

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Konjugálható fluoreszcens festékanyagok
tervezése, szintézise és alkalmazása**

Hlogyik Tamás

Témavezető:

Dr. Mernyák Erzsébet

egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

Gyógyszerésztudományi Kar, Farmakognóziai Intézet

Kémia Doktori Iskola

Szeged

2026

1. Bevezetés és célkitűzések

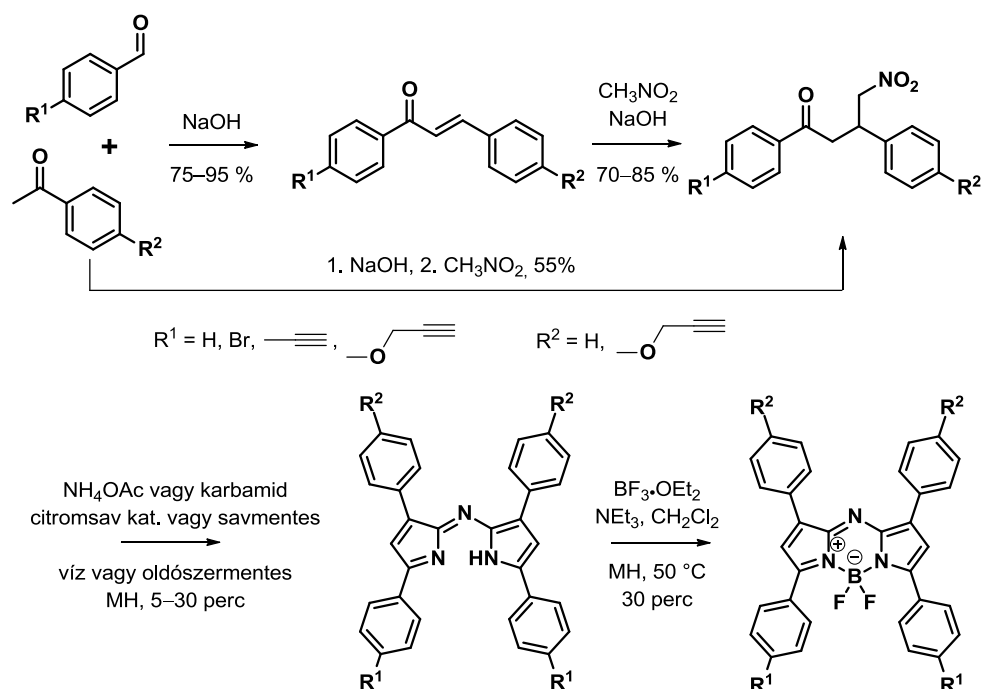
A biológiai rendszerekben zajló folyamatok molekuláris szintű nyomon követése és értelmezése kulcsfontosságú az orvosi biológia és a gyógyszerkémia számára. E területek egyre inkább a nem radioaktív, optikai eszközökkel nyomon követhető, nagy érzékenységgű képalkotó módszerekre támaszkodnak. A radioizotópos jelölés előnyei mellett biztonsági, engedélyezési és hulladékkezelési terhei miatt egyre inkább a háttérbe szorul, így előtérbe kerülnek az alternatív jelölési megoldások, mint például a fluoreszcens jelölés. A hatékonyságához szükséges a megfelelő fotofizikai (abszorpciós/emissziós értékek, kvantumhatásfok), kémiai (stabilitás, funkcionalizálhatóság, oldhatóság) és biológiai (kompatibilitás, célba juttathatóság) tulajdonságokkal rendelkező festékek kiválasztása és előállítása. Munkánk célja olyan, konjugálásra alkalmas BODIPY-, rodamin- és rozamin-származékok, valamint vörös-/közeli infravörös tartományban emittáló *aza*-BODIPY-k szintézise volt, amelyek egyrészt biomolekulák szelektív jelölésére, másrészt fotodinámiás terápiában, mint teranosztikum (terápiás szer és diagnosztikum) alkalmazhatók. Ennek érdekében olyan funkciós csoportokat hordozó festék-alapvázakat terveztünk előállítani, melyekkel megvalósítható különböző, módosított biomolekulákkal történő konjugáció. A terminális alkin vagy fenolos hidroxilcsoportokkal rendelkező származékokat alapváz szintézisstratégiával vagy posztfunkcionalizálással állítottuk elő. A reakciókörülmények optimalása érdekében igyekeztünk az oldószer mennyiséget és a halogénezett vegyületek felhasználását minimálisra szorítani, és ahol csak lehetett, mikrohullámú energiaközléssel segíteni a reakciók lejárásodását. Munkánk során többek között átmenetifém-katalizált Sonogashira reakciót, Vilsmeier-Haack formilezési és Pinnick-oxidációt alkalmaztunk. Az ösztadiol hormont a 3-as hidroxilcsoportján módosítottuk és különböző hosszúságú linkerekkel láttuk el, célunk volt eredeti biológiai aktivitásának megőrzése. A konjugátumokat CuAAC reakcióval vagy éterszintézissel építettük ki. Együttműködő partnerek segítségével terveztük jellemezni az új fluorofórok és konjugátumaik spektroszkópiai tulajdonságait, elvégezni nagyfelbontású mikroszkópiás vizsgálatokat, a biológiailag aktív molekulák ösztrogénreceptorhoz való affinitásának mérését és a megfelelő kötődési konformáció igazolását számításos kémiai módszerekkel, valamint a fluorofórok biológiai hatásának vizsgálatát fotodinámiás terápiában.

