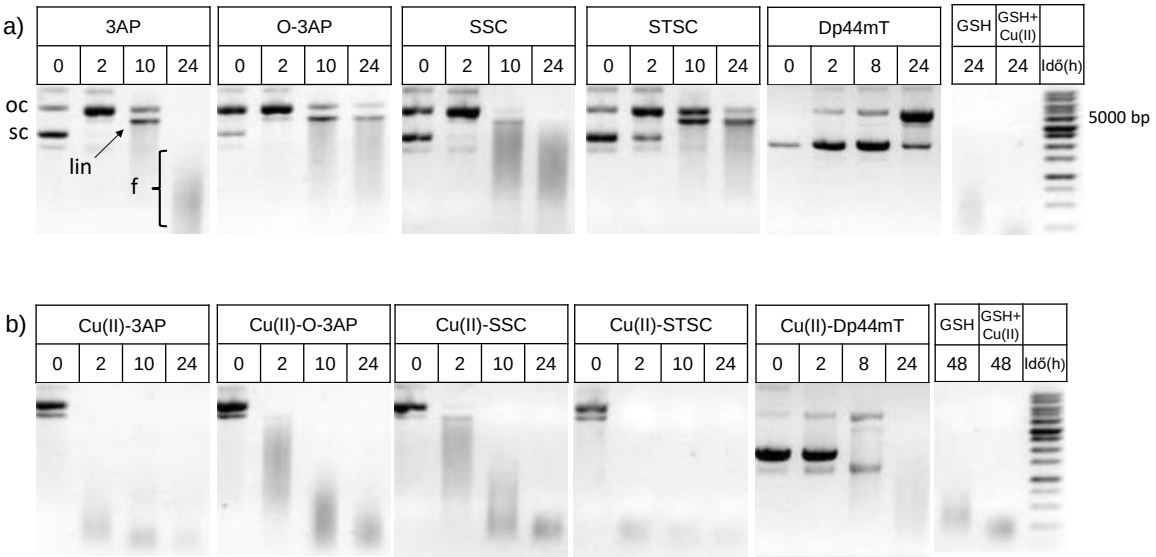
Szeretném megköszönni a velem együtt dolgozó PhD hallgatóknak, Dr. Hajdu Bálintnak, Dr. Mészáros János Péternek, Kovács Hildának, valamint technikusunknak, Szűcsné Tóth Katalinnak a sok segítséget, és a jó hangulatot.

Köszönöm Attilának, Bálintnak, Hildának, Janinak és Orsinak, hogy átolvasták a dolgozatomat és hasznos megjegyzésekkel láttak el.

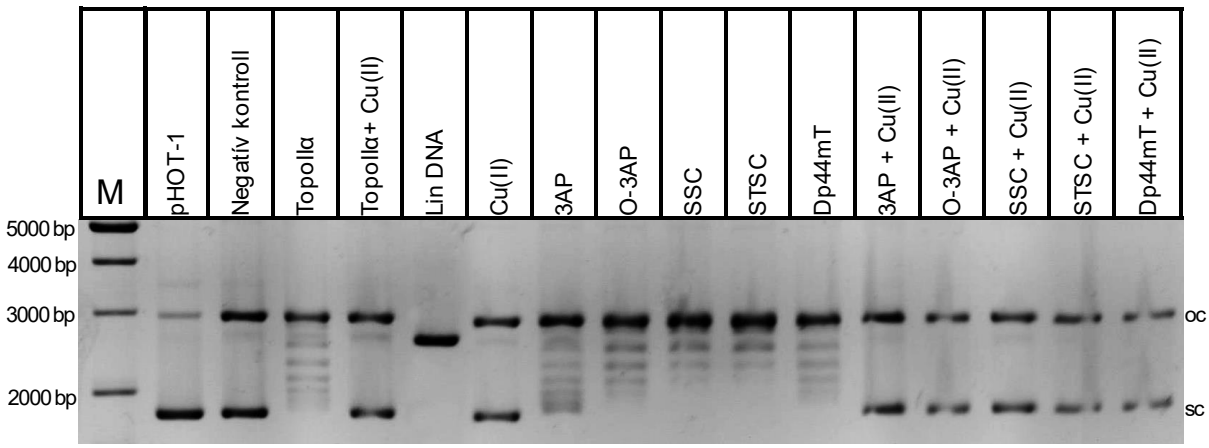
Köszönöm édesapámnak, nagymamámnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak.

