

**Egyes gyűrűs kalkonanalógok glutation konjugációs reakcióinak
tanulmányozása reaktivitás-biológiai aktivitás összefüggések vizsgálata
céljából**

Doktori (Ph.D.) értekezés



Dr. Fatemeh Kenari

Farmakológiai és Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A doktori iskola vezetője: **Prof. Dr. Pintér Erika**

Programvezető: **Prof. Dr. Pál Perjési**

Témavezető: **Prof. Dr. Pál Perjési**

Gyógyszerészi Kémiai Intézet,

Pécsi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar

Pécs 2023

1. Bevezetés

1.1. Kalkonok

A kalkonok (1,3-difenil-2-propen-1-one-ok) a flavonoid-bioszintézisben található köztes és prekursor vegyületek. A kalkonok többek között bizonyítottan citotoxikus, gyulladáscsökkentő és féreghajtó hatásúak. Egyes kalkonok klinikai felhasználását is jóváhagyták. A könnyű szerkezeti módosítás és a biológiai és farmakológiai tevékenységek széles skálája a kalkonszármazékok nagy változatosságához, és ezzel együtt a gyógyszerkutatás és -fejlesztés népszerűségéhez vezetett. A kalkonok és szintetikus analógjaik számos biológiai hatása spontán és enzimkatalizált reakcióképességükhöz kapcsolódik. Ezekre a hatásokra különböző hatásmechanizmusokat javasoltak, de a pontos molekuláris célpont sok esetben még nem ismert.

A kalkonok nemkovalens kölcsönhatások révén kölcsönhatásba kerülhetnek a sejtek makromolekuláival, ami a vegyületek alacsonyabb toxicitását és genotoxicitását eredményezi. Korábban kimutatták, hogy a kalkonok és analógjaik intrinsic reaktivitást mutatnak tiolcsoportokkal szemben. Ezért a kalkonok és a kéntartalmú biomolekulák kölcsönhatásának vizsgálata kulcsfontosságú lehet a vegyületek hatásmechanizmusának megismerésében. A glutation redukált formája (GSH) a redukzív intracelluláris állapotot védi az oxidatív metabolitok redukálásával, általában a glutation-peroxidáz (GPx) enzimek segítségével. Ezenkívül részt vesz a glutation S-transzferáz (GST) enzim által katalizált reakciókban, a xenobiotikumok biotranszformációjával és az oxidatív stresszel kapcsolatos reaktív metabolitok méregtelenítésében. A GSH létfontosságú szerepet játszik az olyan alapvető antioxidánsok, mint a C-vitamin és az E-vitamin redukált formában tartásában is, ami a redox egyensúly fenntartását eredményezi. Végül a GSH képes reverzibilisen kötődni a fehérjék tiolmaradványaihoz (glutationiláció), megelőzve ezzel azok oxidatív károsodását. A nem-enzim-katalizált biotranszformációs átalakulások a xenobiotikumok metabolizmusának jelentős összetevői, az elektrofil részek GSH-val szemben mutatott spontán reakciói következtében. A nagy reakcióképességű elektrofilek, mint például az endogén 4-hidroxi-2-noneal vagy az exogén NAPQI, a paracetamol jól ismert metabolitja, reagálhatnak a GSH-val, mielőtt azok fontos sejtalkotókkal, például DNS-sel, RNS-sel, fehérjékkel reakcióba lépnének. Így ezek a reaktív elektrofil vegyületek nem-enzim-katalizált reakciókban továbbalakulnak, mielőtt toxikus hatást fejtenének ki a sejtekben.

1.2. Tiolok

1.2.1. Glutation

Az L-gamma-glutamil-L-ciszteinil-glicin (glutation, GSH) egy fő tripeptid, amely a legtöbb emlőssejtben jelentős (1-10 mM) koncentrációban található és szintetizálódik. A glutation alapvető sejtfunkciói közül meg kell említeni az a) antioxidáns aktivitást, b) a xenobiotikumok metabolizmusát és eliminációját, c) a sejtek redoxpotenciáljának fenntartását, valamint szerepét a d) a sejtproliferációban, e) a zsírsavbioszintézisben és f) a génexpresszió jelátvitelében.

1.2.2. N-acetilcisztein

Az N-acetil-cisztein (NAC) nem mérgező vegyület, a glutation bioszintézis prekurzora. A glutation szájon át nem szívódik fel jól, ezért koncentrációjának növelése érdekében NAC-kiegészítés javasolt. A NAC legfontosabb felhasználási területe az orvosi gyakorlatban a paracetamol-mérgezés ellenszereként történő alkalmazása. Szulfhidril (tiol) funkciós csoportot tartalmaz, így a kalkonokkal lejátszódó reakciókban a glutationhoz hasonló mechanizmus szerint reagál.

1.2.3. Glutation S-transzferázok

A glutation-transzferázok három fő funkcióval rendelkeznek az élő szervezetekben: a) katalitikus tevékenység, b) nem-szubsztrát ligandumok megkötése és c) részvétel fehérje-fehérje kölcsönhatásokban. A GST-katalizált reakciók szubsztrátjai három közös tulajdonsággal rendelkeznek: a) hidrofóbok, b) elektrofil (elektronhiányos) atomot (centrumot) tartalmaznak, és c) spontán reakcióban reagálnak a GSH tiolesoportjával.

1.2.4. Glutation a daganatos megbetegedésekben

A reaktív oxigén metabolitok (ROS) fontos szerepet játszanak a tumorsejtek jelátvitelében, a tumorigenezisben és a daganatok progressziójában. Képződése a rákos sejtekben a gyorsabb növekedés és proliferáció miatt jelentősen nagyobb. Ezért ezekben a sejtekben általában magasabb az antioxidáns rendszerek, például az Nrf2 és más, a GSH szintézisével és felhasználásával kapcsolatos enzimek expressziója. Továbbá, egyes daganatok - mint például a petefészek-, emlő- és tüdődaganat - elősegítik a GSH szintézisének és transzportjának upregulációját. Tekintettel a GSH létfontosságú szerepére a daganatos sejtek túlélésében és gyógyszerrezisztenciájában, a vegyület izgalmas perspektívát nyújt a daganatos megbetegedések kezelésében. A GSH és a GST emelkedését egészen a közelmúltig a megbetegedés prognózisa rossz jelének tekintették, a GSH-reaktivitás kettős természetének feltárása azonban új lehetőségeket nyitott.

2. Célkitűzések

A doktori munka általános célja a 4/4'-szubsztituált kalkonok és héttagú gyűrűs analógjaik (redukált glutation (GSH) és *N*-acetyl-cisztein (NAC)) tiolreaktivitásának *in vitro* vizsgálata volt. A konkrét célok a következők voltak:

- A kalkonok (**1**) és héttagú kalkonanalógok (**4**) tiol-reaktivitásának vizsgálata, annak tanulmányozása, hogy
 - (a) a 4(4')-aromás szubsztitúció, és
 - (b) egy héttagú alifás gyűrű beépítése a nyíltláncú kalkon molekulába
 hogyan befolyásolhatja a származékok kezdeti tiolreaktivitását.
- Annak vizsgálata, hogy az inkubációs közeg pH-ja hogyan befolyásolja a 4(4')-CH₃ - és a 4(4')-OCH₃ -szubsztituált **1** és **4** származékok kezdeti tiolreaktivitását,
- A 4(4')-CH₃ - és a 4(4')-OCH₃ -szubsztituált **1** és **4** származékkal végzett tioladdíciós reakciók sztereokémiai kimenetelének vizsgálata különböző pH-értékek mellett,
- A **4c** származék metabolikus stabilitásának vizsgálata patkánymáj-mikroszóma felhasználásával, valamint
- összefüggések keresése a megfigyelt tiolreaktivitás és néhány **1**- és **4**-származék korábban közölt, daganatos sejtekre gyakorolt *in vitro* citotoxikus hatása között.

3. Anyag és módszerek

3.1. In vitro kalkon-GSH inkubációk

A kalkonok kiindulási (*E*) izomerjeit egy korábban leírt módszerrel szintetizáltuk. A minták tisztaságát TLC és HPLC-UV segítségével ellenőriztük. Mind az (*E*), mind a (*Z*) izomerek, valamint a képződött konjugátumok szerkezetét LC-MS mérésekkel igazoltuk. A redukált glutationt és az *N*-acetyl-ciszteint a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A CHROMASOLV gradiens metanolt (HPLC-hez) a Honeywell-től (Magyarország) szereztük be. A HiperSolve CHROMANORM trifluor-ecetsavat a VWR-től (Budapest, Magyarország), a hangyasavat pedig a Fischer Chemicals-től vásároltuk. A HPLC és HPLC-MS mérésekhez használt deionizált vizet a PTE Gyógyszerész Kémiai Intézetben tisztítottuk Millipore Direct-QTM készülék alkalmazásával. A HPLC-mérésekhez használt mobilfázisokat felhasználás előtt 5 percig ultrahangos vízfürdőn gáztalanítottuk. A további felhasznált vegyszerek analitikai minőségűek voltak.