2. Alkalmazott módszerek

A szerves szintéziseket millimólos mennyiségben végeztük, a reakciók lefutását vékonyréteg kromatográfiával követtük. A palládium-katalizált és CuAAC-reakciókat hagyományos melegítéssel körülmények között, vagy mikrohullámú reaktorban hajtottuk végre. A reakcióelegyek tisztítása és a termékek elválasztása oszlopkromatográfiával történt. A vegyületek szerkezetét egy- és kétdimenziós NMR-spektroszkópiai módszerekkel, valamint MS vagy HR-MS mérésekkel igazoltuk.

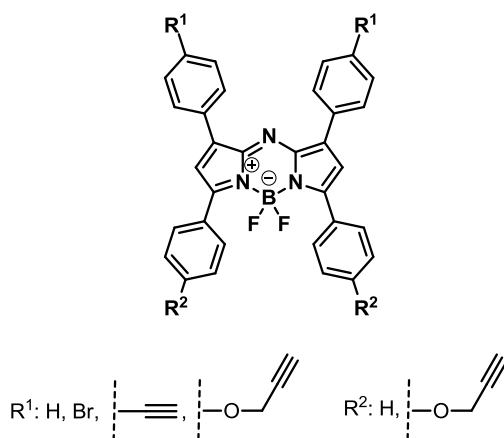
3. Saját, új tudományos eredmények tézisszerű összefoglalása

3.1. Sikeresen javítottunk az *aza*-BODIPY tetrafenil származékának előállítási hatékonyságán (1. ábra). Új, szekvenciális „egyedényes” eljárást dolgoztunk ki a benzaldehid és az acetofenon nátrium-hidroxiddal katalizált kondenzációs reakciójára, és az azt követő Michael-addícióra, nitrometán felesleg alkalmazásával. Azt tapasztaltuk, hogy a két reakciólépés egymás után, tisztítás közbeiktatásával való végrehajtása összességében ~20%-kal alacsonyabb hozammal valósítható meg, azonban a zöld kémia elveit figyelembe véve az „egyedényes eljárás” eredményesebb. Tanulmányoztuk az ezt követő dimerizációs lépés ammónium-acetáttal vagy karbamiddal való megvalósíthatóságát különböző körülmények között. Igazoltuk, hogy az oldószer elhagyható vagy vízre cserélhető az általánosan használt etanol vagy butanol helyett, és a reakcióidő mikrohullám alkalmazásával 1–2 napról percekre rövidíthető. A legjobb hozamot (51%) víz oldószerben, citromsav katalízissel, feleslegben lévő karbamid hozzáadásával kaptuk. Bebizonyítottuk, hogy az utolsó, bórtrifluorid-éteráttal lejátszódó komplexálási lépés, diklórmétán oldószerben, mikrohullámú körülmények között, 50 °C-on, 30 perc alatt hasonló, 90%-os hozammal megvalósítható, mint hagyományos melegítéssel, toluolban, több órán át történő forralással. **(3. publikáció)**



