

perjesi.pal_370_25

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A SZERKEZET, LIPOFILITÁS, TIOL-REAKTIVITÁS ÉS DAGANATSEJT
CITOTOXICITÁS KÖZÖTTI KAPCSOLATOK TANULMÁNYOZÁSA
KALKONOK ÉS GYŰRŰS KALKON-ANALÓGOK KÖRÉBEN

PERJÉSI PÁL

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
GYÓGYSZERÉSZI KÉMIAI INTÉZET



2025

perjesi.pal_370_25

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés	1
2. A kutatási terület háttere	5
2.1. Kalkonok és kalkon-analógok szintézise és sztereokémiája	5
2.1.1. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok szintézise	5
2.1.2. Kalkonok és kalkon-analógok sztereokémiai jellemzése	8
2.1.2.1. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok ^1H NMR spektroszkópiai jellemzői	8
2.1.2.2. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok IR spektroszkópiai jellemzői	9
2.1.3. Kalkonok és kalkon-analógok UV-VIS és fluoreszcencia spektroszkópiai jellemzői	10
2.2. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok fizikai-kémiai jellemzése	11
2.2.1. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok tér és elektronszerkezetének vizsgálata lineáris szabadenergia összefüggések alkalmazásával	11
2.2.1.1. A Hammett egyenlet	12
2.2.1.2. IR spektroszkópiai vizsgálatok	14
2.2.1.3. ^{13}C NMR spektroszkópiai vizsgálatok	16
2.2.2. Kalkonok és kalkon-analógok reaktivitása	17
2.3. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok gyógyszerészeti jellemzése	20
2.3.1. Lipofilitás	20
2.3.2. Kalkonok és kalkon-analógok intesztinális abszorpciója és metabolikus transzformációi	21
2.4. Kalkonok és gyűrűs kalkon analógok daganatellenes hatásai	24
2.4.1. Nem-kovalens kölcsönhatásokon alapuló hatások	26
2.4.2. Tiol-reaktivitáson alapuló hatások	28
3. Célkitűzések	30
4. Módszerek	31
5. Eredmények és diszkusszió	38
5.1. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok szintézise, sztereokémiája [D2,D4-D14]	38
5.1.1. Szintézis, IR, NMR és röntgenkristallográfiai vizsgálatok [D4-D14]	38
5.1.2. Karbociklusos kalkon-analógok fény-inicializált (<i>E</i>)/(<i>Z</i>)-izomerizációjának vizsgálata [D16,D17]	41
5.2. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok UV-VIS spektroszkópiajellemzése [D18-D20]	44
5.3. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok tér és elektronszerkezetének vizsgálata IR és ^{13}C NMR módszerekkel [D15,D121]	46
5.3.1. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok tér és elektronszerkezetének vizsgálata IR spektroszkópiai módszerrel [D15]	47
5.3.2. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok tér és elektronszerkezetének vizsgálata ^{13}C NMR spektroszkópiai módszerrel [D15,D21]	48

5.4. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok gyógyszerészeti jellemzése [D22-D26]	51
5.4.1. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok lipofilitásának meghatározása [D22-D25]	51
5.4.2. Kalkonok intesztinális eliminációjának és metabolizmusának vizsgálata [D26]	56
5.5. Kalkonok és gyűrűs kalkon analógok daganatellenes hatásai	62
5.5.1. (<i>E</i>)-2-(4'-X-benzilidén)-1-cikloheptanonok és karbociklusos kalkon-analógok <i>in vitro</i> daganatsejt citotoxicitásának szerkezet-hatás vizsgálata [D5,D9]	62
5.5.2. Heterociklusos kalkon-analógok <i>in vitro</i> daganatsejt citotoxicitásának szerkezet-hatás vizsgálata [D11]	64
5.5.3. Az (<i>E</i>)-2-(4'-metilbenzilidén)-1-benzoszuberone (7b) és (<i>E</i>)-2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberone (7c) sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata [D28]	68
5.5.4. Ferrocenil-kalkonok szintézise és daganatellenes hatásának szerkezet-hatás vizsgálata [D8,D25,D29]	72
5.5.5. Az (<i>E</i>)-2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberone (7c) <i>in vivo</i> kemopreventív hatásának vizsgálata	73
5.5.5.1. Génexpressziós vizsgálatok [D30]	73
5.5.5.2. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok <i>in vitro</i> CYP1A gátló hatásának szerkezet-hatás vizsgálata [D31]	76
5.6. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok tiol-reaktivitásának vizsgálata	78
5.6.1. <i>In vitro</i> sejtkultúrában végzett vizsgálatok [D32]	78
5.6.2. Sejtmentes körülmények között végzett vizsgálatok	80
5.6.2.1. Kalkonok	81
5.6.2.1.1. 4'-szubsztituált kalkonok [D33]	81
5.6.2.1.2. 4'-hidroxikalkonok és bisz-Mannich-származékaik [D34,D35]	87
5.6.2.1.3. 2'-Szulfonamido-nitrokalkonok és gyűrűs származékaik [D36]	93
5.6.2.2. Karbociklusos kalkon analógok	98
5.6.2.2.1. (<i>E</i>)-2-(4'-X-benzilidén)-1-benzoszuberone [D37,D38]	99
5.6.2.2.2. (<i>E</i>)-2-(4'-X-benzilidén)-1-tetralone [D39]	103
6. Összefoglalás	108
7. Eredmények hasznosíthatósága	111
8. Irodalomjegyzék	113
8.1. Irodalomjegyzék I	113
I.D. Az értekezés alapját képező közlemények	113
I.S. Az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények	117
I.N. Az értekezés témájához nem kapcsolódó saját közlemények	120
8.2. Irodalomjegyzék II.	128
9. Köszönetnyilvánítás	146

Rövidítések jegyzéke**Rövidítés****Teljes kifejezés**

A	terület (<i>area</i>)
A549	humán alveoláris hámsejt adenokarcinóma sejtvonal
ACN	acetonitril
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATPáz	adenozin-trifoszfátáz
a.u.	önkéntes egység (<i>arbitrary unit</i>)
Caco-2	humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonal
CEM	humán T-limfoblasztóma sejtvonal
CHX	ciklohexán
clog P	számított log P
COX	ciklooxygenáz (enzim)
CYP	citokróm P450 (enzim)
DMBA	7,12-dimetil[a]benzantracén
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
(<i>E</i>)	<i>transz</i> (<i>entgegen</i>)
E_s	szterikus szubsztituensállandó
ESI	elektroporlasztásos ionizáció
FCS	fötális borjú szérum (<i>fetal calf serum</i>)
FID	lángionizációs detektor (GC)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FLD	fluoreszcenciás detektor
FT	Fourier transzformáció
G_0	a sejtosztódás "nyugalmi" szakasza
G_1	a sejtosztódás első növekedési szakasza
G_2	a sejtosztódás második növekedési szakasza
GC	gázkromatográfia
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation (glutation-diszulfid)
GST	glutation-S-transzferáz (enzim)
GSTM	mű-típusú glutation-S-transzferáz (enzim)
HeLa	humán méhnyak karcinóma sejtvonal
HOMO	legmagasabb energiájú betöltött molekulapálya
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HTC-116	humán kolorektális epiteliális karcinóma sejt
IC ₅₀	50%-os gátlási koncentráció
ICT	intramolekuláris töltésátvitel
IkB	a nukleáris faktor kappa B transzkripció faktor gátló fehérjéje

IR	infravörös (<i>infrared</i>)
Jak	Janus-kináz
Jak/STAT	gyulladásokat, immunválaszokat vérképzést szabályozó jelátviteli útvonal
k'	kromatográfiás retenció tényező
L1210	egér limfocitikus leukémia sejtvonal
$\log P$	megoszlási hányados tízes alapú logaritmus
LUMO	legalacsonyabb energiájú üres molekulapálya
M	a sejtosztódás mitózis és citokenézis szakasza
MCF-7	humán ösztrogén receptor negatív emlő adenokarcinóma sejtvonal
MDA-MB-231	humán ösztrogén receptor negatív emlő adenokarcinóma sejtvonal
MeOH	metanol
Molt 4/C8	humán T-limfoblasztóma sejtvonal
MR	szterikus és polarizálhatósági szubsztituensállandó
MS	tömegspektrometria (<i>mass spectrometry</i>)
mtsai	munkatársai
NF- κ B	nukleáris faktor-kappa B (transzkripció faktor)
NMR	mágneses magrezonancia (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NAC	N-acetilcisztein
NOE	nukleáris Overhauser effektus
NAD(P)H	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid(-foszfát)
Nrf2	transzkripció faktor
Nrf2-Keap1	antioxidáns gének expresszióját szabályozó jelátviteli útvonal
P388	egér limfoid neoplazma sejtvonal
PC-3	humán prosztata karcinóma sejtvonal
pH	hidrogénion-kitevő (<i>pondus Hydrogenii</i>)
PI	propídiu-jodid
pK_s	savi disszociációs állandó tízes alapú negatív logaritmus
RF VRK	fordított (reverz) fázisú vékonyrétegekromatográfia
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigénszármazékok
RPMI	sejtkultúra tápoldat
R_f	kromatográfiás retenció faktor
R_M	kromatográfiás retenció kapacitás
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (<i>reverse phase high performance liquid chromatography</i>)

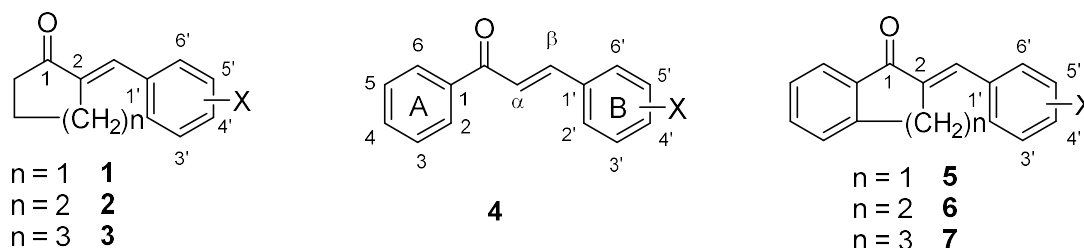
SF-295	humán glioblasztóma sejtvonala
STAT	jelátviteli és transzkripció aktivátor
TOL	toluol
TPSA	topológiai poláris felület
t_R	kromatográfiás retenció idő
TRIS	<i>tris</i> (hidroximetil)-aminometán
UV	ultraibolya
UV-VIS	ultraibolya-látható (fény)
VRK	vékonyréteg kromatográfia
(Z)	<i>cisz</i> (<i>zusammen</i>)

1. Bevezetés

MTA doktori dolgozatomban az MTA kandidátusi fokozat [1] megszerzését követő kutatómunkám eredményeit foglaltam össze. A kutatási eredmények legnagyobb hányada a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Kémiai (ma Orvosi és Biokémiai) és Gyógyszerészi Kémiai Intézeteiben végzett munkáimmal kapcsolatos. A kandidátusi fokozatom megszerzését követően a szintetikus munkákat egyedül végeztem. A vegyületek szerkezetvizsgálata, biológiai hatásainak vizsgálata egyrészt a PTE ÁOK Orvosi Kémiai, majd a PTE GYTK Gyógyszerészi Kémiai Intézetben, másrészt hazai és nemzetközi kooperációkban történt.

A Gyógyszerészi Kémiai Intézet megalakulását (2002) követő első években szintetikus munkáimat Sohár Pál professzor kutatócsoportján belül, az ő laboratóriumában folytattam. 2004 évtől kezdődően tudtam megalakítani kutatócsoportomat. Idővel laboratóriumi tevékenységem jórészt a kísérletek tervezésére, beállítására, a munkatársak munkáinak irányítására és a kísérletek eredményeinek kiértékelésére szűkölt. Ezeknek megfelelően a dolgozatban az eredményeket többes szám első személyben mutatom be.

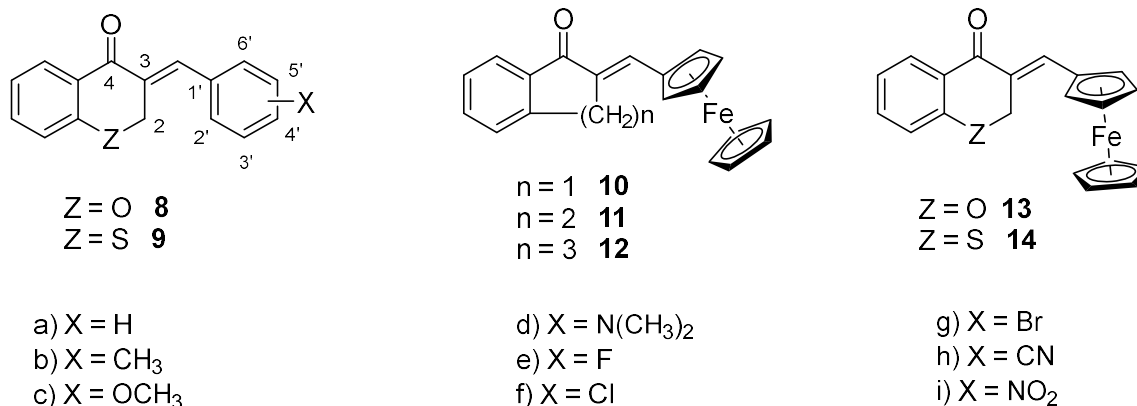
A kandidátusi munkám során kalkonok (**4**) és különböző gyűrűtagszámú (*E*)-2-benzilidén-1-cikloalkanonok (**1-3**) és (*E*)-2-benzilidénbenzociklo-1-alkanonok (**5-7**) (1. ábra) ditiokarbaminsavval és tiokarbamidészarmazékokkal lejátszódó reakcióit vizsgáltam. A gyűrűzárási reakciók eredményeként pirimidin- és 1,3-tiazin-származékokat szintetizáltam. Az **1-3** vegyületek tiol-reagenssel lejátszódó reakcióinak sztereokémiája a gyűrűtagszám és a reakcióközeg savassága függvényében változásokat mutatott [1]. (Megjegyzés: Bár a kalkonok IUPAC nevezéktan szerinti számozása különbözik az 1. ábrán feltüntetett számozásoktól (az 1'-6' pozíciók az A-gyűrű szubsztituenseinek helyzetét jelölik), a **4** vegyületek és gyűrűs analógjaik (**5-9**) spektroszkópai és reaktivitásbeli vizsgálatai eredményeinek egyszerűbb összehasonlítása érdekében, a dolgozatban az 1'-6' pozíciók a kalkonok (**4**) B-gyűrűjének pozícióit jelölik.)



1. ábra. A szintetizált (*E*)-2-benzilidén-1-cikloalkanonok (**1-3**), kalkonok (**4**) és (*E*)-2-benzilidén-1-benzocikloalkanonok (**5-7**) szerkezete

Kandidátusi vizsgálataim folytatásaként, kezdetben elsősorban szintetikus munkákat végeztem. E munkák elsődleges célkitűzése a korábban vizsgált kalkonok (**4**) és a vegyületek különböző gyűrűtagszámú analógjainak tekinthető (**5-9**) származékok szerkezet-daganatsejt citotoxicitás, valamint szerkezet-reaktivitás

összefüggéseinek vizsgálata volt. A vegyületek egy a korábbiaktól némileg különböző szerkezeti csoportját képezték a benzilidén-molekularésztt ferrocenilidén-molekularésszel helyettesített származékai (**10-14**) (2. ábra).



2. ábra. A szintetizált heterociklusos kalkon-analógok (**8,9**) és kalkon-ferrocén hibridek (**10-14**) szerkezete

Munkám kezdetén, Jonathan Dimmock (University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada) professzorral történt együttműködés keretében, a szintetizált vegyületek *in vitro* daganatsejt citotoxikus hatását egér P388 és L1210 leukémia sejtekkel, humán Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal, valamint további mintegy 60, különböző humán szervből származó tumor sejtvonallal szemben vizsgáltuk.

A kalkonok szubsztituált 1,3-difenil-2-propenon-származékok, melyek megismert biológiai hatásai a lipofil tulajdonságú 1,3-difenil-2-propenon alapszerkezet részvételével kialakuló nem-kovalens kölcsönhatások, az aromás gyűrűk elektrofil reaktánsokkal, és/vagy a polarizált szén-szén kettős kötés nukleofil centrumokkal játszódó reakciói eredményeként alakulnak ki [2].

A nem-kovalens kölcsönhatások között jól dokumentált a kalkonok néhány enzimmel (pl. CYP1A, topoizomeráz II), tubulinnal és DNS-sel kialakított kölcsönhatása. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a kialakításában fontos szerepet játszik a vegyületek tér- és elektronszerkezete, valamint lipofil tulajdonsága [3]. A konjugált kalkonok tér- és elektronszerkezete egymással szoros összefüggést mutat. A két hatás egyidejű vizsgálatának egyik gyakran alkalmazott módszere az aromás szubsztituenseknek a konjugált rendszer tér- és elektronszerkezetére gyakorolt hatásainak spektroszkópiai módszerekkel történő vizsgálata. Vizsgálataink során IR és ^{13}C NMR spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk. A vegyületek lipofilitásának jellemzését RF-VRK és HPLC-UV-Vis módszerekkel végeztük.

Az **5-7** vegyületek daganatsejt citotoxikus hatásának megismerését követően *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokat terveztünk az egyik legkiemelkedőbb hatású származék (**7c**) és egy kevésbé hatékony analógja (**7b**) lehetséges molekuláris mechanizmusainak megismerése céljából. E munkák keretében célul tűztük ki a két vegyület Jurkat T sejtek sejtciklusára és tiol-státuszára gyakorolt hatásának vizsgálatát.

A **7c** származék *in vivo* daganatellenes hatását a vegyület 7,12-dimetil[a]benzantracén (DMBA) által kiváltott génexpressziókra gyakorolt hatása alapján vizsgáltuk. A genotoxikus karcinogén DMBA által kiváltott génexpressziók nagyfokú csökkenése alapján feltételeztük, hogy a vegyület gátolja a DMBA CYP-enzimek által metabolikus aktiválódását. Ezt az *in vivo* kísérleteken alapuló feltételezést a **7c** és analógjaik CYP1A enzimaktivitásra gyakorolt gátló hatásának *in vitro* vizsgálata alátámasztotta.

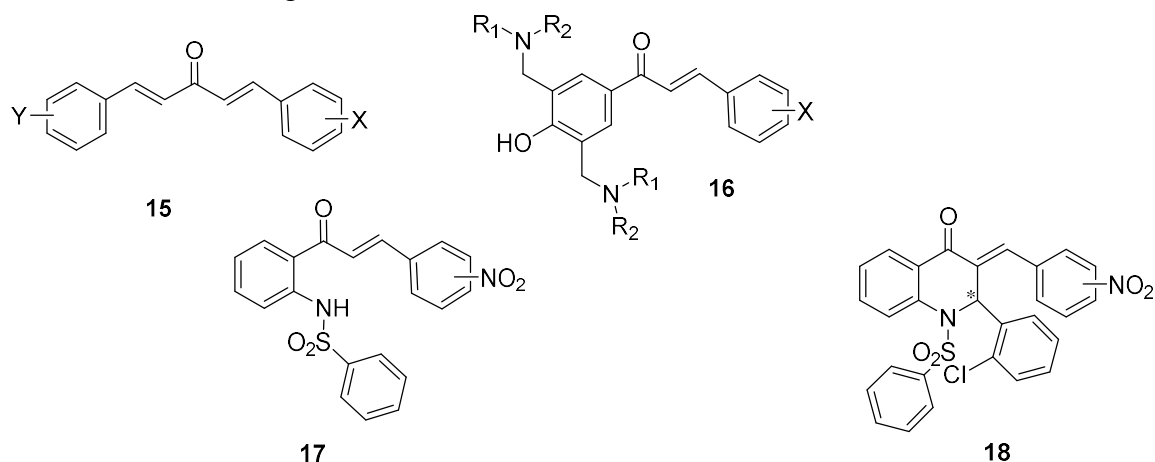
A testidegen vegyületek szerkezetbeli sorsát azok lipofil jellegén túlmenően a metabolikus enzimekkel történő kölcsönhatásuk (biotranszformáció) határozza meg. A kalkonok és a vizsgált kalkonszármazékok metabolikus transzformációi között a legnagyobb jelentőséggel az aromás gyűrűk CYP enzimek által történő oxidációja, az enon rendszer redukciója, valamint a glutationnal (GSH) lejátszódó konjugációs reakciói bírnak [4]. Ez utóbbi átalakulások lejátszódhatnak a celluláris makromolekulák reaktív tiolcsoportjaival is [5,6]. Ezek a kölcsönhatások (részben vagy egészben) alapját képezhetik a vegyületek megfigyelt biológiai hatásainak [7,8]. Ugyanakkor, a metabolikus transzformációk ismerete a testidegen anyagok (metabolikus) stabilitásának is fontos jellemzője.

A vizsgált vegyületek ígéretes *in vitro* daganatellenes hatásainak ismeretében kísérleteket végeztünk kiválasztott kalkonszármazékok *in vivo* vékonybélből történő eliminációjának, valamint vékonybél-metabolizmusának megismerése céljából. E vizsgálataink részét képezték azoknak a Fischer Emil (Pécsi Tudományegyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Pécs) professzorral történő együttműködés keretében megkezdett és ma már a Gyógyszerészi Kémiai Intézetben folyamatban lévő vizsgálatoknak, melyek keretében többek között kapszaicinoidok [N26] és néhány nemszteroid gyulladáscsökkentő vegyület [N8, N9] vékonybélből történő eliminációját és vékonybél-metabolizmusát is vizsgáltuk.

A vizsgált vegyületek tiol-reaktivitásán alapuló hatásainak vizsgálata céljából, munkák kezdetén célul tűztük ki a **4-7** vegyületek glutationnal (GSH) és N-acetilciszteinnel (NAC) lejátszódó reakcióinak vizsgálatát. E munkák során kapcsolatot kerestünk a különbözőképpen szubsztituált kalkonok és a különböző gyűrűtagszámú kalkon-analógok citotoxicitása és a két tiolszármazékkal szemben mutatott reaktivitása között. E munkáim során eredményes kutatási együttműködés alakult ki professzor Caridad Noda Perez (Federal University of Goias, Goiania, Brazília) és professzor Hamilton Napolitano (State University of Goias, Anapolis, Brazília) kutatócsoportjaival. Az együttműködések eredményeképpen a vizsgált vegyületek köre kibővült számos szubsztituált bisz-kalkon (**15**), 3,5-bisz(dialkilaminometilén)-szubsztituált-4-OH-kalkon (**16**), valamint szulfonamid-funkciót hordozó, nyíltláncú (**17**) és gyűrűs kalkonszármazék (**18**) vizsgálatával (3. ábra).

A 4'-helyzetben szubsztituált kalkonokkal (**4**) összehasonlítva a **16** származékok 3,5-helyzetű dialkilaminometilén-csoportja egyrészt csökkentette a

vegyületek lipofilitását, másrészt elektronvonzó (negatív induktív) hatásaik révén módosította azok enon funkciójának elektroneloszlását. A forgalomban lévő gyógyszerek körében számos vegyület rendelkezik alkilamino oldallánccal. Ezért tervbe vettük a 4-OH-kalkonok (4) és a 3,5-bisz(dialkilaminometilén)-szubsztituált-4-OH-kalkonok (16) egy-egy képviselőjének a fenti állatkísérletes modell alkalmazásával történő vékonybél-eliminációjának és –metabolizmusának összehasonlító vizsgálatát.



3. ábra. A 15-18 vegyületek szerkezete

A disszertációban tárgyalt saját eredmények és az azokkal kapcsolatos irodalmi vonatkozások könnyebb megkülönböztetése érdekében a dolgozatot alkotó saját eredményeinket tartalmazó közlemények felsorolása az Irodalomjegyzék I.D fejezetben ([D1-D39]) történik. Az értekezéshez kapcsolódó egyéb saját közleményeink ([S1-S37]), valamint további, az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közleményeim ([N1-N84]) felsorolása az Irodalomjegyzék I.S, illetve I.N fejezetekben található. A nem saját munkáimat jelölő irodalmak felsorolása a szövegben arab számmal szögletes zárójelben [1-418] az Irodalomjegyzék II-ben jelenik meg.

2. A kutatási terület háttere

Ebben a fejezetben a dolgozatban összefoglalt munkák irodalmi hátterét mutatom be. Mivel a munka tematikusan átível a szintetikus szerves kémia, az analitikai kémia, a biokémia és az állatkísérletes farmakokinetika egy-egy körülírt területén, ezért ennek a fejezetnek az összeállításánál igyekeztem a releváns irodalmi ismereteket is a felsorolt tudományterületeknek megfelelően csoportosítani, illetve bemutatni. Mivel az egyes kutatási területek időrendi sorrendben is követik egymást, így a fejezetek a kutatások egymásra épülését, azok kapcsolódási pontjait is szemléltetik.

A kalkonok (4) természetes vegyületek, leggyakrabban a magasabb rendű növényekben, főleg a *Leguminosae*, *Asteraceae* és *Moraceae* család tagjaiban fordulnak elő [D1]. Ezeket a növényeket gyakran használják a hagyományos orvoslásban, ezért a kalkonok gyulladáscsökkentő, antimikrobiális, antifungális, antivirális, antidiabetikus és kemopreventív hatásait kiterjedten vizsgálják számos laboratóriumban. Felismerve a természetes kalkonok sokrétű, farmakológiai is hasznosítható biológiai hatását, nagyszámú szintetikus kalkon és kalkon-analóg szintézise és biológiai hatásainak vizsgálta indult meg és folyik napjainkban is [D2,2-23].

A térszerkezet és a biológiai hatás összefüggéseinek vizsgálata együtt haladt a gyógyszerként használt kismolekulák, valamint a celluláris makromolekulák háromdimenziós szerkezetének, valamint konformációs viszonyainak megismerésére alkalmas analitikai módszerek fejlődésével. A térszerkezet és a biológiai hatás közötti összefüggés vizsgálatának egyik területe a konformatíve flexibilis (nyíltláncú) molekulák rögzített konformációjú, vagy csökkent konformációs mozgási szabadsággal bíró gyűrűs származékainak összehasonlító kémiai és biológiai vizsgálata. Konjugált vegyületek esetében a rögzített konformációjú, vagy gátolt rotációjú analógok között nemcsak a háromdimenziós szerkezet, de a (kovalens, nem-kovalens) reaktivitást befolyásoló elektronszerkezet tekintetében is különbségek mutatkoznak. A dolgozatban összefoglalt eredmények az e területeken folytatott munkákhoz kívánnak újabb kísérleti bizonyítékokat szolgáltatni.

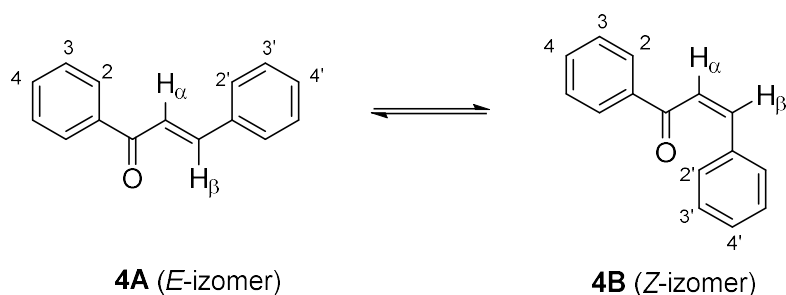
2.1. Kalkonok és kalkon-analógok szintézise és sztereokémiája

2.1.1. Kalkonok és kalkon-analógok szintézise

A 2-propen-1-on (enon) molekularész sokoldalú reakcióképessége és a vegyületek széleskörű biológiai aktivitása miatt számos szintetikus módszert fejlesztettek ki különböző módon szubsztituált kalkonok előállítására. Ebben a dolgozatban csak a leggyakrabban használt Claisen-Schmidt kondenzáció kerül részletesebb bemutatásra, amelyet a dolgozatban vizsgált kalkonok és kalkon-analógok szintézisére alkalmaztunk.

A Claisen–Schmidt reakciót két független kutató, R. L. Claisen és J. G. Schmidt munkái után nevezték el, akik független munkáikban egy aromás aldehid

és egy metil-keton kondenzációs reakcióit írták le ásványi savak [24a] vagy lúgok [24b] jelenlétében. Az eredeti publikációk megjelenése óta számos erős bázis (pl. NaOH, KOH, Ba(OH)₂, terc-butoxid) és sav (pl. száraz HCl, AlCl₃, BF₃) sikeres alkalmazásával találkozhatunk az irodalomban. A reakciók lejátszódhatnak homogén fázisban szerves oldószerek vagy heterogén fázisok felhasználásával, beleértve Lewis és Broensted savakat, szilárd bázisokat és másokat is [D2,25-35]. Az α -helyzetben szubsztituátlan kalkonok előállítása során a Claisen-Schmidt reakciók a legtöbb esetben (*E*)-konfigurációjú kalkonok képződéséhez vezetnek. Propiofenonból kiinduló α -metil-szubsztituált kalkonok szintézise azonban az (*E*)/(*Z*)-izomerek kb. 5:1 arányú keverékét eredményezte [36]. Az (*E*) és (*Z*) konfigurációjú kalkonok (**4**) szerkezetét a 4. ábra mutatja be.

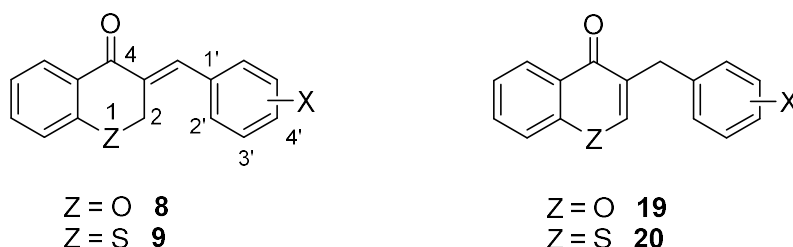


4. ábra. A kalkonok (**4**) (*E*)- (**4A**) és (*Z*)-izomerjeinek (**4B**) szerkezete

A bázis-katalizált Claisen-Schmidt kondenzáció mechanizmusának részleteit benzaldehid és acetofenon reakciójának kvantumkémiai, illetve kinetikai vizsgálatával Yamin és munkatársai [37], valamint Perrin és Chang [38] vizsgálták. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a reakció sebességmeghatározó lépése az aldol intermedier vízvesztése és a C=C kötés kialakulása. Széll és munkatársai azt találták, hogy az elektrondonor csoportokkal szubsztituált aldehidek a savak, míg az elektronszívó szubsztituensek a bázisok által katalizált kondenzációs folyamatban reaktívabbak [39].

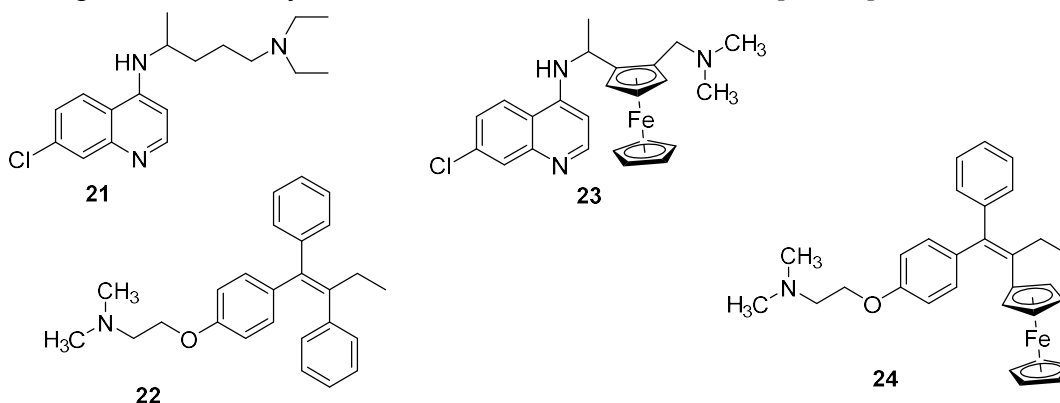
A kalkonok (**4**) különböző háromdimenziós szerkezetei (konformerjei, geometriai izomerjei) eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokat, eltérő reaktivitást és nem-kovalens kölcsönhatást mutatnak. A vizsgálatainkat képező 2-arilidén-benzociklan-1-onok (**5-7**) és heteroanalógjaik (**8,9**) a kalkonok (**4**) konformációs mozgásban korlátozott analógjainak tekinthetők. Közülük, például, számos indanonszármazékot (**5**) publikáltak, amelyek hatékony daganatellenes (tubulin-aktív) hatással rendelkeznek [40-44]. Ezek a konformatíve rögzített gyűrűs kalkon-analógok, olyan háromdimenziós szerkezettel rendelkeznek, amelyek a nyílt láncú analógok konformációs egyensúlyi elegyeiben nem találhatók [45]. Ezért ezek a vegyületek – és különböző gyűrűtagszámú analógjaik - hasznos „molekuláris eszközök” annak vizsgálatára, hogy a kalkon szerkezeti elem háromdimenziós alakját hogyan befolyásolja a gyűrű mérete és szerkezete. Továbbá a különböző háromdimenziós szerkezetek a vegyületek különböző fokú konjugációját eredményezik, ami befolyásolhatja azok kovalens és nem-kovalens kölcsönhatásait.

Az oxigén- és kéntartalmú heteroanalógok (**8,9**) szintén gyűrűs kalkon-származékoknak tekinthetők, amelyek mind kémiai, mind farmakológiai szempontból érdeklődésre számot tartó vegyületek. A szintetikus 3-arilidén-4-kromanonok (**8**) a huszadik század közepétől ismertek. Néhány képviselőjüket a homoizoflavonoidok közé tartozó természetes termékként izolálták [46]. Az (*E*)-3-arilidén-4-(tio)kromanonok szintézise a 4-(tio)kromanonok aromás aldehidekkel, katalizátor jelenlétében lejátszódó kondenzációs reakcióján alapul. Katalizátorként savakat (például H_2SO_4 , H_3PO_4 és HCl) vagy bázisokat (például NaOH , NaOCH_3 , CH_3COONa , piperidin) használtak [46-52]. Mindkét vegyületsor szintézise során, elektronszívó szubsztituens hordozó benzaldehid alkalmazása esetén *exo-endo* kettős kötés vándorlás volt tapasztalható. Ezekben az esetekben a várt (*E*)-3-arilidén-4-(tio)kromanonok (**8,9**) mellett 3-arilmetilén-4-(tio)kromon (**19,20**) származékok képződése is megfigyelhető volt (5. ábra) [47-49].



5. ábra. Az (*E*)-3-arilidén-4-(tio)kromanonok (**8** és **9**) és a 3-arilmetilén-4-(tio)kromonok (**19** és **20**) szerkezete

Gyógyszerként alkalmazott aromás karbociklusos vegyületek aromás gyűrűjének ferrocén (di-*p*-ciklopentadienil-vas(II)) molekulárszre történő cseréje az 1990-es évektől kezdődően gyakran alkalmazott módszer új, szelektívebb és hatékonyabb hatóanyagok kutatása területén. Az első sikeres vizsgálati eredményeket a malária ellenes hatású klorokin (**21**) és a daganatellenes hatású tamoxifén (**22**) ferrocén-analógjainak (**23,24**) (6. ábra) szintézisével és biológiai hatásainak vizsgálataival kapcsolatosan publikálták [53-56]. Az azóta eltelt időben mindkét származék a klinikai vizsgálatok fázisába jutott [57,58]. A ferrocénszármazékok gyógyszerkémiai területén elért eredményeit több összefoglaló közlemény is áttekintette az elmúlt években [59-62].



6. ábra. A klorokin (**21**), a tamoxifén (**22**) és ferrocén-analógjaik (**23** és **24**) szerkezete

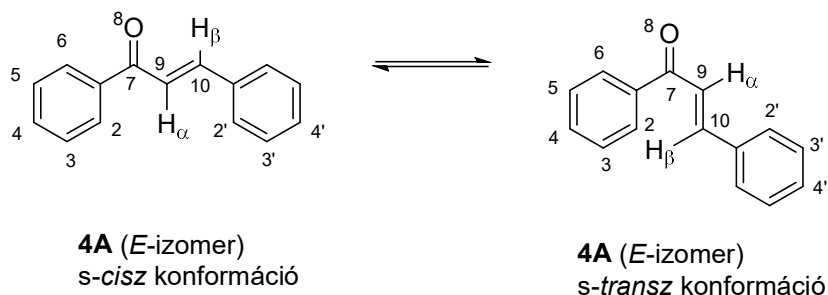
A kalkonok ferrocén-analógjainak első hazai szintéziséről és spektroszkópai vizsgálatairól Nagy és Sohár számolt be. A szerzők az A-gyűrűben ferrocénnel helyettesített, 2'-szubsztituált kalkonok szintézisét, valamint ^1H NMR, ^{13}C NMR és IR vizsgálati eredményeit közölték [63]. Később Sohár és munkatársai farmakológiai célkitűzésekkel B-gyűrűben ferrocénnel helyettesített kalkon-glikozidokat szintetizáltak. A vegyületek *in vitro* daganatsejt citotoxicitási vizsgálata alapján a ferrocén-analógok hatékonyabbnak bizonyultak, mint a referencia vegyületként vizsgált karbociklusos kalkonok [64,65]. E kedvező eredmények ismeretében Csámpai és munkatársai, folytatva a Sohár Pál által kezdeményezett kutatásokat, számos ismert karbociklusos aromás (köztük kalkon) farmakofórt tartalmazó vegyület ferrocén-analógját szintetizálta, elsősorban antiproliferatív aktivitással rendelkező származékok szintézise céljából [65-69]. A ferrocenil-kalkonok szintéziséről és biológiai hatásairól Montes-González és munkatársai közöltek összefoglalót [70].

2.1.2. Kalkonok és kalkon-analógok sztereokémiai jellemzése

2.1.2.1. Kalkonok és kalkon-analógok ^1H NMR spektroszkópai jellemzői

A kalkonok (**4**) sztereokémiai jellemzése egyrészt a szén-szén kettős kötés, másrészt az enon molekulafragmens szigma kötés konfigurációinak ismeretét jelenti. Bár a teljes molekula egy konjugált rendszer, a vegyületek a szén-szén kettős kötés konfigurációját figyelembe véve (*E*) és (*Z*) formában fordulhatnak elő (4. ábra). Általában az (*E*) izomerek (**4A**) a stabilabbak, a (*Z*)-izomerek (**4B**) karbonilcsoportja és B-gyűrűje között fellépő taszító hatás eredményeként [36]. Az (*E*)- és a (*Z*)-izomerek szerkezete ^1H NMR spektrumuk alapján azonosítható, illetve megkülönböztethető. Az H_α és H_β protonok a vegyületek ^1H NMR spektrumaiban jól elkülönülnek egymástól. A H_β protonok jele magasabb kémiai eltolódásnál jelentkezik ($\delta 7.5\text{-}8.0$ ppm) és általában jól elkülönül az aromás protonok jeleitől. A $J^3(\text{H}_\alpha, \text{H}_\beta)$ csatolási állandó értéke az (*E*)-kalkonok esetén a 15-16 Hz, míg a (*Z*)-kalkonok esetén a 7-8 Hz tartományba esik [71].

Az (*E*)-konfigurációjú kalkon (**4** ($\text{X}=\text{H}$)) enon-molekularészének szigma kötése körüli rotáció azonban nem gátolt, ezért a vegyület két konformációban is megtalálható: 180° -os (az *s-transz* konformer), vagy 0° -os (*s-cisz* konformer) diéderes szöggel (7. ábra).



7. ábra. Az(*E*)-kalkonok (**4**) *s-cisz* és *s-transz*-konformációi

Az *s-cisz* konformer gyakorlatilag síkbeli, az *s-transz* konformerben azonban az A gyűrű körülbelül -152° -os O(8)–C(7)–C(9)–C(10) torziós szöggel kitér az enon-molekularész síkjától. A két konformer közötti energiakülönbség 2,0 kcal/mol az *s-cisz* forma javára; az *s-cisz* és az *s-transz* forma közötti átmenet 6,6 kcal/mol. Így két konformer közötti átalakulás könnyen végbe mehet, és így az (*E*)-(s-*cisz*)-kalkon szobahőmérsékletű oldataiban az *s-transz* konformer is megtalálható [72].

Általános megfigyelés, hogy elektronikus okokból a nyíltláncú enon rendszerek inkább az *s-transz* konformációt veszik fel, kivéve, ha sztérikus akadály kényszeríti őket az *s-cisz* konformációba [36]. Így például számos α -helyzetben szubsztituátlan kalkon röntgenkristallográfiai vizsgálata a vegyületek *s-cisz* szerkezetét, míg több α -helyzetben szubsztituált kalkon hasonló vizsgálata a vegyületek *s-transz* szerkezetét igazolta [36]. A két konformer azonosítására mind az (*E*)- mind a (*Z*)-izomerek esetén Baas és Cerfonten ^1H NMR módszert dolgozott ki [73].

Hayes és Timmons α -helyzetben szubsztituátlan és metil-szubsztituált (*E*)-konfigurációjú karbonilvegyületek szén-tetrakloridban felvett IR spektrumainak analízise alapján megállapította, hogy az α -helyzetben szubsztituátlan kalkon oldatban egyensúlyi elegyet képez a megfelelő *s-cisz* konformer nagy részarányával [74]. Az aromás gyűrűn vagy az α -szénatomon lévő különböző szubsztituensek azonban módosíthatják a származékok konformációs egyensúlyát. Az α -metil-szubsztituált kalkonok például egyensúlyt képeznek a megfelelő *s-transz*-konformer nagy részarányával. Ezt a konformációs változást a metilcsoport és az A-gyűrű közötti sztérikus taszítás okozhatja *s-cisz* konformációban [36].

Az (*E*)-konfigurációjú kalkonok és a gyűrűs kalkon-analógok konfigurációja szilárd állapotban stabil; azonban oldatban, fénnel megvilágítva a megfelelő (*Z*) izomerekké alakulhatnak [75,76]. Így például, (*E*)-kalkonok [77-79], (*E*)-2-arilidén-1-indanonok [80-82], és -1-tetralonok [81,82] UV-fény inicializált (*E*)/(*Z*) izomerizációja jól dokumentált az irodalomban. A megfelelő (*E*)/(*Z*) izomerek geometriája, elektronszerkezete, polaritása és polarizálhatósága egymástól nagymértékben különbözik. Ezért az izomerizációs folyamat UV-Vis [83] és ^1H NMR [80] spektroszkópiával, vagy kromatográfiás módszerekkel [84,85] nyomon követhető.

2.1.2.2. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok IR spektroszkópiai jellemzői

Korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy kalkonok karbonil rezgési frekvenciái ($\nu(\text{C}=\text{O})$) 1650 és 1685 cm^{-1} között [86, 87], míg a szén-szén kettős kötés ($\nu(\text{C}=\text{C})$) csúcsa 1580 cm^{-1} körül jelent meg [88]. Thirunarayanan és munkatársai [89,90] közleménye szerint a kalkonok oldatban felvett IR spektruma 1600-1700 cm^{-1} között két abszorpciós sávot mutatott. Elméleti számítások eredményei alapján a szerzők azt feltételezték, hogy a második sáv az (*E*)-(s-

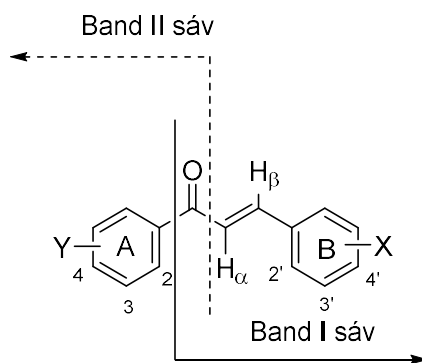
transz)-kalkonokkal egyensúlyi elegyet képező (*E*)-(s-*cisz*)-kalkon izomerek $\nu(\text{C}=\text{O})$ sávjai [71,72]. Az s-*transz* konformer $\nu(\text{C}=\text{O})$ sávja az alacsonyabb, míg az s-*cisz* konformer $\nu(\text{C}=\text{O})$ rezgése a magasabb hullámszámon volt megfigyelhető [89-92].

Al-Ansari [93] FT IR, valamint differenciál pásztázó kalorimetriás módszerrel vizsgálta 4'-dimetilamino-szubsztituált gyűrűs kalkon-analógok (1. ábra, X=4'-N(CH₃)₂) egyes fizikai-kémiai tulajdonságait. Az IR adatok vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy az **5d**, **6d** és **7d** vegyületek $\nu(\text{C}=\text{O})$ rezgése éles csúcsként jelentkezik 1678 cm⁻¹ > 1655 cm⁻¹ > 1652 cm⁻¹ értéknél. Ez a tendencia az akceptor oxigén atom bázikusságának fokozódása miatt következett be, a π rendszer delokalizációja eredményeként [93].

2.1.3. Kalkonok és kalkon-analógok UV-Vis és fluoreszcencia spektroszkópiai jellemzői

A kalkonok és kalkonszármazékok tisztaságvizsgálatának, mennyiségi meghatározásának, reakcióik időbeli lefolyásának, valamint *in vitro* és *in vivo* nem-kovalens kölcsönhatásainak vizsgálatára leggyakrabban a vegyületek UV-Vis, illetve fluoreszcencia spektroszkópia tulajdonságainak - pl. az abszorpciós/emissziós sávok helyzetének és intenzitásának - megváltozásait alkalmazzák [94,95].