A vizsgált kalkonok (**1**) és analógjaik (**4**) tiolokkal való reakcióképességének vizsgálatához két redukált glutationt (GSH) és *N*-acetyl-ciszteint (NAC) tartalmazó oldatot készítettünk az

alábbiak szerint: Mindkét vegyület három különböző pH-értékű (3,2, 6,3 és 8,0) oldatát készítettük el. A pH-t frissen készített 1M NaOH oldattal állítottuk be.

A Oldat: 1,5 cm³ 2,0 × 10⁻¹ M (0,3 mmol tiol) GSH és a NAC ioncserélt vízzel készült oldata.

B Oldat: 4,6 cm³ 6,5 × 10⁻³ M (0,03 mmol kalkon) **1** és **4** kalkonok HPLC-minőségű metanollal frissen készült oldata.

C Oldat: a GSH/NAC és a kalkon oldatokat 37 °C-os vízfürdőben 15 percig sötétben előinkubáltuk. Ezután az A és a B oldatokat összekevertük, így a tiol és a kalkon 10:1 molarányú keverékét kaptuk.

A C oldatot 315 percig sötétben, szabályozott hőmérsékletű (37 °C) vízfürdőben tartottuk. A reakció nyomon követése és az addíciós folyamatok előrehaladásának minőségi jellemzése érdekében az inkubációs elegyek összetételét a 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 225, 255, 285 és 315 perces időpontokban HPLC-UV módszerrel elemeztük.

A kalkonok (**1a**, **1b**) és a ciklikus analógok (**4a**, **4b**) kezdeti (0 perc) csúcsterületének értékeléséhez a vegyületekből, fentiekkel azonos módon, 4,6 cm³ metanos oldatot készítettünk (*B oldat*), majd az oldatokat az elemzés előtt 1,5 ml megfelelő pH-jú vizes oldattal hígítottuk. Az elegyítés előtt az oldatokat 37 °C-on 30 percig előinkubáltuk.

A kiindulási vegyületek korábban bizonyítottan fény-inicializált (*E*)/(*Z*) izomerizációjának termékeit összehasonlítottuk a nem fény által kezdeményezett (retro-Michael-addíció) izomerizáció termékeivel. E célból a B módszerrel elkészített kalkon oldatokat (**1a-4b**) 1 hétig szórt laboratóriumi fényben tartottuk. Az oldatokat HPLC-UV és HPLC-MS módszerrel elemeztük.

3.2. Mikroszomális mérések

A kalkonok kiindulási (*E*) izomerjeit egy korábban leírt módszerrel szintetizáltuk. A tisztaságot TLC és HPLC-UV segítségével vizsgáltuk. Mind az (*E*), mind a (*Z*) izomerek, valamint a képződött konjugátumok szerkezetét LC-MS mérésekkel igazoltuk. A hím patkány májmikroszómát (10 mg) (M9066), magnézium-kloridot, 25 mm-es fecskendőszűrő nejlonmembránt (pórusméret 0,45µm), és redukált β-nikotinamid-adenin-dinukleotid-2'-foszfát nátrium-só-hidrátot (β-NADPH) a Sigma Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől vásároltuk. Az alameticint és a redukált L-glutationt (BioChemica) a Cayman Chemicals és az ITWreagents cégektől szereztük be. A CHROMASOLV HPLC minőségű metanolt a Honeywell-től (Magyarország) szereztük be. A mérésekhez használt deionizált vizet a PTE Gyógyszerész Kémiai Intézetben tisztítottuk Millipore Direct-QTM készülék alkalmazásával. A foszfát pufferezt (pH 7,4) sóoldatot (PBS) az inkubáció napján frissen készítettük a Cold Spring Harbor Laboratory 2014 módszere alapján.

490 μL PBS-t 50 μL patkánymáj-mikroszómával (20 mg/ml fehérje) és 10 μL alamethicin metanolos oldatával (50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje) elegyítettünk, majd a mikroszóma aktiválása céljából 15 percig jégen tartottuk. Ezután 100 μL NADPH-oldatot (2,0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ végső koncentráció) adtunk hozzá, és az oldatot vortexeléssel homogenizáltuk. Hozzáadtunk 25 μL frissen készített **4b** acetonitriles oldatát (0,25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ végkoncentráció) és 100 μL MgCl_2 oldatot (5,0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ végkoncentráció). Minden egyes hozzáadás után az elegyet vortexeltük. Az inkubációs térfogatot 205 μL PBS hozzáadásával 980 μL -re állítottuk be, és 3 percig 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. Ezután az elegyhez 20 μL PBS-ben oldott GSH oldatot (végső koncentrációja 5,0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) adtunk, hogy a végső térfogat 1,0 ml legyen. Az elegyet 10 másodpercig vortexszel homogenizáltuk, majd rázatott vízfürdőbe helyeztük, és az inkubációs idő (120 perc) alatt abban tartottuk. A 0, 30, 60 és 90 perces időpontokban 150 μL mintát vettünk (a 0 perces pontokat az inkubátumok vízfürdőbe helyezésének időpontjának tekintettük). Minden egyes időpontban 150 μL jéghideg metanolt használtunk a reakció leállítására. Az így kapott 300 μL mintát 5 percig 6000 rpm-en centrifugáltuk; a felülúszót fecskendővel összegyűjtöttük, és 0,45 μm -es nejlonmembrános fecskendőszűrőn megszűrtük. A májmikroszóma kivételével minden más összetevőt tartalmazó kontroll inkubációt 0, 30, 60 és 90 perces időpontokban elemeztük.

3.3. HPLC-UV mérések

A méréseket egy Agilent 1100 HPLC-UV-VIS rendszerrel végeztük. A hullámhossz 260 nm-re volt beállítva. A komponensek elválasztását fordított fázisú kromatográfias rendszerben végeztük. A komponensek elválasztásához Zorbax Eclipse XBD-C8 oszlopot (150 mm \times 4,6 mm, részecskeméret 5 μm ; Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) használtunk. Az injektálási térfogat 10 μL volt. A mérés során az oszlopot szobahőmérsékleten (25 °C) tartottuk. Az adatokat az Agilent ChemStation (B.03.01) segítségével rögzítettük és értékeltük. A gradiens elúciót 1,2 ml/perc áramlási sebességgel végeztük; a mobilfázis vízből és 0,1% trifluorecetsavból (A) valamint metanolból és 0,1% trifluorecetsavból (B) állt. A gradiens profilja a következő volt: 8 percig tartó izokratikus időszak 40%-os B mobilfázis, majd lineáris emelkedés 60% B-re 4 perc alatt, egy második lineáris gradiens 90% B-re 3 perc alatt, majd 5 percig tartó izokratikus időszak 90% B és 10% A eleggyel. Ezután az oszlopot a kezdeti feltételekhez egyensúlyba hoztuk 2 perces lineáris gradienssel (40% B), majd 3 percig így tartottuk.

3.4. HPLC-MS mérések

A HPLC HESI-MS elemzéseket egy Ultimate 3000 folyadékkromatográf (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) és egy Thermo Q Exactive Focus quadrupol-Orbitrap hibrid tömegspektrométer

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végeztük. Az adatokat 100 és 1000 Da közötti m/z értékek között gyűjtöttük. Az adatgyűjtést Q Exactive Focus 2.1 és az Xcalibur 4.2 szoftver (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük. A vegyületek és adduktok analizisét HESI pozitív és negatív ionizációs üzemmódban végeztük a következő paraméterekkel: porlasztó feszültség 3500 V; párologtató hőmérséklete 300 °C; kapilláris hőmérséklete 350 °C; porlasztó és segéd gázáram 30, illetve 10 önkényes egység; felbontás 70000 (200 m/z); fragmentáció 20 eV.

A HPLC elválasztást egy Accucore C18 oszlopon (150 mm × 2,1 mm, részecskeméret 2,6 μm) végeztük, és egy Accucore C18 védőoszlopot (5 mm × 2,1 mm, részecskeméret 2,6 μm) is használtunk. Az injektálási térfogat 5 μl volt, az áramlási sebességet 0,4 ml/perc értékre állítottuk be. Az adatelemzést és kiértékelést az Xcalibur 4.2 és a FreeStyle 1.7 szoftverrel végeztük. Az eluensek bináris gradiensét használtuk, amely az A és B mobilfázisokból állt.

A gradiens paraméterei a kalkonokban a következők voltak: víz és 0,1% hangyasav (A), valamint metanol és 0,1% hangyasav (B). A gradiens elúció a következő volt: izokratikus elúció 1 percig 20% B eluenssel, majd lineáris gradiens 9 perc alatt 100% B eluensig, majd izokratikus elúció 2 percig. Ezután az oszlopot 0,5 perc alatt visszaállítottuk 20% B eluensre, majd 2,5 percig izokratikusan ekvibráltuk. A mintavevő készüléket szobahőmérsékleten tartottuk, az oszlopteret pedig 40 °C-on termosztáltuk

A gradiens eluensei az adduktok esetében víz és 0,1% hangyasav (A), valamint metanol és 0,1% hangyasav (B) voltak. A gradiens elúció a következő volt: izokratikus elúció 1 percig 10%-os B eluenssel, majd lineáris gradiens 95% B-eluensig 13 perc alatt, majd izokratikus plató 3 percig. Végül az oszlopot 0,1 perc alatt visszaállítottuk 10% B-eluensre, majd 2,9 percig izokratikusan ekvibráltuk. A mintavevő készüléket szobahőmérsékleten tartottuk, az oszlopkemencét pedig 40 °C-on termosztáltuk. A diódasoros detektort is 260 nm hullámhosszra állítottuk az MS-analízis mellett.