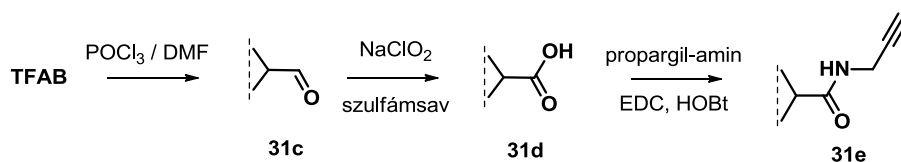
1. ábra

3.2. Kidolgoztunk egy alapvázszintézis-stratégiát konjugálható *aza*-BODIPY származékok előállítására. A konjugálásra alkalmas csoportok beépítését már az első reakciólépésben megvalósítottuk. A terminális alkin funkció bevitele érdekében a 4-brómbenzaldehydet trimetilszilil-acetilénnel reagáltattuk a Sonogashira kapcsolás körülményei között. A propargil-éterek előállítását a 4-hidroxibenzaldehyd vagy a 4-hidroxi-acetofenon propargil-bromiddal való reakciójával hajtottuk végre. Igazoltuk, hogy ezen építőelemek felhasználásával is hasonló hatékonysággal végrehajtható a 3.1. pontban ismertetett eljárás, *aza*-BODIPY-alkineket eredményezve (2. ábra). Megfigyeltük, hogy a trimetilszilil-csoport a reakciósor végére lehasad, így nincs szükség annak fluorid ionnal való eltávolítására. (1. publikáció)



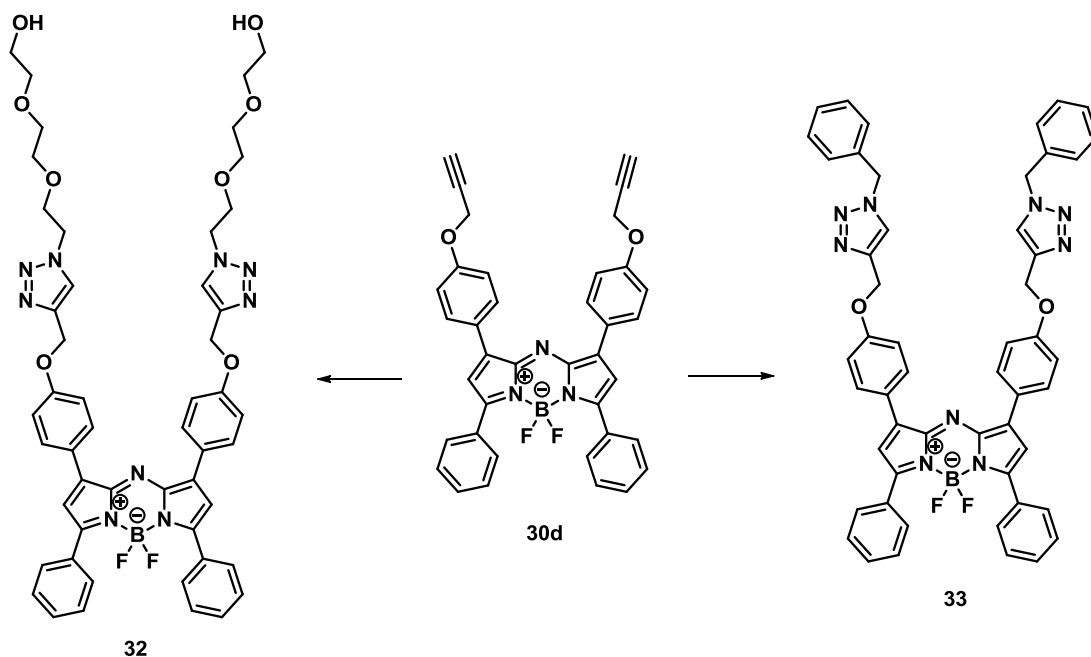
2. ábra

3.3. Tanulmányoztuk az *aza*-BODIPY alapváz posztfunkcionalizálásának lehetőségeit, és igazoltuk, hogy megvalósítható az egyik pirrol gyűrű szelektív formilezése (3. ábra). Ehhez Vilsmeier-Haack (VH) reakcióban módosítottuk az alapvázat: POCl₃ reagenssel, DMF/1,2-diklóretán elegyben történő forralás után vizes közegben, szobahőmérsékleten reagáltattuk tovább, és azt tapasztaltuk, hogy a formilcsoport csak az egyik gyűrűre épült be. A nyersterméket Pinnick-oxidációnak vetettük alá NaOCl₂-tal: a reakció hatékonyan, 84 %-os hozammal eredményezte a karbonsav származékot. A terminális alkin funkció beépítését propargil-amin reagenssel, EDC/HOBt kapcsoló szerek felhasználásával, sikeresen valósítottuk meg. (3. publikáció)