Hatalmas köszönettel tartozom férjemnek, hogy a rengeteg türelmével és szeretetével a támaszom volt PhD-s éveim során.

Függelék



f1. ábra: A réz(II) – (T)SK ligandum (1:2) rendszerek DNS hasítási aktivitása GSH jelenlétében 1%-os (w/v) agaróz gélen. A reakcióelegyek 100 ng pGEX-6P-1 plazmid DNS-t tartalmaztak. A rövidítések a plazmid különböző formáit jelzik: oc: nyílt cirkuláris, lin: lineáris, sc: szuperhelikális, f: fragmentált. Markerként 1 kb-s GeneRuler-t használtunk (M). {c_L = 90 μM; c_{Cu}(II) = 45 μM; c_{GSH} = 4,5 mM; pH = 7,40 (10 mM HEPES); inkubációs idő: 24 óra; T = 37 °C}



f2. ábra: A (T)SK ligandumok és réz(II)-komplexeik topoIIα gátló képessége 1%-os (w/v) agaróz gélen elemezve. A reakcióelegyek 100 ng pHOT1 plazmid DNS-t és 50 μM ligandumot (továbbá a komplexek esetén 50 μM $CuCl_2$-t) tartalmaztak. A pHOT-1 sávot nem inkubáltuk, M: 1 kb GeneRuler Plus marker. A rövidítések a plazmid különböző formáit jelzik: oc: nyílt cirkuláris, lin: lineáris, sc: szuperhelikális. {inkubálási idő: 4 óra, T = 37 °C}

f1. táblázat: A vizsgált ligandumok valamint azok egy ekvivalens réz(II)-ion jelenlétében mért IC_{50} értékei (µM) két humán rákos sejtvonalon (Colo-205, Colo-320) és normál (MRC-5) sejtekben, 72 órás inkubáció után. Összehasonlításképpen a $CuCl_2$ IC_{50} értékeit is feltüntettük. A szelektivitási index (S.I.) a rákos sejteken és a normál sejteken mért IC_{50} értékek arányát jelöli.

IC_{50} (µM)	3AP	Dp44mT	O-3AP	STSC	SSC	
			ligandum			
Colo-205	3,28±0,63	0,051±0,001	69,2±7,5	69,7±1,9	>100	
Colo-320	2,17±0,15	0,057±0,003	75,2±7,5	52,2±6,8	83,5±3,8	
MRC-5	31,4±9,2	3,33±0,04	>100	88±19	>100	
S.I. (Colo-205)[a]	9,57	65,29	>1,4	1,26	–	
S.I. (Colo-320)[b]	14,47	58,42	>1,3	1,69	>1,2	
			Cu(II) – ligandum (1:1) rendszer			**$CuCl_2$**
Colo-205	11,4±1,4	0,05±0,01	24,8±5,5	0,89±0,09	25,4±1,0	19,7±0,9[c]
Colo-320	26,00±0,73	0,04±0,01	10,75±0,83	0,64±0,01	32,5±2,4	20,0±2,3[c]
MRC-5	35,61±0,69	0,55±0,01	11,2±1,0	0,65±0,10	21,5±3,0	24,5±2,6[c]
S.I. (Colo-205)[a]	3,12	11,00	0,45	0,73	0,85	1,24
S.I. (Colo-320)[b]	1,37	13,75	1,04	1,02	0,66	1,23

[a] S.I. = IC_{50} (MRC-5) / IC_{50} (Colo-205). [b] S.I. = IC_{50} (MRC-5) / IC_{50} (Colo-320). [c] Ref. [174].

f2. táblázat: A vizsgált ligandumok és Cu(II)-komplexeinek IC_{50} értékei 72 óra elteltével, a SW480 sejtvonalon.