3.5. Molekuláris modellezés

Az **1c**, **4c**, **CH₃SH** és **CH₃S⁻** szerkezeteket a Gaussview 6.0 szoftver segítségével szerkesztetjük meg. Az elméleti számításokat a G16 szoftvercsomag részeként DFT-vel végeztük. A molekulák optimalizálása a hosszú távú korrekcióval rendelkező M06-2X hibrid csere- és korrelációs funkcionál segítségével történt, a gázfázisban a 6-311++G(d,p) báziskészlettel kombinálva. Határ molekulapályákat (FMO) számítottunk. A molekuláris elektrosztatikus potenciáltérképek elektronikus izodenzitási felületeiken keresztül hozzájárultak a globális elektrofilitás elemzéséhez. A MEP-térképek vizuálisan ábrázolják a molekula felületén lévő

elektrosztatikus potenciált, amely feltárja a magas és alacsony elektronsűrűségű régiókat. A $V(\mathbf{r})$ elektrosztatikus potenciált az \mathbf{r} pontban a következőképpen határozzuk meg.

$$V(\mathbf{r}) = \sum_{\alpha} \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_{\alpha} - \mathbf{r}_A|} - \int \frac{\rho(\mathbf{r})}{|\mathbf{r}_{\alpha} - \mathbf{r}|} d\mathbf{r} \quad (1)$$

ahol Z_A az atommagok töltése. α pontban \mathbf{r}_{α} és $\rho(\mathbf{r})$ a töltéssűrűség az \mathbf{r} pontban.

A molekulák lokális elektrofililitását a Fukui-függvény segítségével határoztuk meg, és ezután lehetett megjósolni a molekulahely-szelektivitást.

$$f(\mathbf{r}) = \left[\frac{\partial \rho(\mathbf{r})}{\partial N} \right]_v, \quad (2) \quad (2)$$

ahol N az elektronok száma a rendszerben, és a konstans kifejezés v a parciális deriváltban a külső potenciál.

A Fukui kiszámításához a Multiwfn 3.6 programot használtuk. Ezen kívül a *pySiRC* – a machine-learning computational platform, egy gépi tanulással működő számítási platformot használtunk a szabadgyökös vegyületek által elősegített oxidációs reakciók szimulálására. A gyökös támadás által kiváltott oxidációs hatás modellezésére a hidroxilgyököt ($\cdot\text{OH}$) választottuk. A kalkonok a hidroxilgyök által okozott oxidatív támadás reakciósebességi állandóját az XGBoost ML algoritmus segítségével jósoltuk meg, és a MACCS ujjlenyomatot szerkezeti leíróként alkalmaztuk.

4. Eredmények

4.1. Nyitott láncú kalkonok

4.1.1. A pH 8,0/7,4 körülmények között végzett reakciók

Ezt a pH-t úgy választottuk, hogy a GST-katalizált reakció körülményeit utánozza, figyelembe véve a redukált GSH és NAC pK_a értékét, amely 8,83 illetve 9,52. Ezen a pH-n a GSH esetében a molekulák 3,6%-a, a NAC molekulák 0,75%-a ionizált formában található, ami a tiolok reaktívabb formája. Az **1a** és **1b** alapvegyület kromatográfiás csúcsterületeinek változását az inkubációs idő függvényében ábrázolva az egyensúlyi állapot kialakulását jelezte. A GSH-val történő inkubációs idő végére (315 perc) a **4a** és **4b** vegyületeknek megfelelő HPLC-csúcs kezdeti területe 3,7%-ra, illetve 5,2%-ra csökkent. A NAC-kal történő inkubáció esetén az **1a** és **1b** kezdeti területe 5,2%-ra, illetve 9,8%-ra csökkent.

A Michael-addíciós reakció korábban ismertetett mechanizmusa alapján a nyílt láncú kalkonok esetében az addíciós reakció során egy új királis centrum, a gyűrűs kalkonokanalógok esetében két új királis centrum keletkezik. Továbbá, a nyílt láncú analógok esetében, figyelembe véve a két tiol eredendő kiralitását, két diasztereomer addukt képződését vártuk. Az alkalmazott HPLC

körülmények között azonban a **GSH-1** és **GSH-2** konjugátumok nem különültek el (1. táblázat).

1. táblázat. A vizsgált kalkonok (**1a** és **1b**) és GSH-adduktjaik (**GSH-1** és **GSH-2**) retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterülete (A)².

pH ³	Összetett	t_R (E)-Kalkon	Terület arány ⁴ A_{315}/A_0	t_R (Z)-Kalkon	Terület (Z)-Kalkon	t_R GSH-1	Terület GSH-1	t_R GSH-2	Terület GSH-2
3.2	1a	16.4	0.81	16.2	<100	13.8	4245	N/D ⁵	-
3.2	1b	15.9	0.96	15.7	<100	11.9	3352	N/D ⁵	-
6.3	1a	16.3	0.09	16.0	<100	13.2	16,571	N/D ⁵	-
6.3	1b	15.8	0.21	15.5	<100	11.3	17,160	N/D ⁵	-
8	1a	16.3	0.04	16.1 ⁶	<100	13.3	17,419	N/D ⁵	-
8	1b	15.7	0.08	15.5	<100	11.0	20,387	N/D ⁵	-

¹Retenciós idők percben;² az adatok két független mérés átlagára vonatkoznak a 315 perces időpontban;³ a vizes tiololdat pH-értéke;⁴ a 0 és 315 percben mért csúcsterületek aránya;⁵ nem kimutatható.

A NAC inkubációk esetében a képződött **NAC-1** és **NAC-2** adduktok jelen voltak, azonban csak részben különültek el. A két átfedő csúcs integrálása alapján a két diasztereomer addukt aránya nem volt egyenlő, és a kevésbé poláris diasztereomer (1,7-1,2-szeres) többsége volt megfigyelhető (2. táblázat).

A kiindulási kalkonok (**1a** és **1b**), valamint GSH- és NAC-konjugátumaik szerkezetét HPLC-MS segítségével igazoltuk.

Az **1a** és **1b** vegyületek GSH-konjugátumának (**GSH-1**) AUC-értéke az idő függvényében ábrázolva enyhe, de állandó növekedést mutatott, míg a NAC-adduktok (**NAC-1** és **NAC-2**) esetében az integrált HPLC-csúcsterületek (AUC-értékek) függvénye az idő függvényében azt mutatta, hogy az **1a** NAC-konjugátumainak képződése az első 45 percben megnövekedett, és az inkubáció során nem változott. Az **1b** NAC-konjugátumok esetében a kinetikus termék (**NAC-1**) gyorsan képződött az első 15 percben. Ezt követően azonban az **1b** **NAC-1** izomerje transz-izomerizálódott a termodinamikai termékké (**NAC-2**), és a 105 perces időpontra elérte az egyensúlyi összetételt

2. táblázat. A vizsgált kalkonok (**1a** és **1b**) és NAC-adduktjaik (NAC-1 és NAC-2) retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterülete (A)².

pH ³	Összetett	t_R (<i>E</i>)- Kalkon	Területi arány ⁴ A_{315}/A_0	t_R (<i>Z</i>)- Chalcone	Terület (<i>Z</i>)- Chalcone	t_R NAC-1	Terület NAC-1	t_R NAC-2	Terület NAC-2
3.2	1a	16.3	0.89	16.1	<100	15.2	1260	15.3	2173
3.2	1b	15.8	0.98	15.5	<100	14.1	1156	14.2	1507
6.3	1a	16.3	0.24	16.0	<100	15.1	4906	15.2	6457
6.3	1b	15.8	0.47	15.5	<100	14.1	4712	14.2	5422
8	1a	16.2	0.05	16.0	<100	15.1	6167	15.2	8875
8	1b	15.7	0.10	15.5	<100	14.1	7167	14.2	8975

¹Retenciós idők percben; ² az adatok két független mérés átlagára vonatkoznak a 315 perces időpontban; ³ a vizes tiololdat pH-értéke; ⁴ a 0 és 315 percben mért csúcsterületek aránya; ⁵ nem kimutatható.