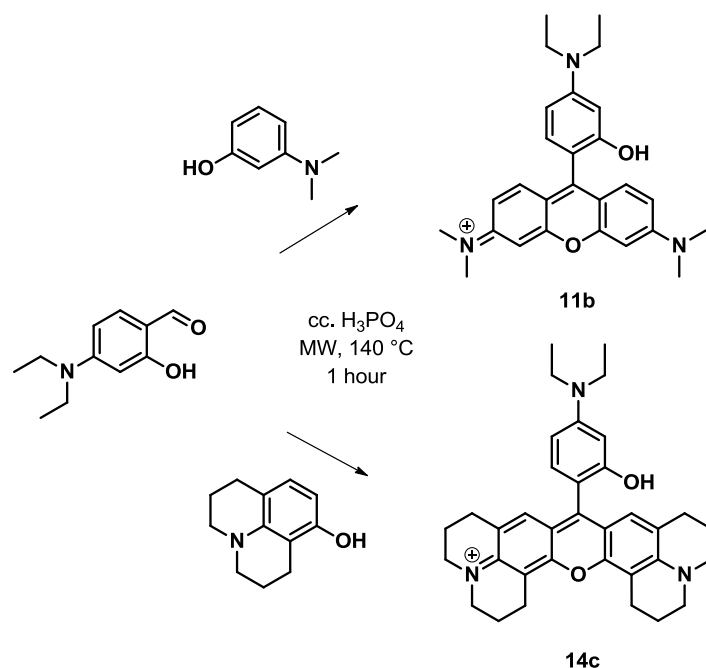
3. ábra

3.4. Sikeresen végrehajtottuk a TFAB *bisz*-propargil származékának (30d) CuAAC-kapcsolását, benzil-azidot vagy a trietilenglikol azid származékát alkalmazva reakciópartnerként. Igazoltuk, hogy Cu(I)-katalizátor (0,05 ekv.), PPh₃ ligandum (0,2 ekv.) és DIPEA bázis jelenlétében, toluolban, 3 órás forralással a triazol konjugátumok jó hozammal (62% és 66%) előállíthatók. (1. publikáció)