Ligandum	TSK IC_{50} (µM)	Cu-TSK IC_{50} (µM)
FTSC	6,54 ± 0,22	6,01 ± 0,54
PTSC	0,051 ± 0,025	0,057 ± 0,024
3AP	0,68 ± 0,18	1,19 ± 0,61
H_2NNHMe	2,54 ± 0,61	3,13 ± 1,48
H_2NNMe_2	0,80 ± 0,12	1,62 ± 0,28
$MeHNNMe_2$	2,28 ± 0,17	3,30 ± 0,83
Me_2NNH_2	8,51 ± 1,18	4,97 ± 1,57
Me_2NNHMe	7,80 ± 2,06	0,93 ± 0,38
Me_2NNMe_2	0,038 ± 0,012	0,066 ± 0,020
Dp44mT	0,047 ± 0,018	0,034 ± 0,013
DpC	0,043 ± 0,017	0,039 ± 0,012

f3. táblázat: A COTI-NH_2 és COTI-2 réz(II)-komplexeire számított izotróp ESR-paraméterek, az anizotróp adatokból a g és A értékek átlagaként. Továbbá a 3AP réz(II)-komplexeinek kísérletileg meghatározott adatai [143].

	g_0	A_0 (G)		g_0	A_0 (G)		g_0	A_0 (G)
HL = COTI-NH_2			**HL = COTI-2**			**HL = 3AP**		
$[CuLH]^{2+}$	2,092	70,5	**$[CuLH]^{2+}$**	2,089	75,7	**$[CuLH]^{2+}$**	2,107	73,4
$[CuL]^{+}$	2,084	74,7	**$[CuL]^{+}$**	2,082	72,7	**$[CuL]^{+}$**	2,096	72,6
[CuL(OH)]	2,071	73,2	**[CuL(OH)]**	2,070	74,3	**[CuL(OH)]**	2,086	70,7

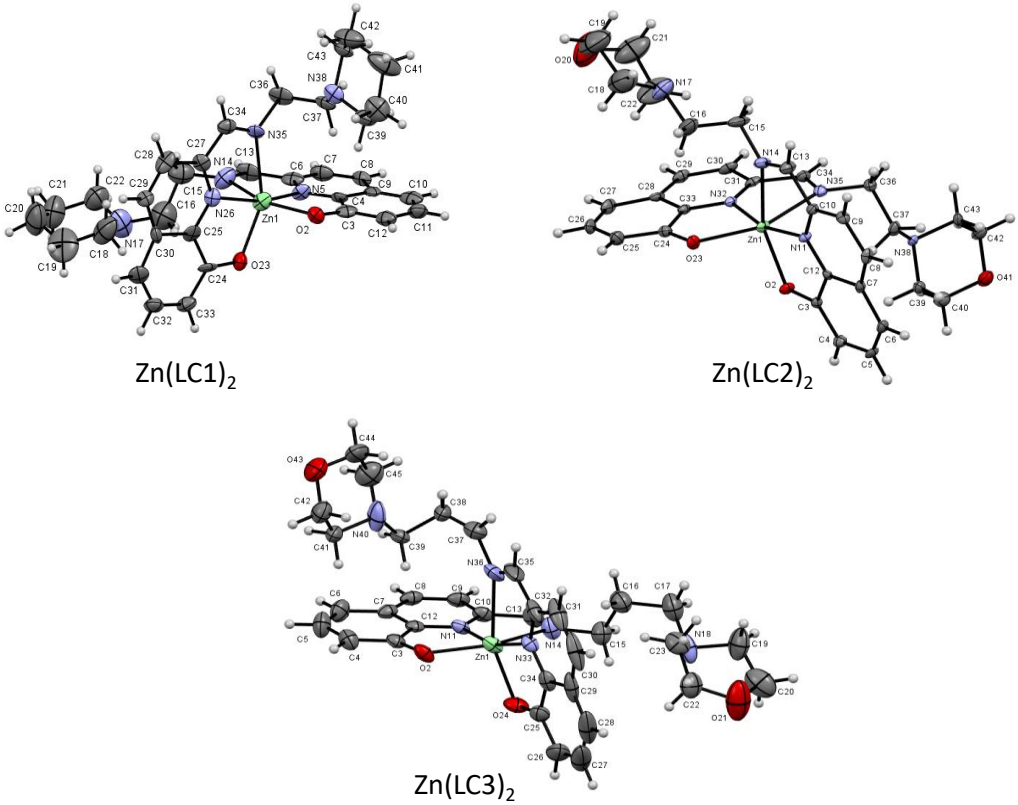
f4. táblázat: A vizsgált TSK-ok rákellenes aktivitása (72 óra utáni IC_{50}-értékek) SW480 sejteken, valamint a TSK-rezisztens SW480/Coti és SW480/Tria sejteken mérve.