A fenti adatok mellett érdemes megemlíteni, hogy mind a NAC-kal, mind a GSH-val végzett inkubáció során néhány kisebb új csúcs alakult ki, amelyeknek a retenciós ideje kissé alacsonyabb volt, mint a kiindulási (el nem reagált) kalkonok **1a** és **1b** csúcsa. Korábbi eredményeink arra utalnak, hogy ezek a csúcsok a kiindulási (*E*)-kalkonok (*Z*) diasztereomerjei. Mivel ezek a csúcsok a tiolok nélkül végzett inkubációkban nem keletkeztek, e csúcsok inkubáció során történő keletkezését retro-Michael addíciós reakció eredményének tekinthetjük. A várt (*Z*) diasztereomerek szerkezetének azonosítása érdekében az **1a** és **1b** fény-inicializált izomerizációját is elvégeztük. Az eredményeket összehasonlítottuk az inkubációk során kapott eredményekkel. A képződött vegyületeket a megfelelő (*Z*) izomerekként azonosítottuk

4.1.2. pH 6,3/6,8 körülmények között végzett reakciók

Az enyhén savas körülmények közötti reakciók a daganatos sejtek celluláris miliójét utánozzák, mivel anyagcseréjük gyors proliferációjuk, migrációjuk és túlélésük támogatása érdekében megváltozik. A glükóz nagy része még oxigén jelenlétében is piruváttá, majd tejsavvá alakul, szemben a normál aerob glükóz-anyagcserével, ahol a piruvát tovább oxidálódik szén-dioxiddá és vízzé. A felhalmozódó tejsav hatására a daganatos sejtek pH-ja kissé savasabb lesz, mint a normál sejteké. Ilyen kísérleti körülmények között (pH 6,3/6,8) a GSH-nak csak körülbelül 0,9%-a és a NAC-molekulák 0,2%-a található a reaktívabb tiolát formában. A reakciók lefolyása ilyen körülmények között korlátozottabb volt, mint a pH 8,0/7,4 mellett megfigyelt reakcióké. A GSH inkubációkban az **1a** és **1b** vegyületek kezdeti területe a vizsgált időszak végére 9,4%-ra és 21,4%-ra csökkent (1. táblázat). A NAC inkubációk esetében a megfelelő értékek 24,4% és 46,8% voltak (2. táblázat).

A reakciók előrehaladási görbéi azt mutatták, hogy a százalékos értékek az egyensúlyhoz közeli

összetételeket jelentik. A pH 8,0/7,4 körülmények között kapott eredményekhez hasonlóan az inkubációs keverékekben kis mennyiségű (*Z*) izomer képződését mutatták ki.

A kalkon-GSH és a kalkon-NAC adduktok kialakulásának folyamatgörbéi két párhuzamos, homorú görbét mutattak véges határértékekkel.

Az 1a és 1b vegyületek GSH-val történő reakciójában az 1. diasztereomer csúcsának előrehaladási görbéje az AUC állandó növekedését mutatja. A végső időpont AUC értéke azonban ennél a pH-nál kisebb, mint a pH 8,0/7,4-nél, 4,9%-kal illetve 15,8%-kal az **1a** és **1b** vegyületek esetében.

A **NAC-1** és a **NAC-2** hasonló viselkedést mutat, mint a **GSH-1** csúcs, ahol az AUC az utolsó időpontig növekszik, ami azt jelzi, hogy az egyensúlyi állapot még nem ért el. Az 1-es és 2-es csúcsok AUC értéke az **1a** esetében 20,4%-kal és 27,2%-kal, az **1b** esetében pedig 34,2%-kal és 39,6%-kal csökkent.

4.1.3. pH 3,2/3,7-es körülmények között végzett reakciók

Erősebb savas körülmények között a reakciók sokkal kisebb mértékben mentek végbe, mint a fenti két körülmények között. Ez az erősebb savas körülmények között; mind a GSH, mind a NAC tiol funkciója kizárólag protonált (semleges) formában található. Bár a protonált tiolok is nukleofil reagensként viselkedhetnek, reakcióképességük sokkal kisebb, mint deprotonált (negatív töltésű) származékaié.

Csak kis mennyiségű adduktot mutattak ki minden egyes kalkon-GSH/NAC inkubátum esetében. A (*Z*)-izomerek kromatográfiás csúcsterület-értékei hasonlóak voltak, mint a megfelelő inkubátumokban pH 8,0/7,4 és 6,3/6,8 mellett (1. és 2. táblázat).

A kalkonok GSH-val való reakciójának előrehaladási görbéi lineárisan lejtős alakot mutattak. A kromatográfiás csúcsterületek hasonló lineáris csökkenése volt megfigyelhető a NAC inkubációkban is.

Az inkubációs időszak alatt a kromatográfiás csúcsterületek a kalkon-GSH és a kalkon-NAC diasztereomerek esetében folyamatosan nőttek.

4.2. (*E*)-2-benzilidinbenzoszuberonok

4.2.1. Reakciók enyhén bázikus (pH 8,0/7,4) körülmények között

Kezdetben a **4a** és **4b** reakcióit bázikus körülmények között vizsgáltuk. A GSH (8,83) és a NAC (9,52) pKa értékét figyelembe véve a GSH molekulák mintegy 3,6%-a és a NAC molekulák 0,75%-a pH 7,4 körülmények között van ionizált formában, ami a tiolok reaktívabb formája.. A GSH-val és a NAC-val végzett reakció azt mutatta, hogy mindkét gyűrűs kalkon spontán reakcióképességgel rendelkezik a vizsgált tiolokkal. A GSH-val történő inkubációs idő (315 perc) végére a **4a** és **4b** alapvegyületeknek megfelelő HPLC-csúcs kezdeti területe 43,5%-kal,

illetve 26,3%-kal csökkent (3. táblázat). Míg, amikor a vegyületeket NAC-cal inkubáltuk, a megfelelő értékek 7,9% és 7,6% voltak (4. táblázat). A kiindulási kalkonok kromatográfias csúcsterületeinek változása az inkubációs idő függvényében azt jelezte, hogy az összetételek csak a NAC inkubáció esetén tükröznek egyensúlyi elegyösszetételeket.

3. táblázat A vizsgált gyűrűs kalkonanalógok (**4a** és **4b**) és GSH-adduktjaik² retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterülete (A).

pH^3	Összetett	t_R (E)-Kalkon	Terület arány ⁴ A_{315}/A_0	t_R (Z)- Chalcone	Terület (Z)- Chalcone	t_R GSH-1	Terület GSH-1	t_R GSH-2	Terület GSH-2
3.2	4a	17.1	0.89	16.8	55.1	14.8 ⁵	74.9	15.2 ⁵	111.5
3.2	4b	16.6	0.95	16.3	136.1	N/D ⁵	-	N/D ⁵	-
6.3	4a	17.0	0.84	16.7	446.6	14.6	297.2	15.1	331.8
6.3	4b	16.9	0.91	16.7	513.4	14.2	233.6	14.8	256.4
8.0	4a	17.4	0.57	17.1	302.8	15.0	2847.0	15.4	3216.3
8.0	4b	16.8	0.74	16.5	412.0	13.9	2584.9	14.6	2785.0

¹Retenciós idők percben;² adatok két független mérés átlagára vonatkoznak a 315 perces időpontban;³ a vizes tiolos oldat pH-értéke;⁴ a 0 és 315 percben mért csúcsterületek aránya;⁵ nem kimutatható.

4. táblázat A vizsgált gyűrűs kalkonanalógok (**4a** és **4b**) és NAC-adduktjaik² retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterülete (A).

pH^3	Összetett	t_R (E)-Kalkon	Terület arány ⁴ A_{315}/A_0	t_R (Z)- Chalcone	Terület (Z)- Chalcone	t_R NAC-1	Terület NAC-1	t_R NAC-2	Terület NAC-2
3.2	4a	17.1	0.76	16.8	124.1	N/D ⁵	-	N/D ⁵	-
3.2	4b	16.6	0.88	16.3	126.9	N/D ⁵	-	N/D ⁵	-
6.3	4a	17.5	0.93	17.2	118.9	16.3	60.0	16.5	513.9
6.3	4b	16.7	0.91	16.4	184.5	15.3	61.8	15.6	392.1
8.0	4a	17.5	0.92	17.2	467.5	16.3	477.7	16.5	913.4
8.0	4b	17.0	0.92	16.8	541.9	15.7	347.5	15.9	624.2

¹Retenciós idők percben;² az adatok két független mérés átlagára vonatkoznak a 315 perces időpontban;³ a vizes tiololdat pH-értéke;⁴ a 0 és 315 percben mért csúcsterületek aránya;⁵ nem kimutatható.

Az addíciós reakciók eredményeként két új királis centrum keletkezik. A két tiol eredendő kiralitását figyelembe véve négy diasztereomer addukt képződését vártuk. Az alkalmazott kromatográfias körülmények között azonban csak két különálló csúcsot lehetett kimutatni. Az analízis mindkét esetben a kevésbé poláris diasztereomerek enyhe túlsúlyát mutatta. A kiindulási kalkonok és GSH- és NAC-konjugátumaik szerkezetét HPLC-MS segítségével igazoltuk.