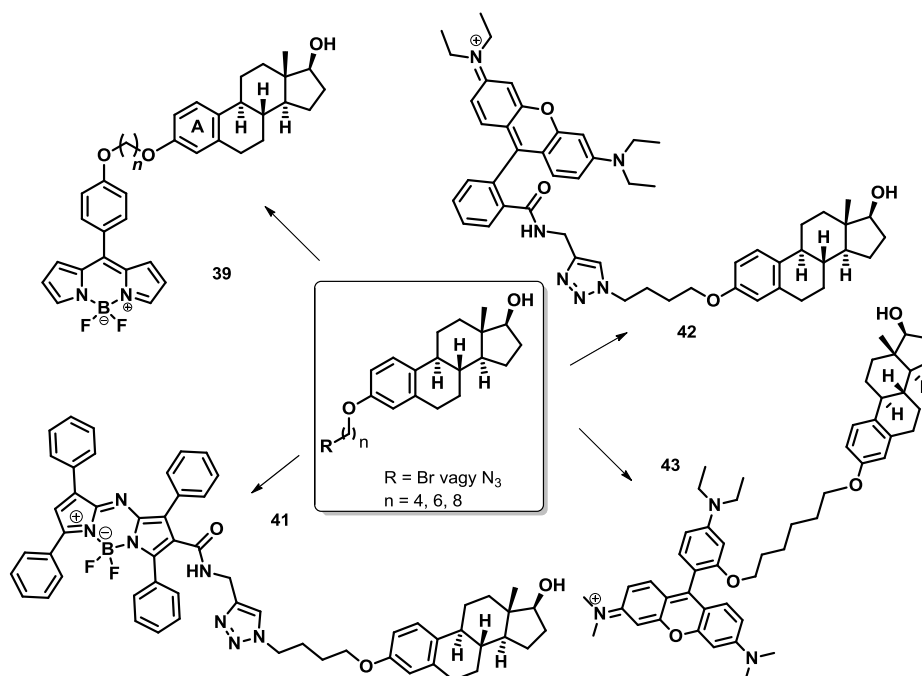
4. ábra

3.5. Tanulmányoztuk a fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó, rozamin-típusú festékek előállításának lehetőségeit, és azt tapasztaltuk, hogy a legjobb eredményt tömény foszforsav közegben, 1 órás mikrohullámú besugárzással, 140 °C-on megvalósított reakcióval érjük el (5. ábra). Sikertült ezzel az eljárással elfogadható hozammal (~30%) konjugációra alkalmas rozamin származékokat szintetizálnunk (**11b**, **14c**). Bebizonyítottuk, hogy a kiindulási szalicilaldehid kondenzációs reakcióban vesz részt a *m*-dimetilamino-fenol vagy a 8-hidroxi-julolidin reagensekkel, ami a xantén váz kialakulását eredményezi.



5. ábra

3.6. Sikeresen végrehajtottuk különböző BODIPY-, *aza*-BODIPY- rodamin- és rozamin-E2 konjugátumok szintézisét (6. ábra). A távoltartó elemeket különböző hosszúságú alkilcsoportok formájában minden esetben a szteroid fenolos hidroxilcsoportjára építettük be. A fenolos hidroxilcsoportokat tartalmazó BODIPY és rozamin származékot éterkötéssel, az *N*-propargil *aza*-BODIPY és rodamin származékot pedig CuAAC reakcióval kapcsoltuk szteroidhoz. A konjugálási reakciók jó hozammal szolgáltatták a kívánt fluoreszcensen jelölt E2-származékokat. (2-3. publikáció)



6. ábra

4. Együttműködésben végzett biológiai és optikai vizsgálatok eredményei

4.1. Az előállított vegyületek közül több képviselő is jelentős aktivitást mutatott fotodinámiás tumorterápiában, A431 emberi bőrlaphám karcinóma sejtvonalon. A TFAB propargil és benzil származékai (**30d**, **33**) fényindukált toxicitása összemérhető volt a TFAB-vel, mikromólos IC_{50} -értékkel. A **32**-es vegyület közülük egyértelműen kiemelkedett, a 3,66 nM-os IC_{50} értékével legjobb tudomásunk szerint a szakirodalomban eddig közölt eredményeket felülmúlta. Megfigyeltük, hogy a vegyületeknek elhanyagolható mértékű sötét toxicitása van, és a legígéretesebb származék még tízezerszeres koncentrációban alkalmazva sem bizonyult toxikusnak.

4.2. A festék-E2 konjugátumokat (**39a-c**, **41**) *in vitro* ösztrogénaktivitás vizsgálatoknak vetettük alá együttműködésben. Igazoltuk, hogy a BODIPY-konjugátumok a fluoreszcens jelölés ellenére megtartották ösztrogénaktivitásukat, szubmikromólos tartományba eső IC_{50} -értékekkel. Radioligand-kötődési vizsgálattal, elsőként a szakirodalomban igazoltuk, hogy a négy szénatomos linkert tartalmazó BODIPY-E2 éter konjugátum (**39a**) dóziszfüggően képes leszorítani a triciált E2-t a humán $\text{ER}\alpha$ ösztrogén kötőhelyéről. Ezen eredményünkkel bizonyított nyert, hogy a szabad fenolos hidroxilcsoportot nem tartalmazó E2-konjugátum nagy affinitással

képes a receptor ösztrogén kötőhelyére kötődni annak ellenére, hogy a szakirodalom szerint ez a hidroxilcsoport elengedhetetlen a vegyület jó kötődése szempontjából. Az előzetes biológiai tesztek eredményei arra utalnak, hogy a rozamin-E2 konjugátum (43) a fentiekével összemérhető ösztrogénaktivitással rendelkezik, azonban az ennek pontosítására irányuló vizsgálatok még folyamatban vannak. Az újonnan szintetizált E2-BODIPY konjugátumok (39a-c) kiindulópontként szolgálhatnak olyan megfelelő jelöltek kifejlesztéséhez, amelyek alkalmasak az ösztrogénfelvétel, -transzport, -biotranszformáció, valamint a fehérjekötődési tulajdonságok vizsgálatára. E folyamatok megfigyelése nemcsak az ösztrogénhatás szempontjából kiemelt jelentőségű, hanem más biológiai összefüggések, többek között a neuroprotektív mechanizmusok tekintetében is. Továbbá, a fluoreszcens ösztrogének jó detektálhatósága révén új, jelentős biológiai hatások azonosítására is lehetőség nyílt. A kutatás során előállított zölden és vörösen fluoreszkáló BODIPY-E2 konjugátumok kiegészítik egymás kémiai terét, mivel a különböző hullámhossztartományokban működő jelölt ösztrogének eltérő orvosi biológiai alkalmazásokra lehetnek alkalmasak. A nagyobb hullámhosszon emissziót mutató fluoreszcens konjugátum - mélyebb szöveti penetrációjának köszönhetően - alapul szolgálhat élősejtes képalkotó technikákhoz, magas térbeli és időbeli felbontású képek előállításának lehetőségét kínálva.