Ligandum/komplex	**SW480 (IC_{50}, µM)[a]**	**SW480/Coti (IC_{50}, µM)[a]**	**Relativ rezisztancia[b]**	**SW480/Tria (IC_{50}, µM)[a]**	**Relativ rezisztancia[b]**
COTI-2	0,37 ± 0,17	9,51 ± 3,11[c]	25,7***	0,41 ± 0,16	1,1[n.s.]
COTI-NMe_2	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,03	1,3[n.s.]	0,04 ± 0,02	1,0[n.s.]
COTI-NMecy	0,64 ± 0,10	3,98 ± 0,40	6,2**	0,71 ± 0,17	1,1[n.s.]
COTI-NH_2 [c]	7,85 ± 0,92	4,39 ± 0,56	0,6***	>20	>2,5
Cu-COTI-2	0,05 ± 0,02	0,46 ± 0,09	9,2**	n.d.	-
Cu-COTI-NMe_2	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,04	3,0[n.s.]	n.d.	-
Cu-COTI-NMecy	0,080 ± 0,003	0,31 ± 0,03	3,9**	n.d.	-
3AP	0,82 ± 0,18	0,81 ± 0,08	1,0[n.s.]	>50	>61

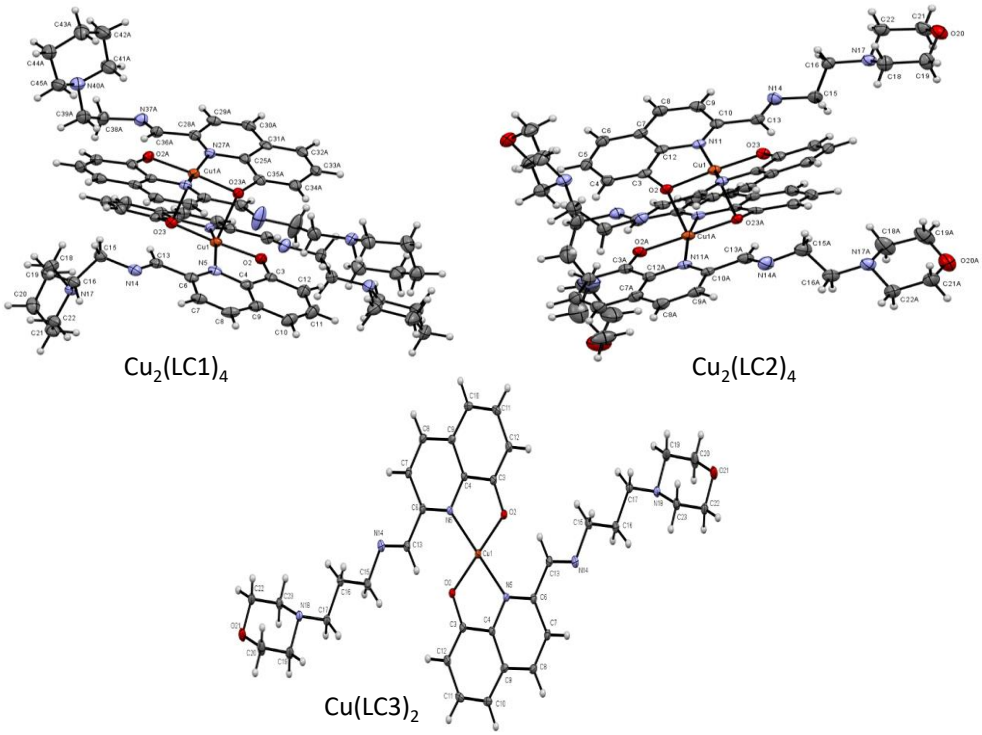
[a]Az IC_{50} értékeket a koncentráció-válasz görbékből számítottuk ki. Az értékeket három párhuzamos kísérletben három különböző mintán végzett független kísérlet átlagaként (± SD) adjuk meg. [b]A rezisztens sejtvonal IC_{50}-értékeit a szülői vonal IC_{50}-értékeivel elosztva számított érzékenységbeli különbségek. ***$p \leq 0,001$, **$p \leq 0,01$, *$p \leq 0,05$; n.s. (nem különbözik szignifikánsan), egymintás t-próbával számolva.

f5. táblázat: A vizsgált 8-hidroxi-kinolinok rákellenes aktivitása (72 óra utáni IC_{50}-értékek) A-375, valamint A-549 sejteken mérve.