A két elkülönülő csúcs, a **GSH-1** és **GSH-2**, valamint a **NAC-1** és **NAC-2** növekedésének

időbeli alakulása jellegzetes különbségeket mutatott. A **4a** és **4b** GSH-adduktok esetében a csúcsterületek az idő múlásával közel lineárisan növekedtek. Az adduktok képződésének előrehaladási görbéi azonban némileg eltérő meredekséget mutattak, különösen a 105 perces időponttól kezdve. A NAC-adduktok esetében az előrehaladási görbék eltértek a linearitástól. A konkáv görbék görbületei a 75 perces időponttól kezdve eltérnek egymástól. Az inkubációs idő végén (315 perc) a GSH-inkubációk két csúcsának területe közel hasonló (arányuk 1,13 és 1,08 a **4a** és **4b** esetében). A NAC inkubációk esetében a megfelelő arányok 1,91 és 1,80 voltak (3. és 4. táblázat). Mind a négy inkubációban kimutatható volt a (Z)-kalkonok képződése is. A NAC inkubációk esetében a (Z)-csúcsok területe összehasonlítható a kalkon-NAC-adduktokéval (3. és 4. táblázat).

4.2.2. Reakció enyhén savas (pH 6,3/6,8) körülmények között

Mint korábban említettük, a gyűrűs kalkonok reakciója a két tiollal enyhén savas körülmények között (virtuális pH 6,8) utánozza a rákos sejtek celluláris miliójét. Ilyen körülmények között a GSH-molekulák mintegy 0,9%-a és a NAC-molekulák 0,2%-a található a reaktívabb tiolát formában. A kiindulási **4a** és **4b** kalkonok koncentrációjának (kromatográfiás csúcsterületének) változása párhuzamosságot mutat mindkét reakcióban. A GSH-val való inkubációs idő végére (315 perc) a **4a** és **4b** HPLC-csúcsának kezdeti területe 16,1%-kal, illetve 9,1%-kal csökkent. Míg a vegyületeket NAC-cal inkubáltuk, a megfelelő értékek 8,9% és 7,1% voltak. Ez utóbbi adatok nagyon közel állnak az enyhén bázikus körülmények között kapott értékekhez (3. és 4. táblázat).

A GSH inkubációkban a **4a-GSH** és a **4b-GSH** diasztereomerek elválasztott HPLC-csúcsterülete az idő múlásával szorosan párhuzamosan nőtt.

Az inkubációs időszak végén a kalkon-GSH adduktok két különálló csúcsának területének aránya közel egység (1,12 és 1,10 a **4a** és **4b** esetében) (3. táblázat).

Hasonló tendencia volt megfigyelhető a **4a** és **4b** NAC-2 csúcs (a magasabb retenciós idővel rendelkező csúcs) területével kapcsolatban is. Ugyanakkor a **4b** NAC-1 csúcsának kromatográfiás területe gyakorlatilag változatlan maradt, míg a **4a** kromatográfiás területe kissé nőtt.

Ennek eredményeként a NAC-2/NAC-1 területek aránya a 315 perces időpontban a **4a** és a **4b** esetében 8,57 és 6,34 volt. Mind a négy inkubációban a (Z)-kalkonok csúcsterületei összehasonlíthatóak a képződött adduktok területeivel. Mivel a kísérleti körülmények között a (Z)-izomerek egyetlen forrása a retro-Michael-reakció, feltételezhető, hogy a megfigyelt diasztereomer-eloszlások nem a kinetikailag kontrollált reakciók eredményeit tükrözik.

4.2.3. Reakció savas (pH 3,2/3,8) körülmények között

Erősebb savas körülmények között mind a GSH, mind a NAC tiol funkciója kizárólag protonált (semleges) formában létezik. Bár a protonált tiolok is nukleofil reagensként viselkedhetnek, reakcióképességük sokkal kisebb, mint deprotonált (negatív töltésű) társaiké.

A kalkon-GSH inkubációkban a reakciók előrehaladási görbéi (a kalkonok kezdeti területének csökkenése) nagyon enyhén lefelé irányuló lineáris alakot mutattak. Az inkubációk végén a **4a** és **4b** csúcsterületének kezdeti értékei 10,6%-kal, illetve 5,3%-kal csökkentek. Ezzel párhuzamosan a **4a-GSH** adduktok (1. és 2. csúcs) csúcsterületének lineáris növekedése volt megfigyelhető. A megfelelő **4b-GSH**-adduktoknak megfelelő csúcsokat nem lehetett kimutatni. A **4a-GSH** izomer csúcsok aránya (315 perces időpontban) 1,48 volt. A megfelelő (Z) izomerek területei sokkal kisebbek voltak, mint a pH 8,0 és pH 6,3 inkubációkban (3. táblázat).

A kalkon-NAC inkubációkban a kalkonok kezdeti területének csökkenése nagyon enyhén lejtő lineáris alakot mutatott, némileg eltérő meredekséggel. A **4a** és a **4b** kezdeti csúcsfelülete a 315 perces időpontra 23,7%-kal, illetve 12,1%-kal csökkent (4. táblázat). A 4-NAC-csúcsokat azonban nem lehetett azonosítani. Az inkubátumok HPLV-UV analízise több kis csúcs kialakulását mutatta, amelyek polárisabbak voltak, mint a kiindulási **4a** és **4b**. A HPLC-MS vizsgálatok a várt adduktképződést jelezték, de a HPLC-UV kromatogramokon nem lehetett azonosítani őket. Mindkét inkubációban megfigyelhető volt a (Z) izomer képződése (5. táblázat).

4.2.4. Molekulamodellelési jellemzés

Meghatároztuk a **4a**, **4b**, a metántiol (CH_3SH) és a deprotonált metántiol (CH_3S^-) molekuláris tulajdonságainak értékeit. A legmagasabb betöltött molekulapálya energiája (E_{HOMO}) a molekula elektronátadásra való képességét, a legalacsonyabb betöltetlen molekulapálya energiája (E_{LUMO}) az elektronbefogadásra mutató képességét mutatja. A két pálya közötti energiakülönbség ($\Delta E_{\text{LUMO-HOMO}}$) pedig a molekulák kémiai stabilitásával áll összefüggésben.

A kémiai potenciált, a kémiai keménységet és az elektrofilítást a következőképpen határozzuk meg: ($\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N}\right)_v$), ($\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2}\right)_v$), és ($\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$). η a molekulának az elektronsűrűség-eloszlás megváltoztatásával szembeni ellenállását jelzi, ami a **4c** esetében magasabb. Másrészt, μ a szabad energia változását jelzi, amikor elektronokat adunk hozzá, vagy veszünk el a molekulából. Ugyanakkor, ω a molekula elektrofilként való viselkedésre való hajlamának mérőszáma. A ω értéke az **1c** esetében nőtt, és μ csökkent a **4c**-hez képest.

Az elektronsűrűségnek a molekulafelületen történő eloszlásának ábrázolása céljából molekuláris elektrosztatikus potenciál (MEP) térképet készítettünk. A MEP-felületen a piros területek az elektronban gazdag és az elektrofil támadásra érzékeny helyeket jelölik. Ezzel szemben a kék területek az elektronhiányos területeket jelölik, és a nukleofil támadásra fogékony helyek. A CH_3S^- esetében a MEP vörös színű a deprotonálásból eredő egyszeres negatív töltés miatt.

A k_{OH} sebességi állandókat kiszámítottuk a minden vizsgált kalcinon esetén. Az eredmények azt mutatták, hogy a legmagasabb k_{OH} értékekkel rendelkező vegyületek nagyobb reaktivitásra utalnak. A reaktivitási potenciál sorrendje a következő volt: CH_3SH ($9,15 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), $\mathbf{1c}$ ($9,01 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) > $\mathbf{4c}$ ($7,85 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) > CH_3S^- ($5,48 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

4.2.5. Mikroszomális inkubáció

A $\mathbf{4b}$ mikroszomális inkubálását alameticin-aktivált patkánymáj-mikroszómával végeztük. Az alameticin egy peptid-antibiotikum, amely különböző alameticin-molekulák oligomerizációjával feszültségfüggő csatornákat képez a lipid kettős rétegekben. A kísérletek első három percében a $\mathbf{4b}$ -t patkánymáj-mikroszómákkal inkubáltuk alameticin jelenlétében. Mivel a kiindulási vegyületnek nincs hidroxil-szubsztituense, ebben az időszakban csak az oxidációs és redukciós reakciók lejátszódását vártuk. Ezután GSH-t adtunk az inkubátumokhoz. Ettől kezdve az anyavegyület és esetleges oxidatív metabolitjainak GSH-val történő reakciója is bekövetkezhetett. Ez utóbbi származékok spontán vagy GST-katalizált reakciókban keletkezhetnek.

A kontroll inkubátumok HPLC-MS-vizsgálata (mikroszóma hozzáadása nélkül) a várt $\mathbf{4b}$ -GSH adduktok képződését mutatta (5. táblázat). Az alkalmazott kromatográfiai körülmények között, a korábbi eredményekhez hasonlóan, két különálló kalcinon-GSH-csúcs jelent meg a kromatogramokon. A $\mathbf{4b}$ -GSH adduktok ($\mathbf{4b}$ -GSH-1 és $\mathbf{4b}$ -GSH-2) szerkezetét pozitív módú HR-MS-sel igazoltuk.