Az (*E*) konfigurációjú kalkonok metanolban/etanolban felvett UV-Vis spektrumában általában két erős abszorpciós maximum jelenik meg, jellemzően a 240-280 nm (Band II. sáv) és 300-380 nm (Band I sáv) hullámhossz-tartományban. Flavonok esetében a Band I. sáv a fahéjsav-molekularészre, míg a Band II sáv a benzoilcsoportra jellemző abszorpciós sávként azonosítható (8. ábra) [96]. Mindkét abszorpció π - π^* elektronátmenettel jár [97]

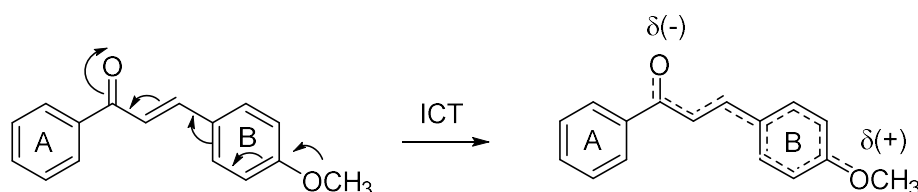


8. ábra. A kalkonok UV/Vis elnyelési sávjainak hozzárendelése

Ezeket a korábbi eredményeket Xue és munkatársai *ab initio* számításai is megerősítették [98]. Számításaik (és kísérleti eredményeik) alapján a vegyületek λ_{max} értékeinek (Band I sáv) batokróm eltolódása érzékenyebb a B-gyűrű elektron donor szubsztituenseinek változásaira. Ez egybeesik a szerzők egy korábbi tanulmányában levont következtetésével, hogy ennek a csúcsnak megfelelő gerjesztés főként a fahéjsav-molekularészen lokalizálható [72]. Ezek az

eredmények összhangban vannak azzal a korábbi tapasztalattal, ami szerint, a kalkonok B-gyűrű szubsztituenseinek növekvő elektronküldő képessége növeli az abszorpciós maximumok hullámhosszát (batokróm hatás) [99-101].

A jelenség értelmezéséhez e vegyületek cinnamoil-fragmensét egy terminális elektronküldő ($-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) és elektronvonzó (konjugált karbonilcsoport) szubsztituenssel helyettesített 1,4-diszubsztituált-benzolszármazéknak tekinthetjük. Foton abszorpció hatására megnő a konjugált karbonil kromofór polaritása, aminek következtében elektronáramlás indul meg az elektrondonor 4'-szubsztituens irányából a karbonilcsoport felé (intramolekuláris töltésátviteli kölcsönhatás). Ennek eredményeképpen ikerionos (poláris) molekulaszervezet jön létre (9. ábra) [102].



9. ábra. Intramolekuláris töltésátviteli kölcsönhatás (ICT) a 4'-metoxikalkon (**4c**) szerkezetében ([102] alapján)

A molekuláris dipólus és a poláris oldószermolekulák közötti kölcsönhatás csökkenti az elektronátmenethez szükséges energiát ($E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$), ami az elektrondonor szubsztituenseknél megfigyelt batokróm hatást eredményez [103]. Az abszorpciós sávok vörös (batokróm) eltolódását az oldószer polaritásának növekedésével pozitív szolvatokromizmusnak nevezzük [104]. E tapasztalatok alapján a vegyületek környezetének megváltozása (például, makromolekulák poláros vagy apoláros régiójához történő nem-kovalens kötődése) megváltoztatja a vegyületek abszorpciós spektrumát [105,106].

Az ultraibolya-látható fénnel gerjesztett molekulák relaxációja fényemisszióval (fluoreszcenciával) járhat. A kibocsátott spektrum jellemzői szintén felhasználhatók a fluoreszkáló vegyületek szerkezetének, molekuláris környezetének jellemzésére [107]. A fluoreszcens próbák egyik nagy csoportját azok a molekulák képezik, amelyben egy elektrondonor (EDG) szubsztituens és egy elektronszívó csoport (EWG) kapcsolódik 1,4-helyzetben egy benzolgyűrűhöz, vagy más aromás gyűrűrendszerhez (*Donor-Bridge-Acceptor* (DBA) típusú fluorofórok) [108]. Ilyen típusú fluorofórok lehetnek a megfelelően szubsztituált kalkonszármazékok is [109-112]. Megjegyzendő azonban, hogy a fluoreszcencia spektroszkópia a spektroszkópiai jellemzőkön túlmenően számos további, pl. kalkon-makromolekula (BSA, HSA, DNS) kölcsönhatás természetének alaposabb megismerésére alkalmas módszert is nyújt az e területen végzendő kutatásokhoz [113,114].

2.2. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok fizikai-kémiai jellemzése

2.2.1. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok tér- és elektronszerkezetének vizsgálata lineáris szabadentalpia összefüggések alkalmazásával

A vegyületek, így a vizsgálatok tárgyát képező kalkonok és kalkon-analógok, reaktivitását, nem-kovalens és kovalens kölcsönhatásainak kialakulását befolyásolja azok tér- és elektronszerkezete. A konjugált rendszerek tér- és elektronszerkezete vizsgálatának egyik gyakori módszere az aromás szubsztituenseknek a vegyületek reaktivására gyakorolt hatásának az ún. lineáris szabadentalpia összefüggések alapján történő vizsgálata [115,116]. E vizsgálatok első eredményei, és azt követően azok egyre szélesebb körben történő alkalmazása, Broensted és Hammett munkásságához köthető [117,118]. További tanulmányok eredményei azt mutatták, hogy az alkalmazott molekuláris paraméterek nem csak a reakciósebességgel és az egyensúlyi állandókkal, hanem a vegyületek fizikai tulajdonságaival (például az ultraibolya abszorpciós maximumokkal, az infravörös abszorpciós hullámszámokkal, az NMR kémiai eltolódásokkal) is korrelálhatók [119-122]. Munkáim során a vegyületek gyűrűtagszámának és a benzilidén-molekularész aromás szubsztituenseinek a vegyületek IR és ^{13}C NMR spektroszkópia adataira gyakorolt hatását vizsgáltam a Hammett-egyenlet alkalmazásával, melyek legfontosabb irodalmi előzményei az alábbiak.

2.2.1.1. A Hammett-egyenlet

Az eredeti Hammett-egyenlet lineáris összefüggést ír le a *meta*- és *para*-szubsztituált benzooesavak relatív deprotonálódási egyensúlyi állandói (K_x/K_o) és a megfelelő benzooesav etil-észterek relatív lúgos hidrolízis-sebességi együtthatói (k_x/k_o) logaritmusai között [118].

$$\log(k_x/k_o) = \rho \log(K_x/K_o) \quad (1)$$

ahol k_o és k_x a benzooesav etil-észter és az X-szubsztituált benzooesav etil-észter lúgos hidrolízisének sebességi együtthatója, K_o és K_x a benzooesav és az X-szubsztituált benzooesav disszociációs állandója, ρ az egyenes meredeksége.

Bevezetve a

$$\log(K_x/K_o) = \sigma_x \quad (2)$$

jelölést, az alábbi kifejezéshez jutunk,

$$\log(k_x/k_o) = \rho \sigma_x \quad (3)$$

ahol σ_x az X-szubsztituens szubsztituensállandója.

Ez utóbbi egyenletet szokás Hammett-egyenletnek nevezni.

A Hammett-egyenlet széleskörű alkalmazása rámutatott arra, hogy azokban a reakciókban, melyekben a reakciócentrum az aromás gyűrűhöz közvetlenül *para*-helyzetben kapcsolódó erősen elektronküldő vagy elektronszívó, konjugációra képes csoportokat (például fenolos hidroxilszármazékok, illetve karbokationt képező tercier halogenidek) tartalmaz, eltérések tapasztalhatók a lineáris kapcsolattól. Ezekben az esetekben „közvetlen” konjugációs kölcsönhatás

keletkezhet a reakciócentrum és a konjugációs kölcsönhatást mutató elektronvonzó szubsztituens (pl. $p\text{-NO}_2$, $p\text{-SO}_3\text{CH}_3$) között. Az eltérések kiküszöbölésére más jellegű σ -állandókat is bevezettek. Ezeknek egyik csoportját az ún. σ_p^- értékek alkotják, amelyek a *para*-helyzetű szubsztituenseknek a reakciócentrum negatív töltésére (pl. -O^-) [123], valamint a σ_p^+ -értékek, melyek a reakciócentrum pozitív töltésére (-NH_3^+) [124] gyakorolt stabilizáló vagy destabilizáló rezonancia effektusát jellemzik.

Mivel az eredeti Hammett-féle σ_p konstansok is magukban foglalnak „közvetlen” konjugációs kölcsönhatásokból eredő hozzájárulást is, Taft további szubsztituensállandókat (σ_p^0) javasolt, melyek mentesek az ilyen effektusoktól. Ezeket a szubsztituensállandókat a szerzők a szubsztituált fenilecetsavak és 3-fenilpropánsavak savi disszociációs állandója, valamint a megfelelő etil-észterek lúgos hidrolízisének sebessége alapján számolták ki [125,126]. A különböző σ konstansok definíciójáról, alkalmazásuk előnyeiről és korlátairól, korábban McDaniel és Brown [127], később Hansh, Leo és Taft közölt összefoglaló közleményt [128].

A számos új σ paraméter publikálását követően, statisztikai elemzések alapján, Swain és Lupton arra a következtetésre jutott, hogy az irodalomban ismert σ szubsztituens-állandók (σ_m , σ_p , σ_p^0 , σ_p^+ , σ_p^-) nem függetlenek egymástól és mindegyik megadható két, egymástól független kölcsönhatás lineáris kombinációjával. Swain és Lupton a két kölcsönhatást „tér” ($\mathcal{F}$) és „rezonancia” ($\mathcal{R}$) kölcsönhatásként nevezte el [129].

$$\sigma = f\mathcal{F} + r\mathcal{R} \pm c \quad (4)$$

ahol az $\mathcal{F}$ és $\mathcal{R}$ a különböző szubsztituensek (H, CH_3 , CH_3O , Cl stb.) tér és rezonancia szubsztituens állandói, míg az f és r az induktív effektusra, illetve a rezonanciaeffektusra jellemző tapasztalati hatékonysági faktorok (érzékenységek).

A szerzők eredeti közleményükben 42 aromás szubsztituens tér ($\mathcal{F}$) és rezonancia ($\mathcal{R}$) állandóinak számított értékét publikálták a korábban publikált σ szubsztituens állandók értékeinek felhasználásával [129]. Swain és Lupton eredeti közleményében publikált $\mathcal{F}$ és $\mathcal{R}$ állandók értékeit számosan bírálták és később Taft és munkatársai korrigálták azokat [128,130]. Ennek ellenére, a Swain-Lupton-féle szubsztituens állandókat széles körben alkalmazták NMR- és IR-adatok, sav-bázis egyensúlyok, elektrofil és nukleofil reakciók [119-121], valamint biológiai aktivitás korreláció analízisének [130].

Az induktív effektus és a rezonanciaeffektus hatása az egyes reakciókban különbözőképpen nyilvánulhat meg. A korábban közölt, különböző σ állandók (σ_m , σ_p , σ_p^0 , σ_p^+ , σ_p^-) a két effektus különböző súlyú összesítését foglalják magukban. Az induktív és a rezonancia effektusok szétválasztására és kvantitatív leírására Taft és munkatársai az alábbi egyenletet javasolták [131]:

$$\log(k/k_0) = \rho_I \sigma_I + \rho_R \sigma_R \quad (5)$$

ahol a σ_I és σ_R a szubsztituensek induktív effektusát, illetve rezonanciaeffektusát jellemző konstansok, míg a ρ_I és ρ_R konstansok a reakciónak az induktív effektusra, illetve a rezonanciaeffektusra vonatkozó érzékenységet fejezik ki.

A legáltalánosabban használt σ_I szubsztituensállandókat [128,131,132] Taft és munkatársai a 4-szubsztituált biciklo[2,2,2]-oktán-1-karbonsavak disszociációs állandóiból számították [133].

A σ_R rezonancia-szubsztituensállandók számítása a Hammett-féle σ_p , valamint a σ_p^0 , σ_p^+ , σ_p^- konstansokból történt a

$$\sigma_p = \sigma_I + \sigma_R \quad (6)$$

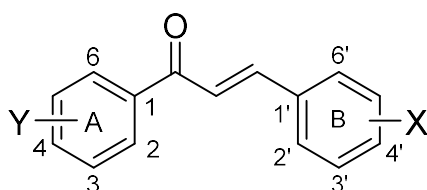
összefüggés alapján. Így, míg a σ_I induktív szubsztituensállandókból egy sorozat létezik, addig a rezonanciahatások elemzésére - a Hammett-féle σ_p és módosított σ_p^0 , σ_p^+ , σ_p^- konstansoknak megfelelően - négy sorozat (σ_R , σ_R^0 , σ_R^+ , σ_R^-) szubsztituensállandó áll rendelkezésre [128,131].

Később a Taft-féle σ_I és σ_R^0 szubsztituensállandókat Reynolds és munkatársai - szubsztituált sztirolszármazékok ^{13}C NMR kémiai eltolódásértékek alapján – módosították. A módosított szubsztituensállandók (σ_F és σ_R) statisztikailag pontosabbá váltak a korábban közölt értékeknél [134].

2.2.1.2. IR spektroszkópiai vizsgálatok

Az aromás szubsztituensek hatásainak a konjugált rendszereken történő tovaterjedése vizsgálatának egyik legrégebbi és még ma is gyakran alkalmazott módszere a szubsztituensállandók és a $\nu(\text{C}=\text{O})$ értékek közötti kapcsolat Hammett-féle összefüggés alapján történő statisztikai analízise [119-122].

Úttörő munkáik során Silver és Boykin [119] két – az aromás gyűrűkön hasonló szubsztituenseket hordozó – (E)-kalkon-sorozat (10. ábra) kloroformos oldatának IR vizsgálatát végezte el.



10. ábra. I. sorozat: Y=H; X = különböző szubsztituensek a 3' és 4' helyzetben. II. sorozat: Y = különböző szubsztituensek a 3 és 4 helyzetben; X = H

A kalkonok kloroformos oldatainak vizsgálata alapján csak az s-cisz konformerhez tartozó $\nu(\text{C}=\text{O})$ értékeket tudták azonosítani, így számításaikat csak erre a konformerre tudták elvégezni. A szerzők a $\nu(\text{C}=\text{O})$ értékek (cm^{-1}) és a Hammett σ_p [118], valamint a Brown-Okamoto σ_p^+ [124] szubsztituensállandók közötti összefüggést a Hammett-féle egyparaméteres (SSP) korreláció számítás (7) alapján tanulmányozták.

$$\nu(\text{C=O}) = \rho\sigma + q \quad (7)$$

ahol $\nu(\text{C=O})$ a karbonil rezonancia hullámszáma (cm^{-1}); ρ az egyenes meredeksége; q a metszéspont (cm^{-1}); σ a Hammett σ [118], vagy a Brown-Okamoto σ_p^+ [124] szubsztituensállandók.

Az A-gyűrűn 21 *para*- és *meta*-helyzetben szubsztituált kalkon (10. ábra, I sorozat) *s-cisz* konformerének $\nu(\text{C=O})$ frekvenciái és három σ konstans (σ_p , σ_p^+ és σ_p^0) közötti kapcsolat elemzése során a legjobb korrelációt a σ_p ($r = 0,965$) és a σ_p^+ ($r = 0,977$) szubsztituensállandók alkalmazásával nyerték. A σ_p^+ értékekkel kapott korreláció a szubsztituensek és a karbonilcsoport közötti szignifikáns rezonancia kölcsönhatást igazolta. A szubsztituenshatások tovaterjedésének hatékonysága ($\rho = 6,24$) azonban csak fele volt a 4-szubsztituált acetofenonok hasonló vizsgálata során kapott értéknek ($\rho = 12,3$) [119].

A szerzők elvégezték a $\nu(\text{C=O})$ értékek és a Swain-Lupton $\mathcal{F}$ és $\mathcal{R}$ paraméterek közötti kétparaméteres (DSS) regresszióelemzést (8) is [119,135].

$$\nu(\text{C=O}) = \rho_F \mathcal{F} + \rho_R \mathcal{R} + q \quad (8)$$

ahol $\nu(\text{C=O})$ a karbonil rezonancia hullámszáma (cm^{-1}); ρ az egyenes meredeksége; q a metszéspont (cm^{-1}); $\mathcal{F}$ és $\mathcal{R}$ a különböző szubsztituensek tér és rezonancia szubsztituensállandói.

A kapott (többparaméteres) korrelációk ($\rho_F = 4,47$; $\rho_R = 7,04$ [119], illetve $\rho_F = 4,88$; $\rho_R = 6,24$ [135]) megerősítették a σ_p^+ értékekkel kapott eredmények következtetéseit. Később, Thirunarayanan és munkatársai hasonló vizsgálatokat végeztek (*E*)-konfigurációjú, 4'- és 3'-helyzetben-szubsztituált 4-bróm-1-naftil-kalkon-származékokkal [71]. A szerzők a vegyületek *s-transz* izomerjeinek $\nu(\text{C=O})$ értékei és a σ_p ($r = 0,996$), illetve a σ_p^+ ($r = 0,990$) szubsztituensállandók között itt is magas korrelációt találtak. Az *s-cisz* izomerek hasonló analízise csak a σ_p paraméterek alkalmazása esetén vezetett statisztikailag értékelhető eredményre. Az *s-cisz* izomerek korrelációs együtthatóinak (r) és transzmittancia hatásfokainak (ρ) alacsony értékét a szerzők a nagy térkitöltésű naftilcsoport okozta aplanaritással magyarázták. A σ_I és a σ_R paraméterek alkalmazása nem vezetett statisztikailag értékelhető eredményre sem az *s-cisz*, sem az *s-transz* izomerek körében [71].

Dinya és munkatársai az **5**, **6**, **8** és **9** (2. ábra) sorba tartozó, rögzített (*E*)-*s-cisz* konfigurációjú, gyűrűs kalkon-analógok térszerkezetét vizsgálták a vegyületek 4'-helyzetű szubsztituenshatásainak tovaterjedése alapján [136]. Eredményeik szerint a vegyületek $\nu(\text{C=O})$ és $\nu(\text{C=C})$ rezgéseinek területei jobb korrelációt mutattak a Hammett σ_p [118], a Brown-Okamoto σ_p^+ [124], és a Perjéssy $X^+(R)$ [137,S15] állandókkal, mint azok frekvencia értékei. A σ_p^+ és $X^+(R)$ állandókkal kapott regressziós együtthatók (ρ) ezekben az esetekben is a szubsztituensek rezonancia effektusának hatékony tovaterjedését igazolták. A transzmisszió hatásfoka az **5** sorban volt a legmagasabb (σ_p^+ ; $\rho = 7,41$) és a **9** sorban a

legalacsonyabb (σ_p^+ ; $\rho = 3,49$). A szerzők a tapasztalatot az enon rendszerek különböző mértékű planaritásával értelmezték [136].

Geribaldi és munkatársai az *s-cisz* konformációjú (*E*)-2-(4-X-benzilidén)-1-ciklohexanonok (**2**) és az *s-transz* konformációjú 5,5-dimetil-3-(4-X-fenil)-ciklohexén-2-onok (**25**) (11. ábra) széntetrakloridos oldatában mért $\nu(\text{C=O})$ értékei szubsztituenshatásainak elemzését végezték el Brown-Okamoto σ_p^+ szubsztituensállandók használatával [S37].



11. ábra. A **2** és a **25** vegyületek szerkezete

Mindkét sorozat $\nu(\text{C=O})$ értékei jó korrelációt mutattak a σ_p^+ szubsztituensállandókkal ($r = 0,982$ (**2**) és $r = 0,965$ (**25**)), ami mindkét sorban a rezonancia hatások hatékony tovaterjedését mutatta. A szubsztituenshatások transzmittanciája ($\rho = 6,60$) a **2** sorozat esetén valamivel magasabb volt, mint a **25** sorozat ($\rho = 5,73$) esetében.

Összefoglalva megállapítható, hogy a *para*-szubsztituált benzilidén-ke-tonok $\nu(\text{C=O})$ értékeinek és a Brown-Okamoto σ_p^+ szubsztituensállandók közötti korreláció vizsgálata alkalmas módszer a különböző konfigurációjú, és adott konfiguráció esetén különböző planaritású rendszerek összehasonlító tanulmányozására. A kétparaméteres szabadenergia összefüggések alkalmazása nem-planáris rendszerek esetén kevésbé alkalmas módszernek bizonyult a szubsztituenshatások vizsgálatára [71,119,135,138].

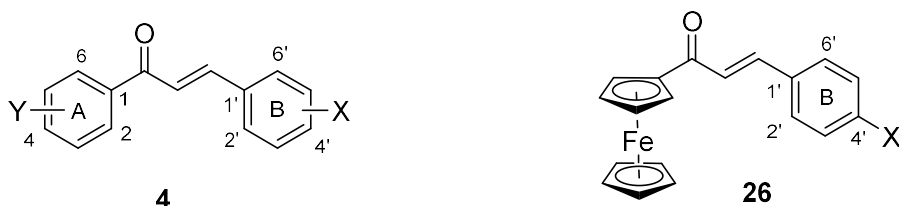
2.2.1.3. ^{13}C NMR spektroszkópiai vizsgálatok

Nagyszámú irodalmi publikáció igazolta, hogy az NMR kémiai eltolódások, az elektronsűrűség-eloszlások érzékeny próbái, és hasznosak a szerves molekulákban lévő elektroneltolódások tanulmányozására [139-143]. Bár az NMR kémiai eltolódások értéke számos kölcsönhatás eredőjének eredménye, számos kutató szoros lineáris szabadenergia-kapcsolatot talált a Hammett-féle σ állandók [118] és/vagy a Brown-Okamoto σ_p^+ állandók [124], valamint az aromás gyűrűn szubsztituált sztirol- [144,145], kalkon- [146,147,148] és ferrocenil-kalkonszármazékok [149] α - és β -hidrogén/szénatomjának ^1H NMR, illetve ^{13}C NMR kémiai eltolódásai között.

Úttörőnek tekinthető munkáik során Reynolds és munkatársai kimutatták, hogy a ^{13}C NMR kémiai eltolódások felhasználhatók a sztirolszármazékok alapállapotú elektroneloszlásában bekövetkező változások vizsgálatára, valamint, hogy a Swain-Lupton szubsztituensállandók alkalmasak a vegyületek polarizációja

és az aromás szubsztituensek elektronhatásai közötti kapcsolat elemzésére [134,150].

További vizsgálatok során több szerző kalkonok (**4**) [151-154] és ferrocenil-kalkonok (**26**) [155,156] (12. ábra) α - és β -szénatomjainak ^{13}C NMR kémiai eltolódásának változását vizsgálta, a legtöbb esetben a Swain-Lupton tér ($\mathcal{F}$) és rezonancia ($\mathcal{R}$) paramétereket használva. E vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a 4'-helyzetű aromás szubsztituensek poláris (induktív) hatása a β -szénatomon, míg a rezonancia hatása (ellenkező előjellel) az α -szénatomon érvényesül. Az A-gyűrű ferrocén-molekularészre történő cseréje alapvetően nem változtatta meg a B-gyűrű szubsztituenshatásai tovaterjedésének hatékonyságát [155,156].



12. ábra. A ^{13}C NMR tanulmányok során vizsgált, A és B gyűrűn szubsztituált kalkonok (**4**) és a **26** ferrocenil-kalkonok szerkezete

Korábbi vizsgálataink során az *s-cisz* konfigurációjú (*E*)-2-(4-X-benzilidén)-1-ciklohexanonok (**2**) ^{13}C NMR-vizsgálatával kapott SSP és DSP eredményeket összehasonlítottuk a vegyület *s-transz* izomerjeinek tekinthető 5,5-dimetil-3-(4'-X-fenil)-cikloxén-2-onok (**25**) hasonló vizsgálatainak eredményeivel (11. ábra). A σ_{I} , σ_{R}^{+} (Taft) [131], σ_{I} , σ_{R}^{0} (Taft) [132], és σ_{F} , σ_{R}^{0} (Reynolds) [134] tér(induktív) és rezonancia paraméterek alkalmazása során mindkét sorozat esetén a β -szénatomok kémiai eltolódására a szubsztituensek induktív hatása volt a meghatározó. A regressziós egyenesek együtthatói mindkét sorozatban hasonló értékek voltak, ami összhangban van az aromás gyűrű és a szén-szén kettős kötés síkjai által bezárt szög hasonlóságával. Ez utóbbi az AM1 számítások alapján 47° a **2** (X=H) és 36° a **25** (X=H) esetén [S37].

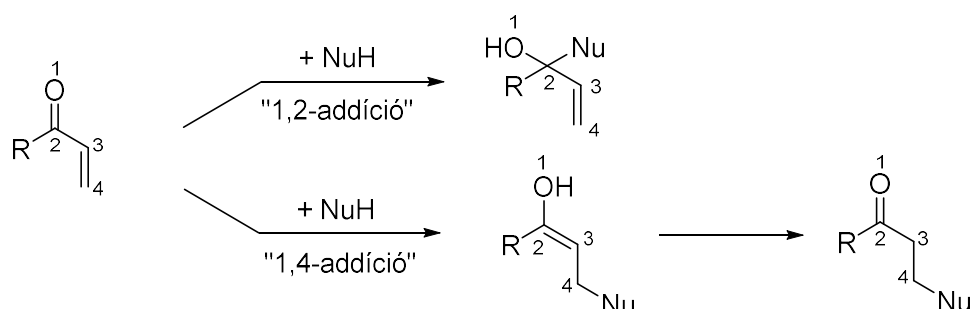
2.2.2. Kalkonok és kalkon-analógok reaktivitása

A kalkonok és gyűrűs analógjaik sokoldalú reaktivással rendelkező vegyületek. Figyelembe véve a reakciók széles körét, azok az aromás gyűrűk és az enon rendszer reaktivitása köré csoportosíthatók [2]. Az aromás gyűrűk reaktivitásának jellemzője az elektrofil szubsztitúció. E reakciók között megemlítendő az aromás gyűrűk funkcionális reakciói; pl. dialkilaminometilén- [157], szulfonamido- [158], és prenil-származékok [159] szintézise, valamint a hidroxilgyökökkel lejátszódó reakciók. Ez utóbbi reakciók lejátszódásának mechanizmusa attól függ, hogy az aromás gyűrű hordoz-e hidroxil szubsztituens/szubsztituenseket vagy nem [160].

A polihidroxikalkonok, hasonlóképpen a polihidroxiflavonoidok más csoportjaihoz, ismert természetes és szintetikus antioxidánsok. Antioxidáns hatásuk molekuláris alapja a legtöbb esetben a vegyületek hidroxilgyök befogó képessége, azonban a vegyértékváltó fémionokkal szemben mutatott komplexképző tulajdonságuk is képezheti antioxidáns hatásuk alapját. Bár a kalkonok és rokon szerkezetű flavonoidok hidroxilgyök befogó képessége a vegyületek egyik fontos kémiai reakciója, a dolgozatban tárgyát képező közleményeim az e területen végzett munkáim eredményeit nem tárgyalják. Így a vegyületek hidroxilgyök befogó képességének összefüggéseit tárgyaló közlemények [161-163] eredményeit e helyen nem részletezem.

A kalkonok és rokon szerkezetű vegyületek gyakran vizsgált reakciói az enon fragmens mono- és dinukleofil partnerekkel lejátszódó addíciós és kondenzációs reakciói. Dinukleofil partnerekkel lejátszódó reakcióikat gyakran alkalmazzák különféle heterociklusos vegyületek (pl. pirazolin, pirimidin, 1,3-tiazin-származékok) szintézisére [1,164,165]. A konjugált rendszer jellemzője, hogy mind a karbonil- mind a β -szénatom elektrofil tulajdonsággal rendelkezik (ambidens elektrofil). A két szénatom relatív elektrofil jellegét az enon rendszer szubsztituensei befolyásolják.

Az ún. 1,2-addíció (vagy direkt addíció) során a nukleofil reagens (NuH) a karbonil szénatomhoz kapcsolódik és elsődleges termékként egy O,Nu-félacetál keletkezik, ami a legalább két hidrogénatomot hordozó nukleofil centrumok (pl. primer aminok, hidroxilaminok, hidrazinok) reakciója esetén vizet veszít a reakció körülményei között. Egy adott nukleofil esetén a karbonilcsoport reaktivitását a karbonil szénatomhoz kapcsolódó szubsztituensek sztérikus és elektronikus tulajdonságai határozzák meg. Nagy térkitöltésű, elektronküldő szubsztituensek csökkentik a reaktivitást (13. ábra) [166].

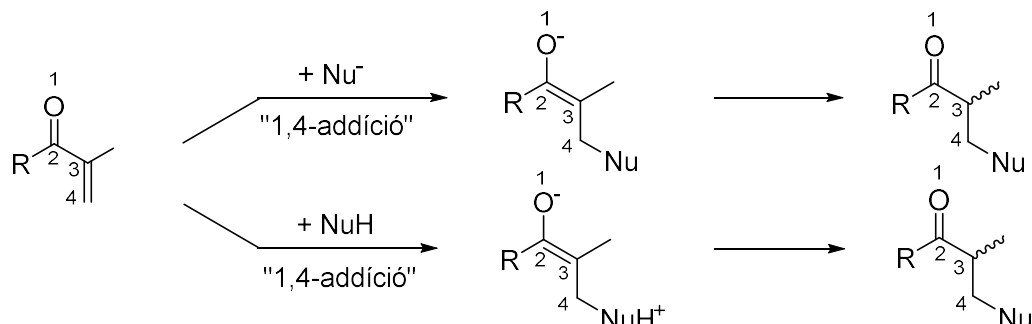


13. ábra. Az enonok 1,2- és 1,4-nukleofil addíciós reakciói

A β -szénatom reakciójával induló reakciók az ún. 1,4-addíciós (vagy konjugált addíciós) folyamatok. Ez esetben a nukleofil reagens (NuH) a nemkötő elektrópárjának részvételével a β -szénatomhoz kapcsolódik, a keletkező enolát protonálódik, majd az enol a termodinamikailag stabilabb ketonná tautomerizálódik (14. ábra) [167].

Deprotonált nukleofil reagensek (Nu⁻) esetén az elsődleges termék egy negatív töltésű enolát, semleges nukleofil reaktánsok (NuH) addíciója esetén egy

ikerionos szerkezetű enolát (14. ábra). Az enolát sztereokémiáját az enon rendszer szubsztituensei határozzák meg. Az 1,4-addíciós (ún. Michael-addíciós) folyamatban leggyakrabban alkalmazott nukleofilek között megemlíthetők a karbanionok, tioalkoholok, tiolátok, enamínok, aminok, valamint a szerves kuprátok (R_2CuLi) [168].



14. ábra. Az enonok 1,4-nukleofil addíciós reakcióinak mechanizmusai

Hogy egy adott reakcióban 1,2-, vagy 1,4-addíció játszódik le, azt a sztereokémiai feltételeken túlmenően alapvetően a nukleofil reagens természete határozza meg. Egy adott nukleofil esetén az 1,2- és az 1,4-addíció egymással versengő folyamatok. Ha a nukleofil erős bázis (pl. cianidion), vagy a reakció alacsony hőmérsékleten játszódik le, mind az 1,2, mind az 1,4 reakció visszafordíthatatlan és a folyamat kinetikai kontrol alatt áll. Mivel a karbonilcsoportra történő 1,2-addíciók gyorsabbak, ezekben a reakciókban az 1,2-es termékek túlsúlyát tapasztalhatjuk. Ha a nukleofil gyenge bázis (például aminok), akkor a lehetséges 1,2-addíció általában (nem túl alacsony hőmérsékleten) reverzibilis. Így az 1,2- és 1,4-addíció közötti versengés termodinamikai kontrol alatt áll. Ezért a legtöbb esetben az 1,4-addíciós termék képződése a domináns (14. ábra) [169].

Az 1,2- és 1,4-addíciós termékek megoszlásának egy másik magyarázatát az ún. HSAB (kemény-lágy savak bázisok) teória adja [170]. E teória szerint a kemény elektrofil centrumok preferáltan a kemény nukleofil reaktánsokkal reagálnak. Reakcióik során az elektrosztatikus kölcsönhatások dominálnak. Ugyanakkor, a lágy elektrofilek lágy nukleofilekkel (nagy méretű, kis elektronegativitású centrumokkal) lejátszódó reakcióit a nagyobb kiterjedésű, diffúz elektrónpályák átlapolása kontrollálja [171,172]. Az α,β -telítetlen karbonilvegyületek poláros karbonilcsoportjának szénatomja kemény, míg a kevésbé polarizált β -szénatomja viszonylag lágy elektrofil tulajdonságokkal rendelkezik (ambidens elektrofilek). Ezért a kemény nukleofil reagensek (Grignard-reagensek vagy fém-hidridek) esetén a direkt, míg lágy nukleofil reagensek (pl. tiolátok) esetén a konjugált addíciós folyamat preferenciája figyelhető meg [173].

Az elektrónpályák kölcsönhatása szempontjából meghatározó azok térbeli elhelyezkedése (koefficiense), valamint energiaszintje [171,172]. A nukleofil addíciós folyamat során a nukleofil HOMO molekulapályáján található elektrópár reagál az elektrofil partner LUMO molekulapályájával. A kölcsönhatás ott a

legkifejezettebb, ahol a LUMO pálya térkitöltése (koefficiense) a legnagyobb. Mivel enonok esetén a LUMO pályakoefficiense a β -szénatomon kifejezettebb, ezért a nagy térkitöltésű HOMO pályával bíró (lágy) nukleofil reagensek a β -szénatommal reagálnak [174].

A szervezetben számos reaktív tiolcsoporttal bíró fehérje meghatározó szerepet játszik a sejtek osztódásában, citoprotektív folyamatok szabályozásában, a redox homeosztázis fenntartásában [D3,175]. Ugyanakkor, a citoplazmában mM koncentrációban jelen lévő redukált glutation (GSH) a testidegen vegyületek metabolikus transzformációjában is jelentőséggel bír. Munkánk során részletesebben kalkonok (**4**) és karbociklusos kalkon-analógok (**6,7**) tiolokkal (redukált glutationnal (GSH) és *N*-acetilciszteinnel (NAC)) lejátszódó nem-enzimkatalizált reakcióit vizsgáltuk. A vizsgált vegyületek kiválasztása *in vitro* citotoxicitás vizsgálati eredményeik alapján történt. A kiválasztott vegyületek közé a leghatékonyabb és a kevésbé hatékony származékok egyaránt bekerültek. Így az eredmények tájékoztató információt adtak a tiol-reaktivitás jelentőségéről a vegyületek megfigyelt biológiai hatásaiban.

2.3. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok gyógyszerészeti jellemzése

A vegyületek fizikai-kémiai sajátosságainak ismerete mind kémiai, mind biológiai szempontból elengedhetetlen. Ezek a tulajdonságok meghatározzák egyrészt a vegyületek farmakokinetikai sorsát (felszívódását, eloszlását, metabolizmusát, kiürülését), valamint biológiai hatásaik kialakulását. Az ezen sajátosságokat meghatározó tulajdonságok között a leggyakrabban vizsgált fizikai-kémiai jellemzők a sav-bázis tulajdonság, az oldhatóság, a lipofilitás és a permeabilitás. Ezek tartoznak a hatóanyagok ún. „*physico-chemical profiling*” témakörébe [176,177]. Ennél valamivel szélesebb körű jellemzését jelenti az ún. gyógyszerészeti jellemzés („*pharmaceutical profiling*”), melybe már beleértendő a vegyületek azonosságának és tisztaságának („*integrity*”), valamint a metabolikus és kémiai stabilitásának, fehérjekötődésének és a - gyógyszerinterakciókra utaló - CYP450 enzimaktivitásra gyakorolt hatásának a vizsgálata is [178,179]. E jellemzők közül munkám során a vizsgált vegyületek lipofilitását, fehérje- és DNS-kötődését, valamint *in vivo* vékonybélből történő eliminációját, valamint intesztinális és hepatikus metabolikus transzformációit vizsgáltam. A vegyületek DNS-kötődési, valamint *in vitro* metabolikus stabilitásvizsgálatainak eredményei azonban terjedelmi és tematikai szempontok alapján nem kerültek be a dolgozatba.

2.3.1. Lipofilitás

A lipofilitás az egyik legrégebben használt fizikai-kémiai paraméter a gyógyszerkutatásban, amely, mint anyagi tulajdonság, a vegyületek apoláris (lipofil) környezethez való affinitását jellemzi. A testidegen vegyületek szerkezetbeli sorsát (farmakokinetika) és biológiai hatásait (farmakodinámia) egyaránt befolyásolja [180-182].

A biológiailag aktív (köztük a gyógyszerjelölt) vegyületek e fizikai-kémiai tulajdonságnak a jellemzésére leggyakrabban azok oktanol-víz megoszlási hányadosát, illetve annak tízes alapú logaritmusát ($\log P_{\text{oktanol/víz}}$) használják [183,184]. Bár az oktanol-víz megoszlási hányados ($\log P_{\text{oktanol/víz}}$) számítására számos számítógépes program áll ma már rendelkezésre, ezek alkalmazhatósága azonban limitált és számos kritikát váltott ki [185-187].

Egy adott vegyület lipofilitása szorosan összefügg annak ionizáltsági állapotával. Az ionizált és a nem-ionizált formák fizikai-kémiai tulajdonságai, így azok lipofilitása, eltérnek egymástól. A gyakorlatban ezért két különböző lipofilitást különböztetünk meg: az ún. *valódi megoszlási hányadost* ($\log P$) és a *látszólagos megoszlási hányadost*, vagy disztribúciós koefficiens ($\log P_{\text{app}}$; $\log D_{\text{pH}}$). Előbbi a nemionizált semleges forma, az utóbbi egy adott pH-jú környezetben előforduló formák összességének megoszlására vonatkozik [188].

A lipofilitás meghatározásának referencia módszere az ún. rázótolcséres eljárás [189]. A módszer ismert korlátai (pl. nagy időigény, oldhatósági problémák, nagy tisztaságú minták [190]) miatt ionizálható vegyületek esetén ma a pH-metriás meghatározás tekinthető referencia módszernek [191]. A nagyszámú vegyület lipofilitásának rövid időn belül történő meghatározására irányuló törekvések eredményeképpen számos ún. indirekt eljárás is alkalmazható a lipofilitás számszerű jellemzésére. Az indirekt $\log P$ meghatározások elvi alapját a folyadék/folyadék vagy folyadék/micella megoszláson alapuló kromatográfiás retenció (t_R vagy R_f) és a megoszlási hányados között fennálló összefüggés (korreláció) adja meg [192]. Az indirekt eljárások előnye, hogy az igen magas és nagyon magas lipofilitású vegyületek is mérhetők, a módszerek gyorsak és egyszerűek, és nem igényelnek nagy tisztaságú mintákat.

A munkánk során alkalmazott fordított fázisú vékonyréteg kromatográfiás módszer lényege, hogy direkt módszerrel meghatározott, ismert $\log P$ értékű referencia vegyületek sorozatára egy, a lipofilitástól függő vékonyréteg kromatográfiás paramétert, a retenciós faktorról közvetlenül összefüggésben álló ún. R_M értéket ($R_M = \log(1/R_f - 1)$) határozzunk meg, majd az R_M értékek alapján kalibrációs egyenest szerkesztünk az alábbi (9) egyenlet értelmében:

$$\log P = aR_M + b \quad (9)$$

ahol $\log P$ a referencia vegyületek lipofilitása, a a kalibrációs egyenes meredeksége, R_M a referencia vegyületek kísérletileg meghatározott R_M értékei, b az egyenes állandója.

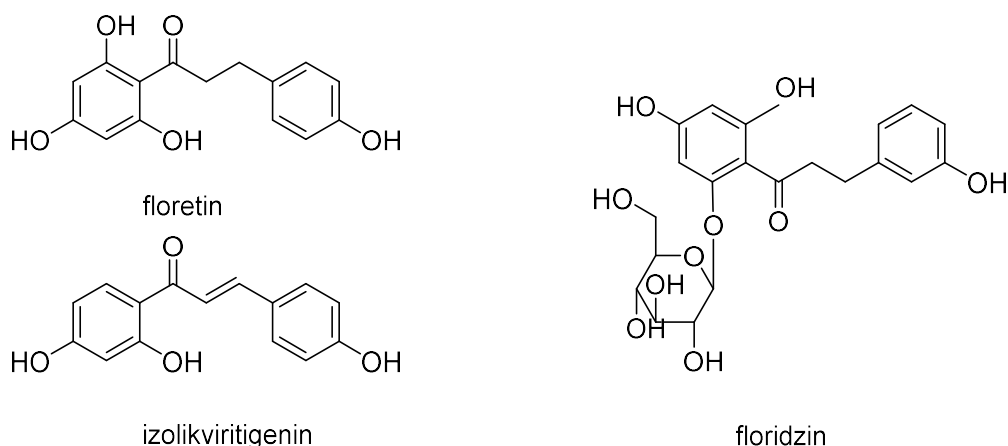
Az így kapott kalibrációs egyenes alapján meghatározható a vizsgált vegyületek $\log P_{\text{VRK}}$ értéke [193]. Mivel vizsgált vegyületeink fiziológias pH tartományokban (pH 6-8) kizárólag nem-ionizált formában fordulnak elő [S28], a $\log P_{\text{VRK}}$ értékek az adott pH tartományban állandónak tekinthetők.

2.3.2. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok intesztinális abszorpciója és metabolikus transzformációi

A modern gyógyszertervezés nemcsak a vegyületek farmakológiai aktivitására koncentrál, hanem azt is vizsgálja, hogy képesek-e felszívódni és elérni a kívánt hatás helyét. A vegyületek abszorpciójának vizsgálatára használt egyik módszer a bél-permeabilitás és metabolizmus vizsgálata kísérleti patkányokban. Korábban, két *kvázi in vivo* módszer került kifejlesztésre és széleskörű alkalmazásra [194,195,196]. Több kísérletes eredmény is igazolta, hogy a humán és a patkány vékonybél permeabilitás és a vizsgált vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságai nagyfokú hasonlóságot, szoros korrelációt mutatnak [197,198]. Az *in vivo* módszerek mellett, nagyszámú minta vékonybél permeabilitásának vizsgálatára alkalmazott technika a Caco-2 sejt monorétegeken keresztül történő diffúzió vizsgálata [199].

A testidegen anyagok metabolikus transzformációit kémiai szempontból Fázis I és Fázis II átalakulások közé csoportosíthatjuk [200]. A farmakokinetikai viselkedést tekintve további fázisokat is megkülönböztetünk (Fázis 0, Fázis III), amelynek során kovalens átalakulás nem történik, mégis a felszívódás és kiürülés, a biológiai membránokon való áthaladás szempontjából meghatározó lépések [201]. A vizsgált vegyületeink funkciós csoportjait (aromás gyűrű, karbonilcsoport, polarizált szén-szén kettős kötés) figyelembe véve, a Fázis I átalakulások közül az oxidáció és a redukció, a Fázis II átalakulások közül a glutation-konjugáció, a fenolos származékok esetén a glükuronsav-konjugáció a releváns transzformációk [200].

A flavonoidok, így a természetes kalkonok, mint élelmiszer tartalmi anyagok, felszívódásával és metabolikus átalakulásaival több szerző foglalkozott. A flavonoidok a természetben általában glikozid formában találhatók. A különböző cukorkomponensű flavonoid-glikozidok közül a glükozidok felszívódása általában gyorsabb, mint a nem-glükóz komponensű glikozidoké. Így például, Hollmann és mtsai [202], a kvercetin-glükozid és rutinozid összehasonlító abszorpciós vizsgálata alapján feltételezte, hogy a glükozid már a nagyobb abszorpciós kapacitással rendelkező vékonybélből képes felszívódni, míg a rutinozid csak a vastagbélből. Crespy és munkatársai a dihidrokalkon floridzin (floretin-2-glükozid) és aglikonjának (floretin) *per os* felszívódását vizsgálták kísérleti patkányokon (15. ábra). A vegyületek plazmakoncentrációjának vizsgálata során azt tapasztalták, hogy mindkét forma hatékonyan felszívódik, farmakokinetikájuk azonban különbözik; az aglikon felszívódása gyorsabb, a glükozidé elhúzódóbb [203].



15. ábra. A floretin, a floridzin (floretin-2-glükózid) és az izolikviritigenin szerkezete

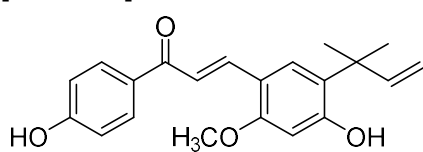
Egy közel egyidőben megjelent közleményükben a szerzők az általunk is alkalmazott *in vivo* patkány vékonybél perfúziós kísérletek során vizsgálták két flavonoid (kvercetin és floretin), valamint O-glükózidjaik felszívódását és metabolizmusát [204]. Vizsgálataik alapján mindkét vegyület esetén az aglikonok felszívódása a gyorsabb. Qiao és munkatársai az izolikviritigenin *per os* felszívódását vizsgálták patkány modellen. A szerzők azt találták, hogy a vegyület (aglikon) gyorsan felszívódik a gyomor-bél rendszerből [205]. Összefoglalva, az irodalmi adatok alapján megállapítható, hogy a flavonoidok és glükózkonjugátumaik jól felszívódnak a gyomor-bél rendszerből, valamint, hogy az aglikonok abszorpciója a gyorsabb folyamat [206].