IC_{50} (µM)							
A-375				**A-549**			
1	2,7 ± 0,03	L^1	12,3 ± 0,5	**1**	4,2 ± 0,2	L^1	>50
2	6,5 ± 0,8	L^2	>50	**2**	9,3 ± 0,4	L^2	>50
3	5,1 ± 0,3	L^3	23,9 ± 1,5	**3**	8,9 ± 0,2	L^3	>50
4	2,0 ± 1,3	L^4	>50	**4**	3,9 ± 0,6	L^4	>50
5	3,4 ± 0,1	L^5	30,9 ± 0,3	**5**	5,1 ± 0,01	L^5	>50
6	13,6 ± 0,9	L^6	21,2 ± 0,2	**6**	16,0 ± 0,3	L^6	46,9 ± 0,8
7	5,1 ± 0,4	L^7	12,4 ± 0,2	**7**	9,3 ± 0,2	L^7	23,6 ± 0,2
8	2,8 ± 0,4	L^8	9,1 ± 1,9	**8**	5,1 ± 0,2	L^8	45,1 ± 2,7



f3. ábra: A Zn(II)komplexek SC-XRD-vel meghatározott molekulaszerkezete.



f4. ábra: A Cu(II)komplexek SC-XRD-vel meghatározott molekulaszerkezete.

f6. táblázat: A vizsgált LC2 és LC3 ligandumok réz(II)komplexeire kapott anizotróp ESR paraméterek 30% (v/v) DMSO/H_2O elegyben 77 K-en. A csatolási állandók 10^{-4}cm^{-1} egységben vannak megadva.

	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z	a_x^{N1} a_x^{N2}	a_y^{N1} a_y^{N2}	a_z^{N1} a_z^{N2}	$g_{0,szám}$[b]
Cu(II) – LC2[c]										
$[Cu(akva)]^{2+}$	2,076	2,076	2,410	8	8	126				2,187
Komponens 1	2,068	2,068	2,356	11	11	145				2,164
Komponens 2	2,062	2,062	2,263	34	34	151				2,129
Komponens 3	2,046	2,065	2,256	26	18	142	18 6	12 15	4 9	2,122
Komponens 4	2,052	2,055	2,292	47	17	113	13 6	9 15	4 12	2,133
Komponens 5	2,295	2,110	2,035	97	20	86				2,147
Komponens 6	2,270	2,135	2,027	95	10	87				2,144
Cu(II) – LC3										
Komponens 1	2,068	2,068	2,356	10	10	145				2,164
Komponens 2	2,074	2,074	2,231	42	42	144				2,126
Komponens 3	2,055	2,085	2,274	25	80	106	6 11	14 9	9 6	2,138
Komponens 4	2,051	2,058	2,290	52	14	114	12 8	9 14	6 4	2,133
Komponens 5	2,295	2,110	2,035	97	20	85				2,147
Komponens 6	2,265	2,143	2,021	86	36	94				2,143

[a]A kísérleti hiba ±0,002 volt a g_x és a g_y , ±0,001 a g_z, ± 2×10^{-4} cm^{-1} a A_x és A_y, ±1 ×10^{-4} cm^{-1} az A_z esetén. [b]A számolás az alábbi egyenlet alapján történt: $g_{0,szám} = (g_x+g_y+g_z)/3$. [c]A két széles szingulett jelet (izo 1 és izo 2) az alábbi paraméterekkel kezeltük: $g_0 = 2{,}077$, $\alpha = 205$, $\beta = 36$, $\gamma = -11$ az izo 1 esetén és $g_0 = 2{,}146$, $A_0 = 73$, $\alpha = 99$, $\beta = -16$, $\gamma = 4$ az izo 2 esetén.

f7. táblázat: A vizsgált ligandumok, és azok réz(II)-, valamint cink(II)komplexeinek in vitro antiproliferatív aktivitása 48 órás inkubáció után, az A375 melanoma sejtvonalon meghatározva lumineszcens módszerrel.