A GSH-konjugátumok mellett megfigyelhető volt a kiindulási (E)- $\mathbf{4b}$ (Z)-izomerjének képződése is. Mivel a reakcióelegyet fénytől elzárva tartottuk, a (Z)- $\mathbf{4b}$ képződése csak a képződött adduktok retro-Michael-reakciójával magyarázható. Az (E)- $\mathbf{4b}$ és a (Z)- $\mathbf{4b}$ szerkezetét a tiszta (E)- $\mathbf{4b}$ fényizomerizációjával kapott izomer keverék pozitív módú HR-MS alapján igazoltuk.

A két diasztereomer $\mathbf{4b}$ -GSH-csúcs AUC-értékének összege minden egyes időpontban magasabb volt, mint a megfelelő kontroll inkubátumban. Bár a négy diasztereomer ionizációs válaszfaktora nem ismert, a kontroll és a mikroszomális inkubátumokban mért AUC-értékek

közötti jelentős különbségek határozottan alátámasztják, hogy az alameticin-aktivált mikroszómák felgyorsítják a kalkon-GSH konjugációs reakciót (5. táblázat).

5. Táblázat. A **4b**, a **4b-GSH** izomer csúcsok és a **4b** oxidatív metabolitjainak HPLC-MS-csúcterülete (AUC) az inkubációs idő függvényében.

<i>Összetett</i>	<i>t_R</i> (min)	<i>Kontrol</i> <i>0 perc</i>	<i>Kontrol</i> <i>90 perc</i>	<i>Mikroszóma</i> <i>0 perc</i>	<i>Mikroszóma</i> <i>90 perc</i>
(E)-4b	13.8	4,093,677,464	2,215,039,743	8,297,984,438	3,815,982,269
(Z)-4b	13.32	495,826,994	299,494,818	856,426,548	550,348,953
4b-GSH-1	10.47	1,466,946	18,724,489	2,210,842	50,714,479
4b-GSH-2	10.86	2,493,046	12,017,553	4,293,434	61,264,226
Nor-4b	12.25	N/D	N/D	7,206,428	81,441,916
4b+O	11.93	N/D	N/D	11,740,789	44,057,081

A mikroszomális inkubátumok totálon MS spektrumának elemzése során két olyan terméket találtunk, amelyek képződését CYP-katalizált reakciókkal lehet magyarázni: egy oxidált **4b** (**4b+O**) és a demetilezett származékot (**nor-4b**). Mindkét csúcs AUC értéke folyamatosan nőtt az inkubációs idővel (5. táblázat). A képződött oxidált metabolit pontos szerkezete további vizsgálatot igényel. A lehetséges epoxid-metabolit GSH-adduktjának képződésének hiánya következtében azonban ésszerű feltételezni, hogy a képződött oxidált metabolit a **4b** hidroxilszármazéka. A **4b** demetilezési reakciója a megfelelő 4'-OH-származékot eredményezte. A HPLC-MS elemzés nem mutatta ki a megfelelő alkohol jelének jelenlétét.

5. Diszkusszió

A kalkonok és rokon vegyületek Michael-típusú tiolreaktivitása gyakran biológiai aktivitással jár együtt. Ezzel szemben számos példa bizonyítja, hogy a kalkonok nem kovalens kölcsönhatásai a sejtek makromolekuláival fontos szerepet játszhatnak a vegyületek biológiai hatásaiban. Egy QSAR-vizsgálat során Katsori és munkatársai megállapították, hogy a *clogP* paraméter fontos szerepet játszik a QSAR-kapcsolatokban. A szerzők úgy találták, hogy az elektronhatások elhanyagolhatók a vizsgált kalkonok daganatellenes hatásában. A nyílt láncú **1a** és **1b** azonban gyengébb citotoxicitással rendelkezik, mint a **4a** és **4b** vegyületek. Továbbá, a **4a** és **4b** citotoxicitása és sejtciklus-moduláló hatása jellegzetes különbségeket mutatott.

Az **1a**, **1b** kalkonok és hétagú ciklikus analógjaik, a **4a**, **4b** spontán reakcióképességének vizsgálata kimutatta, hogy mind a GSH, mind a NAC savas (pH 3,2/3,7, pH 6,3/6,8) és bázikus

(pH 8,0/7,4) körülmények között spontán reagál a vizsgált kalkonokkal. A kezdeti reakciók sebességét és az egyensúlyok összetételét azonban befolyásolta a reaktánsok jellege és az inkubációs elegyek pH-ja.

A 4-szubsztituensek hatásának elemzése bázikus (pH 8,0/7,4) vagy enyhén savas (pH 6,3/6,8) körülmények között azt mutatta, hogy a 4-metil-szubsztituált **1a** és **4a** mutatta a nagyobb kezdeti reakcióképességet. Az **1a** (144,9 ppm), **1b** (144,6 ppm), **4a** (138,0 ppm) és **4b** (137,7 ppm) C₁₀ atomjának ¹³C NMR eltolódása - amely az adott atommagok körüli elektronsűrűséget jelzi - nagyon hasonlóan bizonyult. A különböző szubsztituensekkel rendelkező kalkonok reakcióképességében megfigyelt különbség a tiol-adduktok stabilitásával magyarázható. Humphlett és munkatársai egy korai munkájukban kimutatták, hogy a kalkon-addukt α -hidrogénatomjának aktivitása, az eliminációval képződő enon rezonancia-stabilizációja és a tiolátion anionos stabilitása a meghatározó tényezője a fordított folyamatnak. A szerzők a α -keto és a β -fenil szubsztitúciót találták a hatékony reverz reakciók meghatározó tényezőinek. Mivel a 4-metoxi szubsztitúció hatékonyabban tudja növelni az elektronsűrűséget a szén-szén kettős kötésen, és a képződött kalkon rezonancia-stabilizált, az eliminációs folyamat hatékonyabb az **1b** (**4b**) esetében, mint az **1a** (**4a**) esetében. A megfigyelés tovább erősíti azt a korábban felvetett nézetet, hogy az eltérő reaktivitás (legalábbis részben) a tiol-adduktok eltérő stabilitásának eredménye lehet. Hasonlóan a megfelelő nyílt láncú kalkonokkal (**1**) azonos körülmények között kapott eredményekhez, a 4-metil-szubsztituált származék (**4b**) képezi a stabilabb adduktokat. Hasonló következtetéseket vontak le d'Oliveira és munkatársai néhány kalkon és merev kinolon analógjaik vizsgálata során.

A pH 6,3/6,7-es inkubációk során kapott eredmények hasonlóak a pH 8,0/7,4-es inkubációk eredményeihez (3. és 4. táblázat). Ilyen körülmények között mindkét inkubáció összetétele egyensúlyi keveréket képvisel. Mindkét körülmények között a **4a** konverziója mindkét tiol esetében valamivel magasabb.

A GSH inkubátumokban (315 perces időpont) a két elválasztott csúcs területének aránya a **4a** és **4b** esetében mindkét pH (pH 8,0/7,4 és 6,3/6,8) mellett közel volt az egységhez (3. táblázat). Ezzel szemben az **1a** és **1b** NAC-kal való reakcióinak HPLC-analízise a legkevésbé poláris diasztereomer különböző (1,8-8,57-szeres) feleslegét mutatta (4. táblázat). A megfigyelt diasztereoszelektivitást befolyásolta a 4-szubsztituens jellege és a pH. Így a metil-szubsztituált **4a** mindkét pH-értéknél nagyobb diasztereoszelektivitást mutatott. A diasztereoszelektivitás a pH csökkentésével nőtt (4. táblázat). Megemlítendő azonban, hogy a megfigyelt diasztereoszelektivitások nem tükrözik az addíciós reakciók diasztereoszelektivitását. (retro-

Michael-reakciók).

Savas körülmények között (pH 3,2/3,8) a megfelelő konjugátumok képződése kizárólag a protonált tiolformák nukleofil addíciójának köszönhető a polarizált szén-szén kettős kötések. A GSH inkubátumok megfelelő összetételének összehasonlítása azt mutatta, hogy az azonos szubsztituenssel rendelkező származékok hasonló GSH-reaktivitással rendelkeznek (4. táblázat). A NAC-kal való reakciók esetében azonban eltérő eredményeket kaptunk. A 315 perces százalékos konverzió a **4a** (23,7%) és a **4b** (12,1%) esetében magasabbnak bizonyult, mint a megfelelő nyílt láncú kalkonok **1a** és **1b** esetében (10,9%, illetve 1,5%) (6. táblázat). A HPLC-UV kromatogramokon azonban nem lehetett **4-NAC** adduktokat azonosítani. Ehelyett több kis, nem azonosított csúcs jelent meg. A HPLC-MS-elemzéssel sikerült azonosítani a várt konjugátumokat.

6. Táblázat. A kezdeti kalkon HPLC-UV csúcsok százalékos csökkenése az **1.** és **4.** sorozat 315 perces GSH és NAC inkubációs keverékeiben. *Az alábbiakban közzétett adatok a [77] alapján számítva.