4.3. A szabad fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó rozamin származék fluoreszcenciája erős pH-függést mutatott. Savas közegben a fluoreszcencia intenzitása kiugróan magasnak bizonyult, majd a pH növekedésével folyamatosan csökkent és 5-6 érték körül minimálisra esett. Az adatok alapján szigmoid illesztéssel határoztuk meg a vegyület savi disszociációs állandóját, ami $pK_a = 3,75$ -re esett.

5. Az értekezés alapját képező közlemények (MTMT azonosító:)

1. **Hlogyik T**, Laczkó-Rigó R, Bakos É, Poór M, Kele Z, Özvegy-Laczka Cs, Mernyák E. Org. Biomol. Chem., **2023**, 21, 6018–6027. **IF = 2,9**

2. Peřina M, Börzsei R, Ágoston H, **Hlogyik T**, Poór M, Rigó R, Özvegy-Laczka Cs, Batta G, Hetényi Cs, Vojáčková V, Jorda R, Mernyák E. Eur. J. Pharm. Sci. **2024**, 199, 106813.

IF = 4,7

3. **Hlogyik T**, Bózsity N, Börzsei R, Kovács B, Labos P, Hetényi Cs, Kiricsi M, Huliák I, Kele Z, Poór M, Erostyák J, Hunyadi A, Zupkó I, Mernyák E. Int. J. Mol. Sci. **2025**, 26(15), 7075.

IF = 4,9

Összesített IF = 12,5

6. A doktori értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

1. Náfrádi M, **Hlogyik T**, Farkas L, Alapi T. J. Environ. Chem. Eng. **2021**, 9, 106684.

IF = 6,8

2. Farkas J, Náfrádi M, **Hlogyik T**, Pravda BC, Schrantz K, Hernádi K, Alapi T. Environ. Sci.: Water Res. Technol. **2018**, 4, 1345–1360.

IF = 3,3

Összesített IF = 10,1

7. Az értekezéshez kapcsolódó posztterek és előadások

Előadás

1. **Hlogyik Tamás**, Mernyák Erzsébet – Biomolekulák zöld- vagy vörös-emittáló fluorofórral való jelölése – XLVIII. Kémiai előadói napok, Szeged, 2025.10.27-29.

2. **Hlogyik Tamás**, Mernyák Erzsébet – Aza-BODIPY típusú fényérzékenyítő anyagok szintézise – XLVI. Kémiai előadói napok, Szeged, 2023.10.17-19.

3. **Hlogyik Tamás**, Mernyák Erzsébet – Vörös emittáló fluorofórok szintézise és fotodinámiai alkalmazhatóságuk – Ifjú Szerves Kémikusok Előadójúlése, 2023.05.09.

4. **Hlogyik Tamás**, Mernyák Erzsébet – BODIPY-típusú fluorofórok etinil-származékainak szintézise és konjugálása – Ifjú Szerves Kémikusok Előadójúlése, 2022.05.18.

Poszter

1. **Tamás Hlogyik**, Máté Vágvolgyi, Labos Péter, Noémi Bózsity, István Zupkó, Attila Hunyadi, Erzsébet Mernyák – Novel Fluorescent-labeled estradiol derivatives. 30th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, 2024.10.7-8.

2. **Hlogyik Tamás**, Mernyák Erzsébet – Fluoreszcensen jelölt 17 β -ösztadiol származékok előállítása – Vegyészkonferencia, Eger, 2024.06.10-12.

3. **Hlogyik Tamás**, Mernyák Erzsébet – Biomolekulák konjugálására alkalmas *aza*-BODIPY típusú fluorofórok szintézise – Vegyészkonferencia, Eger, 2022.06.15-17.
4. **Tamás Hlogyik**, Erzsébet Mernyák – Synthesis of red-emitting fluorophores - 28th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, Szeged, 2022.1114-15.