Ligandum/komplex	IC_{50} (μM) ± hiba
LC1	15,2 ± 0,2
$Zn(LC1)_2$	9,1 ± 1,5
$Cu(LC1)_2$	5,2 ± 0,4
LC2	15,9 ± 0,1
$Zn(LC2)_2$	10,3 ± 1,6
$Cu(LC2)_2$	7,7 ± 0,4
LC3	25,8 ± 0,3
$Zn(LC3)_2$	9,3 ± 1,1
$Cu(LC3)_2$	6,7 ± 0,2

f8. táblázat: $HQNO_2$-L-Pro és különböző fémionokkal képzett komplexeinek *in vitro* citotoxicitása (IC_{50} értékek µM-ban) a MES-SA és MES-SA/Dx5 sejtvonalak esetén (144 óra).

IC_{50} (µM)	MES-SA	MES-SA/Dx5
ligandum		
$HQNO_2$-L-Pro	226 ± 17	97 ± 29
fémsók hozzáadásával		
+ 1 ekv. Cu(II)	39,6 ± 6,9	25,2 ± 5,7
+ 0,5 ekv. Cu(II)	49 ± 15	35 ± 11
+ 1 ekv. Zn(II)	164 ± 24	> 400
+ 0,5 ekv. Zn(II)	> 400	> 400
+ 1 ekv. Fe(III)	89,0 ± 9,2	47,3 ± 8,6
+ 0,33 ekv. Fe(III)	121 ± 27	53,4 ± 8,8

f9. táblázat: Az előállított VLX600 és származékainak karakterizálása.

3-hidrazinil-6-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]-indol:

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6):

δ = 11,88 (bs, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,93 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,20 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 4,32 (s, 2H), 2,48 (s, 3H).

VLX600: (E)-6-metil-3-(2-(1-(piridin-2-il)etilidén)hidrazinil)-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]-indol:

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6):

E-izomer (~90%): δ = 12,43 (s, 1H, H11), 10,89 (s, 1H, H8), 8,59 (d, J = 4,2 Hz, 1H, H1), 8,16 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H4), 8,05 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H17), 7,87 (td, J = 7,9, 1,7 Hz, 1H, H3), 7,40−7,35 (m, 2H, H2, H15), 7,27 (t, J = 7,5 Hz, 1H, H16), 2,52 (s, 3H, H14), 2,49 (3H, H7; DMSO alatt, csak a 2D esetén figyelhető meg). Z-izomer (~10%): δ = 14,88 (s, 1H), 12,43 (s, 1H, átlapol az E-izomer csúccsal), 8,88 (d, J = 3,9 Hz, 1H), 8,09 (td, J = 7,9, 1,8 Hz, 1H), 8,02 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,79 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,57 (dd, J = 7,1, 5,2 Hz, 1H), 7,41−7,35 (m, 1H, átlapol az E-izomer csúccsal), 7,29−7,24 (m, 1H, átlapol az E-izomer csúccsal), 2,49 (3H, DMSO alatt, csak a 2D esetén figyelhető meg), 2,45 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6):

E-izomer: δ = 159,00 (C9), 155,80 (C5), 148,65 (C10), 148,53 (C1), 148,22 (C6), 138,99 (C19), 138,93 (C12), 136,26 (C3), 129,82 (C15), 123,26 (C2), 122,02 (C16), 121,83 (C13), 119,83 (C4), 118,33 (C18), 117,70 (C17), 16,55 (C14), 11,94 (C7).

Elemanalízis:

$C_{17}H_{15}N_7 \cdot 1{,}5H_2O$-re számolt értékek: 59,29 % C; 5,27 % H; 28,47 % N.

$C_{17}H_{15}N_7 \cdot 1{,}5H_2O$-re mért értékek: 59,28 % C; 4,95 % H; 28,35 % N.

ESI-TOF MeCN/MeOH + 1% H_2O-ban: m/z (M + H, számított) = 318,1462 m/z, (M + H, talált) = 318,1460 m/z.

VLX-3AP:(E)-2-((2-(6-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3 il)hidrazinilidén)metil)-piridin-3-amin:

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 13,36 (bs, 1H), 13,19 (s, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,08 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 8,04 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,79 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,61 (dd, J = 8,5, 5,1 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,37 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 2,55 (s, 3H) ppm. Két H-jel nem látható az 1D ^{1}H NMR spektrumban.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 150,11, 145,76, 141,93 (csak 2D-ben látható), 141,47 (csak 2D-ben látható), 140,70 (csak 2D-ben látható), 139,71, 133,02, 131,27, 121,27,29,6,3 , 119,40, 117,51, 16,64 ppm. Három C-jel csak a 2D-s spektrumban látható, egy kvaterner C-jel pedig nem látható sem az 1D-s, sem a 2D-s spektrumban.