<i>Összetett</i>	<i>pH</i>	<i>Reagens tiol</i>	<i>A kezdeti csúcsterület csökkenése (t=315 perc) (%)</i>	<i>Reagens tiol</i>	<i>A kezdeti csúcsterület csökkenése (t=315 perc) (%)</i>
1a	8.0/7.4	GSH	96.3*	NAC	94.8*
4a	8.0/7.4	GSH	43.5	NAC	7.6
1b	8.0/7.4	GSH	92.1*	NAC	90.2*
4b	8.0/7.4	GSH	26.3	NAC	7.9
1a	6.3/6.7	GSH	90.6*	NAC	75.6*
4a	6.3/6.7	GSH	16.1	NAC	7.1
1b	6.3/6.7	GSH	78.3*	NAC	53.3*
4b	6.3/6.7	GSH	9.1	NAC	9.0
1a	3.2/3.7	GSH	19.3*	NAC	10.9*
4a	3.2/3.7	GSH	10.6	NAC	23.7
1b	3.2/3.7	GSH	4.2*	NAC	1.5*
4b	3.2/3.7	GSH	5.3	NAC	12.1

Ami a gyűrűs szerkezet hatását illeti, a héttagú gyűrű beépítése a kalkon molekuláriszbe csökkentette a spontán tiol-reaktivitást (6. táblázat). Mivel a tiolok és az aromás szubsztituensek azonosak voltak, a két sorozat reakcióképességében megfigyelt különbségeket a gyűrűs szerkezet magyarázhatja. Amslinger és munkatársai az α -pozícióban különböző szubsztituensekkel rendelkező kalkonok tiol-reaktivitását vizsgálták. A származékok tiolreaktivitásának kinetikáját összefüggésbe hozták néhány biológiai hatásukkal, amelyek közvetlenül a Michael-akceptor képességükhöz kapcsolódnak. Például a 2',3,4,4'-

tetrametoxikalkon (TMC) α -metil-szubsztitúciója csökkentette, az α -ciano szubsztitúció jelentősen növelte a nem szubsztituált TMC tiolreaktivitását. E korábbi megfigyelések alapján ésszerű feltételezni, hogy a **4a** és **4b** benzoszuberon-származékok csökkent reaktivitása az α -alkil-szubsztitúció és a gyűrűs szerkezet által okozott konformációs feszülés együttes hatásának a következménye. További kutatásokra van szükség a gyűrű elektronikus és sztereokémiai hatásainak számszerű jellemzésére.

Az addíciós reakció eredményeként, az **1a** és **1b** nyílt láncú vegyület esetében két diasztereomer addukt képződése lehetséges. Bár az alkalmazott kromatográfiai körülmények között a GSH-adduktok nem szeparálódtak, a NAC-reakciói során mindkét diasztereomer kimutatható volt. Ezekben a reakciókban diasztereoselektivitás volt megfigyelhető; a kevésbé poláros diasztereomer 1,7-1,2-szer volt kedvezőbb, mint a másik addukt (2. táblázat). A szelektivitás mértéke fordított arányosságot mutatott a pH-val, valamint a szubsztituensek természetével.

A fenti eredmények további bizonyítékkal szolgálnak egy hattagú, hidrogénkötésekkel stabilizált ciklikus intermedier, mint köztes termék, kialakulásának alátámasztására a kalkonok protonált tiolokkal való reakciója során. Ezt az elképzelés a GSH és egy 4'-hidroxikalkon bisz-Mannich-származékok reakciójában került publikálásra. Ez alapján, magyarázatunk szerint a planáris enon molekulacsoport *Re-oldalát* támadja meg a protonált tiol, hattagú köztiterméket képezve, amiben a nagy kiterjedésű arilgyűrű pszeudoekvatoriális pozíciót foglal el.

A **4a** és **4b** gyűrűs kalkonok GSH-addíciós reakcióinak eredményeként négy diasztereomer addukt képződhet. A GSH és a NAC inherens kiralitásából adódóan két *cisz*- és két *transz*-addukt képződik.

Korábban Armstrong és munkatársai beszámoltak a GSH és az (*E*)-(4'-X-fenil)-3-butén-2-one (PBO) nyílt láncú kalcion analógok GSTM 4-4-katalizált reakciójának sztereokémiájáról. A reakciókban nagyobb mennyiségben képződtek a polárisabb GSH-adduktok. A PBO-GSH és a **4-GSH** adduktok diasztereomer párjainak HPLC elválasztási eredményei alapján feltételezhető, hogy a jelen reakciókban képződött két szeparálódó csúcs a diasztereomer *cisz* és *transz* adduktoknak felel meg.

A retro-thia-Michael-reakciók a megfelelő (*Z*)-izomerek képződését is eredményezhetik. Ezért, hiteles referencia (*Z*)-izomerek előállítása érdekében, az **1** és **4** sztereokémiailag homogén (*E*)-izomerjeit, a korábban publikált körülmények között, fény-inicializált izomerizációnak vetettük alá. Ennek eredményeként, a HPLC-MS adatok megegyeztek a megfelelő (*Z*) izomerekével. Mivel a kísérleteket fény kizárásával végeztünk, feltételezhető,

hogy a megfigyelt (*E*)/(*Z*) izomerizáció egyetlen forrása a retro-thia-Michael-reakció lehetett.

A **4a** és **4b** reakciók esetében mindkét tiol reakcióiban viszonylag nagy mennyiségű (*Z*)-izomer volt detektálható. Mind enyhén bázikus, mind enyhén savas körülmények között a kiindulási vegyületek mennyiségének a reverzibilis reakcióinak nettó változásai következtében bekövetkező csökkenése volt megfigyelhető. A (*Z*)-izomerek HPLC-csúcsterületei azonban az **1a** és **1b** esetében igen alacsony volt (<100 mAU 315 perc alatt).

A kalkonok (**1**) és héttagú gyűrűs analógjaik (**4**) különböző reakcióképességére vonatkozó fizikai-kémiai tulajdonságok megismerése érdekében számításokat végeztünk az **1c**, **4c**, - és mint modell tiolok – a **CH₃SH** és **CH₃S⁻** HOMO és LUMO molekulapálya energiáit és néhány elektrofil reakcióképességének paramétereinek megismerése céljából. A Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) elmélet szerint a nukleofil-elektrofil reakciók lehetőleg hasonló keménységű vagy lágyaságú elektrofilek és nukleofilek között játszódnak le. Az α,β -telítetlen keton esetében a karbonil oxigénatom elektronokat szív el a C₂=C₁₀ kötéstől – így elektronhiányt hoz létre a C₁₀ atomon - a nukleofil támadás legvalószínűbb helyén. A metántiol esetén a nukleofil támadás a kénatomon történik. Az **1c** és **4c** vegyületek esetén a karbonil oxigénatom nagy negatív töltéssűrűséggel rendelkezik, ami Lewis-bázis viselkedésre utal. Ezzel szemben a kék színnel megjelenő alacsonyabb töltéssűrűségű területek a molekulák Lewis-savas viselkedését jelzik.

A LUMO-energiák összehasonlítása azt mutatta, hogy az **1c** (-35,98 kcal/mol) savasabb, mint a **4c** (-28,44 kcal/mol). A **CH₃SH** LUMO-energiája (-2,979 kcal/mol), ami a deprotonált formában (**CH₃S⁻**) 77,99 kcal/mol értékre nő. Ezeket a tulajdonságokat a további meghatározott paraméterek is tükrözik. A molekula modellezési számítások tehát a kísérleti eredményeket alátámasztó adatokkal szolgáltak. Az **1a** és **1b** egyensúlyi (egyensúlyközeli) összetételei magasabb termékarányt mutatnak, mint a **4a** és **4b** gyűrűs kalkonanalógoké.

A mikroszomális inkubációk során megfigyelt **4b-GSH** képződése megerősítette az *in vitro* inkubációik eredményeit. A mikroszomális inkubátumok elemzése megerősítette a **4b-GSH** adduktok jelenlétét. A konjugátumok mennyisége minden mintavételi időpontban jelentősen nagyobb volt, mint a kontroll inkubátumé. Ebből arra lehet következtetni, hogy az alameticin-aktivált mikroszóma felgyorsította a kalkon-GSH konjugációt. Mivel a **4b** vegyület egy viszonylag lipofil kalkonanalóg, mind a mikroszomális glutation-transzferázok (MGST-k), mind az úgynevezett mikroszómához kapcsolódó GST enzimek szubsztrátja lehet. Ez utóbbi GST-formák a mikroszomális külső membránhoz kapcsolódnak, és jellemzőik hasonlítanak a citoszolikus GST enzimekéhez.