Az abszorpció mellett, az ún. „*first-pass*” metabolizmus is erőteljes befolyással bírhat a felszívódó vegyületek biohasznosulására. Ezért a vegyületek intesztinális és hepatikus metabolizmusa is azok hatását befolyásoló tényező. A vizsgált vegyületeink szempontjából jelentős Fázis I reakciókat katalizáló enzimek közül kiemelendők a CYP enzimek, melyek közül a CYP 1A1, 2B1, 2C11, 2D2, 3A1 és 3A9 formák expresszióját igazolták a kísérleteinkben alkalmazott patkány vékonybélben [207]. Hasonló expressziós profilt mutattak a párhuzamosan vizsgált hepatikus CYP enzimek izoformái is. Itt azonban a CYP2E1 izoforma is kimutatható volt [208]. A CYP 1A enzimek kettős szerepet töltenek be a testidegen anyagok metabolizmusában; egyrészt gyógyszer-hatóanyagokat inaktíválnak, másrészt prokarcinogén anyagok (pl. policiklusos aromás szénhidrogének) metabolikus aktiválását is végzik [209].

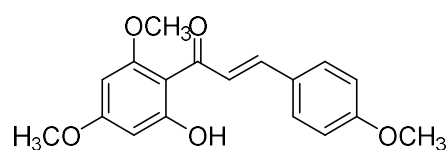
Kohno és munkatársai szubsztituátlan kalkon (**4a**) patkány máj mikroszóma frakcióval végzett kísérletében fő metabolitként 4-hidroxikalkont azonosítottak. A 4-hidroxilációt a rekombináns CYP 1A1, 1A2 és 2C6 izoenzimek katalizálták [210]. Cuendet és munkatársai az izolikviritigenin (15. ábra) *in vitro* és *in vivo* metabolizmusát vizsgálták patkány máj mikroszóma frakció alkalmazása, valamint kísérleti patkányok *per os* izolikviritigenin kezelése során. A máj mikroszóma inkubátumokból az anyavegyület hét oxidatív Fázis I metabolitját és három glükuronid konjugátumát, míg az *in vivo* kísérletekből származó

plazmamintákban öt glükuronid konjugátumát és három szulfát konjugátumát azonosítottak. Jelen dolgozatban bemutatott eredményeink szempontjából ugyancsak jelentőséggel bíró eredmény, hogy az izolikviritigeninnel kezelt kísérleti állatokon a 7,12-dimetilbenz[a]antracén-indukált emlőtumor kialakulásának látenciaideje megnőtt [211]. A szerzők a tapasztalatokat a vegyület - egy előző közleményükben igazolt - NAD(P)H:kinon reduktáz enzim indukciójával magyarázták [212].

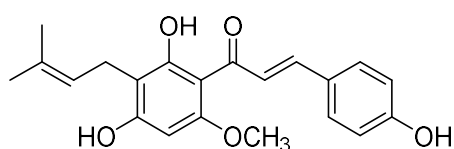
Az izolikviritigeninnel végzett kísérletekben igazolt metabolikus transzformációkhoz hasonló átalakulásokról számoltak be a likokalkon A [213,214], a flavokawain A, B, és C [215], a xantohumol [216], a hidroxiszafról sárga A [217] és több, malária ellenes hatású cisztein-proteináz gátló szintetikus kalkon [218,219] *in vitro* és *in vivo* vizsgálatai során is (16. ábra).



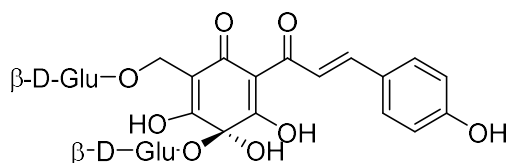
likokalkon A



flavokawain A



xantohumol



hidroxiszafról sárga A

16. ábra. A likokalkon A, flavokawain A, xantohumol és hidroxiszafról A szerkezete

A kalkonok Fázis II biotranszformációi közül mind kémiailag, mind biokémiai (farmakológiai) szempontból jelentőséggel bíró reakció a vegyületek redukált glutationnal (GSH) lejátszódó reakciója. A reakció alapját a GSH nukleofil kénatomjának a kalkonok polarizált szén-szén kettős kötésére történő addíciója (tia-Michael addíció) képezi [167,168]. A glutation a citoszolban relatíve magas koncentrációban (1-10 mM) megtalálható tripeptid. Tiol-funkciójának következtében fiziológiás körülmények között erős nukleofil; egyidejűleg redukáló (antioxidáns) tulajdonságú vegyület [220,221]. A vegyület kritikus szerepet játszik a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában, valamint a sejtciklus szabályozásában, az apoptózisban, az immunológiai védekezésben és a kóros rendellenességek megelőzésében [D3].

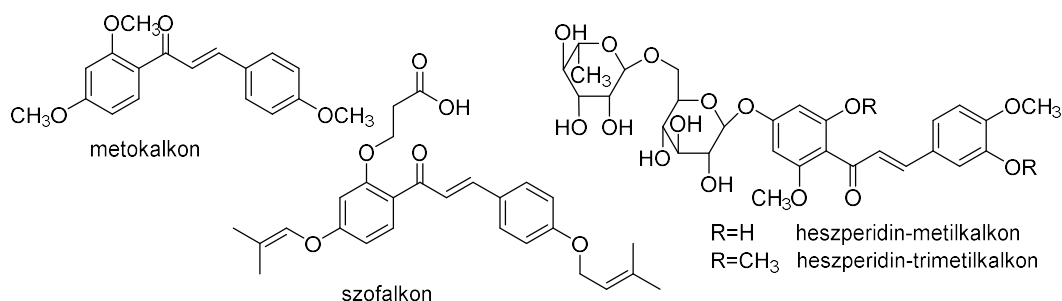
A GSH testidegen anyagokkal történő reakcióit a citoszolban, valamint a mitokondriális membránban lokalizálódó glutation-S-transzferáz (GST) enzimek katalizálják [222,223]. A GST enzimek három fő funkcióval rendelkeznek az élő szervezetekben: (a) katalitikus aktivitás, (b) nem-szubsztrát ligandumok megkötése, és (c) részvétel a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban [224-226]. A GST enzimek katalizátor hatásának alapja, hogy a redukált glutationnal történő kölcsönhatásuk eredményeképpen a GSH pK_a értékét (8,83) pK_a 6-7 értékre

csökkentik az enzim aktív helyének környezetében. Ezáltal megnő a nagyobb nukleofil erővel bíró tiolátiót hordozó GSH molekulák száma [D4,175,227,228]. A májban képződő GSH-konjugátumok kiürülnek az epével, vagy a vesében merkaptursav-származékokká alakulva a vizelettel ürülnek ki a szervezetből [200].

2.4. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok daganatellenes hatásai

Az irodalomban nagyszámú kísérletes és összefoglaló közlemény foglalkozik a természetes és szintetikus kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok sokrétű biológiai hatásaival. A növényi fiziológiás hatásaikon túl, ezek között megemlíthetők az antioxidáns, antidiabetikus, gyulladáscsökkentő, antibakteriális, antifungális, parazitaellenes, daganatellenes (citotoxikus és sejtosztódást gátló), valamint kardio- és neuroprotektív hatások [D1,9-23].

Ezideig a klinikai gyakorlatban két kalkon, a metokalkon (mint koleretikus szer) és a szofalkon (mint gyomorfekély-ellenes szer) került alkalmazásra (17. ábra) [14]. Ezenkívül klinikai vizsgálatok történtek a heszperidin-metilkalkon és a heszperidin-trimetilkalkon krónikus vénás elégtelenségben történő alkalmazásával kapcsolatosan (17. ábra) [14]. Ugyancsak számos klinikai vizsgálat tárgyát képezték a kalkonok, elsősorban a likokalkon A, szerepét gyulladásos bőrtünetek kezelésében (16. ábra) [18]. Saját vizsgálataink az általam szintetizált vegyületek daganatellenes (citotoxikus, sejtosztódást gátló és kemopreventív) hatásaival foglalkoztak. Így a jelen dolgozat csak e terület részletesebb áttekintésére korlátozódik.



17. ábra. A metokalkon, szofalkon, heszperidin-metilkalkon és heszperidin-trimetilkalkon szerkezete

A természetes kalkonok daganatellenes (daganatos sejtekkel szemben mutatott citotoxikus és sejtosztódást gátló) hatásait számos összefoglaló közlemény elemzi. Az összefoglalók alapján a természetes kalkonok viszonylag magas biztonsági profillal rendelkeznek [229-236]. Azonban a legtöbb esetben a vegyületek citotoxikus hatása, kémiai stabilitása, *per os* biológiai hasznosulása és metabolikus stabilitása távol áll a szintetikus vegyületekétől [233].

Ez utóbbi tapasztalatok alapján, nagyszámú kalkon, kalkonszármazék és kalkon-analóg szintéziséről és antiproliferatív (daganatsejt citotoxikus) hatásáról jelent meg az utóbbi években publikáció [236-246]. Mahapatra és munkatársai közleményében a daganatellenes kalkonokat nyolc csoportba sorolta: (1) celluláris transzportereken ható, (2) hormonháztartást befolyásoló, (3) fehérje

dezacetiláláson alapuló hatással rendelkező, (4) p53 fehérje degradációját gátló, (5) JAK/STAT szignalizációs mechanizmust gátló, (6) angiogenezist gátló, (7) sejtosztódást gátló, valamint (8) citotoxikus hatással bíró származékok [239]. A szerzők közleményükben 316 szintetikus és természetes kalcin fenti besorolás alapján történő bemutatását foglalták össze.

Ugyanakkor, a potenciálisan daganatellenes természetes és szintetikus kalcinok hatásainak más szempontból történő rendezése azt mutatta, hogy a vegyületek között megtalálhatók a kémiai karcinogenezis minden alapvető lépésének (inicializáció, promóció, progresszió) gátlásán alapuló hatással bíró származékok.

Így például, az inicializáció fázisában hatékony kalcinszármazékok lehetnek a reaktív metabolitok képződését katalizáló (pl. a policiklusos aromás szénhidrogéneket aktiváló CYP1A) enzimek gátlása [247], a reaktív intermediereket kevésbé toxikus származékokká konvertáló enzimek (pl. GSH-S-transzferáz, NAD(P)H kinon-reduktáz) enzimek aktivitásának megnövelése [247,248], valamint az oxidatív stressz következtében megnövekedett koncentrációjú reaktív gyökök (elsősorban a hidroxilgyökök) direkt kémiai kölcsönhatások (pl. gyökbefogási reakciók) révén kevésbé toxikus származékokká történő átalakítása [249-251]. E vegyületek kemopreventív szerekek tekinthetők. Ugyanakkor, kalcinok és kalcin-analógok antiangiogenetikus hatása a vegyületek antipromóter/antiprogesszív hatásának egyik jól dokumentált példája [236,243].

A daganatos sejtek osztódásának gátlása, szintén a kalcinok és kalcinszármazékok antikarcinogén hatásának jól dokumentált területe [239]. E hatások között megemlíthető a vegyületek antimitotikus [18,252,253], valamint a ciklin-dependens kináz [254-256], tirozin-kináz [257-259], topoizomeráz [260-264], vagy az I κ B [13, 265-267] enzimekre gyakorolt hatásuk.

A megismert biokémiai folyamatok természete, valamint a szerkezet-hatás összefüggések alapján, a fenti hatásokat a vegyületek kovalens és nem-kovalens kölcsönhatásokon alapuló hatásaiként csoportosíthatjuk. A kovalens kölcsönhatások közül csak a legvalószínűbbnek tekinthető, és a saját kutatási területemhez is kapcsolódó, tiol-reaktivitáson alapulókat tekintem át.

2.4.1. Nem-kovalens kölcsönhatásokon alapuló hatások

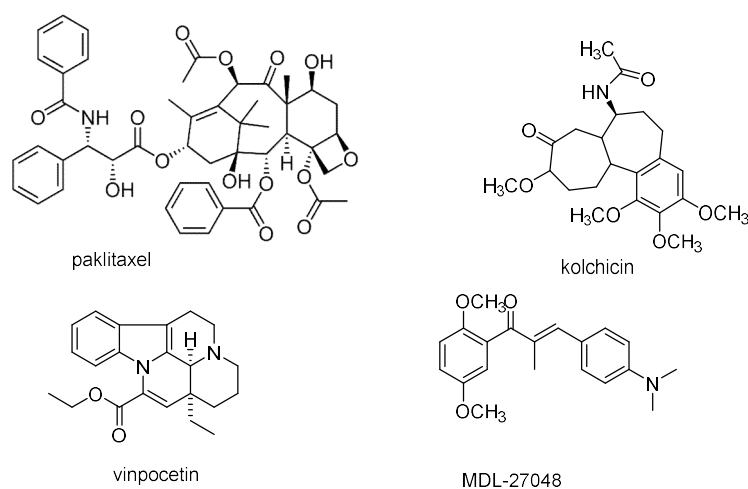
Nagyszámú közlemény írja le a vegyületek molekuláris kölcsönhatásainak természetét nem vizsgáló, feltételezett nem-kovalens kölcsönhatásokon alapuló biológiai hatásait. Így, számos közlemény számol be kalcinok *in vitro* α -glükózidáz, α -amiláz, valamint COX gátló hatásairól [18]. Különbözőképpen szubsztituált kalcinok α -glükózidáz és kolinszteráz gátlásának szerkezet-hatás összefüggései azt mutatták, hogy a leghatékonyabb származékok a B-gyűrű 4'-helyzetében elektronküldő szubsztituenset hordoznak. A szubsztituensek egyrészt jelentőséggel bírnak a célmolekulákkal kialakított kölcsönhatásokban, másrészt

növelik az elektronsűrűséget (csökkentik az elektrofil jelleget) a kalkon-molekularesz β -szénatomján [268].

A kalkonok daganatsejt citotoxikus hatásának egyik jellegzetessége, hogy a kezelt sejtek nagy hányadának osztódása a G_2/M fázisok határán megáll. Hasonló tulajdonsággal bír például a paklitaxel, ami egy a klinikai gyakorlatban is alkalmazott citosztatikum. A taxánok (pl. a paklitaxel) (18. ábra) a mikrotubulusok β -tubulin építőelemeivel képeznek komplexet és így megakadályozzák a mikrotubulusok depolimerizációját, az utódsejtek szeparációját. A kolchicin és a vinka-alkaloidok (pl. vinpocetin) (18. ábra) viszont a tubulin építőelemek asszociációját gátolják [269].

Az ezideig leghatékonyabb antimitotikus hatással bíró kalkon (MDL-27048) (18. ábra) 1989-ben történt publikálása [270] óta, nagyszámú kalkon és kalkonszármazék antimitotikus hatásáról jelent meg publikáció. Következő közleményükben a szerzők fluoreszcenciás vizsgálatokkal igazolták, hogy a vegyület a mikrotubulusok kolchicin-kötőhelyével alakít ki reverzibilis kölcsönhatást [271]. Molekula-dokkolással kapott eredmények több kalkon esetén azt mutatták, hogy a kalkonok a mikrotubulusok kolchicin kötőhelyéhez kapcsolódnak és gátolják a mikrotubulusok szintézisét [272]. A tubulin-aktív kalkonok vizsgálati eredményeinek jó összefoglalóját találhatjuk Mahapatra és munkatársai közleményében [239].

Egy átfogó áttekintő közleményben Ducki öt különböző csoportba sorolta a tubulin-aktív kalkonokat és kalkon-analógokat: (A) kalkonok; (B) α -szubsztituált kalkonok; (C) alkén-funkcionalizált kalkonok; (D) konformációban korlátozott kalkonok; és (E)-1,3-diszubsztituált kalkonok [252]. Az α -metil-szubsztituált kalkonok hatékonyabb antimitotikus szernek bizonyultak, mint a szubsztituátlan analógjaik. Ezt a szerző az előbbi származékok domináns *s-transz* konformációjának tulajdonította.



18. ábra. A paklitaxel, kolchicin, vinpocetin és MDL-27048 szerkezete

Egy következő, szintén a sejtciklust befolyásoló mechanizmusa a kalkonok daganatellenes hatásának a topoizomeráz II enzim gátlása [239]. A sejtekben a II-

es típusú topoizomerázok különösen fontosak az újonnan szintetizált testvérkromoszómák szétválasztására való képességük miatt. A klinikailag alkalmazott topoizomeráz II gátlók közül a legelterjedtebbek az antraciklin-antibiotikumok, amelyeknek legfontosabb képviselője a doxorubicin és a daunorubicin. Ezek közel planáris, kondenzált aromás gyűrűket tartalmazó molekulák, melyek a DNS egymás fölött elhelyezkedő purin és pirimidin bázisai közé ékelődnek és π -kölcsönhatások révén ott rögzülnek (interkaláló topoizomeráz II gátlók) [261]. Shangpheap és munkatársai 47, az A és B gyűrűn különbözőképpen szubsztituált kalkon és humán topoizomeráz II ATPáz és DNS-komplex kötőhelyének kölcsönhatását vizsgálták molekuláris dokkolási számításokkal. Az *s-cisz* konformációjú származékok a számítások szerint az enzim ATPáz kötőhelyével szemben mutattak nagyobb affinitást [264]. A topoizomeráz II gátlók ez utóbbi osztályába (topoizomeráz II inhibitorok) sorolt vegyületek legismertebb képviselője a bisz-dioxipiperazin, amit leggyakrabban antraciklin kezelés alatt álló betegek körében, mint kardioprotektív szert alkalmaznak [261].

2.4.2. Tiol-reaktivitáson alapuló hatások

Az α,β -telítetlen karbonilvegyületek, köztük a kalkonok és a gyűrűs kalkon-analógok tiolokkal lejátszódó Michael reakciója jól ismert átalakulása a vegyületeknek. Ezeknek az átalakításoknak az egyik *in vitro* és *in vivo* körülmények között is dokumentált átalakulása a citoszolban található tripeptiddel, a glutationnal (GSH) lejátszódó konjugált addíciója [273]. A glutationnal történő reakció azonban nem csak a testidegen anyagok biotranszformációja szempontjából jelentős. A GSH központi szerepet játszik a sejthalálban, beleértve az apoptotikus sejthalált is. A celluláris GSH szint többek között befolyásolja a kaszpáz aktivitást, a transzkripció faktorok aktiválását, a Bcl-2 expresszióját, a ceramid termelést, a tiol-redox jelátvitelt és a foszfatidilszerin-externalizációt [D3,274,275].

A kalkonok és más elektrofil centrummal bíró vegyületek azonban a GSH mellett más celluláris tiolokkal, proteinek, fehérjék reaktív tiolcsoportjaival is képesek reakcióba lépni. A celluláris makromolekulákkal történő kovalens kölcsönhatás kialakulásának feltétele a vegyületek előzetes, nem-kovalens módon történő kölcsönhatása. Leggyakrabban ez a kölcsönhatás eredményezi a vegyületek specifikus biológiai hatását. Ezt követően alakulhat ki kovalens kölcsönhatás a vegyületek elektrofil centrumaival. A leggyakoribb módosítandó funkciónak ezideig a cisztein tiolcsoportja bizonyult [276,277]. A kovalens módosító szerek molekuláris mechanizmusai között az aktivált szén-szén kettős kötésre történő tia-Michael addíció az egyik leggyakrabban előforduló protein-ligandum kölcsönhatás [278-282].

A kalkonok protein-tiolokkal lejátszó reakciójával értelmezhető például, a vegyületek nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) aktivitás gátlásán, valamint az Nrf2-

Keap1 útvonal aktiválásán alapuló gyulladáscsökkentő és (következésképpen) daganatellenes hatása [283-285]. Az Nrf2-Keap1 útvonal aktiválása és az NF- κ B útvonal gátlása példák a gyulladás elleni sejtes védekezési stratégiákra, melyekben a tiol-közvetítette II-es fázisú enzimek indukciójához vezető folyamatok kulcsszerepet játszanak [286-289]. Az NF- κ B útvonal gátlásának egyik lehetőségét jelentik, az optimális fizikai-kémiai tulajdonságokkal (pl. sztereokémia, $\log P$) és tiol-reaktivitással bíró, antiproliferatív hatású kalkonok, kalkon-analógok tervezése és alkalmazása. Ugyanakkor, az Nrf2 útvonal aktiválása a kémiai daganatképződés inicializációs fázisának gátlását (citoprotekció) eredményezi. További, a szerkezet-hatás összefüggések alapján tiol-reaktivitáson alapuló molekuláris mechanizmussal bíró kalkonok között beszámoltak p53-indukciót okozó [290], vaszkuláris endothelium növekedési faktor (VEGF) gátló [291], valamint katepszin-K gátló [292] származékok szintéziséről és vizsgálatáról.

A kovalens módosítás révén kialakuló biológiai hatás tervezése korai szakaszának egyik módszere a vegyületek különböző celluláris (és szintetikus) tiolokkal szemben mutatott reaktivitásának vizsgálata [280-282, 293,294]. Amslinger és mtsai kiterjedten vizsgálták az α -szénatomon különbözőképpen szubsztituált és szubsztituátlan kalkonok ciszteaminnal pH 7,4-es etilén-glikol-TRIS puffer elegyben lejátszódó reakcióit. A szubsztituátlan vegyületek szerkezet-hatás összefüggéseinek elemzésekor azt tapasztalták, hogy a B-gyűrű szubsztituenseinek elektronikus hatásai kifejezettebben érvényesülnek, mint az A-gyűrű hasonló szubsztituenseié [293]. Hasonló eredményt kaptak Dinkova-Kostova és mtsai is, kalkonok és kalkon-analógok különböző tiol-reagensekkel lejátszódó reakcióinak kinetikai vizsgálata során. Az α -szénatomon különbözőképpen szubsztituált kalkonok azonos körülmények között végzett összehasonlító kinetikai vizsgálata azt mutatta, hogy az α -helyzetű elektronküldő csoportok (pl. metilcsoport) csökkentik, elektronszívó csoportok (pl. nitrocsoport) növelik a származékok tiol-reaktivitását [294]. Petri és munkatársai eredményei rávilágítottak, hogy a különböző tiol-reagensek más-más reaktivitás-profil eredményeznek. Vizsgálataik alapján a GSH alkalmazása vezetett a humán vonatkozás szempontjából legrelevánsabb eredményekhez [281].

3. Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kutatómunka célja kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok szintézise, fizikai-kémiai és gyógyszerészeti jellemzése és *in vitro* megfigyelhető daganatsejt citotoxikus hatásainak szerkezet-hatás és tiol-reaktivitás-hatás összefüggéseinek megismerése volt. Ennek megfelelően, kutatómunkám célkitűzései a következők voltak:

1. Szisztematikusan változtatva a karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) gyűrűtagszámát, valamint a vegyületek B-gyűrűjének szubsztituenseit, szerkezet-hatás és szerkezet-reaktivitás összefüggések vizsgálatára alkalmas vegyületgyűjtemény szintézise, szerkezeti és sztereokémiai jellemzése.
2. A hattagú karbociklusos kalkon-analógok (**6**) heterociklusos analógjainak (**8,9**), valamint az **5-9** származékok ferrocén-analógjainak szintézise, szerkezeti jellemzése és daganatsejt citotoxikus hatásának vizsgálata.
3. Különböző gyűrűtagszámú karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) sztereokémiai stabilitásának, (*E*)/(*Z*)-izomerizációjának vizsgálata.
4. Különböző gyűrűtagszámú, 4'-helyzetben különbözőképpen szubsztituált karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) lipofilitásának jellemzése. Az (*E*)-konfigurációjú kalkonok (**5-7**) és megfelelő (*Z*)-izomerjeik lipofilitásának összehasonlítása.
5. Különböző gyűrűtagszámú, 4'-helyzetben különbözőképpen szubsztituált karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) elektronszerkezetének UV-Vis, IR és ¹³C NMR spektroszkópiai adatok alapján történő jellemzése. Az **5-7** származékok benzilidén-szubsztituensei elektronikus hatásainak lineáris szabadentalpia összefüggések alapján történő összehasonlító vizsgálata.
6. Különböző gyűrűtagszámú, a benzilidén-molekularész aromás gyűrűjén különbözőképpen szubsztituált gyűrűs kalkon-analógok (**5-9**) *in vitro* daganatsejt citotoxicitásának vizsgálata. A leghatékonyabb vegyületsorból (**7**) kiválasztott vegyületek sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata.
7. Kiválasztott (*E*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-benzoszuberon (**7**) származékok daganatos sejtekre jellemző génexpressziók változásaira gyakorolt hatásának vizsgálata *in vivo* kísérleteken.
8. Kiválasztott kalkonok (**4**) és karbociklusos kalkonszármazékok (**5-7**) *in vitro* CYP1A gátló hatásának szerkezet-hatás vizsgálata.
9. Kiválasztott kalkonok (**4**) *in vivo* vékonybélből történő eliminációjának és vékonybélben történő metabolizmusának vizsgálata.
10. Az A-gyűrűn különbözőképpen szubsztituált kalkonok (**16,17**) tiol-reaktivitásának vizsgálata, a vegyületek *in vitro* daganatsejt citotoxicitását jellemző IC₅₀ értékek és a megfigyelhető tiol-reaktivitás közötti kapcsolat elemzése céljából.
11. 4-helyzetben szubsztituált kalkonok (**4**) és különböző gyűrűtagszámú karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) tiol-reaktivitásának vizsgálata, a vegyületek gyűrűtagszáma, valamint a daganatsejt citotoxicitásukat jellemző IC₅₀ értékek és a tiol-reaktivitás közötti kapcsolat elemzése céljából.

4. Módszerek

A dolgozatban bemutatott eredmények és a kísérletek kivitelezése a hivatkozott saját közleményekben megtalálhatók, így a kivitelezés részletei ott áttekinthetők. A dolgozat terjedelme indokolta, hogy itt csak a legfontosabb anyagok előállításának és tisztításának eljárásait, valamint a saját munkák kísérleti, elemzési és értékelési módszereit soroljam fel.

4.1. Használt anyagok

A használt vegyszerek mindegyike analitikai tisztaságú volt. A szintézisekhez használt vegyszereket, oldószereket általában a Reanaltól (Budapest, Magyarország) vagy a Molar Chemicals Kft-től (Halásztelek, Magyarország) vásároltuk. A redukált glutationt és az *N*-acetilciszteint a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől, a CHROMASOLV gradiens metanolt a Honeywell Kft-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A HiperSolve CHROMANORM trifluorecetsavat a VWR International Kft-től (Debrecen, Magyarország), a hangyasavat a Fischer Chemicals-tól (Zürich, Svájc) szereztük be. A további felhasznált vegyszerek analitikai minőségűek voltak.

A vizsgált kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok kiindulási (*E*) izomerjeit szubsztituált benzaldehidek és a megfelelő ketonok bázis-katalizált Claisen-Schmidt reakciójával szintetizáltuk [D5-D14]. A minták tisztítását normál fázisú oszlopkromatográfiával, állófázisként szilikagél (Kieselgel 60; 0,040–0,063 mm, Merck), mozgófázisként toluolt, illetve változó összetételű toluol-etanol, vagy etilacetát-hexán elegyet használva végeztük. A reakciók előrehaladását, valamint a minták tisztaságát VRK (szilikagél 60 F₂₅₄; Merck Life Science Kft, Budapest, Magyarország) és/vagy HPLC-UV-Vis módszerekkel ellenőriztük. A vegyületek szerkezetét IR, NMR, MS és több esetben röntgendiffrakciós módszer alkalmazásával igazoltuk. A tiokromanon-származékok (**9**) *exo*-*endo* izomerjeinek szétválasztását oszlopkromatográfia (szilikagél/toluol) alkalmazásával végeztük [D12]. A kísérletek során használt minták tisztaságát alkalmazás előtt VRK és GC-FID, vagy HPLC-UV-Vis módszerekkel ellenőriztük.

A megfelelő (*Z*)-izomereket az (*E*)-izomerek fény-inicializált izomerizációjával nyertük. A kapott izomerek szerkezetét ¹H NMR, GC-MS és HPLC-MS mérésekkel igazoltuk [D16,D17,D33,D38,D39].

A humán Jurkat T limfocita sejteket (ATCC, E6-1 klón) az LGC Promochemtől (Teddington, UK) szereztük be. A Jurkat sejtek tenyésztése 37 °C-on, megfelelő pára- és 5% CO₂-tartalmú környezetben, RPMI 1640 tápoldatban (pH 7,4) történt, amit kiegészítettünk 10% FCS-sel (magzati borjú szérum, Diagnosticum Zrt. Budapest, Magyarország), penicillinnel (100 U/ml) és sztreptomocinnel (100 µg/ml) [D29,D232].

4.2. IR és UV-Vis mérések

A szintetizált vegyületek infravörös spektrumait Nicolet Impact 400 (Nicolet) [D5,D9,D11], vagy Bruker IFS-55 FT IR spektrofotométeren [D7,D8,D10,D25], KBr

pasztillában, referencia spektrumként KBr pasztillát használva vettük fel. A vizsgált vegyületek oldatfelvételei kloroformos oldatban Zeiss Specord M80 (Carl Zeiss, Jena) készülék alkalmazásával készültek [D15].

Az UV-Vis abszorpciós spektrumokat Specord M40 (Carl Zeiss, Jena, Germany), Secomam Anthelie Light (Secomam, Alés, France) [D18], Shimadzu MultiSpec-1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) [D20], valamint Jasco V-750 (ABL&E Jasco Magyarország Kft, Budapest Magyarország) [D19] kétsugaras spektrofotométereken, 10 mm-es küvetták használatával vettük fel.

4.3. NMR mérések

A szintetizált vegyületek ^1H és ^{13}C NMR analíziseit Perkin-Elmer R12A (60 MHz), JEOL FX90Q (90 MHz) [D5,D8,D11], Varian UNITY/NOVA 400 WB (400/100 MHz, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) (Varian, Palo Alto, CA, USA) [D12,D15,D16, D21] vagy Bruker Avance DRX 500 FT NMR (500.13/125.77 MHz, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) spektrométerek alkalmazásával végeztük [D6,D8,D10,D25].

4.4. GC Mérések

A GC-FID és GC-MS méréseket HP5890 Series II gázkromatográfion lángionizációs (FID) és/vagy HP5971A tömegszelektív detektor (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) alkalmazásával végeztük. A HP5971A tömegszelektív detektort *scan* módban (50-600 m/z) működtettük [D16].

4.5. HPLC-UV és HPLC-FL mérések

A méréseket a Gyógyszerészi Kémiai Intézetben működő, integrált Agilent 1100 HPLC-UV-Vis [D17,D24,D33-D39], illetve HPLC-FL [D34] rendszerrel (kvaterner pumpa, gázmentesítő egység, automata injektor, termosztálható kolonnatartó, UV-Vis, illetve fluoreszcencia (FL) detektor) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) végeztük. Az adatokat az Agilent ChemStation Rev. A.10.02 és Rev. B.03.01 operációs rendszerek segítségével rögzítettük és értékeltük.

4.6. HPLC-MS mérések

A kalcion-GSH/NAC *in vitro* inkubációs elegyek HPLC-MS méréseihez [D33,D36,D38,D39] a Gyógyszerészi Kémiai Intézetben működő Thermo Q Exactive Focus kvadrupól-Orbitrap hibrid tömegspektrométerhez (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kapcsolt Thermo Dionex UltiMate 3000 folyadékkromatográfiás rendszert (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) használtuk. Az adatgyűjtést és adatelemzést Q Exactive Focus 2.1, Xcalibur 4.2. és FreeStyle 1.8 szoftverek (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük.

A **7b** és **7c** vegyületek *in vitro* sejtes és sejtmentes körülmények között GSH-val lejátszódó reakcióiban keletkező vegyületek vizsgálatát a PTE Orvosi és Biokémiai Intézetben működő, Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) mikro HPLC rendszerhez kapcsolt Bruker microTOF tömegspektrométerrel (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) végeztük. Az adatgyűjtéshez és adatelemzéshez a Bruker Data analysis 4.1 szoftvert használtunk [D32,D37].

A **4r**, **4s**, **16b** és **16c** 4-hidroxikalkonok *in vitro* GSH-inkubátumai és intesztinális perfúzió során nyert mintái HPLC-MS analízisét a PTE ÁOK Igazságügyi Orvostani Intézetben működő, Jasco HPLC rendszerhez kapcsolt Waters TQ-S micro [D27,D34], illetve Waters Xevo TQ-S micro tripla-kvadrupól tömegspektrométer (Waters, Milford, MA, USA) [D34] alkalmazásával végeztük.

4.7. Log P_{VRK} meghatározási kísérletek [D22-D25]

A **4-8** vegyületek log P értékének meghatározása a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémia Intézetében kimunkált fordított-vékonyrétegekromatográfiás technika alkalmazásával történt. A módszer lényege, hogy az eljárás során a lipofilitástól függő kromatográfiás paramétert (a retenciók faktorral közvetlenül összefüggésben álló ún. R_M értéket: $R_M = \log (1/R_f - 1)$) határozzuk meg, majd kalibrációs egyenes felhasználásával log P értéket számolunk ($\log P = aR_M + b$) [320]. A meghatározáshoz szilanizált szilikagél 60F₂₅₄ (20 cm x 20 cm) lapokat (Merck Life Science Kft, Budapest, Magyarország) és metanol-víz (60+40) kifejlesztő elegyet használtunk. A kifejlesztést követően a foltok előhívása UV-fényben ($\lambda = 254$ nm), valamint jódgőzben történt. Minden vizsgálati eredmény három párhuzamos meghatározásból származik [D22-D25].

A *para*-szubsztituált vegyületek log P_{CLOGP} értékének számolásához a Chem3D Ultra 9.0.1. szoftver (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) CLOGP alkalmazását használtuk.

4.8. Állatkísérletek [D27]

Kísérleteinket 230-260 g tömegű, 24 órán át éheztetett hím Wistar patkányon (9-11 hetesek; súlyuk 250-300 g; TOXI-COOP, Magyarország, Budapest), a Gyógyszerészi Kémiai Intézet állatkísérletes laboratóriumában végeztük. A kísérleti állatok altatásához 1,2 g/kg intraperitoneálisan (i.p.) adott uretánt alkalmaztunk. A középvonaltól mentén hasi feltárást végeztünk, majd a vékonybél jejunális szakaszának 10 cm-ét kanüláltuk. A perfundálást a vizsgált vegyület izotóniás perfúziós médiummal készített, 15 ml térfogatú oldatával végeztük, 13 ml/perc áramlási sebesség mellett, 90 percig. Az izolált bélszakasz disztális végén kifolyó oldatot egy rezervoárba vezettük, amelyből egy perfúziós pumpa segítségével azt folyamatosan visszajuttattuk a bélumenbe. A kanülált szegmentumból kifolyó perfúziós folyadékból meghatározott időközönként 250 μ l térfogatú mintát vettünk. A perfundált oldat hőmérsékletét a perfúzió teljes időtartama alatt 37 °C-on tartottuk. Az eredmények három párhuzamos kísérletből származnak. Az ábrákon (27. és 28. ábra) feltüntetett adatok az átlagértékeket és a szórás (*standard error*) jelölik.

Az analitikai mérések validálásához kontroll állatkísérleteket végeztünk. A kontroll kísérletek során a perfúziót izotóniás perfúziós médiummal végeztük. A kontroll kísérletek során a perfúziót izotóniás perfúziós médiummal végeztük. Az így kapott oldatokat használtuk oldószerként a HPLC-UV mérések validálása során. A perfúziós médium kezdeti volumene 15 ml volt, amely a perfúzió

időtartama alatt a mintavételek következtében csökkent, illetve a bél folyadékot exkretáló vagy felszívó tevékenysége révén is módosulhatott. Mindkét tényező figyelembevételével történő korrekció segítségével számítottuk ki az aktuális perfúziós volument egy adott időpontra vonatkoztatva.

4.9. Áramlási citometriai vizsgálatok [D29]

4.9.1. Sejtkezelési protokoll

A kísérleteket a PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet laboratóriumában végeztük, Jurkat T-sejtek alkalmazásával. A sejtek kezelése (5×10^5 db sejt / 1,0 ml RPMI 1640 tápoldat) a **7b** (23,3 μ M), illetve a **7c** (5,6 μ M), vegyületekkel a vizsgálati módszereknek megfelelően 1, 4, 8, 24, illetve 48 órán keresztül történt. A koncentráció értékek az előzetesen meghatározott IC_{80} dózisértékeknek feleltek meg [D5]. A kalkon-származékokat DMSO-ban oldottuk, és a DMSO-oldatból 10 μ l-t adtunk 1,0 ml sejteket tartalmazó tápoldathoz. A kontroll sejtuszuspenziókat nem kezeltük, illetve minden esetben készítettünk egy olyan kontrollt is, ami csak 1% DMSO-t tartalmazott, kalkon nélkül.

4.9.2. Citotoxicitás vizsgálatok

A Jurkat T-sejtek kezelése (5×10^5 db sejt / 1,0 ml RPMI 1640 tápoldat) a **7b** (23,3 μ M), illetve a **7c** (5,6 μ M) vegyületekkel a sejtkezelési protokoll (4.9.1) szerint történt. A 8, 24 és 48 órás sejtkezelést követően az összes sejt, valamint az életképes sejtek számolása tripánkék festékkizárásos teszttel, hemocitóméter használatával történt. Az eredmények négy párhuzamos mérésből származnak. A táblázatban (22. táblázat) feltüntetett adatok az átlagértékeket és a szórást (*standard error*) jelölik.

4.9.3. Áramlási citometriai vizsgálatok

4.9.3.1. Sejtosztódásra gyakorolt hatás vizsgálata

Az áramlási citometriai méréseket és analíziseket a PTE ÁOK Biofizikai Intézetben működő FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) áramlási citométeren a CellQuest (BD Biosciences) program segítségével végeztük.

A Jurkat T-sejteket (5×10^5 db sejt/1,0 ml tápoldat) a **7b** (23,3 μ M), illetve **7c** (5,6 μ M) vegyületekkel a sejtkezelési protokoll (4.9.1) szerinti 8, 24 és 48 órás kezelést és centrifugálást (1000g, 5 perc) követően kétszer hideg PBS-pufferrel, majd annexin-kötő pufferrel mostuk. A sejteket annexin-kötő pufferben felvettük és 2 μ l fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt annexin V-oldattal (Annexin V-FITC) (BD Biosciences) és 10 μ l 50 μ g/ml koncentrációjú propídium-jodid (PI) oldattal fénytől védve, szobahőmérsékleten 15 percre inkubáltuk. Az inkubációs idő lejártá után a mintákat annexin-kötő pufferrel 500 μ l-re hígítottuk, majd 30 percen belül vizsgáltuk áramlási citométerrel. A 48 órán keresztül kezelt sejtek jelölése az előzőekhez hasonlóan, de csak propídium-jodiddal történt. Az eredmények négy párhuzamos mérésből származnak. A táblázatban (23. táblázat) feltüntetett adatok az átlagértékeket és a szórást (*standard error*) jelölik.

4.9.3.2. Sejtciklus-analízis

A Jurkat T-sejteket (5×10^5 db sejt/1,0 ml tápoldat) a **7b** (23,3 μ M), illetve **7c** (5,6 μ M) vegyületekkel a sejtkezelési protokoll (4.9.1.) szerinti 8, 24 és 48 órás kezelést és centrifugálást (1000g, 5 perc) követően kétszer hideg PBS-pufferrel mostuk, majd 20 percen keresztül 300 μ l 4% paraformaldehid-oldattal fixáltuk. Ezt követően a sejteket kétszer 2,0 ml PBS-pufferrel, majd 1,0 ml szaponin-pufferrel (PBS/0,1% BSA/0,1% szaponin) mostuk, majd 300 μ l propídium-jodid (PI) jelölő-oldatban (50 μ g/ml PI; 100 Kunitz egység RNase A szaponin pufferben) vettük fel. Az áramlási citometriai méréseket és analíziseket 30 perc inkubálási időt követően végeztük. Az eredmények négy párhuzamos mérésből származnak. A táblázatban (24. táblázat) feltüntetett adatok az átlagértékeket és a szórást (*standard error*) jelölik.

4.10. Génexpressziós kísérletek [D30]

4.10.1. Kísérleti állatok kezelése

A **7c** gyűrűs kalkonszármazék génexpressziókra gyakorolt hatását vizsgáló kísérletben három, hat-hat, 6-8 hetes nőstény CBA/Ca beltenyésztett egérből álló csoportot intraperitoneálisan (i.p.) adott, 40 mg/testtömeg/kg dózisu, kukoricaolajban oldott 7,12-dimetilbenz[a]antracénnel (DMBA) kezeltünk. A három csoport közül kettő 25 mg/testtömeg/kg dózisu, kukoricaolajban oldott **7c** kalkont is kapott (i.p.); az első csoport a DMBA-kezeléssel egyidejűleg, a második csoport pedig 24 órával a DMBA kezelés előtt. A negyedik (kontroll) csoport (6 egér) kukoricaolajat (1 ml/testtömeg/kg, i.p.) az ötödik csoport (6-6 egér) kukoricaolajban oldott **7c** kalkont (25 mg/testtömeg/kg, i.p.), majd 24 órával a **7c** kezelést követően kukoricaolajban oldott DMBA-t (40 mg/testtömeg/kg; i.p.) kapott. A hatodik csoport (6-6 egér) csak kukoricaolajban oldott **7c** kalkont (25 mg/testtömeg/kg, i.p.) kapott.

Az utolsó kezelés után 24 órával cervikális diszlokációt követően az állatok máját, tüdejét, veséit RNS-izolálás céljából eltávolítottuk.

4.10.2. RNS izolálás

Az állatkísérletek során nyert szervekből a génexpresszió-változások vizsgálatához szükséges RNS izolálása guanidin-izotiocianát-fenol-kloroform (Trizol; Invitrogen, Paisley, UK) oldat használatával, standard módszerrel történt [295]. Az egy-egy kísérleti csoportból származó egyesített RNS minták tisztaságát a 260/280 nm-en mért fényelnyelés hányadosával ellenőriztük.

4.10.3. Slot-blot hibridizáció

Hoefer slot-blotter segítségével 10 μ g nukleinsavat Amersham Hybond-N+ nitrocellulóz membránra (Merck Life Science Kft, Budapest, Magyarország) vittünk, majd kemilumineszcensen jelölt próbával (Amersham ECL) 42 °C-on, egy éjszakán át hibridizáltuk, a gyártó által megadott protokoll szerint. A kemilumineszcens jelet előhívás után digitalizáltuk, majd a Quantiscan 2.0 (Biosoft) programmal értékeltük. Minőségi kontrollként a konstitutívan expresszáldó β -aktin génnel végeztünk rehibridizációt. A Ha-ras, c-myc, p53 és

β -aktin gének plazmidba illesztett klónozott génpróbáit (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) *E. coli* HB 101 baktériumtörzsben tartottuk fenn, és a kísérlet előtt abból izoláltuk.

4.11. *In vitro* tiol-reaktivitás celluláris környezetben [D32]

A Jurkat T-sejteket (5×10^6 db sejt) a **7b** (23,3 μ M), illetve **7c** (5,6 μ M) vegyületekkel egyrészt 1,0 ml PBS-pufferben (tápanyagmentes környezet) 1 órán át, másrészt 1,0 ml RPMI 1640-tápadatban 4 és 8 órán át inkubáltuk a sejtkezelési protokoll (4.9.1.) szerint. Az inkubálást követően az elegyet centrifugáltuk (1000g, 5 perc), kétszer 1,0 ml hideg 0,9%-os NaCl-oldattal mostuk, majd 600 μ l TRIS-pufferben (50 mM; 0,1% SDS; pH 7,4) feloldottuk. A sejteket 3 egymást követő „freeze-thaw ciklust” alkalmazva roncsoltuk. A sejtlyázumokat centrifugáltuk (13 000g, 5 perc), a tiszta felülúszót a szabad celluláris tiol-szint, a glutation-szint (GSH és GSSG), valamint a fehérjekoncentráció meghatározására használtuk.

A minták GSH és GSSG tartalmának meghatározása céljából a felülúszókat perklórsavval kezeltük, a kicsapódott fehérjét centrifugálással (10000g, 4 perc) eltávolítottuk, 1 M KOH-oldattal semlegesítettük, a kivált KClO₄ csapadékot centrifugálással (3000g, 3 perc) szeparáltuk. Az így kapott felülúszóból történt a redukált és oxidált glutation-szint meghatározása HPLC-FL módszerrel. A kezeletlen és a kalkonokkal kezelt minták glutation-koncentrációjának meghatározása a standard sorozat mintáinak meghatározása során felvett kalibrációs egyenesek segítségével történt. A mért redukált és oxidált glutation-szinteket a minták fehérjemennyiségére vonatkoztattuk. Az eredmények három párhuzamos mérésből származnak. A táblázatban (35. táblázat) feltüntetett adatok az átlagértékeket és a szórást (*standard error*) jelölik. A szignifikanciát az egymintás Student-féle *t*-teszttel számítottuk ki. A kontrolltól való szignifikáns eltérés jelölése: * $p < 0,05$.