Elemanalízis:

$C_{16}H_{14}N_8 \cdot 1{,}5H_2O \cdot 2HCl$-re számolt értékek: 45,94 % C; 4,58 % H; 26,79 % N.

$C_{16}H_{14}N_8 \cdot 1{,}5H_2O \cdot 2HCl$-re mért értékek: 45,69 % C; 4,65 % H; 25,38 % N.

ESI-TOF MeCN/MeOH + 1% H_2O-ban: m/z (M + H, számított) = 319,1414 m/z, (M + H, talált) = 319,1415 m/z.

VLX-STSC: (E)-2-((2-(6-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-il)hidrazinilidén)metil)fenol:

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 12,33 (s, 1H), 11,97 (s, 1H), 11,52 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,02 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,31–7,21 (m, 2H), 6,97–6,88 (m, 2H), 2,53 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6): δ = 157,78, 156,97, 148,48, 143,51, 139,00, 138,89, 130,24, 129,89, 129,11, 122,07, 121,90, 119,27, 119,22, 118,43, 117,61, 116,34, 16,63 ppm.

Elemanalízis:

$C_{17}H_{14}N_6O \cdot 1{,}5H_2O$-re számolt értékek: 59,12 % C; 4,96 % H; 24,33 % N.

$C_{17}H_{14}N_6O \cdot 1{,}5H_2O$-re mért értékek: 59,16 % C; 4,58 % H; 24,21 % N.

ESI-TOF MeCN/MeOH + 1% H_2O-ban: m/z (M + H, számított) = 319,1302 m/z, (M + H, talált) = 319,1302 m/z.

VLX-DpC: 3-(2-di(piridin-2-il)metilén)hidrazinil)-6-metil-5H-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol:

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 14,27 (bs, 1H), 12,77 (s, 1H), 8,92 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 8,62 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 8,07–8,01 (m, 3H), 7,64–7,58 (m, 2H), 7,50 (ddd, J = 7,4, 4,9, 0,9 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,31 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 2,52 (s, 3H) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 155,61, 151,56, 149,17, 148,34, 148,02, 140,19, 139,75, 137,71, 137,25, 131,24, 126,75, 124,57, 123,76, 123,71, 122,74, 122,34, 118,52, 117,89, 16,48 ppm. Két kvaterner C-jel, nem látható sem az 1D, sem a 2D spektrumban.

Elemanalízis:

$C_{21}H_{16}N_8 \cdot 1{,}5H_2O$-re számolt értékek: 61,9% C; 4,70 % H; 27,50 % N.

$C_{21}H_{16}N_8 \cdot 1{,}5H_2O$-re mért értékek: 62,01 % C; 4,62 % H; 26,93 % N.

ESI-TOF MeCN/MeOH + 1% H_2O-ban: m/z (M + H, számított) = 381,1571 m/z, (M + H, talált) = 381,1571 m/z.

VLX-COTI-2: (E)-3-(2-(6,7-dihidrokinolin-8(5H)-ilidén)hidrazinil)-6-metil-5H-[1,2,4]-triazino[5,6-b]indol:

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 12,51 (s, 1H), 10,70 (s, 1H), 8,51 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 8,04 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,30–7,22 (m, 2H), 2,91 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,80 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,51 (s, 3H), 1,89 (quint, J = 6,0 Hz, 2H) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 159,40, 150,29, 148,72, 147,72, 146,79, 138,98, 138,78, 136,27, 135,07, 129,73, 122,94, 121,98, 121,73, 118,36, 117,71, 28,46, 26,32, 21,01, 16,49 ppm.

Elemanalízis:

$C_{19}H_{17}N_7 \cdot 1{,}5H_2O$-re számolt értékek: 61,61 % C; 5,44 % H; 26,47 % N.

$C_{19}H_{17}N_7 \cdot 1{,}5H_2O$-re mért értékek: 61,31 % C; 5,11 % H; 26,13 % N.

ESI-TOF MeCN/MeOH + 1% H_2O-ban: m/z (M + H, számított) = 344,1618 m/z, (M + H, talált) = 344,1616 m/z.