A mikroszomális inkubátumok total ionkromatogramjainak elemzése során két olyan terméket találtunk, amelyek képződését CYP-katalizált reakciókkal lehet magyarázni: egy oxidált **4b** (**4b+O**) és a demetilezett származékot (**nor-4b**). Mindkét származék AUC értéke párhuzamosan nőtt az inkubációs idővel. A képződött oxidált metabolit pontos szerkezete további vizsgálatokat igényel. A lehetséges epoxid-metabolit GSH-adduktjának képződésének hiánya alapján azonban ésszerű feltételezni, hogy a képződött oxidált metabolit a **4b** hidroxilszármazéka. A **4b** demetilezési reakciója a megfelelő 4'-OH-származékot eredményezte. A 4'-OH-metabolittal (**nor-4b**) végzett korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a vegyület hatással van a mitokondriális légzési funkciókra. A vegyület foszforilációt gátló hatása és/vagy részleges szétkapcsolása a mitokondriális aktivitás stimulációját és fokozott ROS-képződést eredményezett. A mikroszomális inkubációban nagy mennyiségű (*Z*)-izomer képződése szintén hozzájárulhat a vegyület megfigyelt biológiai hatásaihoz. Továbbá, a **4b** GSH-reaktivitása részt vehet a vegyület korábban bejelentett apoptotikus hatásában.

6. Következtetések

Mindkét kalkon **1a**, **1b** és héttagú ciklikus analógjaik (**4a**, **4b**) fiziológiás (pH 7,4) körülmények között intrinsic reaktivitást mutattak GSH-val és NAC-val szemben. A nyiltlancú kalkonok reaktivitása nagyobb volt, mint a gyűrűs analógoké. Ezen túlmenően, a vegyületek reakcióképességét a benzilidén-csoport 4-es helyzetében található aromás szubsztituens is befolyásolta. Ezek a megfigyelések alapul szolgálnak más, optimalizált tiol-reaktivitással rendelkező kalkon/gyűrűs kalkonszármazékok tervezéséhez és szintetizálásához.

A **4b** mikroszomális biotranszformációja azt mutatta, hogy a vegyületet a CYP és a GST enzimek képesek metabolizálni. A CYP által katalizált átalakulások eredményeként egy monooxigénezett (**4b+O**) és egy demetilált (**nor-4b**) metabolitot azonosítottunk. Ezenkívül jelentős mennyiségű (*Z*)-**4b**-t is azonosítottunk az inkubálásokban. Mivel a kiindulási vegyület (*Z*)-izomerjének háromdimenziós szerkezete, konjugációja és lipofilitása eltérő, ennek az izomernek a kialakulása szerepet játszhat a vegyület megfigyelt biológiai hatásaiban.

Továbbá, a **4b** GSH-reaktivitása befolyásolhatja a vegyület biohasznosulását. A celluláris GSH-szintet megváltoztató reakciók részt vesznek a vegyületek korábban leírt apoptotikus hatásában is. Meg kell azonban említeni, hogy bár a **4a** és **4b** tiolreaktivitása hasonló, a legtöbb vizsgált daganatos sejtvonalal szemben a két vegyület citotoxicitásban két nagyságrendű különbség volt megfigyelhető.

A kalkonok daganatellenes hatása összefügg azzal a képességükkel, hogy számos molekuláris célpontra hatnak, mint például: ABCG2, tubulin, aktivált nukleáris B-sejt

növekedés (NF- κ B), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), tirozin kináz receptor (EGFR), mezenchimális. epiteliális átmeneti faktor (MET), 5- α -reduktáz, ACP-reduktáz, hiszton-deacetiláz, p53, CDC25B (protein tirozin-foszfátáz), retinsav-receptorok, ösztrogén topoizomeráz receptorok és MDM2. A jelenlegi és korábbi eredményeinket figyelembe véve feltételezhető, hogy a **4a** és **4b** eltérő biológiai hatásainak molekuláris alapja a vegyület nem kovalens kölcsönhatásaival függ össze.

7. Publikációk és poszter bemutatások

A dolgozat tárgyához kapcsolódó publikációk száma: 4

A dolgozat tárgyához nem kapcsolódó publikációk száma: 2

A témához kapcsolódó szóbeli előadások és poszter bemutatások száma: 6

A Ph.D. disszertáció témájához kapcsolódó publikációk impact faktorainak összege: 11.135

A Ph.D. értekezés témájához kapcsolódó publikációk:

1. Perjési, P.; Caridad, N.P.; Aline, B.; Giulio, D. d'Oliveira; Kenari, F. The Chemistry of GST-Catalyzed Reactions. In *Glutathione: Biosynthesis, Functions and Biological Implications*; Perjési, P., Ed.; Nova Science Publishers: Hauppauge, New York, **2019**; pp. 373–403. ISBN 978-1-5361-4740-7.
2. Kenari, F.; Molnár, S.; Perjési, P. Reaction of Chalcones with Cellular Thiols. The Effect of the 4-Substitution of Chalcones and Protonation State of the Thiols on the Addition Process. Diastereoselective Thiol Addition. *Molecules* **2021**, *26*, 4332. doi:10.3390/molecules26144332.
3. Kenari, F.; Molnár, S.; Pintér, Z.; Bitaraf, S.; Perjési, P. (*E*)-2-Benzylidenecyclanones: Part XVII. An LC-MS Study of Microsomal Transformation Reactions of (*E*)-2-[(4'-Methoxyphenyl) Methylene]-Benzosuberone-1-One: A Cyclic Chalcone Analog. *J. Pharm. Biopharm. Res.* **2023**, *4*, 326–339, doi:10.25082/JPBR.2022.02.004.
4. Kenari, F.; Molnár, S.; Borges, I.D.; Napolitano, H.B.; Perjési, P. (*E*)-2-Benzylidenecyclanones: Part XVIII Study the Possible Link between Glutathione Reactivity and Cancer Cell Cytotoxic Effects of Some Cyclic Chalcone Analogs A Comparison of the Reactivity of the Open-Chain and the Seven-Membered Homologs. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8557. <https://doi.org/10.3390/ijms24108557>.

A Ph.D. dolgozat tárgyához nem kapcsolódó publikációk:

1. Sadighpour, T.; Mubarak, M.; Sabaeifard, P.; Saeifar, S.; Kenari, F. COVID-19 and Renal Involvement; Evolving Role of Thromboinflammation, Vascular and Glomerular Disease in the Pathogenesis. *J. Nephropathol.* **2021**, *10*. doi:10.34172/jnp.2021.23.
2. Rozmer, Z.; Kenari, F.; Tyukodi, L.; Kulcsár, G.; Huber, I.; Perjési, P. A PTE GYTK Gyógyszerészi Kémiai Intézetben folyó kutatásokról I. Szerkezet-reaktivitás és szerkezet-hatás vizsgálatok. *Magy. Kém. Foly. Kém. Közl.* **2022**, *128*, 53–59. doi:10.24100/MKF.2022.02.53.

Szóbeli előadások és poszter bemutatások:

1. Kenari, F.; Perjési, P. Study on Interaction of Reduced Glutathione (GSH) with Cyclic Chalcone Analogs.; [s.n.], Ed.; Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar: Pécs, 2018; p. [36]-[36].
2. Kenari, F.; Perjési, P. Study of Interaction of Reduced Glutathione (GSH) with Chalcone and Some Cyclic Chalcone Analogues. *Acta Pharm. Hung.* **2017**, *87*, 156–157.
3. Perjési, P.; Almási, A.; Kenari, F.; Kuzma, M.; Fliszár-Nyúl, E. Non-Enzyme Catalyzed Metabolic Transformations of Xenobiotics. *Acta Pharm. Hung.* **2017**, *87*, 113.
4. Kenari, F.; Molnár, S.; Kulcsár, G.; Perjési, P. Study of Interaction of Reduced Glutathione (GSH) with Some Chalcone Analogues. In VIII. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2019: Absztrakt kötet. 8th Interdisciplinary Doctoral Conference 2019: Book of Abstracts; Bódog, F., Csiszár, B., Eds.; Pécsi Tudományegyetem Doktorandusz Önkormányzat, Pécs, 2019; pp. 122–122. ISBN 978-963-429-374-3.
5. Kenari, F.; Bernardes, A.; Noda, P.C.; Molnár, S.; Kulcsár, G.; Perjési, P. Study of Interaction of Reduced Glutathione (GSH) with Some Chalcone Analogs in Vitro and in Vivo. *Acta Pharm. Hung.* **2020**, *90*, 123–124.
6. Kenari, F.; Perjési, P. Study on Interaction of Reduced Glutathione (GSH) with Cyclic Chalcone Analogues.; Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság (MGYT): Budapest, 2018; p. abstract.

8. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Perjési Pálnak az évek alatt nyújtott támogatásáért. Hasznos tanácsai nagyban hozzájárultak a dolgozat elkészítéséhez, és gazdagította a témával kapcsolatos megértésemet.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani a Gyógyszerészi Kémiai Intézet vezetőjének, Dr. Rozmer Zsuzsannának, valamint az Intézet munkatársainak, akik az elmúlt évek során segítettek a munkámat.

Férjemnek, Patrick-nek, a kitartó támogatásáért és türelméért.

Végül hálával tartozom szüleimnek Dr. Fallahkohan Leyla-nak és Kenari Alireza-nak, hogy mindvégig hittek bennem és arra ösztönöztek, hogy leküzdjem a korlátaimat.