A **7b** és **7c** vegyületek GSH-konjugátumainak vizsgálata céljából a felülúszókat és a feltárt üledékeket centrifugális szűrő (Amicon Ultra, 10K „cut off” membrán, Merck-Millipore, Budapest, Magyarország) segítségével fehérjementesítettük, centrifugáltuk (10000g, 30 perc) majd ESI(+) HPLC-MS módszerrel vizsgáltuk. A sejtes üledék feltárását nagy energiájú ultraszonikátorban (UIS250V) (6x10 másodperc) jeges hűtést alkalmazva végeztük.

4.12. *In vitro* tiol-reaktivitás sejtmentes körülmények között [D33-D39]

A vizsgált kalkonok (**4**) és analógjaik (**6,7**) redukált glutationnal (GSH) és *N*-acetilciszteinnel (NAC) sejtmentes körülmények között lejátszódó reakcióját három különböző pH értékre (3,2, 6,3 és 8,0) beállított GSH/NAC oldat használatával vizsgáltuk. A tiolok vizes oldatát (1,5 ml, 0,3 mmol tiol) a kalkonok metanolos oldatával (4,6 ml, 0,03 mmol kalkon) elegyítettük ($t = 0$). Az elegyítés előtt mindkét oldatot 37 °C-os vízfürdőben 15 percig sötétben előinkubáltuk. Ezután az oldatokat elegyítettük, és a reakcióelegyeket 315 percig sötétben, szabályozott hőmérsékletű (37 °C) vízfürdőben tartottuk. A reakció előrehaladásának nyomon

követése céljából az inkubációs elegyek összetételét a 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 225, 255, 285 és 315 perc időpontokban HPLC-UV-Vis módszerrel elemeztük. Minden esetben két párhuzamos mérést végeztünk. Az ábrákon (38-41, 58, 59, 60 és 61 ábrák) feltüntetett adatok az átlagértékeket és a szórást (*standard error*) jelölik.

A kontroll kísérletekben a tiolok vizes oldata helyett 1,5 ml pH 3,2, pH 6,3 és pH 8,0 kémhatású (tiol-mentes) vizes oldatot használtunk. Az elegyek összetételét a tiol-tartalmú inkubátumokhoz hasonlóan, a 0, 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 225, 255, 285 és 315 perces időpontokban HPLC-UV-Vis módszerrel elemeztük.

A kiindulási vegyületek korábban bizonyított [D16,D17] fény-inicializált (E)/(Z) izomerizációjának termékeit összehasonlítottuk a vegyületek nem fény-inicializált (retro-Michael-addíció) izomerizáció termékeivel. E célból a kalkonok metanolos oldatait 1 hétig szórt laboratóriumi fényben tartottuk.

A **4r**, **4s** 4-hidroxikalkonok és a **16b** és **16c** bisz-Mannich kalkonszármazékok tiol-reaktivitásának vizsgálatát 3:1 GSH:kalkon molarányt használva, négy különböző savasságú (pH 3,2, pH 6,1, pH 7,4 és pH 8,0) oldatban végeztük. A reakciópartnerek elegyét a fentiekhez hasonlóan, 37 °C-on inkubáltuk és az elegyek összetételét 0, 30, 60, 120, 180 perc inkubálást követően HPLC-UV-Vis módszerrel analizáltuk. A **4r** és **4s** vegyületek reakciót – a **4b** és **4c** kalkonokhoz hasonlóan – 75 %(v/v) metanol tartalmú vizes oldatban, a vízzoldékony **16b** és **16c** vegyületek reakcióit 0,01 M (pH 7,4) vagy 0,2 M (pH 6,1, pH 7,4 és pH 8,0) foszfát pufferben végeztük. A **4r** és **4s** vegyületek esetén a GSH-oldat savasságát 1 M NaOH-oldat hozzáadásával, a **16b** és **16c** vegyületek esetén a GSH szubsztancia adott pH-jú foszfát-pufferben történő oldásával állítottuk be [D34].

A **17a** és **17b** nyíltláncú, valamint a **18a** és **18b** gyűrűs kalkon-szulfonamid hibridek (3. ábra) glutationnal szemben mutatott reaktivitását DMSO:H₂O(pH3,2) = 9:1 (v/v) arányú oldószerkeletben vizsgáltuk. Vizsgálataink során 100 µl frissen készített pH 3,2-es ($1,875 \times 10^{-3}$ mmol, illetve $7,5 \times 10^{-3}$ mmol GSH-tartalmú) vizes GSH-oldatot és 900 µl frissen készített, $6,25 \times 10^{-4}$ mmol kalkon-tartalmú DMSO-oldatot használtunk. Az elegyeket 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk és a reakciók előrehaladását HPLC-UV módszerrel követtük. Két párhuzamos kísérletet végeztünk, melyek eredményeinek eltérése minden mérési pontban $\pm 5\%$ -on belüli volt [D36].

A kiindulási kalkonok, gyűrűs kalkon-analógok, a vegyületek (Z)-izomerjei, valamint tiol-konjugátumai szerkezetét minden vizsgálat során HPLC-MS módszerekkel igazoltuk.

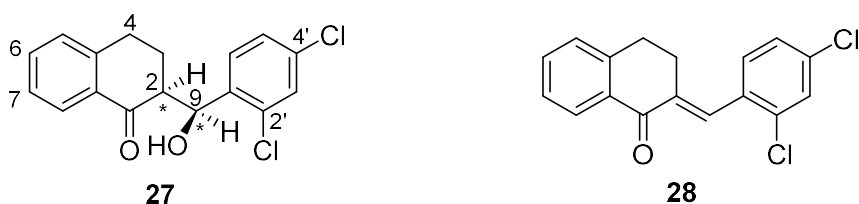
5. Eredmények és diszkusszió

5.1. Kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok szintézise, sztereokémiája [D2,D4-D14]

5.1.1. Szintézis, IR, NMR és röntgenkristallográfiai vizsgálatok [D4-D14]

A vizsgálataink tárgyát képező kalkonokat (**4**) és gyűrűs kalkon-analógokat (**5-9**; **12-16**) (2. és 3. ábra) aromás aldehidek (szubsztituált benzaldehidek, ferrocén-karbaldehid) és acetofenon, cikloalkanonok ($n=5-7$), illetve gyűrűs benzociklanonok (1-indanon, 1-tetralon, 1-benzoszuberon, 4-kromanon, 4-tiokromanon) bázis-katalizált Claisen-Schmidt reakciójával állítottuk elő [D2]. A legtöbb esetben [D5-D12] bázisként nátrium-hidroxid-oldatot használtunk. 1-Kromanon és 1-tiokromanon alkalmazása esetén, korábbi irodalmi tapasztalatok alapján [47-49], a kondenzációs reakciókat néhány csepp piperidin katalizátor jelenlétében végeztük. Ez esetben csökkenteni tudtuk az elsődleges termék exo-endo kettőskötés átrendeződését. Így is azonban a legtöbb esetben a reakciók az exo (**8,9**) és az endo (**10,11**) kettős kötésű struktúrizomerek képződését eredményezték (5. ábra). A keletkező szerkezeti izomereket oszlopkromatográfias módszerrel szeparáltuk [D11,D12].

Saját kísérleteink során a Claisen-Schmidt kondenzáció elsődleges termékét (aldol) csak a 2,4-diklórbenzaldehid és 1-tetralon reakciójában tudtuk izolálni. A vegyület szerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel igazoltuk. Amint azt a 19. ábra mutatja, az izolált vegyület (**27**), a $2S^*$ és $9S^*$ konfigurációjú diasztereomer, melyben a ciklohexénon gyűrű félszék konformációjú és a nagy térkitöltésű C-2-szubstituens pszeudo-ekvatoriális helyzetű [D13]. A **27** aldol adduktot és az abból keletkező (*E*)-2-(2',4'-benzilidén)-1-tetralont (**28**) oszlopkromatográfias módszerrel választottuk el egymástól. Utóbbi szerkezetét, így (*E*)-konfigurációját, röntgendiffrakciós módszerrel is igazoltuk [D14].



19. ábra. A **27** és **28** vegyületek szerkezete

Vizsgálatainkba bevontuk a **15** bisz-kalkon-analógokat [S9], valamint a 4-hidroxikalkonok 3,5-(dialkilaminometilén)-származékait (**16**) is (3. ábra). Utóbbiakat a kiindulási kalkonok és *N,N*-dialkil-metiléniminium-klorid (Eschenmoser só) reakcióiban, a részben vezetésem alatt dolgozó braziliai Ph.D. hallgatóm szintetizálta [D35]. A tetralonszármazékok *N*-analógjának tekinthető 4-kinolinonszármazékok (**18**) szintézise a nyíltláncú 2-benzolszulfonamido kalkonok (**17**) 4-nitro-, illetve 3-nitrobenzaldehyddel lúgos körülmények között lejátszódó reakciójával történt, szintén a braziliai laboratóriumban (3. ábra) [D37].

Az alkalmazott gyűrűs ketonok, valamint az 1-tetralon heteroanalógjainak kiválasztása lehetővé tette a kalkon-molekularész különböző konformációinak és konjugációs viszonyainak tanulmányozását mind annak kovalens és nem-kovalens kölcsönhatásaira gyakorolt hatásai szempontjából. A gyűrűtagszám változása ($n=0,5,6,7$) az enon-molekularész olyan térszerkezeteinek kialakulását eredményezte, amelyek a nyíltláncú kalkonok konformációs egyensúlyaiiban nem jelennek meg. A vegyületek aromás szubsztituenseinek elektronküldő, illetve elektronszívó tulajdonságai pedig az enon-molekularész (és azon keresztül a teljes molekula) polaritását, polarizálhatóságát, illetve reaktivitását befolyásolják.

A **4-7** vegyületek KBr pasztillában felvett IR spektrumaiban $1600-1800\text{ cm}^{-1}$ tartományban a várakozásnak megfelelően két intenzív sáv jelenik meg, amelyek a $\nu(\text{C=O})$ és $\nu(\text{C=C})$ vegyértékrezgésként azonosíthatók. A tapasztalat szerint a vizsgált vegyületek karbonil IR-frekvenciáját döntően a gyűrű tagszáma határozza meg. A gyűrűfeszültség magasabb rezgési frekvenciákat eredményez, ami mind szilárd fázisban (1. táblázat) [D7], mind az oldatban felvett spektrumok esetén (7. táblázat) [D13] az **5** (indanon) sorozatban a legnagyobb.

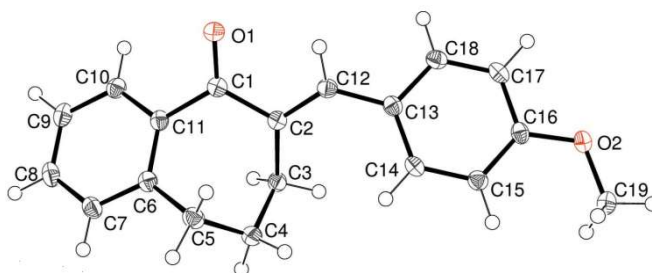
1. táblázat. A **4a-7a** benzilidén- [D7] és a **10-14** ferrocénmetilén-származékok [D8] KBr pasztillában mért karbonil rezgési frekvenciáinak ($\nu(\text{C=O})$), valamint H_α (**4a**) és H_β atomjai ^1H NMR eltolódásainak (δ ; CDCl_3) gyűrűtagszám függése [D6]

Vegyület	(E)-izomer				(Z)-izomer	
	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1}) KBr	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1}) CHCl_3	δH_α (ppm)	δH_β (s)* (ppm)	*	δH_β (s)* (ppm)
4a	1662	1666	7,53**	7,81**	-	-
5a	1693	1694	-	7,67	-	6,99
6a	1661	1669	-	7,88	-	6,84
7a	1663	1665	-	7,84	-	6,69
10	1683	-	-	$\approx 7,6$	-	-
11	1659	-	-	7,69	-	-
12	1656	-	-	7,57	-	-
13	1658	-	-	7,68	-	-
14	1655	-	-	7,59	-	-

*Szingulett. **Dublett ($^3J = 15,6\text{ Hz}$)

A **5b** és néhány rokon szerkezetű 4'-szubsztituált indanonszármazék röntgendiffrakciós vizsgálata szerint a vegyületek szerkezete csak kismértékben tér el a teljesen síkszerű alakzattól [296]. A **6a**, **6b** és rokon szerkezetű 4'-szubsztituált tetralonszármazékok esetén a két aromás gyűrű diéderes szöge a legtöbb esetben $50-60^\circ$ közé esik. A molekulák síkszerű alakzattól eltérő szerkezetét elsősorban a csavart szék konformációjú ciklohexénon gyűrű okozza. A 4'-szubsztituensek nem gyakorolnak kifejezett hatást a háromdimenziós szerkezetekre [297]. A **7c** és néhány rokon szerkezetű 4'-szubsztituált (E)-2-(X-

benzilidén)-1-benzoszuberón-származék röntgendiffrakciós analízise szintén a vegyületek planáristól eltérő szerkezetét igazolta. A ciklohepténon gyűrű megközelítőleg csónak konformációjú, melyben a C(3)-C(4)-C(6)-C(11) atomok közel koplanárisak. Ez a konformáció jelentős mértékű csavarodást eredményez a C(11)-C(1) kötés körül: a C(10)-C(11)-C(1)-O(1) diéderes szög $36,06^\circ$, a két aromás gyűrű által bezárt szög $23,79^\circ$ (20. ábra). Hasonló eredményre vezetett a további származékok vizsgálata is [298]. A mért IR karbonil frekvenciák összhangban vannak ezekkel az eredményekkel.



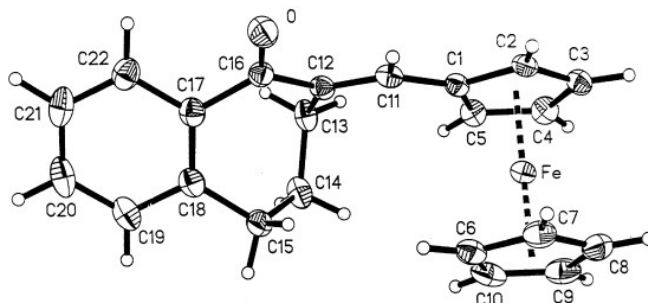
20. ábra. Az (*E*)-2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberón (**7c**) röntgendiffrakciós képe [298]

Szubsztituált benzaldehidek helyett ferrocén-karbaldehydet használva, a **10-14** gyűrűs ferrocenil-kalkon-analógokat kaptuk. A bázis-katalizált Claisen-Schmidt kondenzációval nyert vegyületeket oszlopkromatográfiás tisztítása és hexánból történt kristályosítása után sötétvörös/lila kristályos termékeket nyertünk. A vegyületek KBr-ban felvett IR spektrumaiban a $\nu(\text{C}=\text{O})$ frekvenciát – a fenil-analógokhoz hasonlóan – főként a gyűrűtagszám határozza meg. A nyíltláncú kalkonokhoz hasonlóan [299], a karbociklusos ferrocén-analógok (**10-12**) $\nu(\text{C}=\text{O})$ rezgési frekvenciái a ferrocén-molekularész elektron-rezervoár tulajdonsága következtében alacsonyabbak, mint a megfelelő benzilidénszármazékoké (**5a-7a**). A ferrocénszármazékok körében, az indanonszármazék (**10**) $\nu(\text{C}=\text{O})$ rezgési frekvenciája, 26 cm^{-1} -rel magasabb (1683 cm^{-1}) a további analógok (**11-14**) átlagánál (1657 cm^{-1}) (1. táblázat) [D8].

Az (*E*)-konfigurációjú kalkonok (**4**) ^1H NMR spektrumaiban az α és β protonok jelei két dublettként jelennek meg, 15-16 Hz-es csatolási állandóval [149]. A 2. ábrán feltüntetett kalkonok (**4**) és gyűrűs kalkon-analógok (**5-14**) Claisen-Schmidt reakcióval történő szintézise során saját és irodalmi [79-83] tapasztalatok alapján minden esetben a megfelelő (*E*)-geometriájú termékek voltak izolálhatók. A vegyületek szén-szén kettős kötésének (*E*)-konfigurációját ^1H NMR [D5,D6,D8-D12,D16,D35,D37], néhány esetben (D8,D9,D13,D14,D35,D37) röntgenkristallográfia segítségével is igazoltuk.

A **7c** ferrocén-analógjának (**12**) röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezetét a 21. ábra mutatja. A C(1)-C(11)-C(12)-C(16) atomokon átívelő sík közel koplanáris a felső Cp gyűrűvel. Ez a planáris, két aromás gyűrűvel konjugált enon szerkezet magyarázatot ad többek között a vegyület (és a hasonló geometriájú, rokon szerkezetű **10,11,13** és **14** vegyületek) tiol-reaktivitásának és

(fény-inicializált *(E)/(Z)* izomerizációjának elmaradására. A **12** molekula, a **7c** benzilidén-analóghoz hasonlóan aplanáris. A C(11)-C(12)-C(16)-O diéderes szög $22,6^\circ$, a C(11)-C(12)-C(16)-C(17) szög $-157,42^\circ$, míg a C(12)-C(16)-C(17)-C(18) diéderes szög értéke $40,05^\circ$ [D8].



21. ábra. Az *(E)*-2-(ferrocenilmetilén)-1-benzoszuberon (**12**) röntgendiffrakciós képe [D8]

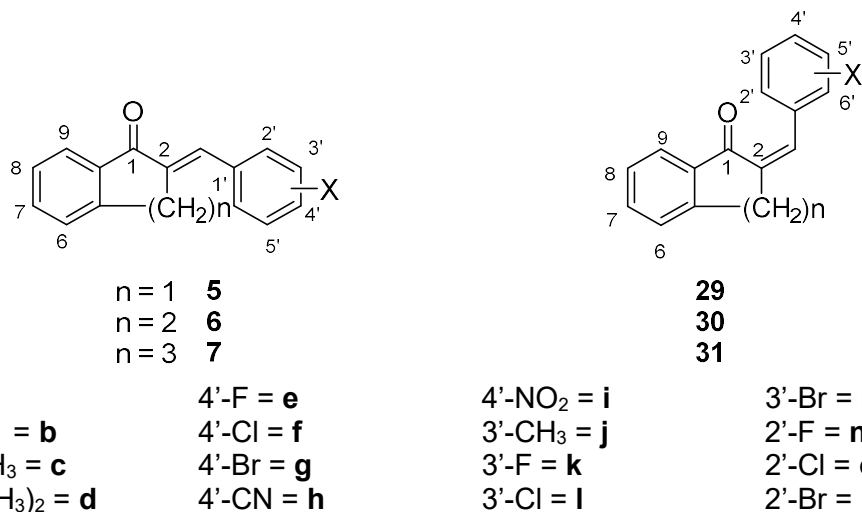
5.1.2. Karbociklusos kalkon-analógok (5-7) fény-inicializált *(E)/(Z)* izomerizáció vizsgálata [D16,D17]

Az **5-7** vegyületek *(E)* konfigurációja szilárd állapotban hosszabb tárolás esetén is stabilnak bizonyult. Ugyanakkor, a vegyületek szórt laboratóriumi fényen tartott szerves oldószeres oldataiban idővel a VRK vizsgálatok során új kromatográfiás folt volt észlelhető. Az oldatok párhuzamosan elvégzett VRK és gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS), valamint a bepárolt oldatok maradékai deuterio-kloroformos oldatainak ^1H NMR vizsgálatai, igazolták, hogy az újonnan keletkező kromatográfiás foltok/csúcsok megjelenése a kiindulási vegyületek *(E)/(Z)* izomerizációjának az eredménye [D16]. Hasonló izomerizációt a 4'-N(CH₃)₂-benzilidén-, valamint a ferrocénszármazékoknál nem tapasztaltunk. Az izomerizáció elmaradását mindkét esetben az enon-molekularész megnövekedett elektronsűrűségével magyarázzuk [300].

A szintézisek során tiszta formában izolálható *(E)*-konfigurációjú molekulák *(Z)*-konfigurációjú származékokká történő izomerizációja a térszerkezet nagymértékű változását eredményezi (22. ábra). Mivel a keletkező *(Z)* izomerek kémiai és fizikai-kémia tulajdonságaik (pl. reaktivitásuk), valamint biológiai hatásaik szempontjából várhatóan különböző tulajdonságokkal rendelkeznek, így vizsgálataink során nagy jelentőséggel bírt tiszta *(E)* izomerek használata. E megfigyelések, illetve rokon szerkezetű vegyületek *(Z)* izomerjeivel kapcsolatos irodalmi adatok vezettek a vegyületek fény-inicializált *(E)/(Z)* izomerizációs folyamatainak vizsgálatára. A vizsgált **5-7** vegyületek szerkezetét a 22. ábra mutatja be.

A szén-szén kettős kötés *(E)/(Z)* izomerizációja (a) termikus, vagy (b) fény-inicializált folyamat lehet. Mindkét reakció reverzibilis folyamat, aminek következtében egyensúlyi elegyek keletkezése várható. Az izomerizáció eredményeképpen a termodinamikailag stabilabb *(E)* konfigurációjú kalkon molekula – az aromás gyűrű és a karbonilcsoport taszító kölcsönhatásának

köszönhetően - deformáltabbá válik. Ennek eredményeképpen gyengül a konjugáció erőssége, ami az elektroneloszlás megváltozását eredményezi.



22. ábra. Az **5-7** gyűrűs kalkon-analógok (*E*) és (*Z*) izomerjeinek szerkezete

Vizsgálatainkat szórt laboratóriumi fényben tartott és UV-fénnyel besugárzott mintákkal végeztük. A laboratóriumi szórt fényben történő vizsgálatokhoz a tiszta **5-7** (*E*) izomerekből 1 mg/ml koncentrációjú kloroformos vagy benzolos oldatokat készítettünk. Az oldatok izomer összetételét az oldatok elkészítését követően, majd egy héten keresztül színtelen üvegedényben, szórt laboratóriumi fényben történő állást követően vizsgáltuk. A besugárzással végzett izomerizációs kísérleteink során a tiszta (*E*) izomerek 1 mg/ml benzollal készült oldatát 4 órán keresztül, laboratóriumi szórt fény kizárásával, 3x125 W teljesítményű magas nyomású higanygőz lámpával megvilágítottuk. Az így keletkező termékek kromatográfiás jellemzői minden esetben megegyeztek a szórt laboratóriumi fényben keletkező izomerek jellemzőivel. Az oldatok izomerösszetételének vizsgálatára vékonyréteg-kromatográfiás (VRK), gázkromatográfiás (GC) és HPLC-UV-Vis módszereket használtunk. A VRK és HPLC módszereket [D16,D17] a kísérleteinkben használt kalkon minták tisztaságvizsgálatára rutinszerűen használtuk.

Az izomerpárok ¹H NMR spektrumaiban a (*Z*)-izomerek (**29-31**) benzil protonjai 0,63-1,17 ppm *upfield* eltolódást mutattak az (*E*)-izomerek (**5-7**) megfelelő értékeihez képest, ami az (*E*)-izomerek C(1) karbonilcsoportjának anizotróp árnyékolásmentesítő hatásával magyarázható. A hatás erősebb a planárisabb **5** sorozat esetén, mint a kevésbé planáris **6** és **7** sorozatokban (2. táblázat). Ugyancsak a keletkező vegyületek (*Z*)-konfigurációját igazolta a benzil (=CH-) és a H(3) hidrogének között megfigyelt erős NOE jel is. A GC-MS vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy hasonlóan az (*E*)/(*Z*)-dipnon (1,3-difenil-2-butén-1-on) izomerekhez [84], a kevésbé planáris karbociklusos kalkon (*Z*)-izomerek rövidebb retenciós időnél jelentkeztek [D16].

Az izomerelegyek összetételének pontosabb megismerése céljából fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszert

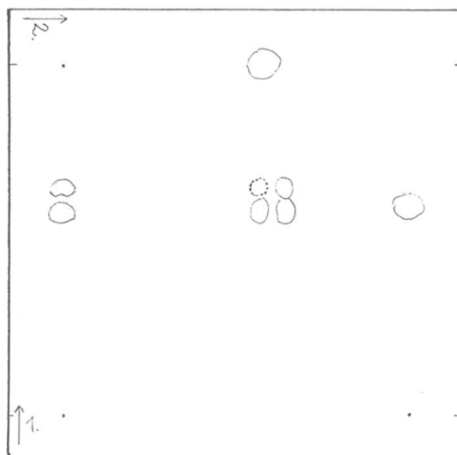
dolgoztunk ki az (*E*) és (*Z*) izomerek elválasztására, valamint az izomerizációs folyamat időbeli lefutásának követésére [D17]. A magas nyomású higanygőz lámpával besugárzott oldatokból a kísérletek 0, 30, 60, 90, 120, 180 és 240 perces időpontjaiban mintát vettünk, a mintákat nitrogén gázzal bepároltuk, a bepárlási maradékot HPLC-UV-Vis módszerrel analizáltuk. HPLC vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az azonos körülmények között besugárzott minták izomerelegyének összetételére mind a gyűrűtagszám, mind a benzilidén-molekularész szubsztituense hatást gyakorol. Így a legerősebben konjugált **5** vegyületek körében a keletkező (*Z*) izomerek mennyisége jóval kisebb volt, mint a megfelelő **6** és **7** vegyületek esetén. Az erős π -elektron donor 4'-dimetilamino-szubsztituált származékok oldataiban pedig (*Z*) izomer nem volt kimutatható [D17]. Hasonlóképpen viselkedtek a megfelelő ferrocenil-kalkon analógok is [D25].

2. táblázat. Néhány (*E*)- (**5-7**) és (*Z*) (**29-31**) 2-(4'-X-benzilidén)-1-benzocikloalkanon ^1H NMR kémiai eltolódás (δ) értékei (ppm) [D16]

Vegyület	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	=CH	H-4'
5a	4,04			7,54	7,60	7,39	7,90	7,67	7,43
29a	3,90			7,48	7,58	7,39	7,83	6,99	7,38
5b	4,00			7,53	7,59	7,40	7,89	7,64	-
29b	3,88			7,47	7,57	7,39	7,83	6,97	-
5h	4,05			7,56	7,64	7,44	7,90	7,62	-
29h	3,92			7,49	7,62	7,41	7,82	6,99	-
6a	3,14	2,95		7,25	7,49	7,37	8,14	7,88	7,36
30a	3,15	2,93		7,27	7,48	7,34	8,12	6,84	7,29
6b	3,14	2,94		7,24	7,48	7,36	8,14	7,86	-
30b	3,14	2,91		7,27	7,47	7,34	8,13	6,81	-
6h	3,07	2,96		7,26	7,51	7,37	8,12	7,79	-
30h	3,16	2,94		7,28	7,50	7,34	8,05	6,81	-
7a	2,61	2,08	2,90	7,20	7,47	7,36	7,78	7,84	7,36
31a	2,47	2,02	3,03	7,24	7,48	7,35	7,99	6,69	7,28
7b	2,61	2,08	2,89	7,19	7,46	7,35	7,78	7,82	-
31b	2,44	2,00	3,01	7,23	7,47	7,35	7,96	6,65	-
7h	2,55	2,05	2,89	7,20	7,48	7,36	7,89	7,76	
31h	2,47	2,01	3,0	7,24	7,48	7,34	7,77	6,65	

Kétdimenziós vékonyréteg-kromatográfiás módszer alkalmazásával igazoltuk, hogy az izomerizáció reverzibilis folyamat. Az (*E*)-2-(3'-metilbenzilidén)-1-benzoszuberonnal (**7j**) végzett kísérleteink során (HPTLC lap (Merck No. 5629; diklórmétán eluens), a felvitt két tiszta (*E*)-izomer minta közül az egyiket kifejtés előtt 365 nm hullámhosszú UV fénnel (analitikai UV lámpa) besugároztuk, majd a kromatogramot kifejtettük. Ekkor, a várakozásnak megfelelően, a besugárzott minta (23. ábra, bal oldali sáv) két kromatográfiás foltot adott. A második dimenzióba történő kifejtést megelőzően, az első dimenzióban elváló foltokat az előzőekkel megegyezően ismét besugároztuk.

Ekkor azt tapasztaltuk, hogy mind a kiindulási (*E*)-, mind a képződött (*Z*)-izomer (a magasabb R_f értékű folt) a kifejlesztést követően két, egymástól elkülönülő, azonos R_f értékkel megjelenő foltot adott (23. ábra) [D16].



23. ábra. Az (*E*)-2-(3'-metilbenzilidén)-1-benzoszuberon (**7j**) HPTLC lapon vizsgált, fény-inicializált (*E*)/(*Z*) izomerizációja [D16]

5.2. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok UV-Vis spektroszkópiai jellemzése [D18-D20]

Az UV-Vis, valamint a fluoreszcencia spektroszkópia a kalkonok mennyiségi meghatározásának és a biológiai makromolekulákkal lejátszódó (nem-kovalens) kölcsönhatásai vizsgálatának egyik leggyakoribb módszere [94,95]. Vizsgálataink során a benzilidén-molekularészen különbözőképpen szubsztituált **4-7** vegyületek UV-Vis spektrumait különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező oldószerekben vettük fel annak vizsgálata céljából, hogy összefüggést keressünk a vegyületek molekuláris környezete és UV-Vis spektroszkópia segítségével megfigyelhető elektronszerkezeti változása között.

Vizsgálataink kezdetén az **4a-c-7a-c** származékok $2,5 \times 10^{-5}$ M koncentrációjú ciklohexán (CHX), acetonitril (ACN), metanol (MeOH) és dimetilszulfoxid (DMSO) oldószerekkel készített oldatainak UV-Vis spektrumait hasonlítottuk össze [D18]. Később vizsgálatainkat kiegészítettük a **4d-7d** származékok és ciklohexán helyett a jobb oldhatóságot biztosító toluol (TOL) bevonásával [D19]. A vizsgált vegyületek TOL, ACN, MeOH és DMSO oldószerekben felvett UV-Vis spektrumainak Band I abszorpciós sáv hullámhosszait a 3. táblázat foglalja össze.

A vizsgálatok eredményei alapján a vegyületek Band I $\lambda_{\max}$ értékei minden vizsgált oldószerben, minden szubsztituens esetén az **5** vegyületek körében a legmagasabb és a **7** vegyületek körében a legalacsonyabb. Ez a tapasztalat, összhangban az IR és a ^{13}C NMR adatokkal, a legerősebb konjugációt a közel teljesen planáris **5**, a leggyengébbet a **7** vegyületek körében támasztja alá.

3. táblázat. Az **4-7** vegyületek Band I abszorpciós maximumai (nm) különböző oldószerekben [D18,D19]

Szubsztituens	4'-H	4'-CH ₃	4'-OCH ₃	4'-N(CH ₃) ₂
Oldószer/Vegyület	4a	4b	4c	4d
TOL	308	319	338	404
ACN	306	317	336	409
MeOH	309	321	342	420
DMSO	314	325	347	424
Oldószer/Vegyület	5a	5b	5c	5d
TOL	316	325	343	416
ACN	314	325	346	417
MeOH	320	333	353	431
DMSO	320	332	354	430
Oldószer/Vegyület	6a	6b	6c	6d
TOL	301	324	338	403
ACN	300	324	338	405
MeOH	303	324	344	418
DMSO	306	330	346	420
Oldószer/Vegyület	7a	7b	7c	7d
TOL	301	313	329	388
ACN	302	311	328	393
MeOH	302	313	332	404
DMSO	305	315	334	403

Az abszorpciós maximumoknak az oldószer polaritásának növekedését kísérő batokróm eltolódását pozitív szolvatokromizmusnak nevezzük [104]. A megfigyelt pozitív szolvatokromizmus összhangban van egy jelentős töltésátviteli (ICT) karakterrel rendelkező átmenettel. A molekulák gerjesztett állapota polárosabb, mint az alapállapot és az elektronátmenethez szükséges energia ($\Delta E_{\text{LUMO}}-E_{\text{HOMO}}$) az oldószer polaritásának növekedésével csökken [103]. Az oldószerek polaritásának változása következtében bekövetkező batokróm eltolódás – a 4'-N(CH₃)₂-csoport legnagyobb elektrondonor tulajdonsága miatt – a **4d-7d** vegyületek körében a legnagyobb és a **4a-7a** (szubsztituátlan) származékok körében a legkisebb. Az értékek minden szubsztituens esetén a **4** és a **7** sorban a legmagasabbak. A **7a**, **7c** és **7d** származékok batokróm eltolódásai (**7a** (4 cm⁻¹), **7c** (5 cm⁻¹) és **7d** (15 cm⁻¹)) jól értelmezhetők a vegyületek első gerjesztett állapotú és alapállapotú dipólusmomentumainak különbségével ($\Delta\mu$) is, ami kísérleteink szerint mindhárom vegyület esetén (**7a**: 4,56 D, **7c**: 4,50 D és **7d**: 4,46 D) pozitív érték [D20].

Az oldószer és az oldott anyag kölcsönhatásának bonyolultsága miatt a jelenség elméleti alapon még ma sem tárgyalható kielégítő pontossággal. Sok szerző foglalkozott ezért empirikus oldószerhatás-paraméterek definiálásával [301,302]. Bár az empirikus oldószerhatás-paramétereket nagyon különböző

folyamatok (pl. kémiai reakciók sebességi együtthatói vagy egyensúlyi állandói, abszorpciós színeképek sávjaihoz tartozó gerjesztési energiák) alapján határozták meg, mégis, kvalitatíve, sőt esetenként kvantitatíve is jól tükrözik a lehetséges oldott anyag/oldószer kölcsönhatások sokaságát [303]. Munkánk során több makroszkopikus és spektroszkópiai méréseken alapuló empirikus oldószerhatás-paramétert vizsgáltunk, melyeket a 4. táblázat foglal össze.

4. táblázat. A vizsgálatok során alkalmazott oldószerek makroszkopikus ((D, ϵ_r) , és mikroszkopikus (E_T^N , DN, AN, α , β). empirikus fizikai-kémiai tulajdonságai (oldószer állandói) [D16]

Oldó-szer	Dipólus momen-tum (D) [304]	Relatív permittivi-tás (ϵ_r) [305]	E_T^N (kcal/mol) [104]	DN (kcal/mol) [306]	AN (kcal/mol) [307]	α [308]	β [309]
TOL	0,38	2,43	0,100	0,1	-	-	0,10
ACN	3,92	37,5	0,460	14,1	18,9	0,15	0,31
MeOH	1,7	32,7	0,762	19,0	41,5	0,98	0,62
DMSO	3,96	46,7	0,444	29,8	19,3	-	0,76

Amint az a 4. táblázatban látható, a legkifejezettebb ICT karakterű 4'-dimetilamino-szubsztituált-származékok (**4d-7d**) abszorpciós maximumainak oldószer-indukált batokróom eltolódása a $TOL < ACN < MeOH \approx DMSO$ sorrendet követi. A vegyületek megfigyelt batokróom eltolódásainak ilyen sorrendje a vizsgált oldószerhatás-paraméterek közül a DN értékekkel mutat hasonlóságot. A DN kifejezi a donor molekula és egy akceptor molekula teljes kölcsönhatását, beleértve a dipól-dipól vagy ion-dipól kölcsönhatásokat, valamint a szabad elektronpár elérhetősége által okozott hatást [306]. Így a tapasztalat jól értelmezhető az vizsgált oldószerek és a **4d-7d** vegyületek karbonilcsoportja között kialakuló kölcsönhatás eredményeként.

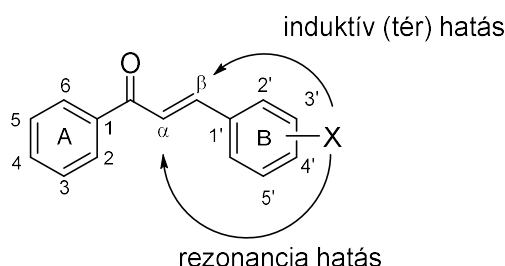
Összefoglalva megállapítható, hogy a nyíltláncú kalkonok (**4**) karbociklusos analógjai (**5-7**) a gyűrűtagszámtól függetlenül, ICT karakterű vegyületek. A poláris-poláris kölcsönhatások (dipól-dipól vagy ion-dipól kölcsönhatások) és a hidrogénkötések alapvető szerepet játszanak az eltérő fizikai-kémiai tulajdonságú oldószerekben mért batokróom eltolódások különbségeinek megértésében. Ennek megfelelően, a kalkonok nemkovalens kölcsönhatások eredményeképpen megfigyelhető UV-Vis spektroszkópiai változásai információt adhatnak a kölcsönhatás természetét illetően.

5.3. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok tér- és elektronszerkezetének vizsgálata IR és ^{13}C NMR módszerekkel [D15,D21]

A konjugált vegyületek elektronszerkezete meghatározó jelentőségű a vegyületek polaritásának, polarizálhatóságának, térszerkezetének és reaktivitásának szempontjaiból. A vizsgált vegyületeink megfigyelt daganatellenes

hatásai, valamint feltételezett tiol-reaktivitása szempontjából ezek a fizikai-kémiai tulajdonságok meghatározó szerepet töltenek be. E molekuláris jellemzők vizsgálatának egyik módszere az aromás szubsztituenshatások konjugált rendszereken történő tovaterjedése hatékonyságának vizsgálata spektroszkópai módszerekkel. A vizsgált vegyületeink e tulajdonságainak megismerése céljából, a szubsztituenshatások tovaterjedésének hatékonyságát vizsgáltuk a **4-7** sorozat 4'-helyzetben különbözőképpen szubsztituált származékai körében IR és ^{13}C NMR módszerekkel.

Korábbi (nyíltláncú kalkonokkal végzett) vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a karbonil rezgési frekvenciát, valamint a benzil (C_β) szénatom körüli elektronsűrűséget elsősorban a szubsztituensek induktív (tér-) effektusa, míg a benzilidén (C_α)-szénatom körüli elektronsűrűséget a szubsztituensek rezonancia effektusa határozza meg [119,146].



24. ábra. A B-gyűrűn szubsztituált kalkonok szubsztituenseinek domináns hatása a C_β és C_α szénatomok ^{13}C NMR kémiai eltolódás [119], illetve a $\nu(\text{C}=\text{O})$ rezgési frekvenciák [146] értékeire

5.3.1. Kalkonok (4) és karbociklusos kalkon-analógok (5-7) tér- és elektronszerkezetének vizsgálata IR spektroszkópai módszerrel [D15]

Vizsgálataink kezdetén 4'-szubsztituált **4-7** vegyületek kloroformos oldatban mért karbonil rezgési frekvenciáinak $\nu(\text{C}=\text{O})$ gyűrűtagszám-függését vizsgáltuk. Az eredményeket az 5. táblázat foglalja össze [D15].

5. táblázat. Az **4-7** 4'-X-szubsztituált vegyületek CHCl_3 oldatban mért karbonil rezgési frekvenciáinak ($\nu(\text{C}=\text{O})$) gyűrűtagszám- és szubsztituens-függése [D15]

Vegyület	X	4	5	6	7
a	4'-H	1665,7	1694,4	1668,5	1664,8
b	4'-CH ₃	1664,5	1692,8	1666,0	1663,2
c	4'-OCH ₃	1662,5	1691,6	1664,8	1662,0
d	4'-N(CH ₃)	1655,5	1684,8	1658,3	1657,2
e	4'-F	1667,2	1697,6	1668,0	1664,0
f	4'-Cl	1667,5	1698,0	1669,5	1665,6
g	4'-Br	1667,7	1698,0	1669,5	1664,8
h	4'-CN	1670,9	1702,0	1671,2	1667,2
i	4'-NO ₂	1671,5	1704,0	1672,5	1668,6
Átlag		1665,2	1695,0	1667,0	1664,0

Amint az adatok mutatják, a vizsgált származékok átlagainak $\nu(\text{C}=\text{O})$ értékei a gyűrűtagszám függvényében az **5>>6>4 $\approx$ 7** sorrend szerint változtak (7. táblázat). A gyűrűs ketonok $\nu(\text{C}=\text{O})$ értékeit – egy adott oldószerben – a karbonilcsoport polaritása, valamint a gyűrűtagszám (szögfeszültség) határozza meg. Az eredmények alapján a szögfeszültség az **5** sorban – a várakozásnak megfelelően – megnöveli a vegyületek $\nu(\text{C}=\text{O})$ értékeit. Ezek az eredmények megegyeznek Al-Ansari [93] és Dinya [136] korábbi eredményeivel.

A karbonilcsoport polaritását a $\text{C}(\alpha)$ -szénatom elektronsűrűségének növekedése egy adott vegyületsor esetén csökkenti, csökkenése növeli. Ennek megfelelően, a 4'- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -szubsztituált-származékok $\nu(\text{C}=\text{O})$ rezgési frekvenciái a legalacsonyabbak, míg a 4'- NO_2 -szubsztituált-származékoké a legmagasabbak, mind a négy vegyületsorban (5. táblázat).

A szubsztituenshatások transzmissziójának hatékonysága a Hammett-féle szigma (σ_p) állandók [118] és a Brown-Okamoto (σ_p^+) állandók [124] függvényében az **5>>4>6>7** sorrend szerint változott. A nyíltláncú kalkonokhoz (**4**) hasonlóan, a karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) esetén is mindkét szubsztituensállandó használatával szoros korrelációt tapasztaltunk. Utóbbi a gyűrűs analógok körében is a rezonanciahatások átvitelének hatékonyságát jelzik. Hasonló csökkenő sorrendet mutattak a Taft σ_I és σ_R^0 állandókkal [132] kapott korrelációk is. Utóbbiak - a σ_p^+ szubsztituensállandókkal kapott eredményekkel összhangban - mind a négy vegyületsorban a rezonanciahatások kifejezettebb érvényesülését mutatták (6. táblázat). Minden esetben a leghatékonyabb transzmisszió a rigid, planáris **5** sorozat esetén volt megfigyelhető [D15].

6. táblázat. A **4-7** vegyületek CHCl_3 oldataiban mért $\nu(\text{C}=\text{O})$ értékei (5. táblázat) alapján számított regressziós egyenesek regressziós együtthatói [D15]

Vegyü- let	$\rho(\sigma_p)^*$	$r(\sigma_p)^*$	$\rho(\sigma_p^+)^{**}$	$r(\sigma_p^+)^{**}$	ρ_R^{***}	ρ_I^{***}	r^{***}	n^{****}
4****	9,19	0,965	6,24	0,977	14,26	8,52	0,992	9
5	12,0	0,989	7,78	0,970	15,25	12,90	0,983	9
6	7,95	0,958	5,32	0,970	13,13	6,53	0,991	9
7	6,41	0,971	4,24	0,972	10,88	4,70	0,968	9

*Hammett-féle szigma (σ_p) állandókkal [118] kapott adatok. **Brown-Okamoto (σ_p^+) állandókkal [124] kapott adatok. ***Taft σ_I és σ_R^0 és állandókkal [132] kapott adatok. ****A vizsgált származékok száma. *****A [119] közleményben publikált adatok.

5.3.2. Kalkonok (**4**) és karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) tér- és elektronszerkezetének vizsgálata ^{13}C NMR spektroszkópiai módszerrel [D15,D21]

A munkák folytatásaként, a vegyületek ^{13}C NMR vizsgálata során a $\text{C}(1)$, $\text{C}(\alpha)$, és $\text{C}(\beta)$ szénatomok kémiai eltolódásának szubsztituens- és gyűrűtagszám-függő változását vizsgáltuk. A ^{13}C NMR kémiai eltolódás (δ) értékek

összehasonlítása információt nyújt egy adott szénatom körüli elektronsűrűség változásáról azonos gyűrűtagszámú származékok esetében [139-143].

A 7. táblázat a **4a-c**, **5a-c**, **6a-c** és **7a-c** vegyületek enon-molekularész szénatomjainak ^{13}C NMR kémiai eltolódásait foglalja össze. Vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy egy-egy sorozaton belül a 4'-szubsztituensek hatása a ^{13}C $\delta\text{C}(1)$ eltolódás értékeire csekély; valamint, hogy a $\delta\text{C}(\beta)$ eltolódás értékek érzékenysége elmarad a szubsztituensek $\delta\text{C}(\alpha)$ értékekre gyakorolt hatásától.

7. táblázat. A **4a-c**, **5a-c**, **6a-c**, és **7a-c** vegyületek enon-molekularész szénatomjainak ^{13}C NMR kémiai eltolódásai (ppm; CDCl_3 -ban) [D15,D21]

Vegyület ^{Referencia}	$\delta\text{C}1$	$\delta\text{C}(\alpha)$	$\delta\text{C}(\beta)$	$\Delta(\delta\text{C}(\beta)-\delta\text{C}(\alpha))$	$\Delta(\delta\text{C}(\alpha))$
4a ^{D21}	190,5	122,1	144,8	22,7	
4b ^{D21}	190,6	121,1	144,9	23,8	0
4c ^{D21}	190,5	119,7	144,6	24,9	-2,4
5a ^{D15}	194,3	134,7	133,9	-0,8	
5b ^{D15}	194,3	133,7	133,9	0,2	-1,0
5c ^{D15}	194,3	132,3	133,7	1,4	-2,4
6a ^{D21}	187,9	135,4	136,6	1,2	
6b ^{D21}	187,9	134,7	136,8	2,1	-0,7
6c ^{D21}	187,8	133,5	136,6	3,1	-1,9
7a ^{D21}	198,0	137,8	138,0	0,2	
7b ^{D21}	198,1	137,0	138,0	1,0	-0,8
7c ^{D21}	198,1	135,7	137,7	2,0	-2,1

Amint látható, a C(β) atomok elektronsűrűsége (^{13}C NMR eltolódása) a hat- és héttagú kalkon-analógokban (**6** és **7**) viszonylag közel van egymáshoz. Ezeknél az értékeknél mintegy 2 ppm értékkel alacsonyabb a planáris öttagú gyűrűs analógok (**5**) $\delta\text{C}(\beta)$ értéke, jelezve a C(β) atom elektronsűrűségének megnövekedését az öttagú gyűrűs kalkon-analógok körében. Mindhárom karbociklusos kalkon-analóg sorozat $\delta\text{C}(\beta)$ értéke azonban jóval kisebb, mint a hasonlóképpen szubsztituált nyílt láncú kalkonok (**4a-c**) megfelelő értékei. Hasonlóképpen, de a **4** sorozathoz viszonyított ellenkező előjellel, változnak az **5-7** származékok $\delta\text{C}(\alpha)$ értékei. Ezek a különbségek a nyíltláncú kalkon α -szénatomjának alkil-szubsztitúciójával (a szubsztituens pozitív induktív effektusával) és a kialakuló gyűrű okozta konformációs változásokkal magyarázhatók.

Kilenc, 4'-helyzetben különbözőképpen szubsztituált **4-7** származék ^{13}C NMR $\delta\text{C}(\alpha)$ és $\delta\text{C}(\beta)$ adatai alapján, a Hammett-féle szigma (σ_p) állandókkal [118] kapott regresszióanalízisek eredményeit a 8. és a 9. táblázat foglalja össze.

8. táblázat. Az 4-7 vegyületek CDCl_3 oldataiban mért ^{13}C NMR $\delta\text{C}(\alpha)$ értékei alapján számított regressziós egyenesek regressziós együtthatói [D15,D21]

Vegyület	$\rho(\sigma_p)^*$	$r(\sigma_p)^*$	ρ_R^{**}	ρ^{**}	r^{**}	n^{***}
4^{D15}	5,38	0,993	8,80	4,07	0,992	9
5^{D21}	5,39	0,993	8,86	4,08	0,996	9
6^{D21}	4,64	0,992	7,52	3,57	0,991	9
7^{D21}	4,93	0,994	7,96	3,80	0,991	9

*Hammett-féle szigma (σ_p) állandókkal [118] kapott adatok. **Taft σ_I és σ_R^0 és állandókkal [132] kapott adatok. ***A vizsgált származékok száma.

Amint a táblázat adatai mutatják, a $\delta\text{C}(\alpha)$ értékek és a Hammett-féle szigma (σ_p) állandók közötti összefüggés ρ értékei alapján a transzmisszió hatékonyságára az **5 $\approx$ 4>7>6** sorrendet találtuk (8. táblázat). Ugyanakkor, a szubsztituenshatásokra kevésbé érzékeny $\delta\text{C}(\beta)$ értékek a négy vegyületsorban a **4>6>5>7** sorrendben változtak (9. táblázat).

9. táblázat. A 4-7 vegyületek CDCl_3 oldataiban mért ^{13}C NMR $\delta\text{C}(\beta)$ értékei alapján számított regressziós egyenesek regressziós együtthatói [D15,D21]

Vegyület	$\rho(\sigma_p)^*$	$r(\sigma_p)^*$	ρ_R^{**}	ρ^{**}	r^{**}	n^{***}
4^{D16}	-2,82	0,957	-2,78	-4,07	0,996	9
5^{D21}	-2,62	0,960	-2,54	-3,79	0,997	9
6^{D21}	-2,76	0,970	-2,89	-3,79	0,997	9
7^{D21}	-2,27	0,938	-1,99	-3,55	0,995	9

*Hammett-féle szigma (σ_p) állandókkal [118] kapott adatok. **Taft σ_I és σ_R^0 és állandókkal [132] kapott adatok. ***A vizsgált származékok száma.

A Hammett-féle σ_p konstans értékek a szubsztituensek induktív és rezonancia (mezomer) effektusainak eredőjét tükrözik. A két különböző szubsztituenshatás elkülönülten történő vizsgálatára több szubsztituensállandó is ismeretes az irodalomban. Vizsgálataink során a Swain-Lupton [129], a σ_I, σ_R^+ (Taft) [131], a σ_I, σ_R^0 (Taft) [132] és a σ_F, σ_R^0 (Reynolds) [134] tér (induktív) és rezonancia paraméterek alkalmazásával elemeztük a 4'-szubsztituensek tér (induktív) és rezonancia (mezomer) kölcsönhatások útján kialakult hatását a négy vegyületsorban. E disszertáció keretében csak a σ_I, σ_R^0 (Taft) [132] állandókkal kapott adatok alapján elemezzük a kísérleti tapasztalatokat. A másik három állandóval kapott értékek és az abból levonható következtetések összhangban vannak a dolgozatban leírt adatokkal, illetve elemzéssel.

A $\nu(\text{C}=\text{O})$ rezgések kétdimenziós regressziós analízisével kapott σ_I és σ_R együtthatók sorrendje mind a négy vegyületsor esetén a Hammett-féle szigma (σ_p) [118] és a Brown-Okamoto (σ_p^+) állandók [124] alkalmazásával kapott sorrend szerint (**5>4>6>7**) változtak (6. táblázat). Ugyanakkor, a ^{13}C NMR $\delta\text{C}(\alpha)$ analízisének eredményei a **5 $\approx$ 4>7>6** sorrendet mutatták (8. táblázat). A regressziós koefficiensek abszolút értékeinek összehasonlítása az **5-7** gyűrűs kalkonszármazékok esetében is alátámasztotta azt a korábbi – nyíltláncú kalkonok

hasonló vizsgálatai során nyert – tapasztalatot [146], hogy a szubsztituensek rezonancia effektusa a C(α) atomon, az induktív hatásoké a C(β) atomon a kifejezettebb (8. és 9. táblázat).

Az **6** és a **7** sorozatok $\nu(\text{C}=\text{O})$ és ^{13}C NMR $\delta\text{C}(\alpha)$ értékei alapján meghatározott alacsonyabb transzmissziós hatékonysága a **4** és **5** vegyületek planáris szerkezetének torzulásával magyarázható. A magyarázatot több, az **5-7** sorba tartozó vegyület röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezete is alátámasztja [295-297]. A **6** és **7** származékok transzmissziós hatékonysága sorrendjének különbözőségét a két spektroszkópai tulajdonságot ($\nu(\text{C}=\text{O})$ és ^{13}C NMR $\delta\text{C}(\alpha)$) meghatározó fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. szögfeszültség, planaritás, konjugáció) különbözőségével magyarázhatjuk.

A kalkonok nukleofil addíciós reakcióiban résztvevő C(β) atom ^{13}C NMR $\delta\text{C}(\beta)$ értékei és a tér (induktív) szubsztituensállandók közötti regresszió vizsgálatának eredménye alapján a transzmisszió hatásosságára a **4>5 $\approx$ 6>7** sorrendet találtuk (9. táblázat). A ρ_R értékeknél magasabb ρ regressziós együtthatók a szubsztituensek induktív hatásának hatékonyabb tovaterjedését jelzik mind a négy sorozatban. Megjegyzésre érdemes, hogy a $\delta\text{C}(\beta)$ értékek és a Hammett-féle szigma (σ_p) állandók közötti összefüggés analízisével kapott ρ értékek alapján a transzmisszió hatékonyságára igen hasonló (**4>6 $\approx$ 5>7**) sorrendet találtunk (9. táblázat). Ugyanakkor, a nyíltláncú (**4**) [D34], hattagú (**6**) [D38], héttagú (**7**) [D33] és öttagú (**5**) [nem közölt eredmények] gyűrűs kalkon-analógok GSH-val és NAC-cal szemben mutatott reaktivitása is hasonló sorrendet mutatott.

5.4. Kalkonok (4) és gyűrűs kalkon-analógok (5-7) gyógyszerészeti jellemzése [D22-D26]

5.4.1. Kalkonok (4) és karbociklusos kalkon-analógok (5-7) lipofilitásának vizsgálata [D22-D25]

A munkánk során szintetizált és vizsgált kalkonok (**4**) és gyűrűs kalkon-analógok (**5-7**) daganatsejt citotoxikus hatásai mind az aromás gyűrű szubsztitúciójától mind a gyűrű szerkezetétől függő változásokat mutattak (lásd 5.5.1. fejezet).

A Takácsné Novák Krisztina professzor asszonnyal történő együttműködés keretében, egy, általa kimunkált, validált fordított fázisú vékonyréteg kromatográfiás (RP-TLC) módszer [193] alkalmazásával vizsgáltuk a vegyületek $\log P_{VRK}$ értékeit. A módszer alkalmasságának igazolására, néhány kiválasztott vegyület $\log P$ értékét a klasszikus rázótolcséres módszerrel is meghatároztuk [D22].

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a vegyületek $\log P_{VRK}$ értéke 2,5–5,4 között változik a gyűrű tagszámának, valamint a szubsztituens minőségének, jellegének és helyzetének függvényében. A **4-7** sorozat átlagos $\log P_{VRK}$ ($-\text{CH}_2-$) inkrementum értéke a **4** és **5** sorozat tagjai között alacsonyabb (0,2 $\log P$ egység),

mint az **5** és **6** (0,42 $\log P$ egység), illetve a **6** és **7** sorozat tagjai között (0,38 $\log P$ egység) [D23]. A vártak megfelelően, a **6** vegyületek 4-helyzetű CH_2 -csoportjának oxigénatommal történő helyettesítése eredményeképpen csökkent a **8** vegyületek lipofilitása. A **6** és **8** 4'-helyzetben szubsztituált származékok átlagos $\log P_{\text{VRK}}$ értékei közötti különbséget 0,23 $\log P$ egységnek találtuk [D24].

A 10. táblázat a 4'-szubsztituált származékok kísérletes úton meghatározott $\log P_{\text{VRK}}$ értékeken kívül, a számolás útján kapott $\log P$ értékeket is tartalmazza. A számítógépes program (CLOGP) által használt módszer a Hansch-Leo fragmens alapú számítás, ahol az alapmolekula és a hozzá kapcsolódó fragmensek, szubsztituensek száma és helyzete határozza meg a számított $\log P$ értéket [310]. A mért és számított értékek viszonylag jól korrelálnak egymással. A legnagyobb eltérések a dimetilamino- és a metoxiszármazékok esetén voltak megfigyelhetők. Ezekben az esetekben a számított értékek a kísérletileg meghatározott értékeknél szisztematikusan alacsonyabbak voltak.

10. táblázat. A **4-8** sorozatok 4'-helyzetben szubsztituált származékainak kísérletes úton meghatározott ($\log P_{\text{VRK}}$), valamint számított ($\log P_{\text{CLOGP}}$) $\log P$ értékei [D22-D24]

Vegyület	4 ^{D22,D23}	5 ^{D22,D23}	6 ^{D22,D23}	7 ^{D22,D23}	8 ^{D24}
Szubsztitu- ens	$\log P_{\text{VRK}}/$ ($\log P_{\text{CLOGP}}$)	$\log P_{\text{VRK}}/$ ($\log P_{\text{CLOGP}}$)	$\log P_{\text{VRK}}/$ ($\log P_{\text{CLOGP}}$)	$\log P_{\text{VRK}}/$ ($\log P_{\text{CLOGP}}$)	$\log P_{\text{VRK}}/$ ($\log P_{\text{CLOGP}}$)
4'-H	3,42 (3,62)	3,63 (3,60)	4,14 (4,16)	4,48 (4,72)	3,98 (N.A.)*
4'-N(CH₃)₂	4,23 (3,79)	4,50 (3,76)	4,91 (4,32)	5,26 (4,88)	4,68 (3,91)
4'-OCH₃	3,67 (3,54)	3,91 (3,52)	4,32 (4,08)	4,72 (4,64)	4,15 (3,67)
4'-CH₃	4,12 (4,12)	4,30 (4,10)	4,76 (4,66)	5,10 (5,22)	4,54 (4,25)
4'-F	3,65 (3,77)	3,75 (3,74)	4,14 (4,30)	4,45 (4,86)	N.A.*
4'-Cl	4,11 (4,34)	N.A. (4,31)	4,58 (4,87)	5,10 (5,43)	4,30 (4,46)
4'-Br	4,23 (4,48)	N.A. (4,46)	4,68 (5,02)	5,22 (5,58)	4,36 (4,61)
4'-CN	2,93 (3,06)	3,13 (3,03)	3,48 (3,59)	3,72 (4,15)	N.A.*

*Nincs adat.

A dimetilamino- és a metoxi-szubsztituált származékok kísérletileg meghatározott és számított $\log P$ értékeinek különbsége azon korábbi kísérleti eredmények alapján értelmezhető, amely azt igazolta, hogy egyes természetes és szintetikus kumarinok RP-TLC R_f értéke a molekulák és a mozgófázis közötti intermolekuláris kölcsönhatások erőségének a függvénye [311]. Mivel a vegyületek D-A (*Donor-Acceptor*) típusú konjugált molekulák [D18], a

dimetilamino-funkció proton akceptor képessége (**4b** és **5b** pK_a 1,59 és pK_a 2,04) [S28] szignifikánsan alacsonyabb a dimetilaminobenzoléhoz (pK_a 5,07) képest [312]. A dimetilamino- és a metoxi-szubsztituált kalkonszármazékok csökkent hidrogénkötés képző képességük miatt gyengébb kölcsönhatást alakíthatnak ki az eluenssel mint az a kialakuló konjugáció nélkül várható, ami a vizsgált származékok csökkent R_f értékét – és ennek következtében relatíve magasabb lipofil jellegét – eredményezi.

Kísérleti tapasztalataink szerint, a szubsztituenseknek nemcsak a minősége, hanem a helyzete is befolyásolja a vegyületek $\log P$ értékét (11. táblázat). A 7-tagú gyűrűs benzoszuberonszármazékok (**7**) esetén azt találtuk, hogy egy adott szubsztituens *orto*, *meta*, illetve *para* helyzetben tartalmazó vegyületek $\log P$ értékei a $\log P_{VRK}(orto) \leq \log P_{VRK}(para) \leq \log P_{VRK}(meta)$ sorrend szerint változnak [D22]. Az **5** és **6** és **8** sorozatok tagjainál azonban a különböző helyzetben szubsztituált analógok $\log P_{VRK}$ értékeiben nem volt megfigyelhető hasonló szabályszerűség [D23,D24].

11. táblázat. A szubsztituensek helyzetének hatása az **5-8** sorozat vegyületeinek kísérletes úton meghatározott $\log P_{VRK}$ értékeire [D22-D24]

Vegyület/Szubsztituens	$\log P_{VRK}$		
	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>
5 /OCH ₃ [D23]	4,01	3,97	3,91
5 /CH ₃ [D23]	4,12	4,34	4,30
5 /F [D23]	3,90	4,82	3,75
5 /Cl [D23]	4,28	4,38	N.A.*
5 /Br [D23]	4,36	5,15	N.A.*
6 /OCH ₃ [D23]	4,43	4,42	4,32
6 /CH ₃ [D23]	4,56	4,70	4,76
6 /F [D23]	4,42	4,35	4,14
6 /Cl [D23]	4,60	4,82	4,58
6 /Br [D23]	4,61	4,88	4,68
7 /OCH ₃ [D22]	4,69	4,79	4,72
7 /CH ₃ [D22]	4,92	4,98	5,10
7 /F [D22]	4,55	4,60	4,45
7 /Cl [D22]	5,04	5,22	5,10
7 /Br [D22]	5,04	5,35	5,22
8 /OCH ₃ [D24]	4,33	4,19	4,15
8 /CH ₃ [D24]	N.A.*	4,48	4,54
8 /Cl [D24]	4,46	4,63	4,30
8 /Br [D24]	4,51	4,56	4,36

*Nincs adat.

Korábbi, az analóg (*E*)-2-(X-benzilidén)-1-cikloalkanonokkal (**1-3**) végzett munkáink során már felismertük, hogy a vegyületek oldataiban már szórt laboratóriumi fény hatására (*E*)/(*Z*) izomerizáció játszódik le [1]. Megegyező

tapasztalatot nyertünk az (*E*)-konfigurációjú gyűrűs kalkon-analógok (**5-7**) hasonló vizsgálata során is (lásd 5.1.2. fejezet). Mivel az (*E*) és (*Z*) izomerek térszerkezete, reaktivitása - a biológiai hatás szempontjából meghatározó fizikai-kémiai tulajdonságaik - különbözőek, a biológiailag leghatékonyabb **7** sorban megvizsgáltuk, hogy az (*E*)/(*Z*) izomerizáció hogyan változtatja meg a vegyületek $\log P_{VRK}$ értékeit [D16].

Kísérleteinkben, a fordított fázisú vékonyréteg lapra felcseppentett tiszta (*E*) izomereket UV-fénnyel besugározva a megfelelő (*E*)/(*Z*) izomer elegyet kaptuk. A tiszta (*E*) izomerek és az (*E*)/(*Z*) izomer elegyek R_M értékeiből meghatároztuk a (*Z*) izomerek $\log P_{VRK}$ értékeit. Kísérleteink alapján, megállapítható, hogy a megfelelő (*Z*)-izomerek lipofilitása átlagosan 0,65 $\log P_{VRK}$ értékkel alacsonyabbak. Az eredményeket a 12. táblázat foglalja össze.

12. táblázat. Az (*E*)- and (*Z*)-2-(*X*-benzilidén)-1-benzoszuberonok (**7**) $\log P_{VRK}$ értékei [D16]

Szubsztituens	$\log P_{VRK}$ 7E (<i>E</i> izomer)	$\log P_{VRK}$ 7Z (<i>Z</i> izomer)	$\Delta \log P_{VRK}$
4'-H	4,48	3,34	1,14
4'-CH ₃	5,10	4,60	0,50
4'-F	4,45	3,91	0,54
4'-Cl	5,10	4,65	0,45
4'-Br	5,22	4,70	0,52
3'-CH ₃	4,98	4,28	0,70
3'-F	4,60	4,02	0,58
3'-Cl	5,22	4,52	0,70
3'-Br	5,35	4,71	0,64
2'-F	4,55	3,66	0,89
2'-Cl	5,04	4,43	0,61
2'-Br	5,04	4,48	0,56
Átlag			0,65

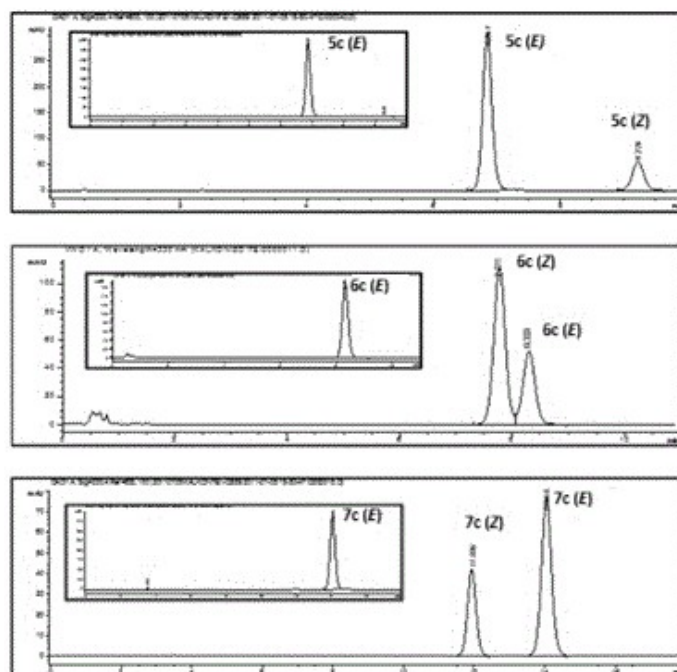
Mivel a szintetizált (*E*) kalkonok/karbociklusos kalkon-analógok (*Z*) izomerjeinek sztereokémiája, fizikai-kémiai tulajdonságai és megjósolhatóan reaktivitása is különböző a szintetizált (*E*) izomerekhez képest, egy, az RP-VRK vizsgálatoknál érzékenyebb, egyszerűen kivitelezhető HPLC-UV-Vis módszert dolgoztunk ki a vegyületek (sztereokémiai) tisztaságvizsgálatára. Az alkalmazott izokratikus módszerrel meghatározott retenciós tényezők ($k' = t'_R/t_0$) egyidejűleg alkalmas mérőszámok voltak a vegyületek relatív lipofilitásának jellemzésére is [313]. A vizsgált vegyületek retenciós tényezőit a 13. táblázat tartalmazza [D17].

A korábbi RP VRK vizsgálatok eredményeivel összhangban, az **5-7** (*E*)-konfigurációjú vegyületek retenciós tényezői (lipofilitása) a gyűrűtagszám növekedésével párhuzamosan megnövekedtek. A héttagú gyűrűs származékok (**7**) (*Z*) izomerjei e módszer alapján is kevésbé lipofil tulajdonságúnak mutatkoztak, mint a megfelelő (*E*) izomerek (13. táblázat).

13. táblázat. Az (*E*)- és (*Z*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-indanonok (**5E** és **5Z**), -tetralonok (**6E** és **6Z**), és benzuszuberonok (**7E** és **7Z**) RP-HPLC retenciós tényező (*k'*) értékei [D17]

Szubsztituens/Sorozat	5E	5Z	6E	6Z	7E	7Z
	<i>k'</i>	<i>k'</i>	<i>k'</i>	<i>k'</i>	<i>k'</i>	<i>k'</i>
4'-H	8,83	10,70	14,45	12,39	18,68	14,12
4'-CH ₃	14,41	17,80	23,19	20,14	30,16	22,34
4'-OCH ₃	9,72	13,44	11,67	10,87	20,41	17,19
4'-F	8,94	12,03	14,75	14,06	19,21	15,60
4'-Cl	16,03	20,49	25,48	22,74	33,68	25,19
4'-CN	5,62	7,09	8,87	8,33	11,52	9,66
4'-N(CH ₃) ₂	8,83	-	-	-	18,68	-

A korábban nem vizsgált **5** és **6** sorozat (*Z*) izomerjeinek lipofilitása (retenciós tényezője) a megfelelő (*E*) izomerek értékeihez képest a gyűrűtagszám függvényében különbözőséget mutatott. Így a hattagú gyűrűs (*Z*) izomerek (**6Z**) *k'* értékei, a **7** ((*E*)/(*Z*)) párokhoz hasonlóan, alacsonyabbak voltak, mint a megfelelő (*E*) izomereké. Ez esetben azonban az (*E*)/(*Z*) párok retenciós tényező értékei közötti különbség kisebb volt, mint a megfelelő héttagú gyűrűs vegyületepárok esetén. Az öttagú gyűrűs analógok esetén pedig a (*Z*) izomerek retenciós tényezője (lipofilitása) minden vizsgált vegyület esetében magasabb volt, mint a megfelelő (*E*) izomeré (13. táblázat). A 4'-metoxi-szubsztituált származékok (**5c-7c**) (*E*)/(*Z*) izomerjeinek HPLC-UV-Vis kromatogramjait a 25. ábra mutatja be.



25. ábra. Az **5c-7c** 2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzocikloalkanonok (*E*) és (*Z*) (**5cZ-7cZ**) izomerjeinek HPLC-UV-Vis kromatogramjai [D17]

A geometriai izoméria lipofilitásra gyakorolt hatása a gyógyszerkémia viszonylag feltáratlan területe [314]. Dearden, összefoglaló közleményében a $\log P$ és a molekuláris refraktivitás (MR), a parachor (PA), a moláris térfogat (MV), valamint a van der Waals térfogat (Vw) és a van der Waals felület nagysága (Aw) között felismert összefüggéseket említi meg [315]. A vizsgált molekuláink (*E*)/(*Z*) izomerizációja e paraméterek mindegyikének változását eredményezi. IR és ^{13}C NMR vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a konjugáció a nyíltláncú kalkonok (**4**) és a (rigid) öttagú gyűrűt tartalmazó gyűrűs kalkon-analógok (**5**) körében a legerősebb [D15, D21]. Az (*E*) izomerek (*Z*) izomerré történő átalakulása a cinnamilidén-molekularész háromdimenziós szerkezetének nagyfokú változását, a planáris szerkezet torzulást eredményezi. Ezt többek között igazolja, hogy a vizsgált vegyületek ^1H NMR spektrumában a (*Z*)-izomerek (**29-31**) benzil protonjainak kémiai eltolódási értékei 0,63–1,17 ppm *upfield* eltolódást mutatnak a megfelelő (*E*)-izomerek (**5-7**) benzil protonok kémiai eltolódási értékeihez képest (2. táblázat). Ez a hatás valószínűleg karbonilcsoport anizotróp árnyékolásmentesítő hatásának tulajdonítható, amely az összes (*E*)-izomerben megtalálható. A megfelelő (*Z*)-izomerekben a karbonilcsoport anizotróp hatása erősebb a **29** sorozatban (ahol az enon részlet síkbeli), mint az **30** és **31** származékok körében (2. táblázat), ahol az enon részlet eltér a síkbelitől [D6].

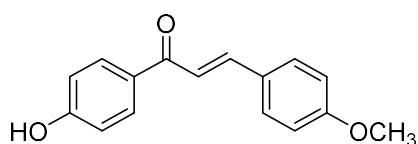
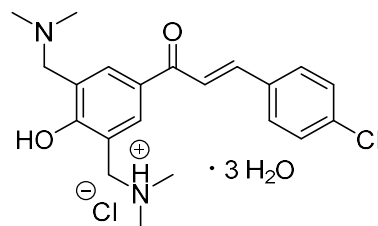
Összességében megállapítható volt, hogy a kalkon struktúra gyűrűs szerkezetbe történő integrálása, a benzilidén-molekularész aromás gyűrűjének szubsztitúciója, valamint az enon-molekularész geometriájának megváltoztatása a lipofilitás optimalizálásának érzékeny és hatékony módszerei a vegyületek körében. A felismert összefüggések lehetőséget teremtenek a kalkon molekularésszel rendelkező, esetleges gyógyszerjelölt molekula optimális fizikai-kémiai tulajdonságainak tervezésében.

5.4.2. Kalkonok intesztinális eliminációjának és metabolizmusának vizsgálata [D26]

A *per os* alkalmazott vegyületek oxidatív biotranszformációja már a vékonybélben, majd azt követően a májban megtörténhet. Ezt számos, kalkonokkal végzett *in vivo* és *in vitro* kísérlet eredménye is igazolta (2.3.2. fejezet). Vizsgálataink során egy kiválasztott 4-hidroxikalkon (**4q**) és egy 4-hidroxikalkon *bisz*-(dialkilaminometilén)-szubsztituált-származékának (**16a**) (26. ábra) patkány vékonybélből történő *in vivo* eliminációját és Fázis II metabolizmusát vizsgáltuk a Gyógyszerészi Kémiai Intézetben működő állatkísérletes laboratóriumban.

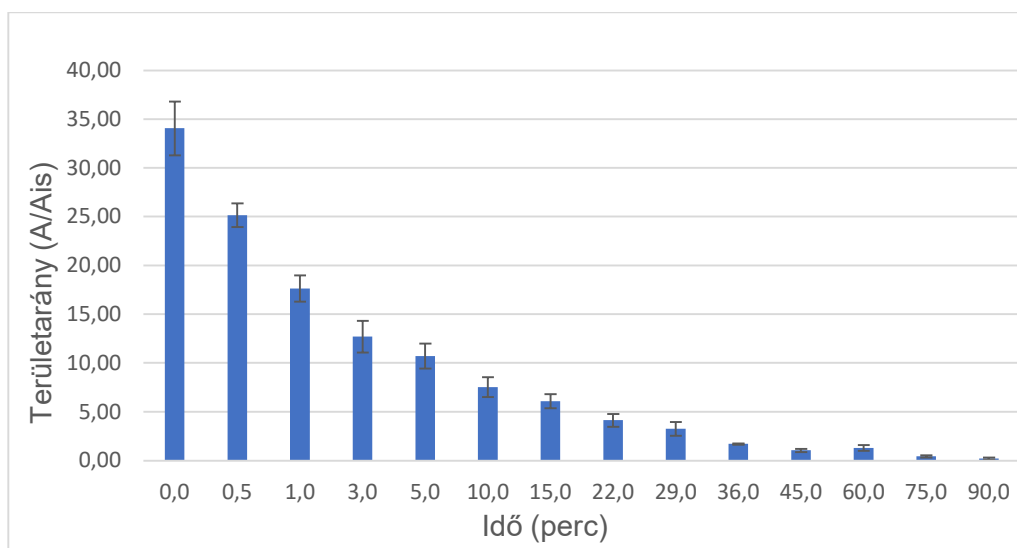
Kísérleteinkben olyan elrendezést és metodikát alkalmaztunk, amelynek révén mind a vékonybél metabolikus enzimjeinek aktivitását, azaz mind a metabolitok képződését, mind a konjugátumok vékonybélbe történő kiválasztását vizsgálni tudtuk. A **4q** és a **16a** kalkonokat 240 μM , illetve 280 μM koncentrációban perfundáltuk a vékonybélben és a vegyületek eliminációjának időbeli lejátszódását a perfúziós oldatok 0, 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 22, 29, 36, 45, 60, 75 és 90 percben vett

mintáinak HPLC-UV-Vis analízisével határoztuk meg [D26]. A bélperfúziós modell azon az elven alapul, hogy a perfúziós oldatban a gyógyszerkoncentráció az idő múlásával csökken, ami a nettó gyógyszerfelszívódásnak tulajdonítható. Az alkalmazott kísérleti elrendezés lényegében megfelel a *per os* gyógyszeralkalmazásnak, a vizsgált vegyületet ugyanis közvetlenül juttattuk és perfundáltuk a vékonybélbe, ahová a szájon keresztül történő bevétel után is jutott volna. A módszert korábban már alkalmaztuk a 4-nitrofenol [N22], a kapszaicin [N26] és az ibuprofén [N8,N9] hasonló vizsgálatára.

**4q****16a**

26. ábra. A **4q** és **16a** vegyületek szerkezete

A **4q** és a **16a** vegyület vékonybélből történő eliminációjának időbeli lefolyását a 27. és a 28. ábra mutatja. Az ábrák a vizsgált kalcin koncentrációjának validált HPLC-UV-Vis módszer alkalmazásával mért változását mutatják a perfúzió időtartamának függvényében.

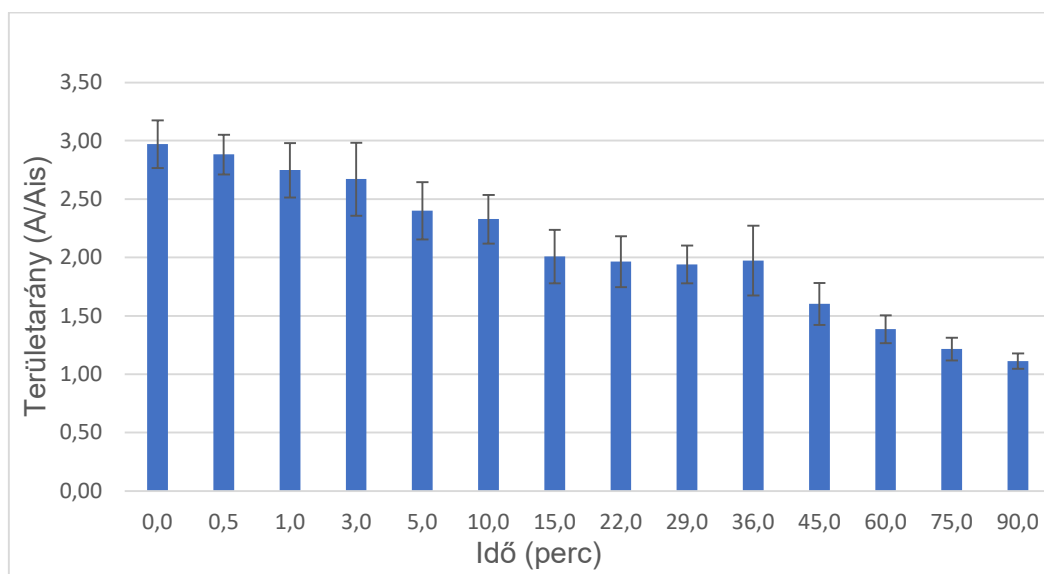


27. ábra. A **4q** kalcin (0,24 mM) HPLC csúcsterületének változása a perfúziós oldatban a vegyület intesztinális eliminációja során. Minden érték három párhuzamos mérés átlaga [D26]

Eredményeink azt mutatták, hogy a 90 perces kísérletek során a **4q** kalcin szinte teljes mennyisége eliminálódott a perfuzátumból (27. ábra). Hasonló lefutású nettó eliminációs görbét kaptunk a kapszaicin és dihidrokapszaicin megegyező kísérleti körülmények között vizsgált intesztinális felszívódásának vizsgálata során is [N26]. A hasonló felszívódási profilt mutató kapszaicinoidok gasztrointesztinális felszívódásának vizsgálata során Kawada és mtsai igazolták,

hogy a kapszaicin és a dihidrokapszaicin patkány vékonybélből (jejunum szakasz) történő eliminációja passzív folyamat [316]. Bár kísérleteink során nem vizsgáltuk, a **4q** vegyület szerkezete alapján feltételezhető, hogy a vegyület abszorpciója is passzív diffúzió révén történik.

A bázikus trimetilamino-funkcival bíró **16a** vegyület intesztinális abszorpciójának kinetikája nagymértékben különbözik a **4q** vegyületétől. A **16a** vegyület kezdeti koncentrációja a kísérlet végére (90 perc) körülbelül felére csökken egy közel lineáris összefüggés szerint (28. ábra).



28. ábra. A **16a** kalkon (0,28 mM) HPLC csúcsterületének változása a perfúziós oldatban a vegyület intesztinális eliminációja során. Minden érték három párhuzamos mérés átlaga [D26]

Ez a kísérleti tapasztalat megegyező azokkal a korábbi hasonló körülmények között kapott eredményekkel, melyek szerint a kalkonok/dihidrokalkonok és glükuronid konjugátumai közül az apolárisabb aglikonok felszívódása gyorsabb [203-206].

Számos tanulmány kiemelte, hogy a vegyületek ionizációs profilját (és annak következtében bekövetkező lipofilitás-változását) körültekintően figyelembe kell venni a biohasznosulásuk előrejelzésében [317-319]. A **16a** dimetilaminometilén-szubsztituens pK_a -értéke alacsony [321]; ezért túlnyomórészt ionizálódik a gyomor-bél traktusban. Ezzel szemben a **4q** fenolos hidroxilcsoportjainak magas pK_a -értéke [S28] miatt fiziológias pH-n túlnyomórészt töltésmentes, ami passzív diffúzió révén teszi lehetővé a permeabilitását.

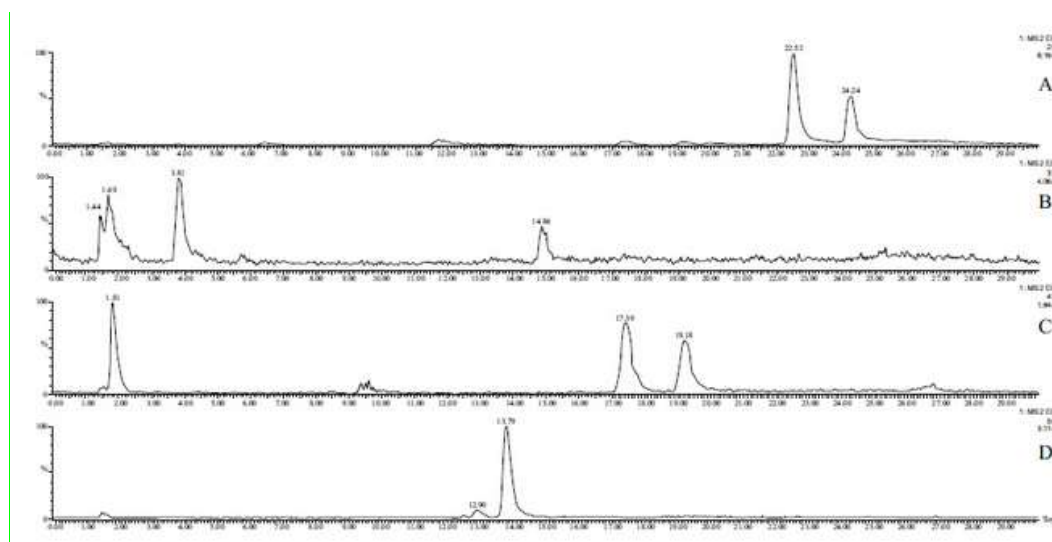
A kísérleti tapasztalat értelmezéséhez feltételezhető, hogy a **16a** vegyület protonált N-atomjának segítségével ionpárt képez a tápcsatorna mukózával és így alkalmassá válik a koncentráció grádiens irányába történő passzív diffúzióra (hidrofil diffúzió). A rendelkezésre álló abszorpciós felület a kísérlet elején telítődik és ennek eredményként a vegyület abszorpciója nulladrendű kinetikát követ [320]. Ugyanakkor, a vegyület magas ionizációs foka miatt e vegyület membránon való

átjutását specifikus transzport- és csatornafehérjék aktivitása is segítheti [322,323].

A béllumen metabolikus aktivitása jól dokumentált. A patkány enterocitáiban expresszáldó fő metabolikus enzimek a CYP1A1, 2B1 és 3A1 [324,325], a GST [326], a SULT [327,328] és az UGT1A formák [329]. Az MRP2 a polarizált sejtek, például a bélhámsejtek apikális membrán doménjében lokalizálódik, ahol a szubsztátok egyirányú transzportját közvetíti a szerv lumen oldalára [330].

A két kalcron lehetséges Fázis II metabolitjainak kimutatása és azonosítása céljából elvégeztük a bélperfuzátumok HPLC-MS analízisét. Az alacsony metabolit koncentrációk miatt a vizsgálatokhoz szilárd fázisú extrakcióval kombinált HPLC-MS módszereket fejlesztettünk ki. A két perfuzátum molekulaion-kromatogramjai a 29., 30. és 31. ábrán láthatók.

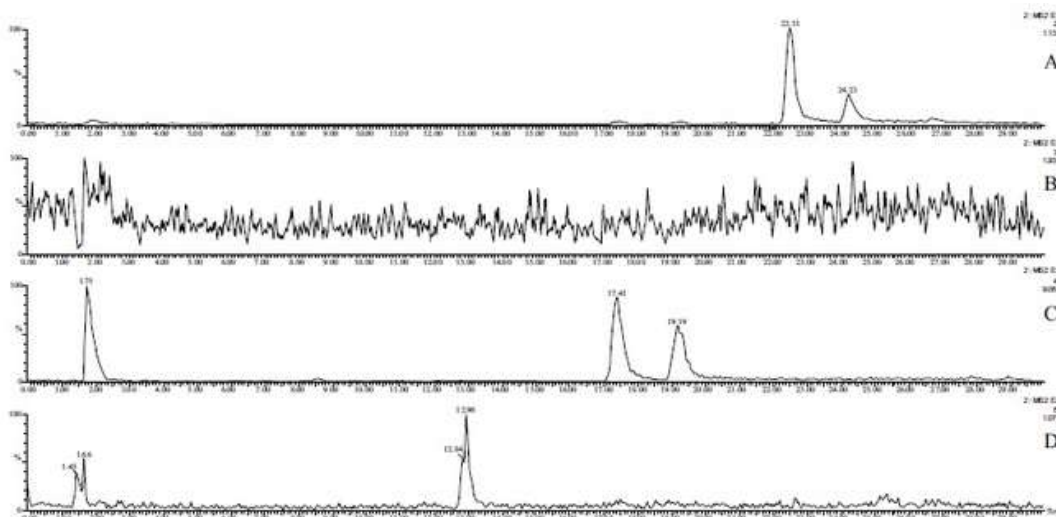
A **4q** kalcron 90 perces perfuzátumában ESI(+) ionizációval kombinált HPLC-MS módszerrel kimutatható volt a **4q** alapvegyület (t_R = 22,52 perc és 24,24 perc), valamint a vegyület szulfát- (t_R =14,86 perc) (**4q-SO₃H**), glükuronid- (t_R =17,39 perc és 19,18 perc) (**4q-GLU**) és glutation-konjugátuma (t_R =12,90 és 13,79 perc) (**4q-GSH**) (29. ábra).



29. ábra. A **4q** kalcron (A), valamint szulfát- (B), glükuronid- (C) és glutation-konjugátumának (D) HPLC-ESI(+) kromatogramjai [D26]

A **4q** alapvegyület (A panel), annak glükuronidja (C panel) és glutation-konjugátuma (D panel) két elkülönülő kromatográfiás csúcs formájában azonosítható mindkét ionizációs módszer alkalmazása esetén. Figyelembe véve a glükuronid- és glutation-konjugáció mechanizmusait [331], a **4q** és a **4q-GLU** páros csúcsok megjelenése a kiindulási (*E*)-konfigurációjú **4q** kalcron (*E*)/(*Z*) izomerizációjával magyarázható. A **4q-GSH** konjugátumok két részlegesen szeparálódó csúcsai ugyanakkor diasztereomer GSH-adduktok képződésével magyarázható.

Az ESI(-) ionizációval végzett HPLC-MS analízis csak az alapvegyület (**4q**) (A panel), valamint annak glükuronid- (**4q-GLU**) (C panel) és glutation- (**4q-GSH**) (D panel) konjugátumainak jelenlétét mutatta (30. ábra).



30. ábra. A **4q** kalcinon (A), valamint glükuronid- (C) és glutation-konjugátumának (D) HPLC-ESI(-) kromatogramjai [D26]

A GSH-konjugáció a kalcinonok és más enonok jól ismert metabolikus átalakulása (Michael-típusú addíció). Ezekben a reakciókban a nukleofil kénatom az enon rész β -szénatomjához kapcsolódik, ami egy új királis centrumot hoz létre. Az enantiomer-tiszta GSH (2*S*,5*R*) addíciójának eredményeképpen a reakció két diasztereomer addukt képződését eredményezi. A viszonylag rövid retenciós idejű vegyületek szerkezetét nem sikerült azonosítani. A perfuzátumok ESI(+) és ESI(-) HPLC-MS analízisének eredményeit a 14. táblázat foglalja össze.

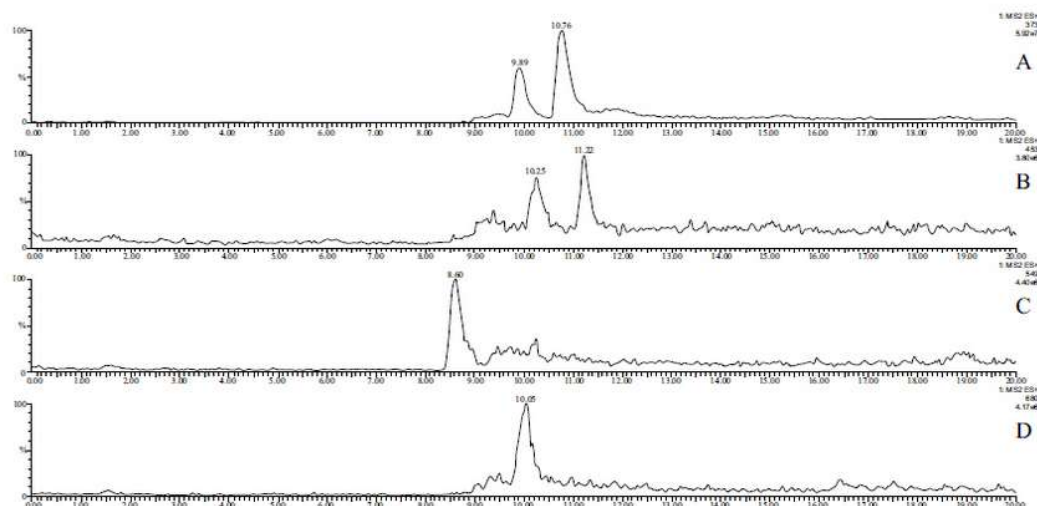
14. táblázat. A **4q** kalcinon 90 perces intesztinális perfuzátumában azonosított metabolitok HPLC-MS adatai [D26]

Vegyület	Moláris tömeg	t_R (perc) ESI (+)	t_R (perc) ESI (-)
4q	254,09	m/z 255 $t_{R1}=22,52$; $t_{R2}=24,24$	m/z 253 $t_{R1}=22,51$; $t_{R2}=24,23$
4q-SO₃H	334,05	m/z 335 $t_R=14.86$	m/z 333 (nem detektálható)
4q-GLU	430,13	m/z 431 $t_{R1}=17,39$; $t_{R2}=19,18$	m/z 429 $t_{R1}=17,41$; $t_{R2}=19,19$
4q-GSH	561,18	m/z 562 $t_{R1}=12,90$; $t_{R2}=13,79$	m/z 560 $t_{R1}=12,96$; t_{R2} (nem detektálható)

t_R , retenciós idő

A bisz-Mannich-analóg **16a** esetében a 90 perces perfuzátum ESI(+) ionizációval végzett HPLC-MS analízise a **16a** alapvegyület (t_R = 9,89 perc és 10,76 perc), valamint annak szulfát- (t_R = 10,25 perc és 11,22 perc) (**16a-SO₃H**), glükuronid- (t_R = 8,60 perc) (**16a-GLU**) és glutation-konjugátumának (t_R = 10,05

perc) (**16a-GSH**) jelenlétét igazolta. A kromatogramokon az alapvegyület (**16a**) és szulfát-konjugátuma (**16a-SO₃H**) diasztereomerek keverékeként volt azonosítható (31. ábra). A perfuzátumok ESI(+) és ESI(-) HPLC-MS analízisének eredményeit a 15. táblázat foglalja össze.



31. ábra. A **16a** kalcin (A), valamint szulfát- (B), glükuronid- (C) és glutation-konjugátumának (D) HPLC-ESI(+) kromatogramjai [D26]

15. táblázat. A **16a** kalcin 90 perces intesztinális perfuzátumában azonosított metabolitok HPLC-MS adatai [D26]

Vegyület	Moláris tömeg (Bázis)	<i>t_R</i> (perc) ESI (+)	<i>t_R</i> (perc) ESI (-)
16a	372,16	m/z 373 <i>t_{R1}</i> =9,89; <i>t_{R2}</i> =10,76	m/z 371 (nem detektálható)
16a-SO₃H	452,12	m/z 453 <i>t_{R1}</i> =10,25; <i>t_{R2}</i> =11,22	m/z 451 (nem detektálható)
16a-GLU	548,19	m/z 549 <i>t_R</i> =8,60	m/z 547 (nem detektálható)
16a-GSH	679,24	m/z 680 <i>t_R</i> =10,05	m/z 678 (nem detektálható)

Összefoglalva megállapítható, hogy a **4q** kalcin és a **16a** *bis*-Mannich kalcin intesztinális eliminációja lényeges különbséget mutat: a **16a** származék eliminációja jóval elmarad a **4q** vegyületétől. A felszívódott **4q** és **16a** kalcinok Fázis II metabolikus átalakulásokat mennek keresztül a bélhámsejtekben, és az alapvegyületek glükuronid-, szulfát- és glutation-konjugátumai megjelennek a bélperfuzátumban. A szilárd fázisú extrakcióval kombinált HPLC-MS módszer lehetővé tette a konjugátumok azonosítását. Az eredmények legjobb tudomásunk szerint elsőként mutatják be, hogy a fenolos kalcinok ilyen szerkezeti módosítása hogyan befolyásolja a vegyületek vékonybélből történő eliminációját és metabolizmusát.

5.5. Kalkonok (4) és gyűrűs kalkon-analógok daganatellenes hatásai

5.5.1. (E)-2-(4'-X-benzilidén)-1-cikloheptanonok (3) és karbociklusos kalkon-analógok (5-7) *in vitro* daganatsejt citotoxicitásának szerkezet-hatás vizsgálata [D5,D9]

A **3** és **5-7** vegyületek (92, a benzilidén-molekularészen azonosan szubsztituált származék) P388, L1210, Molt 4/C8, CEM rágcsló, és mintegy 60 humán tumor sejtvonallal szemben mutatott *in vitro* citotoxikus hatásának vizsgálata Dimmock és munkatársaival kialakult kooperációs munka keretében történt [D5,D9].

Az **5-7** vegyületek (56 származék) rágcsló (egér) P388, L1210 sejtekkel, valamint humán Molt 4/C8 és CEM T-sejtekkel szemben meghatározott IC₅₀ értékei alapján számított Átlagos Potenciál (ÁP) értékeit [D5] a 16. táblázat foglalja össze. A vizsgálatok során a vegyületek legnagyobb koncentrációja a P388 tesztben 50 µM, míg az L1210, Molt 4/C8 és CEM tesztekben 500 µM volt. Amikor a sejtek szaporodásának 50%-os gátlásához szükséges koncentráció (IC₅₀) egy vegyület esetén nagyobb volt, mint 50 µM (P388 teszt), vagy 500 µM (L1210, Molt 4/C8 és CEM tesztek), az átlag számításakor a kérdéses vegyület IC₅₀ értékét 50, illetve az 500 µM értéként vettük figyelembe. Így a táblázatban közölt átlagos értékek (ÁP) nem szigorúan a kísérletileg meghatározott IC₅₀ értékek átlagai.

16. táblázat. A **3** és az **5-7** sorozat vizsgált vegyületeinek Átlagos Potenciál (ÁP, µM) értékei [D5]

Soro- zat	P388 sejtek	L1210 sejtek	Molt 4/C8	CEM limfociták
(3)	34,5 (16,8-50) ^a	227 (68,4-500)	186 (39,2-500)	136 (30,1-500)
(5)	42,9 (21,0-50)	27 (41,2-500)	267 (42,3-500)	155 (31,8-500)
(6)	20,9 (5,3-50)	135 (17,5-500)	158 (2,11-500)	115 (1,65-500)
(7)	11,2 (1,6-19,9)	85,2 (0,34-500)	66,0 (0,47-500)	47,0 (0,35-500)

^aAz ÁP számításakor figyelembe vett IC₅₀ értékek tartománya (µM).

A négy teszt alapján számított ÁP értékek összehasonlításakor megállapítható volt, hogy az (E)-2-(X-benzilidén)-1-benzoszuberón (**7**) származékok a leghatékonyabb tumorellenes (citotoxikus) vegyületek (16. táblázat). Ugyanakkor, a **7** vegyületek mintegy háromszor hatékonyabbak, mint a rokon szerkezetű **3** származékok, jelezve az (E)-2-(X-benzilidén)-1-cikloheptanon (**3**) molekularészhez kapcsolódó második aromás gyűrű fontosságát a citotoxikus hatás kialakulásában. A vizsgált vegyületek közül a leghatékonyabb származéknak az (E)-2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberón (**7c**) bizonyult (17. táblázat).

Az A gyűrű jelentőségén túlmenően számos vegyület térszerkezetének röntgendiffrakciós vizsgálata azt mutatta, hogy az aromás gyűrűk térbeli helyzete

befolyással bír a vegyületek citotoxicitására. A vizsgált topológiai tulajdonságok összehasonlítása alapján (a) a karbonilcsoportra jellemző vegyértékszög az öttagú gyűrűs vegyületek (**5**) esetén a legkisebb ($106\text{--}107^\circ$) és a héttagú gyűrűs vegyületek (**7**) esetén a legnagyobb (119°); (b) az enon rendszert jellemző vegyértékszögek az **5>6>7** irányban csökkennek; és (c) a B-gyűrű és az enon C=C kötés síkja az **5** sorozatban közel planáris, míg a **6** és **7** sorozatokban – a B-gyűrű szubsztituenseinek természetétől és helyzetétől függően – 132° és 167° között változik [D9]. Az **5a**, **6a** és **7a** vegyületek molekuláris modellezéssel kapott adatok alapján a C (cikloalkán) gyűrű méretének növekedése eredményeképpen megváltozik az A-B gyűrűk középpontjai közötti távolság ($6,85\text{ \AA}$, $7,47\text{ \AA}$ és $7,43\text{ \AA}$), valamint a két gyűrű síkjának diéderes szöge ($58,7^\circ$, $-58,6^\circ$ és $85,2^\circ$) [D5].

17. táblázat. Néhány *E*-2-(X-benzilidén)-1-benzoszuberon (**7**) *in vitro* IC₅₀ és MG MID^a értékei (μM) [D5]

Vegyület (X)	P388 IC ₅₀ (μM)	L1210 IC ₅₀ (μM)	Molt 4/C8 IC ₅₀ (μM)	CEM IC ₅₀ (μM)	Humán (MG MID) ^a
7 (H)	12,7	106,0±31	42,7±3,3	28,9±0,7	18,6
7 (3'-F)	10,9	134±50	28,3±2,4	11,2±2,6	16,2
7 (4'-F)	11,1	60,3±10,6	53,6±7,0	20,0±6,4	N.A. ^b
7 (3'-Cl)	8,2	52,3±0,0	23,8±2,7	9,44±2,06	16,6
7 (4'-Cl)	9,5	51,8±0,4	33,0±0,3	15,1±4,7	17,0
7 (3'-Br)	10,5	51,0±3,5	17,1±0,3	8,90±0,90	N.A. ^b
7 (4'-Br)	18,6	50,9±0,1	54,7±4,7	17,1±1,5	N.A. ^b
7 (3'-CH ₃)	19,9	54,4±5,7	34,6±1,1	15,8±4,8	20,0
7 (4'-CH ₃)	11,8	25,0±7,4	21,3±14,1	11,4±1,6	11,2
7 (3'-OCH ₃)	13,9	56,3±1,8	100	9,50±0,16	15,9
7 (4'-OCH ₃)	1,6	0,34±0,02	0,47±0,33	0,35±0,04	0,269
7 (3'-NO ₂)	15,8	48,8±0,2	8,82±0,38	7,72±0,93	10,2
7 (4'-NO ₂)	10,9	500	500	500	89,1
7 (4'-N(CH ₃) ₂)	1,9	1,87±0,07	5,25±3,63	3,05±0,46	1,41

^aÁtlaggrafikon középértéke. ^bNincs adat.

A vegyületek citotoxicitása a B gyűrű szubsztituenseinek Hammett-féle szigma (σ_p és σ_m) [118] valamint Hansch-Fujita π [130] értékeivel negatív, míg a szubsztituensek MR [130] valamint E_s [130] értékeivel pozitív korrelációt mutatott. A 13. táblázatban szereplő vegyületek négy vizsgált sejtkultúrával szemben mutatott IC₅₀ értékek alapján kapott regressziós egyenletek a következők:

$$\log 1/IC_{50} (\text{P388}) = -0,289 \sigma - 0,603 \pi + 0,089 MR + 0,257 E_s - 0,984 \quad (r = 0,929)$$

$$\log 1/IC_{50} (\text{L1210}) = -0,897 \sigma - 0,776 \pi + 0,249 MR + 0,969 E_s - 1,637 \quad (r = 0,936)$$

$$\log 1/IC_{50} (\text{Molt/C8}) = -0,773 \sigma - 0,677 \pi + 0,213 MR + 0,997 E_s - 1,379 \quad (r = 0,938)$$

$$\log 1/IC_{50} (\text{CEM}) = -0,851 \sigma - 0,327 \pi + 0,199 MR + 0,979 E_s - 1,144 \quad (r = 0,947)$$

A szubsztituensek sztérikus tulajdonságait (méret, sztérikus gátlás) jellemző paraméter (E_s) nagysága a vegyületek L1210, Molt/C8 és CEM sejtekre gyakorolt hatásában jelentőséggel bíró molekuláris tulajdonságnak bizonyult. Ezzel párhuzamosan, a szubsztituensek nagyságát („*bulkness*”) és a vegyületek polarizálhatóságára gyakorolt hatását jellemző MR állandó jelentősége is nagyobb e három sejtvonal esetén. A vizsgált vegyületek $\log P_{VRK}$ értéke a 3,75-5,35 tartományba esik (11. táblázat). Ebben a tartományban mind a négy sejtvonal esetén a szubsztituensek lipofilitását jellemző állandó (π) növekedése a vegyületek IC_{50} értékének növekedését (citotoxicitásának csökkenését) eredményezte. Hasonlóképpen, mind a négy sejtvonal esetén a Hammett-féle szigma (σ) értékek növekedése (elektronvonzó képességük erősödése) szintén a vegyületek citotoxikus hatásának csökkenését eredményezte.

A fenti szerkezet-hatás összefüggések a vegyületek nem-kovalens kölcsönhatásokon alapuló citotoxikus hatásával vannak összhangban.

5.5.2. Heterociklusos kalkon-analógok *in vitro* daganatsejt citotoxicitásának szerkezet-hatás vizsgálata [D11]

A karbociklusos kalkon-analógok perspektivikus kiindulási struktúráknak bizonyultak hatékonyabb daganatellenes hatású vegyületek tervezéséhez és szintéziséhez. Ezek között számos (*E*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-tetralon-származék (**6**) is hatékony daganatsejt citotoxikus származéknak bizonyult. Ugyanakkor, számos **6** és **7** származék kísérleti egereken végzett *in vivo* vizsgálata során a vegyületek legtöbbje 30 mg/kg és 100 mg/kg (i.p.) nem mutatott toxikus hatást. Elhullást még a 300 mg/kg (i.p.) dózis sem okozott [D5,D9]. E kedvező tapasztalatok alapján, célul tűztük ki a **6** származékok heterociklusos analógjainak szintézisét és daganatellenes hatásainak megismerését. E dolgozat keretében a szintetizált (*E*)-3-(4'-X-benzilidén)-4-kromanonok (**8**) szintézisét és *in vitro* daganatsejt citotoxicitás vizsgálatainak eredményeit mutatom be.

A 3-arilidén-4-kromanonok (**8**) első képviselőit különböző a liliomfélék családjába tartozó *Eucomis*, *Muscari*, és *Bellevalia* fajokból izolálták [332]. Ezekből a népgyógyászatban kiterjedten alkalmazott növényekből izolált ún. homoizoflavonoidok (**8**) számos farmakológiailag hasznosítható biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Ennek megfelelően a természetes képviselők izolálása [333-335] és analógjaik szintézise [336] intenzív kutatás tárgya. A karbociklusos kalkon-analógok (**5-7**) szerkezet-hatás elemzése azt mutatta, hogy a vegyületek aliciklusos gyűrűjének mérete befolyásolja az A és B aromás gyűrűk relatív helyzetét és ezek a változások meghatározó jelentőséggel bírnak a citotoxikus tulajdonságaikban [D5,D9]. Mivel a 4-helyzetű metilénecsoport oxigénatomra történő cseréje megváltoztatja a **6** vegyületek háromdimenziós szerkezetét és elektronszerkezetét, a szintetizált **8** vegyületek megismert hatásainak a **6** vegyületekével történő összehasonlítása további információt nyújthat a gyűrűs kalkon-analógok szerkezet-hatás összefüggéseiről.

A vizsgált **8** vegyületek egér L1210 sejtek, valamint humán Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben meghatározott IC₅₀ értékeit a 18. táblázat foglalja össze.

18. táblázat. A vizsgált (*E*)-3-(X-benzilidén)-4-kromanonok (**8**) *in vitro* IC₅₀ értékei (μM) [D11]

Vegyület	X ₁ *	X ₂ *	Molt 4/C8		CEM		L1210	
			IC ₅₀ (μM)**	RH***	IC ₅₀ (μM)**	RH***	IC ₅₀ (μM)**	RH***
8a	2-Cl	H	7,70±0,25	3,84	8,87±1,01	0,99	38,8±1,8	0,77
8b	4-Cl	H	8,33±0,17	>60,0*	8,24±0,57	5,85	242±37	0,29
8c	2-Br	H	7,63±0,078	4,82	11,6±4,2	2,19	36,3±2,9	0,92
8d	3-Br	H	5,22±3,53	4,06	4,81±3,78	1,83	80,3±36,3	1,97
8e	4-Br	H	8,11±0,08	>61,7	8,43±0,61	>59,3	254±41	0,80
8f	2-OCH ₃	H	7,75±0,44	4,04	7,92±0,18	1,59	46,9±6,6	0,86
8g	3-OCH ₃	H	7,72±0,32	1,57	8,05±0,18	1,09	148±52	0,41
8h	4-OCH ₃	H	13,8±6,9	0,68	25,5±19,0	0,35	67,3±23,4	0,65
8i	4-OCH ₃	2-OCH ₃	6,83±0,25	0,25	7,87±0,71	0,24	18,1±2,9	0,44
8j	3-CH ₃	H	7,61±0,42	4,70	7,94±0,10	1,19	124±35	0,59
8k	4-CH ₃	H	8,21±0,71	>60,9	8,30±0,44	55,4	71,4±28,3	2,26
8l	4-N(CH ₃) ₂	H	12,0±1,7	0,18	>100 ^e	<0,02	91,0±0,8	0,19
Melfalan	---	---	3,24±0,79	---	2,47±0,30	---	2,13±0,03	---

*Lásd 2. ábra. **A sejtosztódás 50%-os gátlásához szükséges koncentráció. ***A benzilidén-molekularészen hasonlóképpen szubsztituált **6** és **8** vegyületek IC₅₀ értékeinek a hányadosai (IC₅₀(**6**)/IC₅₀(**8**)).

Amint a táblázat adatai mutatják, a Molt 4/C8 és CEM vizsgálatok esetében az IC₅₀-értékek általában az alacsony μM tartományban vannak, és az aril-szubsztituensek jellege csekély hatással van a citotoxikus hatékonyságra. Másrészt, az L1210 sejtek lényegesen rezisztensebbek ezekkel a vegyületekkel szemben, és az IC₅₀-értékek között jelentős eltérések mutatkoznak (18. táblázat).

A kapott eredmények és az 1-tetralonszármazékok (**6**) IC₅₀ értékei alapján kiszámítottuk a **8** származékok relatív hatékonyságát (RH), ami a benzilidén-molekularészen hasonlóképpen szubsztituált **6** és **8** vegyületek IC₅₀ értékeinek a hányadosa (IC₅₀(**6**)/IC₅₀(**8**)). A 12 vegyületepár RH értékeinek összehasonlító adatait a 19. táblázat foglalja össze.

A kapott adatok alapján két következtetés vonható le. Egyrészt, hogy a **8** sorozat vegyületeinek 42%-kánál hatékonyságnövekedés, míg a fennmaradó összehasonlítások egyharmadában (33%) ekvipotencia figyelhető meg. Másrészt, hogy mindkét sorozatbeli analógok citotoxikus potenciáljának változásai nagymértékben függenek a vizsgált sejtvonaltól. Így általánosságban elmondható, hogy az humán T-limfociták érzékenyebbek a 4-kromanonokra, mint a **6**

sorozatbeli karbociklusos analógokra. Másrészt, az 1-tetralonok (**6**) a 4-kromanon (**8**) származékokhoz képest nagyobb citotoxikus potenciállal rendelkeznek az L1210 sejtekkel szemben.

19. táblázat. A benzilidén-molekularészen azonosan szubsztituált **8a-I** és a **6a-I**, vegyületek daganatsejt citotoxikus potenciál (RH) értékeinek összehasonlítása [D11]

Teszt sejt kultúra	Nagyobb potenciál (darab)		Azonos potenciál (darab)
	8a-I	6a-I	8a-I és 6a-I között
Molt 4/C8	9	2	1
CEM	6	2	4
L1210	0	5	7
Összesen	15	9	12
%	42	25	33

A **6** és **8** sorozat vegyületei közötti citotoxikus hatékonyságbeli eltérés okainak megismerése céljából a vegyületek számos fizikai-kémiai tulajdonságát vizsgáltuk. Így többek között, a **6** sorozat 4-metiléncsoportjának (CH_2) oxigénatommal való helyettesítése befolyásolja a molekulák lipofilitását (lásd 12. táblázat) és polaritását. Ezért kiszámítottuk a **8a-I** $\text{clog}P$ és a topológiai poláris felület (TPSA) értékeit, amelyeket a 20. táblázat foglal össze.

A **6a-I** $\text{clog}P$ értékei 0,41 $\text{clog}P$ értékkel magasabbak, mint az **8** sorozat analóg származékaié, míg a **8a-I** TPSA értékei 9,23 Å² értékkel nagyobbak, mint a rokon 1-tetralonoké (**6**). Ez alapján feltételezhető, hogy a vizsgált sejt vonaltól függően, mindkét fizikai-kémiai paraméter hozzájárul a citotoxikus hatékonyság eltéréseihez.

A **6** és **8** vegyületek – melyek L1210 sejtekkel szemben mért C_{50} értékei jelentős különbségeket mutattak - molekula-modellezéssel kapott optimalizált konformációiban a B-gyűrű és az enon molekularész síkjai közötti diéderes szögek (Θ) értékei között jelentős különbségek mutatkoztak (20. táblázat). A diéderes szögek megváltozása befolyásolja a (a) molekulák háromdimenziós alakját, (b) a konjugáció erősségét, és többek között (c) az enon funkció reaktivitását. A C (cikloalkán) gyűrű méretének növekedése az **5**, **6** és **7** vegyületek körében a B-gyűrű és az enon molekularész síkjai közötti diéderes szögek növekedését eredményezte. Ez a változás a három vegyületsorban a daganatsejt citotixitás (IC_{50}) értékek növekedését eredményezte [D9].

Az előzmények alapján valószínűsíthető, hogy a diéderes szögek nagyfokú, bár ellentétes irányú (csökkenő) változása, a két vegyületsor konformációjának különbözősége (és annak szterikus és elektronikus következményei) jelentős szerepet játszanak az L1210 sejtekkel szemben mutatott citotoxicitás-különbségek kialakulásában. Ezzel a feltételezéssel összhangban, a **8h** **8k** vegyületek spontán tiol-reaktivitása jóval nagyobb, mint a megfelelő **6h** és **6k** vegyületeké [S1].

Összefoglalva megállapítható, hogy további **8** származékok szintézise és biológiai hatásainak vizsgálata perspektivikus területét jelenti a gyűrűs kalkon-származékokkal folytatott kutatásoknak.

20. táblázat. A vizsgált (*E*)-3-(X-benzilidén)-4-kromanonok (**8**), valamint a hasonlóképpen szubsztituált (*E*)-2-(X-benzilidén)-1-tetralonok (**6**) *clogP*, *TPSA* és Θ értékei [D11]

Vegyület	<i>clogP</i> ¹	<i>TPSA</i> ²	Θ ³	Vegyület	Θ ³
8a	4,46	26,31	59,4	6a	119,8
8b	4,46	26,31	50,0	6b	131,1
8c	4,61	26,31	62,0	6c	116,1
8d	4,61	26,31	50,5	6d	130,6
8e	4,61	26,31	50,1	6e	131,1
8f	3,67	35,54	54,5	6f	130,0
8g	3,67	35,54	50,6	6g	130,5
8h	3,67	35,54	49,6	6h	131,6
8i	3,76	44,77	54,1	6i	126,9
8j	4,25	26,31	50,4	6j	130,7
8k	4,25	26,31	49,9	6k	131,2
8l	3,91	29,54	49,2	6l	132,2

¹Számított *logP*. ²Számított topológiai poláris felszín területe. ³A B-gyűrű és az enon molekularész síkjai közötti diédes szög [D11].

Ugyancsak megemlítendő, hogy vizsgálataink szerint a **8a-i** vegyületek közül több kiemelkedő *in vitro* tuberkulosztatikus hatást is mutatott [D27]. A **8a-i** vegyületek benzilidén csoportjának aromás szubsztituentensei, valamint a *Mycobacterium tuberculosis* osztódását gátló hatás erőssége közötti összefüggést vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a pozitív Hammett-féle σ értékkel bíró szubsztituensek növelték, az elektron-donor szubsztituensek csökkentették a hatást. Ugyancsak figyelemre méltó különbségek voltak megfigyelhetők a benzilidén-molekularészen megegyezően szubsztituált, de különböző gyűrűtámszámú **3** és **5-8** származékok gátló hatásai között (21. táblázat).

21. táblázat. A **3** és **5-8** azonosan szubsztituált benzilidénszármazékok *Mycobacterium tuberculosis*-szal szemben mutatott gátló hatásának összehasonlítása (*c* = 12,5 µg/ml) [D27]

Szubsztituens	Gátlás (%)				
	3	5	6	7	8
3'-Br	0	56	51	63	99
3'-OCH ₃	0	0	79	8	98
3'-CH ₃	0	40	78	19	90
4'-CH ₃	3	0	75	0	91

A megfelelő **6** és **8** származékok összehasonlítása ez esetben is a **8** származékok nagyobb hatékonyságát mutatta. Hasonlóképpen a daganatos sejtkultúrákkal szemben mutatott eredményekhez (5.5.1. fejezet), a **3** sorozat

megfelelő tagjainak hatékonysága ebben a vizsgálatban is jóval elmarad a két aromás gyűrűvel rendelkező gyűrűs kalkon-analógokétól [D27].

5.5.3. Az (E)-2-(4'-metilbenzilidén)-1-benzoszuberón (7b) és (E)-2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberón (7c) vegyületek sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata [D28].

Mivel a **7c** átlagos citotoxicitása átlagosan 27-szerese a **7b** citotoxicitásának (17. táblázat), ezért azt vizsgáltuk, hogy a vegyületek citotoxicitásában megmutatkozó különbségek megjelennek-e a sejtciklusra gyakorolt hatásaikban. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a humán Jurkat T-sejtek érzékenyebbek az α,β -telítetlen ketonokra, mint más tumorsejtvonalak [337], így e munka során is Jurkat T-sejteket használtunk.

A kiválasztott kalkonszármazékok Jurkat T-sejtek sejtproliferációjára gyakorolt hatásának megismeréséhez kezdetben a teljes sejtszám, valamint az élő sejtek arányának az alakulását vizsgáltuk a vegyületek ekvitoxikus koncentrációival (**7b**: 23,3 μ M, **7c**: 5,6 μ M) történő kezelést követően. Az életképes sejtek aránya a kontroll sejtekhez képest mindkét gyűrűs kalkon-analóg esetén hasonlóan alakult: 8 órás inkubációs időt követően az élő sejtek mennyisége még közel megegyezik a kezeltlen sejtekével, de 48 órás inkubációs idő után a **7c** vegyülettel kezelt sejtek száma már felére csökkent [D26]. Az eredményeket a 22. táblázat foglalja össze.

22. táblázat. Az életképes sejtszám változása Jurkat T-sejtek **7b** és **7c** vegyületekkel történő kezeléseit követően [D28]

	Életképes sejtszám ($\times 10^5$)*		
	8 óra	24 óra	48 óra
Kontroll	5,45 $\pm$ 0,66	11,26 $\pm$ 1,67	11,07 $\pm$ 1,01
DMSO 1%	5,01 $\pm$ 0,74	10,53 $\pm$ 1,72	11,85 $\pm$ 2,44
7b (23,3 μM)	4,69 $\pm$ 0,52	7,91 $\pm$ 0,78	7,00 $\pm$ 0,76
7c (5,6 μM)	4,88 $\pm$ 0,68	8,68 $\pm$ 0,98	5,33 $\pm$ 0,83

*A meghatározás tripánkékekkel történő festéssel történt, Az eredmények négy párhuzamos mérésből képezett átlag $\pm$ szórás formában vannak feltüntetve.

A **7b** és **7c** vegyületek citotoxikus hatásának további vizsgálata céljából annexinV(-FITC)/propídium jodiddal történő kettős jelölést követő áramlási citometriai módszer alkalmazásával meghatároztuk az inkubátumokban levő élő, korai apoptikus fázisban levő, és apoptózis (és/vagy nekrozis) során elpusztult sejtek mennyiségét [338,339]. A vizsgálatok eredményeit az 23. táblázat foglalja össze.

A 8 órás kezelés alatt sem a **7b**, sem a **7c** vegyület nem mutatott kifejezett toxikus hatást. 24 órás kezelési időtartamot követően azonban az élő sejtek száma sokkal kisebb: a 4'-metoxiszármazék (**7c**) esetén (57,7%), mint a metil-szubsztituált **7b** vegyülettel történő kezelést követően (72,7%). A vegyületek által

módosított sejtek korai apoptotikus (**7c**: 22,8%; **7b**: 7,8%), illetve késői apoptikus/nekrotikus fázisban (**7c**: 16,8%; **7b**: 17,1%) találhatók.

48 órás kezelés során csak az élő és a késői apoptotikus/nekrotikus fázisban levő sejtek mennyiségének meghatározását végeztük el. Ebben az időpontban az élő sejtek száma jelentősen lecsökkent, a **7b** vegyület esetén 48,5%-ra, a **7c** analóg esetén pedig 40,2%-ra. A 48 órás eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy megegyezően a korábbi hasonló vizsgálatok eredményeivel [D5], a két koncentráció (**7b**: 23,3 μ M; **7c**: 5,6 μ M) közel ekvitoxikus dózist képvisel.

23. táblázat. Az élő, korai apoptikus és elpusztult Jurkat T-sejtek aránya (%-ban kifejezve) a **7b** és **7c** vegyületekkel történt 8, 24 és 48 órás sejtkézeléseket követően* [D28]

	Élő sejtek (%)	Korai apoptotikus sejtek (%)	Elpusztult sejtek (%)
8 óra			
Kontroll	90,33 $\pm$ 3,50	2,15 $\pm$ 1,07	3,98 $\pm$ 1,53
DMSO 1%	89,53 $\pm$ 5,60	2,67 $\pm$ 0,17	6,16 $\pm$ 2,68
7b (23,3 μ M)	84,15 $\pm$ 0,52	2,81 $\pm$ 0,09	8,09 $\pm$ 0,11
7c (5,6 μ M)	84,31 $\pm$ 4,24	3,15 $\pm$ 0,45	8,66 $\pm$ 2,15
24 óra			
Kontroll	89,37 $\pm$ 4,08	4,40 $\pm$ 3,07	4,24 $\pm$ 0,71
DMSO 1%	88,43 $\pm$ 5,72	3,17 $\pm$ 2,32	5,71 $\pm$ 2,49
7b (23,3 μ M)	72,71 $\pm$ 6,59	7,81 $\pm$ 0,98	17,11 $\pm$ 6,35
7c (5,6 μ M)	57,65 $\pm$ 5,52	22,80 $\pm$ 1,55	16,82 $\pm$ 3,39
48 óra			
Kontroll	90,27 $\pm$ 0,37	N.A.	9,70 $\pm$ 0,35
DMSO 1%	85,56 $\pm$ 1,26	N.A.	14,43 $\pm$ 1,24
7b (23,3 μ M)	48,53 $\pm$ 3,18	N.A.	51,44 $\pm$ 3,18
7c (5,6 μ M)	40,15 $\pm$ 1,39	N.A.	59,79 $\pm$ 1,39

*Az eredmények négy párhuzamos mérésből képezett átlag $\pm$ szórás formában vannak feltüntetve (N.A.=nincs adat)

A **7b** és **7c** vegyületek Jurkat T-sejtek sejtciklusára gyakorolt hatásának vizsgálata a vegyületekkel történt kezeléseket követően, a celluláris DNS mennyiségi analízise által történt. A Jurkat sejtek kezelését követően 8, 24 és 48 órás időpontokban vizsgáltuk a sejteket, hogy időben is megfigyelhessük a két gyűrűs kalkon-analóg sejtciklusra gyakorolt hatását. A sejtciklus vizsgálat eredményeit, az egyes fázisokban levő sejtek mennyiségét, %-ban kifejezve az 24. táblázat foglalja össze.

Amint a 24. táblázat adatai mutatják, a **7b** és **7c** vegyületek sejtciklusra gyakorolt hatásában eltérések mutatkoztak. A **7c** vegyület korai hatása (8 óra) abban nyilvánult meg, hogy megnövelte a G₂/M fázisban levő sejtek arányát (36,9%), ami együtt járt a G₀/G₁ fázisban levő sejtek mennyiségének

csökkenésével (18,6%), A metilszármazék (**7b**) esetén a sejtek legnagyobb hányada, a kontroll sejtekhez hasonlóan, a G₀/G₁ fázisban volt található (36,8%).

24. táblázat. A **7b** és **7c** vegyületekkel kezelt Jurkat T-sejtek áramlási citometriai módszerrel történt sejtciklus-analízis eredményei 8, 24 és 48 órás kezelést követően* [D28]

	Szub-G ₀ fázis (%)	G ₀ /G ₁ fázis (%)	S fázis (%)	G ₂ /M fázis (%)	Poliploid sejtek (%)
8 óra					
Kontroll	3,3 ± 0,7	42,6 ± 0,9	21,2 ± 3,9	27,2 ± 0,9	5,6 ± 1,0
DMSO 1%	3,1 ± 0,3	40,8 ± 1,4	20,7 ± 3,0	26,6 ± 1,7	7,6 ± 1,3
7b (23,3 µM)	3,8 ± 0,4	36,8 ± 2,3	22,8 ± 3,3	25,1 ± 3,2	8,4 ± 1,1
7c (5,6 µM)	6,4 ± 0,9	18,6 ± 2,2	24,7 ± 1,0	36,9 ± 0,9	9,9 ± 2,7
24 óra					
Kontroll	5,0 ± 1,5	44,7 ± 3,2	25,8 ± 0,5	22,7 ± 1,8	3,6 ± 0,9
DMSO 1%	5,5 ± 2,2	43,6 ± 2,6	21,1 ± 2,1	20,3 ± 1,1	4,9 ± 0,7
7b (23,3 µM)	14,5 ± 2,5	31,7 ± 2,5	17,3 ± 2,8	27,1 ± 2,2	8,5 ± 1,5
7c (5,6 µM)	22,4 ± 1,1	7,3 ± 0,4	9,6 ± 1,2	44,8 ± 4,9	16,2 ± 2,7
48 óra					
Kontroll	6,4 ± 1,9	49,6 ± 2,7	21,0 ± 1,1	17,3 ± 1,5	5,2 ± 2,0
DMSO 1%	8,4 ± 1,8	51,5 ± 2,3	17,2 ± 2,0	19,0 ± 0,7	7,1 ± 2,6
7b (23,3 µM)	36,5 ± 2,4	24,4 ± 1,2	13,0 ± 2,4	13,9 ± 1,3	12,4 ± 2,9
7c (5,6 µM)	40,8 ± 2,2	8,5 ± 0,8	5,9 ± 2,3	8,3 ± 1,5	34,3 ± 6,5

*Az eredmények négy párhuzamos mérésből képezett átlag ± szórás formában vannak feltüntetve.

Hosszabb, 24 órás inkubációs időt követően a **7c** vegyület hatására tovább csökkent a G₀/G₁ fázisban levő sejtek mennyisége (7,3%), és emelkedett a G₂/M fázisban (44,8%), valamint a szub-G₀ (apoptotikus/nekrotikus sejtek) fázisban (22,4%) levő sejtek aránya. Ebben az időpontban (24 óra), a **7b** származékkal kezelt sejtek esetén mérsékelt csökkenés következett be a G₀/G₁ fázisban levő sejtek mennyiségében (31,7%), ami együtt járt a G₂/M fázisban (27,1%), illetve a szub-G₀ fázisban (14,5%) levő sejtek arányának kismértékű növekedésével. A vegyületek eltérő hatása a (G₂/M)/(G₀/G₁) aránnyal is kifejezhető, ami 0,51 a kontroll, 0,85 a metil- (**7b**), és 6,1 a metoxiszármazék (**7c**) esetén.

48 órás kezelést követően mindkét kalkon-analóg esetén további növekedés volt tapasztalható a szub-G₀ fázisban, vagyis jelentősen megnőtt az apoptotikus/nekrotikus sejtek aránya (**7b**: 36,5%; **7c**: 40,8%), valamint ún. poliploid sejtek kialakulása volt megfigyelhető (**7b**: 12,4%, **7c**: 34,3%).

A sejtciklus-vizsgálat eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a két vizsgált vegyület hatása jelentős, de egymástól eltérő. Míg a metilszármazék (**7b**) esetén, a 8 órás kezelést követően a sejtek legnagyobb hányada – a kontroll sejtekhez hasonlóan – a G₀/G₁ fázisban található, addig a metoxi-szubsztituált

analóg (**7c**) esetén a G₂/M fázisban. Mivel a 8 órás időtartam körülbelül harmada egy sejtciklus időtartamának Jurkat T-sejtekben [340], a kísérleti eredmény arra utal, hogy a **7c** vegyület esetén nem működik megfelelően a G₁ ellenőrző pont, aminek egyébként meghatározó szerepe van genetikai problémák kiküszöbölésében [341].

Ugyanakkor, a **7c** vegyület G₂/M fázisú blokkot is okoz. A sejtciklusban bekövetkező ilyen jellegű zavar, mint egyes flavonoidok és kalkonok lehetséges hatásmechanizmusa, az irodalomban is dokumentált [342-345]. Az észlelt változások arra utalnak, hogy a **7c** viszonylag gyorsan DNS károsodást okozhat, aminek gyakori velejárója a G₂/M fázisú blokk [346,347]. A metilvegyület (**7b**) ekvitoxikus dóziséval történő sejtkezelés esetén nem figyelhető meg hasonlóan jelentős változás a G₁ ellenőrzőpontot illetően, és a G₂/M blokk sem kifejezett.

A **7c** származékkal történő hosásztávú (24 és 48 órás) expozíciót követően mind a G₀/G₁, az S, valamint a G₂/M fázisban levő sejtek mennyisége drasztikusan csökkent. Egyidejűleg nagymértékben megnőtt a szub-G₀ fázisban levő (apoptotikus/nekrotikus) sejtek, valamint a poliploid sejtek mennyisége, ami a G₂ ellenőrzőpont működési zavarára utal. Az ilyen jellegű késleltetett sejthalál, amit „mitotikus halál”-nak is neveznek, jellegzetessége a p53 mutáns tumoroknak [348].

Másrészről, a kalkonok ismert mikrotubulus-aktív szerek. A kalkonok daganatsejt citotoxikus hatásának egyik jellegzetessége, hogy a kezelt sejtek nagy hányadának osztódása a G₂/M fázisok határán megáll. Ez a megfigyelhető hatás többek között a vegyületek tubulin építő elemei asszociációjának gátlása eredményeként következhet be (lásd 2.4.2. fejezet). A mikrotubulusok szintézisének gátlása megzavarja a sejtciklust, mitotikus blokkot okoz a gyorsan osztódó sejtekben, ami a daganatos sejtek apoptózisához vezethet [349]. A daganatos sejtek különösen érzékenyek a mitotikus hibákra, ami a daganatellenes kemoterápia egyik célpontja lehet [350]. Ezen túlmenően, a mitózist-célzó szerek apoptotikus hatást fejtenek ki a hosszan tartó mitotikus leállás során (mitotikus sejthalál) [351], és p53-függő apoptózist indukálnak [352].

Hasonló eredményre vezettek Mojzis és mtsai több vegyületünkkel végzett *in vitro* vizsgálatait is. Így például, a humán Caco-2 (humán kolorektális adenokarcinóma) sejtekkel szemben az egyik leghatékonyabb vegyületnek szintén a **7c** vegyület bizonyult (IC₅₀ = 0,44 μM). A vegyület, hasonlóan saját kísérleti eredményeinkhez, a 24 és 48 órás vizsgálatok eredményei alapján a Caco-2 sejtek esetén is megnövelte a G₂/M fázisban lévő sejtek populációját és apoptózist okozott [S22]. A szintetizált (*E*)-2-(*X*-benzilidén)-1-indanon (**5**) és -tetralon-származékok (**6**) között az (*E*)-2-(2',4'-dimetoxibenzilidén)-1-tetralon-származék bizonyult a leghatékonyabb daganatsejt citotoxikus származéknak. A vegyület - a **7c** származékhoz hasonlóan - megnövelte a G₂ fázisban lévő sejtek populációját és apoptózist indukált [S26].

5.5.4. Ferrocenil-kalkonok daganatellenes hatásának szerkezet-hatás vizsgálata [D8,D25,D29]

Az **5-9** gyűrűs kalkonszármazékok ferrocén-analógjainak (**10-14**) szintézisét a megfelelő gyűrűs keton és ferrocén-karbaldehid bázis-katalizált Claisen-Schmidt kondenzációs reakciójával nyertük. A vegyületek szerkezetét, (*E*)-*s-cisz* konfigurációját IR és NMR módszerekkel igazoltuk. A **12** vegyület esetén a spektroszkópai vizsgálatok eredményeit röntgenkristallográfiai vizsgálat is alátámasztotta (21. ábra) [D8].

Az IR $\nu(\text{C=O})$ frekvenciák összehasonlítása azt mutatta, hogy a benzilidén-ketonok (**5a-9a**) frekvenciái 4-7 cm^{-1} -rel magasabbak, mint a megfelelő ferrocén-származékoké (25. táblázat). A **10-14** vegyületek alacsonyabb $\nu(\text{C=O})$ frekvenciái a ferrocén-molekularész nagyobb tömegének és a vegyületek magasabb fokú konjugációja eredményének tekinthető [D8,D25].

Az **5-14** vegyületek rágcsláló (egér) P388 sejtekkel szemben meghatározott citotoxicitási (IC_{50}) adatai azt mutatták, hogy a megfelelő fenil- és ferrocenil-vegyületek a legtöbb esetben azonos mértékű citotoxicitással bírnak. Statisztikailag eltérő ($p=0,05$) IC_{50} értékek csak az **5/10**, **7/12** és **8/13** párok esetén volt megfigyelhető (25. táblázat).

25. táblázat. Az **5a-9a** és a **10-14** vegyületek P388 sejtekkel szemben mutatott *in vitro* citotoxicitás, karbonil rezgési frekvencia és $\log P_{\text{VRK}}$ értékei [D25]

Vegyület	IC_{50} (μM) ^a	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1})	$\log P_{\text{VRK}}$	Vegyület	IC_{50} (μM) ^a	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1})	$\log P_{\text{VRK}}$
5a	65,9±3,5	1696	3,63	10	9,9±0,3	1690	4,62
6a	13,8±1,0	1667	4,14	11	22,5±5,4	1661	5,23
7a	21,0±0,3	1663	4,48	12	15,3±0,6	1659	5,36
8a	32,3±1,8	1673	3,98	13	10,7±2,6	1668	4,79
9a	19,9±4,7	1663	4,43	14	17,0±0,5	1656	5,35

^aÁtlag±szórás

A hattagú karbociklusos vegyületek (**6a** és **11**) IC_{50} értékeinek a megfelelő 4-kromanon (**8a** és **13**) és 4-tiokromanon (**9a** és **14**) értékeivel történt összehasonlítása alapján a heteroatomok beépülése nagyságrendileg nem változtatta meg a vegyületek daganatsejtekkel szemben mutatott citotoxicitását. A **6a** és **11** vegyületek cikloalkénon gyűrűméretének megváltozása a fenil-sorban (**5a** és **7a**) a citotoxicitás csökkenését, a ferrocenil-sorban (**10** és **12**) a citotoxicitás növekedését eredményezte. Figyelemre méltó, hogy a fenilcsoport ferrocenilcsoportra történő cseréje az öttagú gyűrűs kalkon-analógok (**5a/10**) esetén eredményezett leghatékonyabb toxicitás növekedést (25. táblázat).

Az **5a-7a** [D5] és a **10-12** [D8] vegyületek hasonló IR és NMR adatai a két sorozat azonos gyűrűtagszámú vegyületei konjugált molekularészeinek hasonló konformációját mutatták. Hasonló eredményeket kaptunk néhány (*E*)-2-ferrocénmetilén- és (*E,E*)-2,5-diferrocénmetilén-1-cikloalkanonok, valamint

benzilidén-analógjaik térszerkezetének összehasonlítása során is [D10]. A 4-kromanon-származék (**8a**) [353] és szubsztituált analógjai [D11,D12] röntgenkristallográfiai adatainak összehasonlítása az (*E*)-2-benzilidén-1-tetralon (**6a**) [D9,297,354] adataival a két sorozat enon-fragmensének hasonló térbeli szerkezetét igazolta. A **8a** és **9a** vegyületek NMR adatainak [D12] összehasonlítása az analóg **13** és **14** adataival [D8] a megfelelő fenil- (**8a,9a**) és ferrocenilszármazékok (**13,14**) aplanáris cinnamoil-fragmenst tartalmazó, hasonló konformációját mutatta.

A kapott citotoxicitási adatok értelmezése céljából, az 5.4.1. fejezetben bemutatott RF-VRK módszer alkalmazásával, elvégeztük az **5-9** és **10-14** vegyületek $\log P_{VRK}$ értékeinek meghatározását (25. táblázat). A vegyületek $\log P_{VRK}$ értékeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy a ferrocénszármazékok átlagosan 0,94 $\log P_{VRK}$ egységgel (0,81-1,09) magasabb $\log P_{VRK}$ értékkel rendelkeznek. Ez az érték hasonló a ferrocén ($\log P$ 3,28) és a benzol ($\log P$ 2,13) $\log P$ -értékei közötti különbséghez (1,15 $\log P$ egység) [355].

A **13** 4-kromanon-származék kedvező daganatsejt citotoxikus hatása alapján meghatároztuk a vegyület további humán daganatos sejtekkel (HeLa (humán méhnyak karcinóma), MCF-7 (humán emlő adenokarcinóma), A549 (humán alveoláris bazális hámsajt karcinóma) és MDA (humán emlő adenokarcinóma)) szemben mutatott IC_{50} értékeit is. A vizsgált vegyületek közül a **13** származék IC_{50} értéke minden sejt kultúrával szemben a 3,0-71 μM tartományba esett [D29]. Ezek az adatok nagyságrendileg megegyeznek a **8a-l** 3-(4'-X-benzilidén)-4-kromanon-származékok L1210, sejtekkel, illetve Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben meghatározott IC_{50} értékekkel (18. táblázat) [D11].

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a háromdimenziós alak, a konjugáció mértéke és a lipofilitás közötti különbségek nem gyakorolnak erős befolyást a vizsgált fenil-(**5-9**) és ferrocenil-kalkonok (**10-14**) daganatsejtekkel szemben meghatározott citotoxicitására. Figyelembe véve, hogy a ferrocénszármazékok tiol-vegyületekkel (GSH és NAC) szemben nem mutattak spontán reaktivitást [D25], a vizsgált vegyületek citotoxikus hatásai a ferrocenil molekulafragmens redox tulajdonságai és/vagy a molekulák nem-kovalens kölcsönhatásainak eredményeként értékelhetők [356].

5.5.5. Az (*E*)-2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberon (**7c**) *in vivo* kemopreventív hatásának vizsgálata

5.5.5.1. Génexpressziós vizsgálatok [D30]

Az (*E*)-2-(4'-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberon (**7c**) *in vitro* daganatellenes (citotoxikus és apoptózist indukáló) hatásai alapján, néhai Ember István professzor kutatócsoportjával végzett kooperációs munka keretében megvizsgáltuk a vegyület *in vivo* daganatellenes (kemopreventív) hatását.

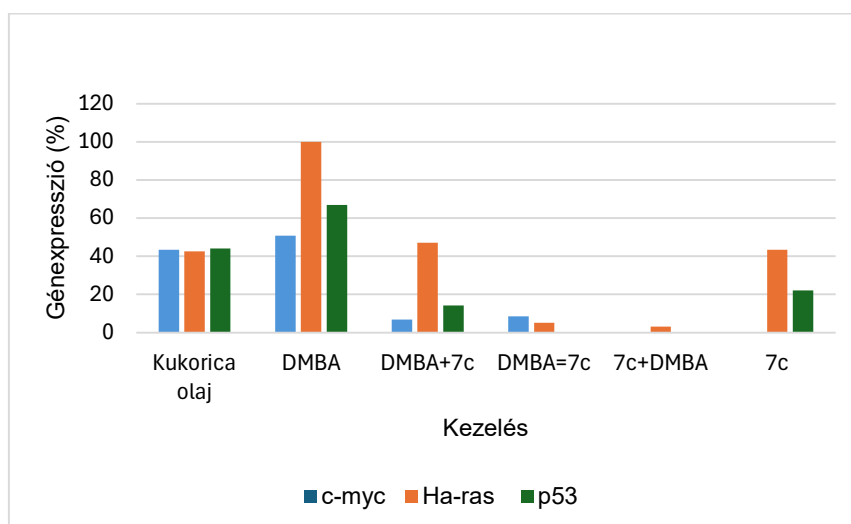
A vizsgálat alapját Ember és munkatársai korábban kimunkált vizsgálati protokollja képezte, mely szerint a korai, karcinogén hatásra létrejövő genetikai

változások (génamplifikáció, génexpresszió és mutáció) és a később kialakuló tumorok között összefüggések találhatók [357]. A vizsgálatok lényege olyan beltenyésztett kísérleti állatok alkalmazása, amelyek különösen érzékenyek kémiai karcinogén anyagokra és azokra egyes kulcs onko- (Ha-ras és c-myc), illetve szupresszor gének (p53) overexpressziójával válaszolnak. A válasz már igen korán, az expozíciót követően 24-72 órán belül jelentkezik [358-361].

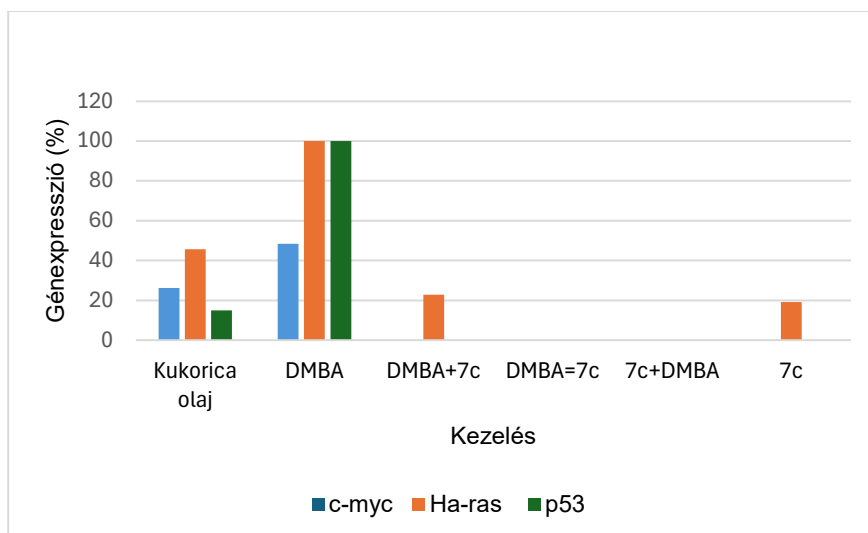
A Ha-ras a kémiai karcinogenezisben kulcsszerepet játszik a szignáltranszferben, a p53 az apoptózisban és a sejt DNS-ét érintő károsodások utáni helyreállításában, a c-myc pedig a proliferációhoz és immortalizációhoz elengedhetetlen. Ezekkel a génekkel három különböző ponton lehet monitorozni a karcinogenezis korai történéseit. Mind a három gén szintjén sikerült vizsgálni azokat a korai változásokat, amelyek az expozíciót és a biológiai hatást jelzik. A tesztrendszer alkalmasnak bizonyult mind karcinogének hatásainak molekuláris szinten történő vizsgálatára, mind kemopreventív szerek tesztelésére [357].

Kísérleteinkben a **7c** vegyületet a genotoxikus karcinogén 7,12-dimetilbenz[a]antracén (DMBA) expozíciót 24 órával megelőzően, az expozícióval együtt vagy az expozíciót követően 24 óra múlva alkalmaztuk. A második expozíció után 24 órával az állatokból eltávolítottuk a májat, a vesét, a tüdőt, majd ezekből (totál) RNS-t izoláltunk és a három kulcsgén expresszióját vizsgáltuk [D30].

Ahogy a 32-34. ábrákon látható, a DMBA szignifikánsan megnövelte a Ha-ras onkogén expresszióját a kezelt állatok májában (32. ábra), veséjében (33. ábra) és tüdejében (34. ábra), összehasonlítva a kontrol egerekben kapott értékekkel. A vesében a p53 gén jelentős overexpressziója és a c-myc gén expressziójának enyhe növekedése is kimutatható volt.

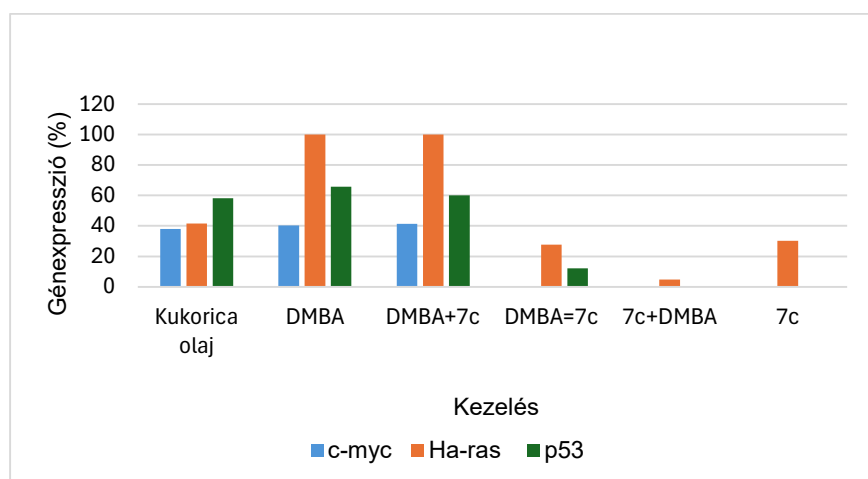


32. ábra. A c-myc, Ha-ras és p53 gének expressziós mintázata CBA/CA egér májban 24 órával a karcinogén (DMBA) kezelés után [D30]



33. ábra. A c-myc, Ha-ras és p53 gének expressziós mintázata CBA/CA egér vesében 24 órával a karcinogén (DMBA) kezelés után [D30]

Amint az ábrák mutatják, a **7c** vegyület adagolás időpontjától függően különbözőképpen befolyásolta a c-myc, a Ha-ras, és a p53 gének DMBA által indukált expresszióját. A vegyület legkifejezettebb szupresszor hatása a fenti három szervben DMBA-val egyidejűleg adva volt megfigyelhető (DMBA=7c).



34. ábra. A c-myc, Ha-ras és p53 gének expressziós mintázata CBA/CA egér tüdőben 24 órával a karcinogén (DMBA) kezelés után [D30]

A policiklusos aromás szénhidrogének, így a DMBA is, genotoxikus hatású karcinogének [362]. A genotoxikus hatás kialakulásának előfeltétele a vegyületek citokróm P-450 enzimek által katalizált metabolizmusa, melynek eredményeképpen az aromás szénhidrogének reaktív epoxid-származékokká alakulnak [363,364]. A **7c** DMBA-indukálta génexpressziókra gyakorolt fenti hatása alapján feltételeztük, hogy a hatás kialakulásában szerepet játszhat a vegyületnek a DMBA-t metabolizáló citokróm P-450 izoenzimre gyakorolt gátló hatása. Ezt a feltételezést a **7c** és néhány rokon szerkezetű analógja esetén igazoltuk [D31]. E kísérleti tapasztalataink alapján a **7c**, valamint szintetikus és

természetes analógjai a policiklusos aromás szénhidrogének okozta karcinogenezissel szemben alkalmazható kemopreventív szerek lehetnek.

5.5.5.2. Kalkonok (4) és karbociklusos kalkon-analógok (5-7) *in vitro* CYP1A gátló hatásának szerkezet-hatás vizsgálata [D31]

Az a kísérleti eredmény, hogy a **7c** vegyületnek a c-myc, a Ha-ras, és a p53 génnek expressziójára gyakorolt szupresszor hatása akkor a legkifejezettebb, ha DMBA-val egyidejűleg kerül alkalmazásra, arra utalt, hogy a **7c** gátolhatja a DMBA metabolikus aktiválását, ami a vegyület mutagén hatásának előfeltétele [363,364]. Ezt támasztották alá más publikációk [365,366], amelyek a **7c**-hez hasonló szerkezetű vegyületek citokróm P-450 gátló hatásáról számolnak be. Ennek a hipotézisnek az igazolása céljából megvizsgáltuk a **7c** és néhány hasonló szerkezetű nyíltláncú (**4**) és gyűrűs (**5-7**) analógjainak metilkolantrén-indukált CYP1A enzim gátlását, ami a patkány májban expresszáldó CYP enzimek között a legnagyobb katalitikus aktivitással bír a DMBA metabolizmusában [363].

Patkány máj mikroszóma alkalmazásával végzett *in vitro* kísérleteinket kiterjesztettük a **4c** és a **7c** vegyületek szerkezeti izomerjeinek (**4c'**, **4c''**, **7c'**, **7c''**), valamint a **7c** vegyület 4'-CH₃ (**7b**) és 4'-N(CH₃)₂ (**7d**) analógjainak vizsgálatára is. A vegyületek CYP1A gátló hatását metilkolantrénnel kezelt patkányból izolált máj mikroszóma frakció 7-etoxirezorufin O-deetilációjának aktivitása alapján határoztuk meg [D31]. Eredményeink alapján a **7c** vegyület erős CYP1A gátló származéknak bizonyult. Ugyanakkor, a rokon szerkezetű **4c**, **4c'**, **4c''**, **5c**, **6c**, **7c'** és **7c''** származékok hatékonyabb CYP1A gátló hatású vegyületnek bizonyultak, mint a referenciavegyületként alkalmazott 7,8-benzoflavon (α -naftoflavon) (26. táblázat).

26. táblázat. A 4-7 vegyületek CYP1A gátló hatásának K_i értékei [D31]

Vegyület	Gyűrű tagszám	Szubsztituens	K_i (μ M)
4c	0	4-OCH ₃	0,117
4c'	0	3-OCH ₃	0,109
4c''	0	2-OCH ₃	0,042
5c	5	4'-OCH ₃	0,143
6c	6	4'-OCH ₃	0,047
7b	7	4'-CH ₃	0,290
7c	7	4'-OCH ₃	0,670
7c'	7	3'-OCH ₃	0,227
7c''	7	2'-OCH ₃	0,031
7d	7	4'-N(CH ₃) ₂	0,253
7,8-benzoflavon			0,167

A **4c** kalkon és az **5c-7c** gyűrűs kalkon-analógok K_i értékeinek összehasonlítása alapján megállapíthattuk, hogy a vizsgált vegyületek mindegyike a CYP1A enzim erős gátlója. A 4'-OCH₃-szubsztituált sorozat leghatékonyabb tagja a hattagú gyűrűs kalkon-analóg **6c**, a leggyengébb gátló hatással bíró származék a héttagú gyűrűs **7c**. A **7c** (4'-OCH₃) vegyület, valamint a 4'-CH₃ (**7b**)

és a 4'-N(CH₃)₂ szubsztituált **7d** analógjai K_i értékeinek összehasonlítása alapján feltételezhető, hogy a gátló hatás kialakulásában a 4'-helyzetű szubsztituensek nemkötő elektronpárja nem bír meghatározó jelentőséggel, legalábbis a héttagú gyűrűs kalkon-analógok sorozatában.

Lewis és munkatársai összehasonlító vizsgálatai alapján a CYP1A szubsztrátok és inhibitorok legtöbbje planáris, két aromás gyűrűvel bíró vegyület [367]. A molekulák nagyfokú hasonlósága a CYP1A enzimek aktív centrumának specifikusságára utal [368,369]. A szubsztrátok és inhibitorok szerkezeti és sztereokémiai jellemzőinek elemzése hasznos módszernek bizonyult a xenobiotikumok membránhoz kötött P450 enzimekhez való maximális kötődési kapacitását meghatározó kritikus molekuláris jellemzők meghatározásában [370,371]. Annak elemzése céljából, hogy a **4-7** vegyületek hatékony CYP1A gátlók lehetnek-e a korábban felismert szubsztrát- és inhibitor tulajdonságok alapján, kiszámítottuk a vegyületek néhány fizikai-kémiai és kvantummechanikai jellemzőjét, amelyek befolyásolják a CYP1A gátló hatást [371-373]. A számított jellemzőket - így a vegyületek legmagasabb energiájú betöltött molekulapályájának (E_{HOMO}) és a legalacsonyabb energiájú üres molekulapályájának (E_{LUMO}) energiakülönbségét (ΔE), valamint a molekula-térfogatot, a molekula-felületet, a molekula polarizálhatóságát és a dipólusmomentumát - a 27. táblázat foglalja össze.

27. táblázat. A **4-7** vegyületek néhány kvantummechanikai és fizikai-kémiai jellemzője [D31]

Ve- gyület	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	$\Delta(E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}})$	Felület (Å ²)	Térfogat (Å ³)	Polarizál- hatóság	Dipólus momentum (D)
4c	-8,966	-0,796	8,170	470,48	761,42	27,96	3,76
4c'	-9,239	-0,846	8,393	468,58	761,31	27,96	3,67
4c'''	-9,025	-0,739	8,286	472,80	759,53	27,96	3,16
5c	-8,954	-0,721	8,233	475,46	770,85	29,03	2,75
6c	-8,912	-0,611	8,301	502,45	810,26	30,86	2,92
7b	-8,813	-0,455	8,358	513,41	854,08	32,70	2,16
7c	-9,068	-0,293	8,775	515,31	853,66	32,70	1,93
7c'	-9,086	-0,189	8,897	510,16	852,63	32,70	3,97
7c'''	-9,019	-0,496	8,523	497,19	828,86	32,06	2,91
7d	-9,204	0-316	8,888	546,74	918,81	35,25	2,04
7,8-benzo- flavon	-8,884	-0,907	7,977	470,13	783,80	32,63	3,92

A kvantumkémiai módszerrel számított HOMO és LUMO pályák energiáinak különbségei alacsonyak, ami gyakori kvantumkémiai jellemzője a CYP1A1 enzim szubsztrátjainak [367]. A számított értékek azonban nem indokolják a **4c'**, **6c** és **7c'** származékok kiemelkedő gátló hatását. Hasonló következtetés vonható le vizsgált vegyületek számított felület, molekula-térfogat, polarizálhatóság és dipólusmomentum értékeinek összehasonlításából (27. táblázat). A vizsgált 4'-

szubsztituált vegyületek $\log P_{VRK}$ értékei a 3,67(**4c**)-5,26(**7d**) tartományba esnek (12. táblázat), amelyek összehasonlíthatóak a CYP1A1 gátló hatású vegyületek átlagos $\log P$ értékével (4,51), ugyanakkor, nagyban különböznek a CYP1A2 szubsztrátok $\log P$ átlagától (1,57) [372].

Összefoglalva, eredményeink szerint a vizsgált kalkonok és gyűrűs kalkon-analógok a CYP1A enzimek hatékony gátlóinak bizonyultak. Ismert, hogy a CYP1A enzimek gátlása ígéretes kemoprevenációs stratégiának tekinthető, ami csökkentheti a gyógyszerek/testidegen anyagok okozta májkárosodást és a daganatellenes szerekekkel szemben kialakuló gyógyszerrezisztenciát [374]. Ezek alapján további származékok CYP1A gátló (és potenciális induktor) hatásának vizsgálata ígéretes területe lehet a kemopreventív szerekek kutatásának.

5.6. Kalkonok és karbociklusos kalkon-analógok tiol-reaktivitásának vizsgálata

A kalkonok sokrétű biológiai hatásainak egy része a vegyületek proteintiolokkal bekövetkező kölcsönhatásával értelmezhető (2.4.2.). Az enon-molekularész legjellegzetesebb – a vegyületek biológiai hatása szempontjából is meghatározó jelentőséggel bíró – reakciója a nukleofil tiolok addíciója a poláris szén-szén kettős kötésre (tia-Michael reakció). A szervezetben számos reaktív tiolcsoporttal bíró fehérje meghatározó szerepet játszik a sejtek osztódásában, citoprotektív folyamatok szabályozásában, a redox homeosztázis fenntartásában. Ugyanakkor, a citoplazmában mM koncentrációban jelen lévő redukált glutation (GSH) a testidegen vegyületek metabolikus transzformációjában is jelentőséggel bír [D4].

5.6.1. *In vitro* sejtkultúrában végzett vizsgálatok [D32]

A **7b** és **7c** vegyületek sejtosztódásra gyakorolt hatásának vizsgálata folytatásaként, megvizsgáltuk, hogy a vegyületek megváltoztatják-e a Jurkat T-sejtek celluláris tiol-státuszát. Vizsgálataink kezdetén a vegyületek celluláris tiol(SH)-szintre gyakorolt hatását vizsgáltuk, tápanyagmentes és tápanyagokat tartalmazó környezetben. A **7b** (23,3 μ M), illetve **7c** (5,6 μ M) vegyületekkel kezelt Jurkat T-sejteket egyrészt tápanyagmentes pufferben 1 órán át, másrészt RPMI 1640-tápoldatban (10% FCS) 4 és 8 órán át inkubáltuk, majd azt követően a sejtek teljes SH-mennyiségét Ellmann-reagenssel [375] meghatároztuk. A sejtek fehérjetartalmára vonatkoztatott celluláris tiol-tartalmat a 28. táblázat foglalja össze.

A **7c** vegyülettel történő 1 órás, tápanyagokat nem tartalmazó PBS-pufferben történt kezelés alatt a celluláris SH-szint szignifikánsan csökkent az 1% DMSO-val kezelt kontroll sejtekhez képest. A **7b** vegyület nem okozott ilyen jellegű változást. A hosszabb ideig (4, illetve 8 óra) tartó, RPMI-tápoldatban történő inkubáció már lehetőséget teremt a sejteknek, hogy reagáljanak a GSH-szintet érintő esetleges változtatásokra [376]. A metoxi-szubsztituált vegyület (**7c**) ezen

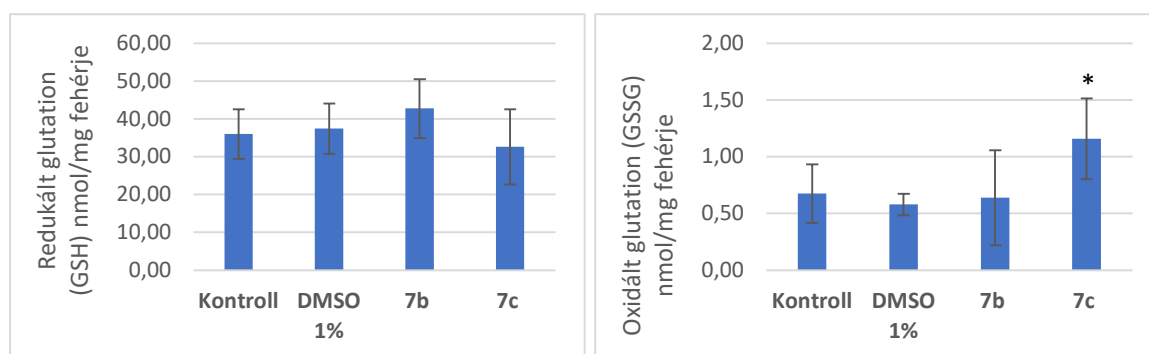
körülmények között is szignifikánsan csökkentette az SH-szintet, ugyanakkor a **7b** vegyület nem okozott szignifikáns változást (28. táblázat).

28. táblázat. Celluláris tiol-szintek a **7b** és **7c** vegyületekkel különbözőképpen kezelt Jurkat T-sejtekben [D32]

	Teljes celluláris tiol(SH) mennyiség* (nmol/mg fehérje)		
	1 óra (PBS)	4 óra (RPMI)	8 óra (RPMI)
Kontroll (DMSO 1%)	33,08 ± 0,35	124,42 ± 3,21	122,01 ± 3,89
7b (23,3 µM)	31,84 ± 0,63	129,19 ± 1,52	114,08 ± 1,07
7c (5,6 µM)	24,01 ± 0,53**	107,92 ± 2,30**	108,03 ± 2,05**

* Az eredmények három párhuzamos mérésből képzett átlag ± szórás formában vannak feltüntetve. Az 1% DMSO-val kezelt kontroll sejtekhez képest szignifikáns különbség (Student-t teszt, $p < 0,05$) **-gal jelölve.

A két vegyület tiol-reaktivitásának vizsgálatát tovább folytatva, a Jurkat sejtek kezelését követően HPLC-UV-Vis/FL módszerrel vizsgáltuk a redukált (GSH) és az oxidált glutation-szintet (GSSG). A GSH oxidációjának megelőzése érdekében mintaelőkészítés során a sejtek roncsolását három, egymást követő „freeze-thaw” ciklus révén valósítottuk meg [377]. A meghatározott redukált és oxidált glutation-szinteket a minták fehérjemennyiségére vonatkoztattuk. Az eredmények (nmol GSH/mg fehérje) a 35. ábrán láthatók.



35. ábra A **7b** és **7c** kalkonszármazékok Jurkat T-sejtek GSH- és GSSG-szintjére gyakorolt hatása 4 órás kezelést követően. A kezeletlen kontroll sejtekhez képest szignifikáns különbség (Student-t teszt, $p < 0,05$) *-gal jelölve [D32]

A kísérleti eredmények alapján a metoxi- (**7c**), és a metil-szubsztituált (**7b**) kalkonszármazék 4 órás kezelést követően eltérő módon befolyásolta a Jurkat T-sejtek glutation-szintjét. A **7b** származék a redukált glutation mennyiségét kis mértékben megnövelte, de nem befolyásolta jelentősen a GSSG szintet a kezeletlen kontroll, illetve 1% DMSO-val inkubált sejtekhez viszonyítva (35. ábra). Korábban is beszámoltak már arról, hogy néhány elektrofil tulajdonsággal rendelkező Mannich-bázis megnövelte a celluláris tiol-szintet Jurkat T-sejtekben [376], illetve HeLa sejtvonalakban [378]. A megnövekedett glutation (és össz-tiol) szint nagy valószínűséggel a GSH-szintet befolyásoló tényezők hatására fellépő *feedback* mechanizmus következtében, *de novo* GSH-szintézis eredményének tekinthető [376].

A **7c** vegyület nem befolyásolta jelentősen a redukált glutation-szintet (GSH), de szignifikáns mértékben megnövelte az oxidált glutation (GSSG) mennyiségét. Ez utóbbi arra utal, hogy a vegyület oxidatív stresszt idéz elő a sejtekben. A GSSG-szint a ROS elleni intracelluláris védekező mechanizmus aktivitásának fiziológiás indikátora, így alkalmas az oxidatív stressz *in vivo* monitorozására is [379]. A GSSG-szint emelkedésével párhuzamosan a GSH-szint szignifikáns csökkenése nem volt megfigyelhető. Ennek hátterében, a megnövekedett glutation-reduktáz és/vagy γ -glutamil-cisztein-szintetáz (γ -GCS) aktivitás állhat [380].

Párhuzamosan folyó vizsgálataink során HPLC-MS módszerrel igazoltuk, hogy sejtmentes (pH 8,0; GSH:kalkon molarány=10:1) körülmények között mind a **7b**, mind a **7c** gyűrűs kalkon-analóg Michael-addíciós reakcióban reagál redukált glutationnal [D33]. HPLC-MS módszer alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy a két kalkon és GSH-konjugátumai kimutathatók-e a 4 órás inkubátumok felülúszójából és sejtes üledékének lizátumából. Vizsgálataink szerint minden mintában csak a kiindulási **7b** és **7c** vegyületek voltak kimutathatók [D32].

Későbbi eredményeink és irodalmi adatok ismeretében ez a tapasztalat egyrészt a két vegyület alacsony tiol-reaktivitásával [D34], másrészt a glutation-S-transzferáz (GST) enzim esetleges gátlásával magyarázható. Az irodalomban több esetben is beszámoltak róla, hogy α,β -telítetlen karbonilvegyületek, köztük kalkonok is, gátolják a GST enzim aktivitását [381-383]. A GST enzim gátlása Jurkat T-sejtekben sejtciklus gátlást és apoptózist indukál [384]. A glutation-S-transzferáz enzim az egyik legfontosabb képviselője a detoxikációs folyamatokban kulcsfontosságú szerepet játszó Fázis II enzimeknek, ugyanakkor számos humán daganatos sejtben túlexpresszálódik, és hozzájárul a tumorsejtek kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciájának a kialakulásához [385]. Az enzim gátlása révén a gyógyszer-rezisztens tumorok újra érzékenyvé tehetők a terápia iránt [381]. A vizsgált kalkonszármazékok GST enzimaktivásra gyakorolt hatása még további vizsgálatokat igényel.

5.6.2. Sejtmentes körülmények között végzett vizsgálatok

Munkánk során részletesebben kalkonok (**4**) és gyűrűs kalkon-analógok (**6**, **7**) tiolokkal (redukált glutationnal (GSH) és *N*-acetilciszteinnel (NAC), mint modell tiolokkal) lejátszódó nem-enzimkatalizált reakcióit vizsgáltuk. A vizsgált vegyületek kiválasztása *in vitro* daganatsejt citotoxicitás vizsgálati eredményeik alapján (16. és 17. táblázatok) történt. A kiválasztott vegyületek közé a leghatékonyabb és egy kevésbé hatékony származék került. Így az eredmények tájékoztató információt adtak a tiol-reaktivitás jelentőségéről a vegyületek citotoxikus hatásaiban. A reakciók HPLC-UV-Vis módszerrel történő nyomon követésével az addíciós reakciók sztereokémiájáról is információt nyertünk.

A vegyületek glutationnal és *N*-acetilciszteinnel lejátszódó reakcióit három különböző savasságú (pH 8,0, pH 6,3 és pH 3,2) oldatban vizsgáltuk. A bázikus

pH-t azért választottuk, mert ez a körülmény modellezi a GST által katalizált reakciók körülményeit; a GSH tiol funkcióscsoportjának ionizációja fokozódik az enzim aktív helyén található imidazol N-atommal való kölcsönhatása miatt [227,228,386,387]. Az enyhén savas pH (pH 6,3) a rákos sejtek enyhén savas pH-ját modellezi [388]. Az erősebben savas körülményeket (pH 3,2) azért választottuk, hogy összehasonlítsuk a két vegyület neutrális és ionizált tiol funkciójának a reaktivitását. Figyelembe véve a GSH és a NAC tiolcsoportjának pK_a értékeit (8,83 és 9,52) [389], ez utóbbi esetben mindkét vegyület tiol funkciója kizárólag semleges formában található. Bár a neutrális tiolok nukleofil reagensként működhetnek, reakcióképességük sokkal alacsonyabb, mint a megfelelő deprotonált (negatív töltésű) tiolátoké [390].

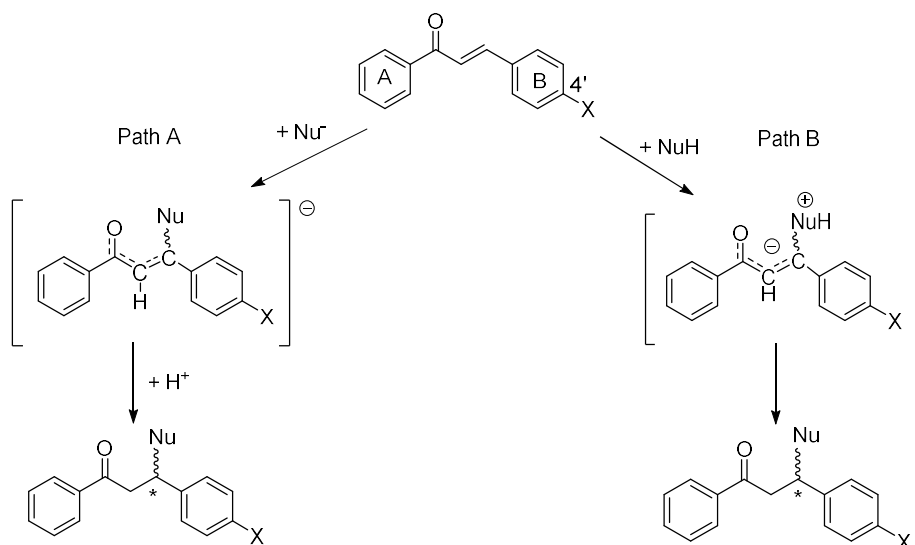
5.6.2.1. Kalkonok

5.6.2.1.1. 4'-szubsztituált kalkonok [D33]

A 4'-szubsztituált kalkonok közül a 4'-CH₃ (**4b**) és a 4'-OCH₃ (**4c**) származékok reaktivitását vizsgáltuk két celluláris tiollal (GSH és NAC) szemben [D33]. A két származék közül a 4'-metilszármazék (**4b**) bizonyult *in vitro* hatékonyabbnak a legtöbb vizsgált daganatos sejtvonallal szemben [S25].

A Michael-reakció egy nukleofil centrum (Michael-donor) jellemzően bázis-katalizált addícióját jelenti egy aktivált szén-szén kettős kötésre (Michael-akceptor). A reakciók a nukleofil reagensok töltése alapján csoportosíthatók, amelyek lehetnek (a) negatív töltésűek (pl. OH⁻, RS⁻, CN⁻) vagy (b) semlegesek (pl. aminok, tiolok). A deprotonált (A útvonal) és a semleges (B útvonal) nukleofilek kalkonokkal lejátszódó addíciós reakcióinak általános mechanizmusait a 36. ábra mutatja be. Amint az ábrán látható, az addíciós reakciók elsődleges terméke egy negatív töltésű (A útvonal), vagy ikerionos szerkezetű (B útvonal) addukt. A második lépés egy sav-bázis reakció, ami intermolekuláris (A útvonal) vagy – ikerionos intermedierek esetében (B útvonal) – akár intramolekuláris módon is lejátszódhat [391].

Vizsgálataink kezdetén a **4b** és **4c** reakcióit bázikus körülmények (pH 8,0) között, 10:1 GSH:kalkon molarányt használva vizsgáltuk. Az addíciós folyamatok előrehaladásának kvalitatív jellemzése érdekében az inkubátumok összetételét a 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 225, 255, 285 és 315 perces időpontokban HPLC-UV módszerrel elemeztük. A vizsgálatok során a detektálást a kalkonok ún. Band II elnyelési sávjának megfelelő hullámhosszon (260 nm) végeztük. Így egyidejűleg detektálhatók voltak mind a kiindulási kalkonok mind az addíciós termékek. Az eredmények értékelése során a kalkonok reaktivitását az egyensúlyi elegyek összetétele, valamint az egyensúlyi elegyek kialakulásához szükséges idő nagysága szempontjaiból jellemeztük.



36. ábra. A deprotonált (Nu^-) és a semleges (NuH) nukleofil reagensek kalkonokkal lejátszódó Michael-típusú addícióinak egyszerűsített mechanizmusai [D33]

A GSH (8,83) és a NAC (9,52) pK_a értékeit [389] figyelembe véve, pH 8,0 körülmények között a GSH molekulák 12,8%-a és a NAC molekulák 2,9%-a található a reaktívabb tiolát formában. A vizsgált időszak végére (315 perc) a **4b** és **4c** kiindulási vegyületeknek megfelelő HPLC csúcs területe a GSH-inkubátumokban a kezdeti érték 3,7%-ára, illetve 7,9%-ára csökkent (29. táblázat) A NAC-inkubátumokban, a megfelelő értékek 5,2% és 9,8% voltak (30. táblázat).

29. táblázat. A **4b** és **4c** GSH-inkubátumaiban azonosított HPLC-UV csúcsainak retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterületei (A)² [D33]

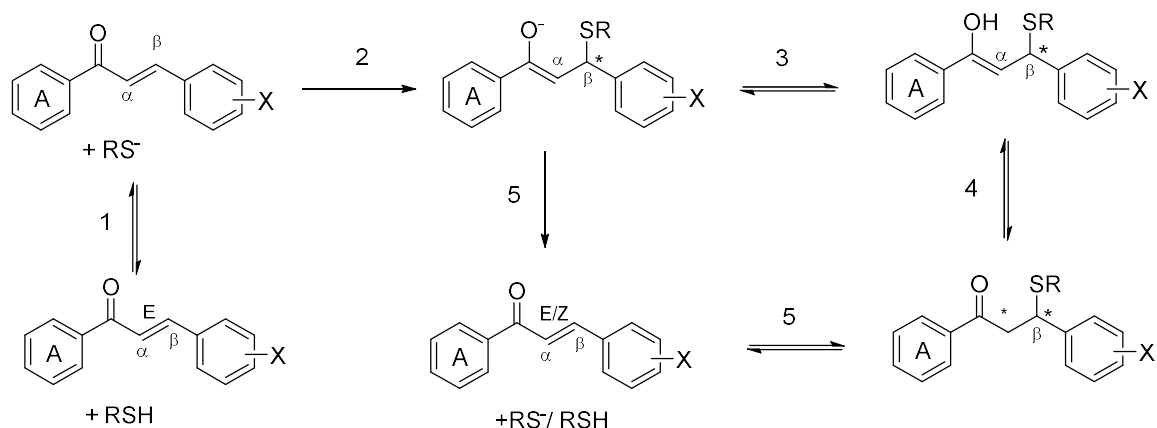
Kalkon	pH ³	t_R (E)-izomer	A_{315}/A_0 ⁴	t_R (Z)-izomer	A (Z)-izomer	t_R GSH-1	A GSH-1	t_R GSH-2	A GSH-2
4b	3,2	16,4	0,81	16,2	<100	13,8	4245	N/D ⁵	-
4c	3,2	15,9	0,96	15,7	<100	11,9	3352	N/D ⁵	-
4b	6,3	16,3	0,09	16,0	<100	13,2	16571	N/D ⁵	-
4c	6,3	15,8	0,21	15,5	<100	11,3	17160	N/D ⁵	-
4b	8,0	16,3	0,04	16,1	<100	13,3	17419	N/D ⁵	-
4c	8,0	15,7	0,08	15,5	<100	11,0	20387	N/D ⁵	-

¹Retenciós idő (perc). ²Az adatok két független kísérlet átlagai az inkubálás 315. percében.

³A vizes GSH oldat pH értéke. ⁴A 315. és a 0. percben mért területek hányadosa. ⁵Nem detektálható.

A fenti adatokon túlmenően megemlítenéd, hogy a GSH-val és NAC-val történő inkubálások során egy kisebb új csúcs jelent meg a kromatogramokon, valamivel rövidebb retenciós idővel, mind az el nem reagáló **4b** és **4c** csúcsai. Korábbi eredményeink [D16,D17] alapján feltételeztük, hogy az új csúcsok a vegyületek (Z) izomerjeinek a csúcsai. A várt (Z) diasztereomerek szerkezetének azonosításához, a korábbi vizsgálatainkban leírt módon, elvégeztük a **4b** és **4c** vegyületek fény-inicializált izomerizációját. A fény-inicializált izomerizációs kísérlet

eredménye alapján a képződött vegyületeket a megfelelő (Z) izomereként azonosítottuk. Mivel az izomerek képződése a tiolok nélkül végzett inkubációkban nem volt megfigyelhető, a (Z) izomer képződését a retro-Michael reakciónak tulajdonítottuk (37. ábra).



37. ábra. A bázis-katalizált reverzibilis tia-Michael addíciós reakciók egyszerűsített folyamata. (1: Tiol-deprotonálódás/protonálódás; 2: Tiolát-addíció; 3: Enolát-protonálódás/deprotonálódás; 4: Enol/Keto tautomerizáció. 5: Tiolát/Tiol elimináció.

30. táblázat. A **4b** és **4c** gyűrűs kalkon-analógok NAC-inkubátumaiban azonosított HPLC-UV csúcsainak retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterületei (A)² [D33]

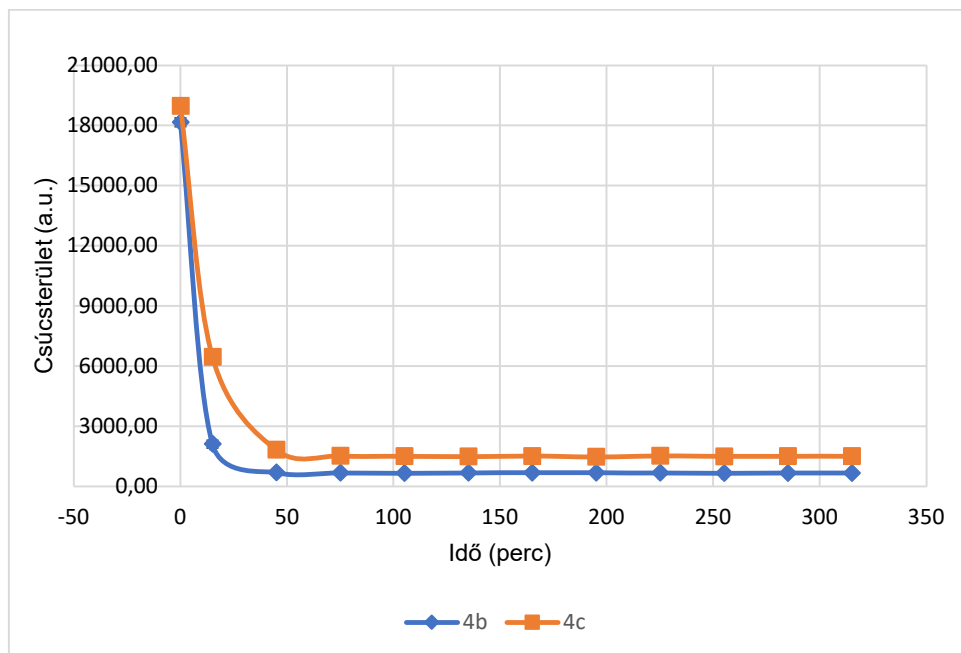
Kalkon	pH ³	t_R (E)-izomer	A_{315}/A_0 ⁴	t_R (Z)-izomer	A (Z)-izomer	t_R NAC-1	A NAC-1	t_R NAC-2	A NAC-2
4b	3,2	16,3	0,89	16,1	<100	15,2	1260	15,3	2173
4c	3,2	15,8	0,98	15,5	<100	14,1	1156	14,2	1507
4b	6,3	16,3	0,24	16,0	<100	15,1	4906	15,2	6457
4c	6,3	15,8	0,47	15,5	<100	14,1	4712	14,2	5422
4b	8,0	16,2	0,05	16,0	<100	15,1	6167	15,2	8875
4c	8,0	15,7	0,10	15,5	<100	14,1	7167	14,2	8975

¹Retenciós idő (perc); ²Az adatok két független kísérlet átlagai az inkubálás 315. percében.

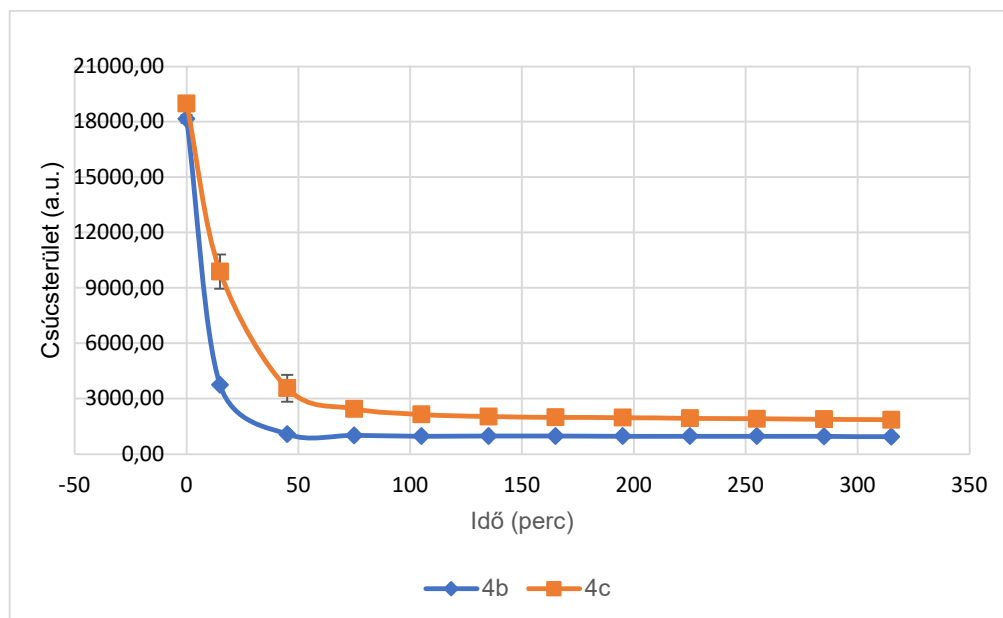
³A vizes NAC oldat pH értéke. ⁴A 315. és a 0. percben mért területek hányadosa. ⁵Nem detektálható.

A **4b** és **4c** kalkonok és a két enantiomer-tiszta tiol addíciós reakcióiban két diasztereomer addukt képződése várható (37. ábra). A GSH-inkubátumok HPLC-kromatogramjain azonban csak egy aszimmetrikus addukt-csúcs volt látható (29. táblázat). Feltételezhetően a két addukt az analízis körülményei között nem vált szét. Ugyanakkor, a NAC-inkubátumokban két, részlegesen szeparálódó addukt-csúcs volt megfigyelhető. Bár az inkubátumokban kis mennyiségben a kiindulási **4b** és **4c** (Z)-izomerjei is kimutathatók voltak, azok mennyisége a reakciók előrehaladásával nem változott. Így feltételezhető, hogy a tapasztalt diasztereoselektivitás ($A_{(NAC-2)}/A_{(NAC-1)}$) az elsődleges addíciós folyamat eredménye (30. táblázat).

A kiindulási kalkonok (**4b** és **4c**) kromatográfiás csúcsterületeinek a reakciók előrehaladásának függvényében tapasztalt változásai azt mutatták, hogy a 315 perces összetételek mindkét esetben egyensúlyi állapotot tükröznek (38. és 39. ábra).



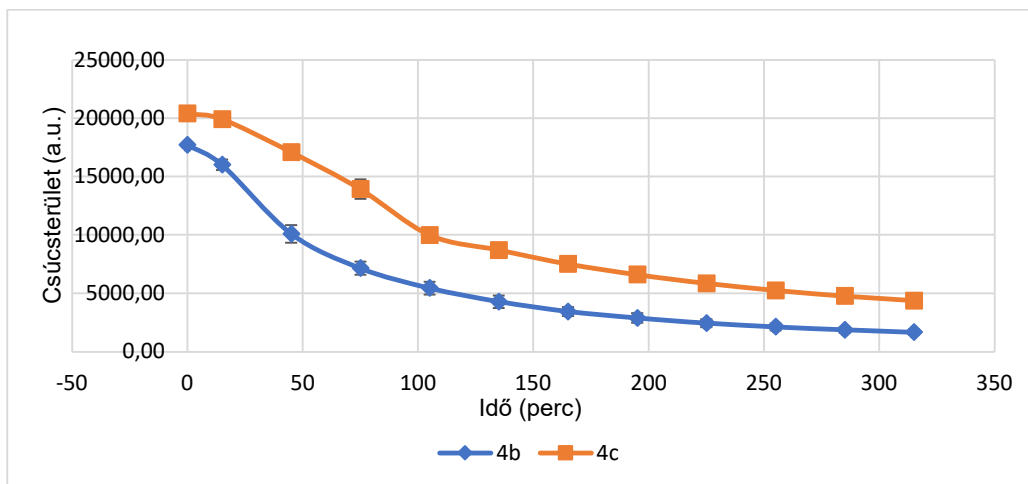
38. ábra. A **4b** és **4c** kalkon HPLC-UV csúcsterületének változása a kalkon-GSH (pH 8,0) inkubátumokban az idő függvényében [D33]



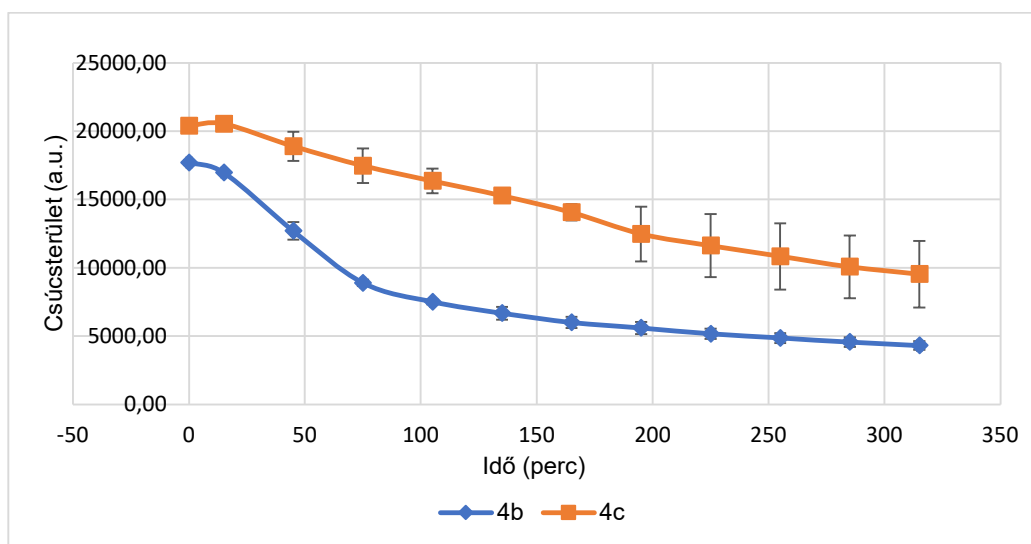
39. ábra. A **4b** és **4c** kalkon HPLC-UV csúcsterületének változása a kalkon-NAC (pH 8,0) inkubátumokban az idő függvényében [D33]

Amikor a vizsgálatokat enyhén savas közegben (pH 6,3) végeztük, mindkét tiol esetén a kezdeti reakciósebességek (0-15 perc között) csökkentek és a reakciók a vizsgálat ideje alatt nem érték el az egyensúlyi állapotot (40. és 41. ábra). Amint az ábrák mutatják, a metil-szubsztituált **4b** **4c**-hez viszonyított kezdeti

sebessége ebben az esetben kifejezettebben magasabb, mint az az enyhén lúgos (pH 8,0) körülmények között megfigyelhető volt (38. és 39. ábra). A vizsgált időszak végére (315 perc) a **4b** és **4c** kiindulási vegyületeknek megfelelő HPLC csúcs területe a GSH-inkubátumokban a kezdeti érték 9,4%-ára, illetve 21,7%-ára csökkent (29. táblázat). A NAC-inkubátumokban, a megfelelő értékek 24,4% és 46,7% voltak (30. táblázat). Az erősen savas (pH 3,2) körülmények között (a) a kezdeti sebességek (és a reakció előrehaladásának mértéke) tovább csökkentek és (b) a **4b** és **4c** származékok reaktivitásának különbsége tovább nőtt (29. és 30. táblázat).



40. ábra. A **4b** és **4c** kalcin HPLC-UV csúcssterületének változása a kalcin-GSH (pH 6,3) inkubátumokban az idő függvényében [D33]



41. ábra. A **4b** és **4c** kalcin HPLC-UV csúcssterületének változása a kalcin-NAC (pH 6,3) inkubátumokban az idő függvényében [D33]

A 4'-helyzetű szubsztituensek hatásának elemzése a bázikus (pH 8,0) (37. és 38. ábra) és az enyhén savas (pH 6,3) körülmények (40. és 41. ábra) között azt mutatta, hogy a 4'-metil-szubsztituált **4b** nagyobb kezdeti reaktivitást mutat és a vizsgálat végén (315. perc) a termékképződés konverziója is magasabb (31. táblázat).

31. táblázat. A kiindulási kalcion HPLC-UV csúcsterületek százalékos csökkenése a **4b** és **4c** kalcionok 315 perces GSH és NAC inkubációs keverékeiben [D33]

Vegyület	pH	Reaktáns	A kiindulási csúcsterület csökkenésének mértéke (%)	Reaktáns	A kiindulási csúcsterület csökkenésének mértéke (%)
4b	8,0	GSH	96,3	NAC	94,8
4c	8,0	GSH	92,1	NAC	90,2
4b	6,3	GSH	90,6	NAC	75,6
4c	6,3	GSH	78,3	NAC	53,3
4b	3,2	GSH	19,3	NAC	10,9
4c	3,2	GSH	4,2	NAC	1,5

A ^{13}C NMR eltolódások, amelyek a **4b** (144,9 ppm) és a **4c** (144,6 ppm) β -szénatomja körüli elektronsűrűség indikátorai [139-143], hasonlóan bizonyultak. Így a **4b** és **4c** kalcionok reaktivitásában megfigyelt különbség a tiol-adduktok stabilitásával magyarázható. Humphlett és munkatársai korai munkájukban kimutatták, hogy az addukt α -hidrogénatomjának reaktivitása, az eliminációval képződő enon rezonancia stabilizációja és a tiolátion stabilitása a retro-addíciós folyamat meghatározó tényezői. A szerzők az α -keto- és β -fenil-szubsztitúciókat találták meghatározó szerkezeti tényezőknél a hatékony fordított reakciókban [392]. Mivel a 4'-metoxi-szubsztitúció hatékonyabban növelheti az elektronsűrűséget a szén-szén kettős kötésen és a képződött kalcion rezonancia stabilizációját is jobban növeli, az eliminációs folyamat a **4c** esetében hatékonyabb, mint a **4b** esetében. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy a 4'-metoxiszármazékok nemcsak a **4c**, de a később tárgyalt **6c** és **7c** származékok esetén is kisebb reaktivitást mutattak.

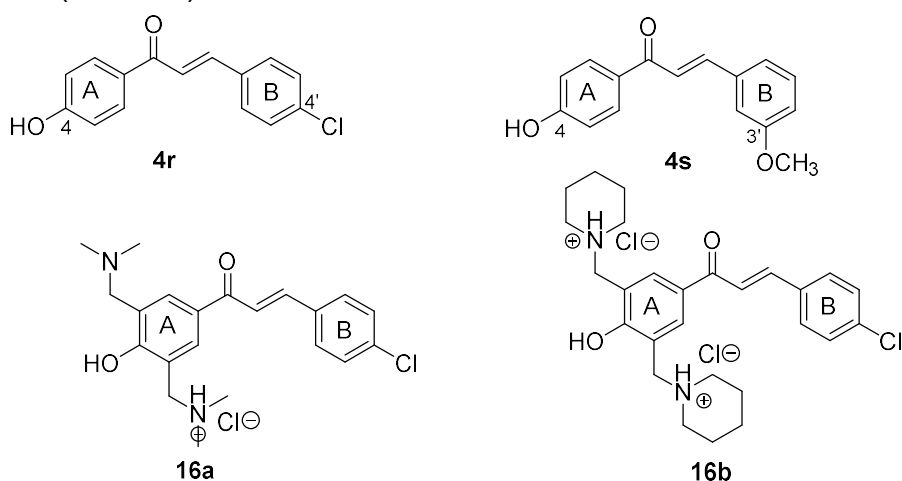
Az NAC-inkubátumok HPLC elemzése mindkét vegyület esetén minden vizsgált pH-n és időpontban a kevésbé poláros (NAC-2) addukt ($A_{(\text{NAC-2})}/A_{(\text{NAC-1})} = 1,15-1,44$ -szerez) feleslegét mutatta (30. táblázat). A **4b** származék pH 3,2 körülmények között megfigyelhető megnövekedett sztereoselektivitása ($A_{(\text{NAC2})}/A_{(\text{NAC1})} = 1,72$) alapján feltételezhető, hogy a reakció első lépésében keletkező addukt – a 4-OH-kalcion *bisz*-Mannich-származékainak hasonló reakciói során megfogalmazott feltételezéssel [D34] összhangban - egy intramolekuláris hidrogénhíd kapcsolat alapján stabilizálódik és a kialakuló hattagú gyűrűs intermedier kedvezményezett konformációja meghatározó jelentőséggel bír a termék sztereokémiáját illetően (49. ábra). Az adduktok sztereokémiájának pontos ismerete hiányában ez a feltételezés azonban további kísérletes bizonyításra szorul.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a legtöbb vizsgált daganatos sejtvonalal szemben toxikusabbnak mutatózó **4b** származék spontán tiol-reaktivitása nagyobb, mint a 4'-metoxi-szubsztituált **4c** származéké. Ugyanakkor megemlítendő, hogy Katsori és Hadjipavlou-Litina QSAR számításai során azt találták, hogy a kalcionok daganatsejtekkel szemben megfigyelt citotoxikus

hatásában a legtöbb modell alapján a $\log P$ paraméter játszik fontos szerepet. Továbbá, a hidrofóbicitás mellett jelentős hatással bír a vegyületek moláris térfogata (MW), valamint a szubsztituensek moláris refraktivitása (MR). Ugyanakkor, az elektronikus hatásoknak kisebb jelentőséget tulajdonítottak [393,394]. A **4b** vegyület kísérleti $\log P_{VRK}$ értékét 4,12-nek a **4c** vegyületét 3,67-nek találtuk [D22]. Így vizsgálataink alapján feltételezhetjük, hogy mind a lipofilitás, mind a tiol-reaktivitás hozzájárulhat a két nyíltláncú kalkon biológiai hatásaihoz.

5.6.2.1.2. 4-Hidroxikalkonok és bisz-Mannich-származékaik [D34,D35]

Számos irodalmi példa mutatja, hogy a fenolos kalkonokból szintetizált Mannich-bázisok figyelemre méltó citotoxikus hatékonysággal rendelkeznek a daganatos sejtvonalakkal szemben [395-400]. Korábbi vizsgálatok alapján a **4r** 4-hidroxikalkon hatékony gátlója az MDA-MB-231 (humán ösztrogén receptor negatív emlő adenokarcinóma) sejtek (IC_{50} 3,8 μM) osztódásának [401]. Továbbá, a **4s** viszonylag hatékony gátlója a PC-3 (humán prosztata karcinóma) sejteknek (IC_{50} 17,9 μM) [397]. Annak vizsgálata érdekében, hogy a 4-hidroxikalkonok Mannich-típusú szerkezeti módosítása hogyan befolyásolja a vegyületek tiol-reaktivását, és az kapcsolatba hozható-e a vegyületek ismert citotoxikus hatásaival, összehasonlítottuk a **4r**, **4s** 4-hidroxikalkonok és a **16a** és **16b** 4-hidroxikalkon bisz-Mannich-származékok glutationnal (GSH) szemben mutatott reaktivitását (42. ábra).

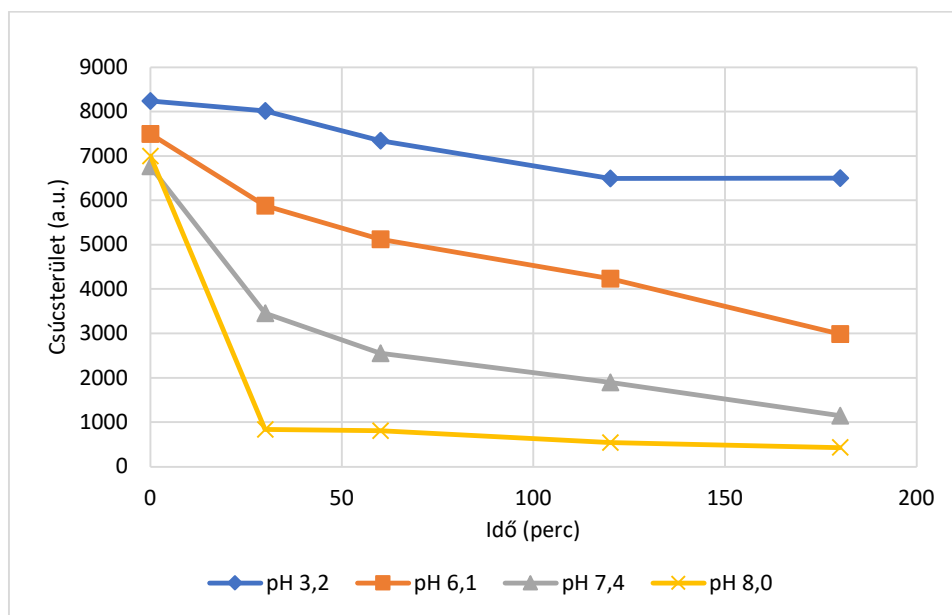


42. ábra. A **4r**, **4s** és a **16a** és **16b** vegyületek szerkezete

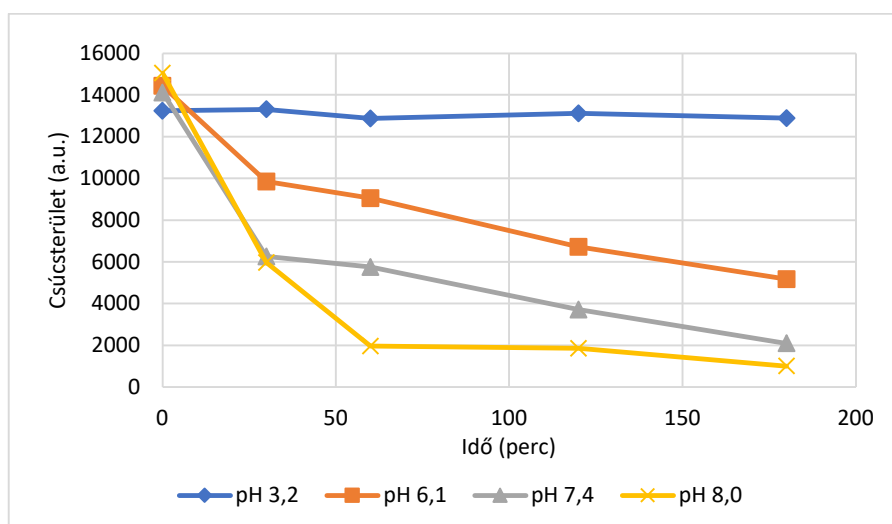
Vizsgálataink során a vegyületek tiol-reaktivitásának vizsgálatát 3:1 GSH:kalkon molarányt használva, négy különböző savasságú (pH 3,2, pH 6,1, pH 7,4 és pH 8,0) oldatban végeztük. A reakciópartnerek elegyét 37 °C-on inkubáltuk és az elegyek összetételét 0, 30, 60, 120, 180 perc inkubálást követően HPLC-UV-Vis módszerrel analizáltuk. A **4r** és **4s** vegyületek reakciót – a **4b** és **4c** kalkonokhoz hasonlóan – 75 %(v/v) metanol tartalmú elegyben, a vízdékony **16a** és **16b** vegyületek reakcióit foszfát pufferben végeztük [D34].

A **4r** és a **4s** kalkonok különböző pH-n kapott HPLC csúcsterület-idő görbéit a 43. és 44. ábra mutatja be. Mind a négy származékkal végzett kísérleteink során

azt tapasztaltuk, hogy a reakciók kezdeti sebessége (0-30 perc) a pH növekedésével párhuzamosan nőtt. A 3'-metoxicsoporttal szubsztituált **4s** származék reaktivitása minden esetben elmaradt a 4'-klórszubsztituált **4r** vegyületétől. A tapasztalt különbséget a 4'-Cl szubsztituens **4r** reaktivására gyakorolt hatásával értelmezhetjük. (A 3'-metoxi-szubsztituens pozitív rezonancia hatása *orto*- és *para*-helyzetben a 4'-Cl szubsztituens negatív induktív – átmeneti termék stabilizáló hatása – *para*-helyzetben érvényesül.) A vizsgálati időszak végén (180 perc) az inkubátumok nem érték el az egyensúlyi összetételt (43. és 44. ábra).



43. ábra. A **4r** kalcin HPLC-UV csúcsterületének változása a különböző savasságú kalcin-GSH inkubátumokban az idő függvényében [D34]

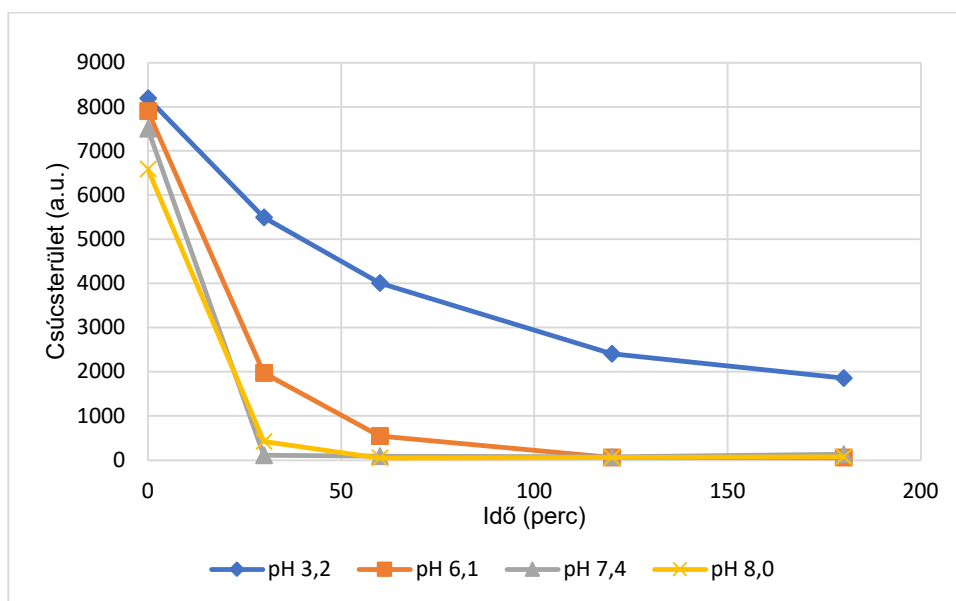


44. ábra. A **4s** kalcin HPLC-UV csúcsterületének változása a különböző savasságú kalcin-GSH inkubátumokban az idő függvényében [D34]

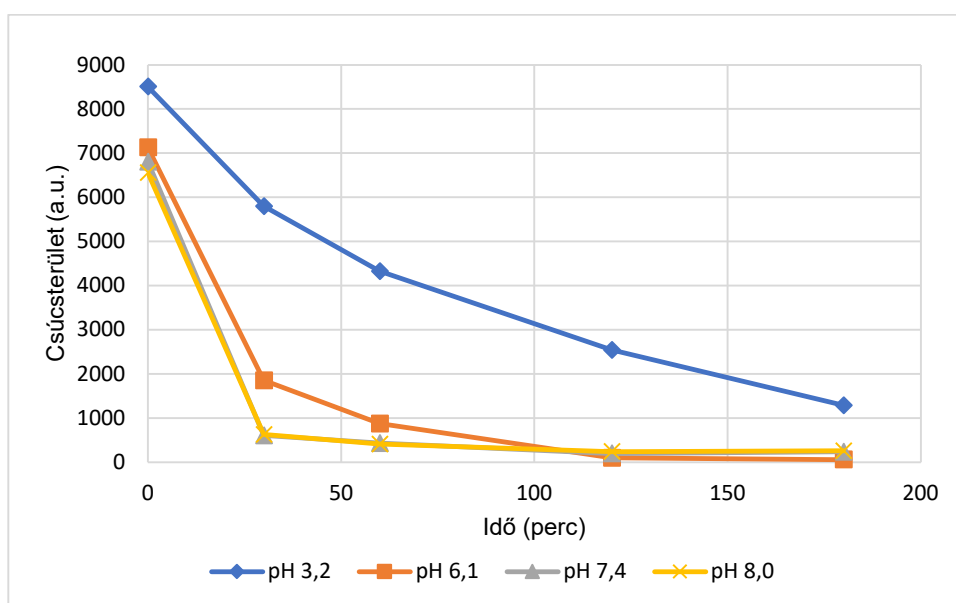
Az inkubátumok HPLC-UV kromatogramjain a várt diasztereomer GSH-adduktok mindkét esetben két elkülönülő csúcsként jelentek meg. A **4r** és **4s**

kalkonok (Z)-izomerjei nem voltak kimutathatók az inkubátumokban. A kiindulási kalkonok és a keletkezett GSH-adduktok szerkezetét pozitív módon elvégzett HPLC-ESI-MS mérésekkel igazoltuk [D34].

A **16a** és **16b** GSH-val, hasonló körülmények között elvégzett reakcióinak vizsgálata szembevető különbségeket mutatott. Mindkét *bisz*-Mannich-származék mind a **4r** és **4s**, mind a **4b** és **4c** kalkonoknál jóval reaktívabbnak bizonyult. A reakciók előrehaladásának a fentiekhez hasonlóképpen kapott adatait a 45. és a 46. ábra mutatja.



45. ábra. A **16a** kalkon HPLC-UV csúcsterületének változása a különböző savasságú kalkon-GSH inkubátumokban az idő függvényében [D34]



46. ábra. A **16b** kalkon HPLC-UV csúcsterületének változása a különböző savasságú kalkon-GSH inkubátumokban az idő függvényében [D34]

Amint az ábrák mutatják, pH 8,0 és pH 7,4 körülmények között a **16a** 60 perc alatt, a **16b** 120 perc alatt gyakorlatilag teljesen elreagált. Enyhén savas (pH 6,1) körülmények között ez az idő mindkét származék esetén 120 perc volt. A legjelentősebb különbség a pH 3,2 körülmények között lejátszódó reakciók esetén volt megfigyelhető: 180 perc alatt a **16a** csúcsterülete a kiindulási érték 20,8%-ra, míg a **16b** 15,2%-ra csökkent. Ez az érték a **4r** esetén 78,9%, **4s** esetén 97,4%, a **4b** esetén 80,7%, míg a **4c** esetén 95,8% volt. A reakciók előrehaladásával párhuzamosan a GSH-konjugátumok kromatográfiás integrált csúcsterülete a kísérlet végéig (180 perc) minden esetben folyamatosan nőtt. A HPLC-UV kromatogramokon a kiindulási kalkonok és a GSH-konjugátumok csúcsain túlmenően további csúcsok megjelenését nem tapasztaltuk. A kiindulási kalkonok és a keletkezett GSH-adduktok szerkezetét ez esetben is pozitív ionizációs módban elvégzett HPLC-ESI-MS mérésekkel igazoltuk [D34].

A kapott adatok csak részben értelmezhetők a vegyületek ^{13}C NMR adataival. A **4r** és **4s** vegyületek β -szénatomjainak ^{13}C NMR kémiai eltolódásai 141,7 ppm, illetve 143,2 ppm, míg a **16a** és **16b** vegyületek megfelelő kémiai eltolódás értékei 143,4 ppm, illetve 145,5 ppm volt. Mivel a **4r** (141,7 ppm) és a **4f** (143,2 ppm) β -szénatomjainak kémiai eltolódásai közötti különbség a **4r** 4-hidroxil szubsztituens hatásának következménye, így megállapítható, hogy a 4-hidroxil szubsztituens növeli a β -szénatom körüli elektronsűrűséget. A 4-szubsztituensek pozitív rezonancia effektusát korábban Solianiova és mtsai is igazolták [402]. Ugyanakkor, a dialkilamino/morfolinometilén szubsztituensek beépítése a molekulákba növelte a 4-hidroxikalkonok β -szénatomjainak elektrofil jellegét. Ez utóbbi tapasztalat a *meta*-helyzetű protonált dialkilaminometilén szubsztituensek erős elektronvonzó képességével [403] magyarázható. A **16b** β -szénatomjának a **16a** β -szénatomjánál erősebb elektrofil jellege összhangban áll a **16b** pH 3,2 körülmények között tapasztalt nagyobb reaktivásával (45. és 46. ábra). A **16a** és **4r** vegyületek β -szénatomjai ^{13}C NMR kémiai eltolódási értékeinek különbsége (1,7 ppm) azonban csak részben magyarázhatja a két vegyület pH 3,2 körülmények között tapasztalt nagyfokú reaktivásbeli különbségét.

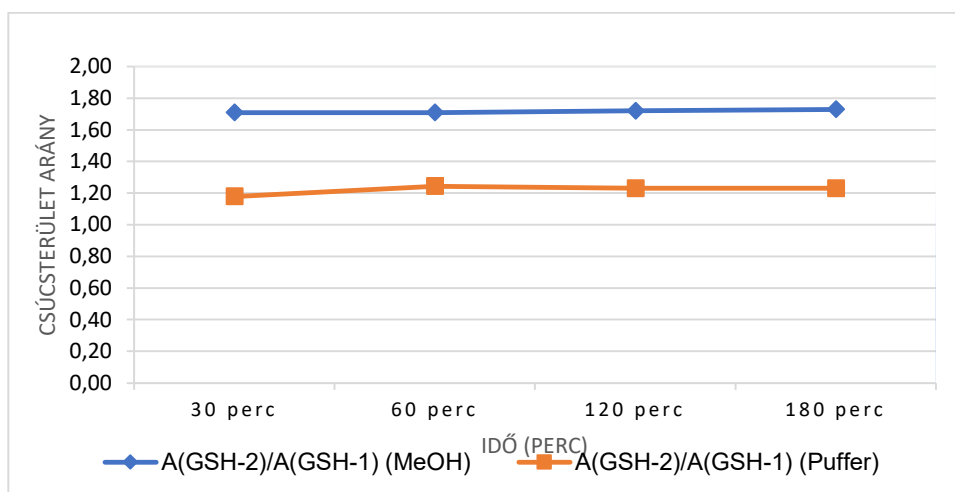
A Mannich-bázisok bioaktivitását, például a citotoxicitását, gyakran a tiolokkal való magas reaktivitásuknak tulajdonítják [403-405]. Így az aminocsoport jellege fontos tényező, mivel a deaminoalkilezés sebessége fordítottan arányos a felszabaduló amin bázikusságával [406]. Ez esetben azonban deaminációval keletkező termékek képződése HPLC-MS mérésekkel nem volt azonosítható.

A korábbi irodalmi és saját kísérleti eredményeink alapján a kalkonok tiol-reaktivitását legkifejezettebben a deprotonált tiol koncentrációja befolyásolja. Számos irodalmi példa igazolta, hogy a szomszédos pozitív töltések a tiolok pK_a -értékének csökkenését eredményezték, növelve azok reaktivitását az elektrofil reagensekkel szemben. Ugyanakkor, közeli negatív töltésű csoportok esetén fordított hatást figyeltek meg [407-409]. Ezen irodalmi tapasztalatok alapján

feltételezhető, hogy a **16a** és **16b** vegyületek protonált aminocsoportjai meghatározóak lehetnek a vegyületek pH 3,2 körülmények között GSH-val szemben mutatott megnövekedett reaktivitásában [408].

A fenti reakciókban minden esetben két diasztereomer kalkon-GSH addukt képződése volt tapasztalható. A csúcsterületek összehasonlítása alapján, a vizsgált 4-hidroxikalkonok (**4r** és **4s**) GSH-adduktjainak aránya minden vizsgált reakciókörülmény esetén (pH 3,2, pH 6,1, pH 7,4, pH 8,0) egyhez közeli érték volt (**4r**: 1.19-0.97; **4s**: 1,14-0,83). (A **4s** pH 3,2 körülmények között nem reagált.) Hasonló eredményeket kaptunk a **16a** és **16b** kalkonok pH 6,1, pH 7,4 és pH 8,0 inkubátumainak analízisekor is. Ugyanakkor, a **16a** és **16b** kalkonok esetén a két terület ($A_{(GSH-2)}$ és $A_{(GSH-1)}$) aránya 1,3 körüli értéket (1,25 és 1,27) mutatott az inkubálás 180 perces időtartama alatt.

A **16a** és **16b** bisz-Mannich-származékok (42. ábra) és GSH pH 3,2 körülmények között tapasztalt reaktivitás és sztereoszelektivitás növekedése okainak jobb megismerése céljából, a **4r** és **16a** kalkonok GSH-val lejátszódó reakcióit tovább vizsgáltuk [D35]. Feltételezve a protonált N-atomok szerepét a reaktivitás és a sztereoszelektivitás növekedésében, elvégeztük a **16a** kalkonok pH 3,2 körülmények közötti inkubálását a **4r** inkubálásával azonos mennyiségű metanol tartalmú elegyben is. Ekkor azt tapasztaltuk, hogy a foszfát pufferben tapasztalt enyhe diasztereomer felesleg a metanol tartalmú oldatban határozottan megnövekedett (47. ábra).



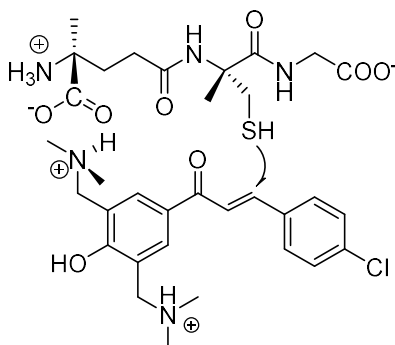
47. ábra. Az $A_{(GSH-2)}/A_{(GSH-1)}$ területarány változása a metanol tartalmú és metanol mentes pH 3.2 savasságú pufferben végzett **16a**-GSH inkubátumokban [D35]

Vizsgálataink alapján a pH 3,2-es inkubációkban a GSH addíciója vagy nem játszódtott le (a **4s** vegyület esetében), vagy a vártnál gyorsabb reakcióban két diasztereomer addukt képződéséhez vezetett (a **16a** és **16b** vegyület esetében). Bázikusabb körülmények között (pH 6,1, pH 7,4, pH 8,0) a reakciók gyorsabban mentek végbe. Ez utóbbi megfigyeléseket a GSH reaktívabb deprotonált formájának növekvő aránya magyarázza. Ebben a tekintetben ezen addíciós reakciók mechanizmusa hasonló a GST-katalizált reakciókéhoz, amelyekben

szintén a deprotonált GSH molekulák (GS^-) a reaktív részecskék [227,228]. Ezekben a reakciókban a tiolát nukleofil addíciója egy szubsztituált acetofenon-enolát képződését eredményezi, amelynek protonálódása Michael-adduktok kialakulásához vezet [410]. Mivel az enolát intermedierek protonálódása nem eredményezi királis centrum kialakulását, a reakciók megfigyelt diasztereoselektivitása a királis GSH reagens prokirális enonra történő sztereoselektív addíciójából ered (39. ábra).

Kubo [411] és Armstrong [227,228] munkái alapján a GST-katalizált reakciók sztereoselektivitásának alapja, hogy az enzim az aktív helyén lévő pozitív töltésű csoport (egy hisztidin protonált imidazol N-atomja) által elősegített legstabilabb átmeneti állapotból származó addukt képződését részesíti előnyben. Így a szerzők az enzimkatalízis központi szerepét az elektrofil és nukleofil centrumoknak a GSH szubsztrátot irányító pozitív töltésű oldalláncok elhelyezkedésének eredményeként értelmezték. Ezen túlmenően, a nukleofil támadás előtt a GSH konformációja az átmeneti állapothoz hasonló helyzetben stabilizálódhat [222]. Lutolf és mtsai azt is hangsúlyozták, hogy a pozitív töltés – pozíciójától függetlenül – nemcsak a tiolok pK_a értékének megváltozását okozza, hanem megváltoztatja az átmeneti állapot energiáját is [407]. Bár a mechanizmus némileg eltérő, az addukt-képződés sztereokémiáját a pH 3,2 körülmények között szintén a nukleofil *Re*- vagy *Si*-oldali támadása határozza meg.

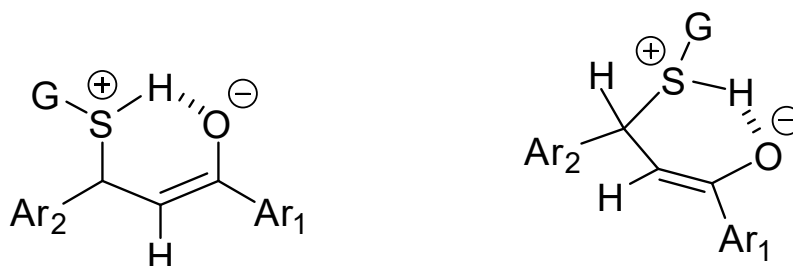
Mivel a megfigyelt reakciósebesség (és sztereoselektivitás) növekedés a tercier nitrogénatomok bevitelének eredménye, feltételezhető, hogy a diasztereoselektív reakciók molekuláris mechanizmusa magában foglalja a Mannich-nitrogénatomok részvételét. E szerint a protonált C3- vagy C5-Mannich-nitrogénatom (pK_a kb. 10–11) ionpárt képez a glutamát deprotonált karboxilcsoportjával (pK_a 2,12). Az ionpár által meghatározott orientáció következtében a kénatom nukleofil támadása a síkszerű enon fragmens *Re*- vagy *Si*-oldaláról kedvezményezett. (Az adduktok abszolút konfigurációi nem ismertek.) Egy ilyen kölcsönhatás a GSH sztereosztereoselektív addícióját eredményezi egy prokirális enon részhez (48. ábra). Tudomásunk szerint az ilyen nagy távolságú reagens által indukált sztereoselektív Michael-addíciós mechanizmust korábban még nem publikáltak.



48. ábra. A **16a** kalkon és a glutation (GSH) feltételezett ionpár kölcsönhatása a pH 3,2 körülmények között lejátszódó reakcióban

Az a megfigyelés, hogy az addíció sztereoszelektivitása nagyobb a metanol-víz rendszerben, mint a vizes rendszerben, szintén összhangban van a fenti modellel. A tiszta víz dielektromos állandójának ($D=78,5$) metanol hozzáadásával ($D=32,6$) történő csökkentése energetikailag kedvezőbbé teszi az ionpárképződést [412]. Ez megerősíti a korábbi eredményeket, miszerint a GSH-ban az elektrosztatikus kölcsönhatások, mint például a molekulán belüli hidrogénkötés, fennmaradnak alacsonyabb dielektromos állandójú oldószerekben, mint például az acetonitril ($D=36,6$), de erősen csökkennek vízben, ahol az oldószeres kölcsönhatások kedveznek [412]. Ugyanakkor, a csökkentett dielektromos állandójú bináris rendszer, a metanol-víz növeli az oldott ionok közötti vonzerőt, ezáltal elősegítve azok rekombinációját.

Ugyanakkor, a GSH tiol ($pK_a = 8,83$) funkciója a pH 3,2 körülmények között teljes mértékben semleges formában található. Bár a neutrális tiolok is nukleofil centrumok, reaktivitásuk sokkal alacsonyabb, mint deprotonált (negatív töltésű) megfelelőiké [390]. A semleges tiol szén-szén kettős kötésre történő addíciója eredményeképpen egy ikerionos szerkezetű átmeneti termék keletkezik, ami intramolekuláris hidrogénkötéssel stabilizálódhat (49. ábra). A kialakuló hattagú gyűrűs intermedier kedvezményezett konformációja tovább növelheti a reakció diasztereoszelektivitását [D35].



49. ábra. A **16a** kalcion és a glutation (GSH) feltételezett gyűrűs átmeneti termékének szerkezete és térszerkezete a pH 3,2 körülmények között lejátszódó reakcióban [D35]

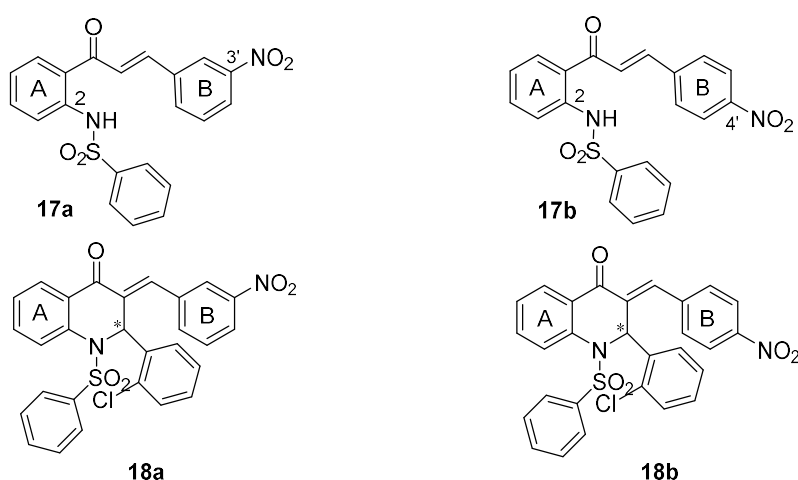
Összefoglalva, a **4r** kalcion és annak bisz-Mannich-származékának (**16a**) savas körülmények (pH 3,2) között GSH-val lejátszódó addíciós reakcióját vizsgálva, a **16a** esetén az addíció sebességének gyorsulását, valamint a GSH sztereoszelektív addícióját figyeltük meg. Irodalmi előzmények alapján mindkét tapasztalat az egyik protonált tercier nitrogén és a deprotonált GSH-glutamát-karboxilát között kialakuló ionpárképződéssel magyarázható. Ugyanakkor, nem kizárható a neutrális tiol addíciójának és az annak eredményeképpen kialakuló hattagú gyűrűs intermedier képződése sem.

5.6.2.1.3. 2-Szulfonamido-nitrokalcionok és gyűrűs származékaik [D36]

A szulfonamido funkcióscsoportot hordozó vegyületek széleskörű farmakológiai hatásokkal rendelkeznek [413]. Így többek között a vegyületcsalád több képviselője is forgalomban lévő antibakteriális, antivirális, diuretikus és antihiperglikémiás szer [413-415]. A szulfonamid származék ABT751 daganatellenes

hatásának 1992-ben történt felismerése óta a szulfonamidok e téren folytatott kutatása számos tubulin-aktív, karboanhidráz-gátló, metionin aminopeptidáz-gátló és vaszkuláris endotéliás növekedésgátló származék hatásának megismeréséhez vezetett [413]. Az eddigi vizsgálatok eredményei alapján a kutatások egyik perspektivikus területét jelenthetik a szulfonamid funkció és kalkon szerkezeti elemeket is hordozó hibridek szintézise és vizsgálata [416].

Vizsgálataink során a **17a** és **17b** nyíltláncú, valamint a **18a** és **18b** gyűrűs kalkon-szulfonamid hibridek (50. ábra) *in vitro* redukált glutationnal szemben mutatott reaktivitását vizsgáltuk annak megismerése céljából, hogy felismerhető-e összefüggés a vegyületek daganatsejt citotoxikus hatása és tiol-reaktivitása között [D36].



50. ábra. A **17a,b** és **18a,b** kalkon-szulfonamid hibridek szerkezete

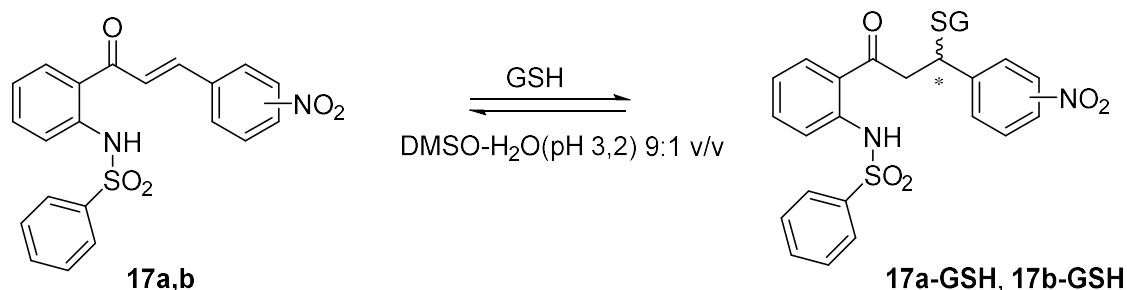
A vegyületek PC-3 (humán prosztata), HCT-116 (humán vastagbél) és SF-295 (humán glioblasztóma) humán tumorsejtvonalakkal szemben mutatott *in vitro* citotoxicitási vizsgálatainak eredményeit a 32. táblázat mutatja. A vizsgálatok során a 25 µg/ml koncentrációban alkalmazott **17a,b** **18a,b** vegyületek MTT módszerrel meghatározott tumorsejt toxicitásának százalékos mértékét hasonlítottuk *in vitro* a kezeletlen kontrolhoz.

32. táblázat. A **17a**, **17b**, **18a** és **18b** vegyületek tumorsejt citotoxicitásának százalékos mértéke *in vitro* a kezeletlen kontrollhoz képest [D36]

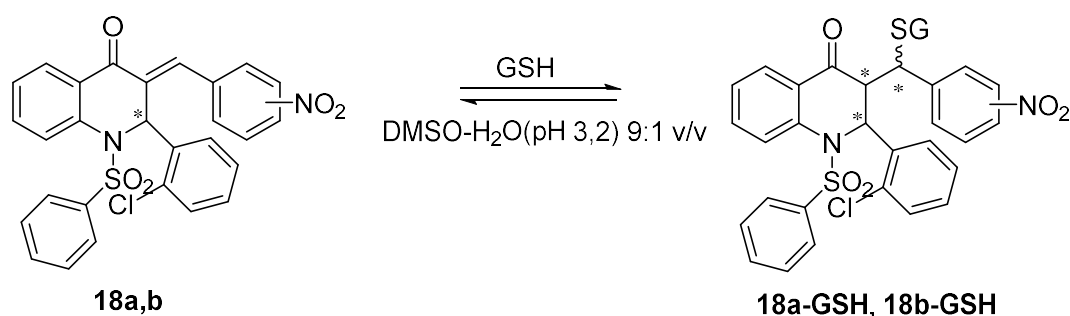
Vegyület	PC-3	HTC-116	SF-295
17a	77,9±3.4	66,8±0.9	63,5±1.1
17b	45,0±0.2	25,7±1.4	81,5±2.5
18a	49,6±1.2	72,8±0.5	60,1±1.6
18b	68,4±0.3	73,4±2.4	50,1±2.1

A reakciókat 37 °C-on, 90% (v/v) DMSO:H₂O (pH 3,2) elegyben végeztük, 3:1 (alacsonyabb) és 12:1 (magasabb) GSH:kalkon mólarányt használva. A nyílt szénláncú kalkonok (**17a** és **17b**) GSH-adduktjai egy, a kinolon-kalkonok (**18a** és

18b) pedig két újonnan képződött sztereogén centrumot tartalmaznak a GSH két inherens (rögzített konfigurációjú) sztereocentruma mellett. Ennek megfelelően a **17a** és **17b** esetében két, az **18a** és **18b** esetében pedig nyolc diasztereomer addukt képződése várható (51. ábra és 52. ábra).

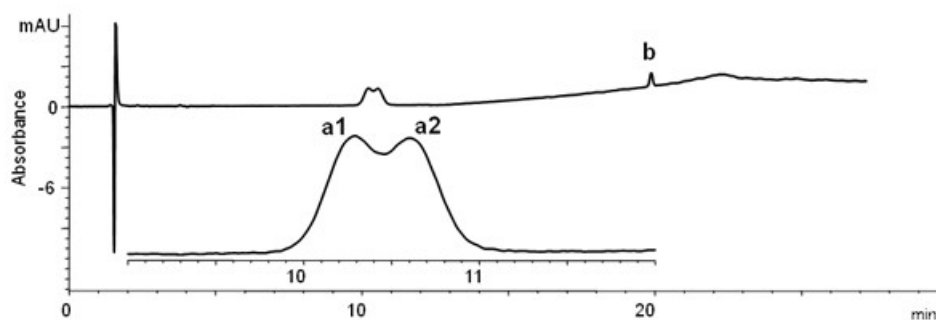


51. ábra. A **17a** és **17b** vegyületek és glutation-adduktjainak szerkezete

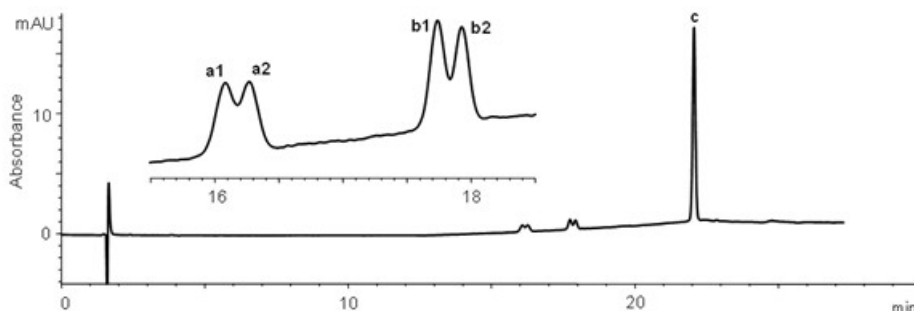


52. ábra A **18a** és **18b** vegyületek és glutation-adduktjainak szerkezete, valamint sztereogén centrumai

A **17a** és **17b** vegyületek GSH-inkubátumainak HPLC-UV kromatogramjain három, a **18a** és **18b** vegyületek esetében öt csúcs jelent meg, amelyek a várt izomer GSH-adduktoknak és a kiindulási kalkonoknak tulajdoníthatók. A keletkezett konjugátumok szerkezetét HPLC-ESI MS vizsgálatokkal igazoltuk. A **17a** és a **18a** vegyületek GSH-inkubátumainak HPLC-UV kromatogramjait az 53. és az 54. ábra mutatja.



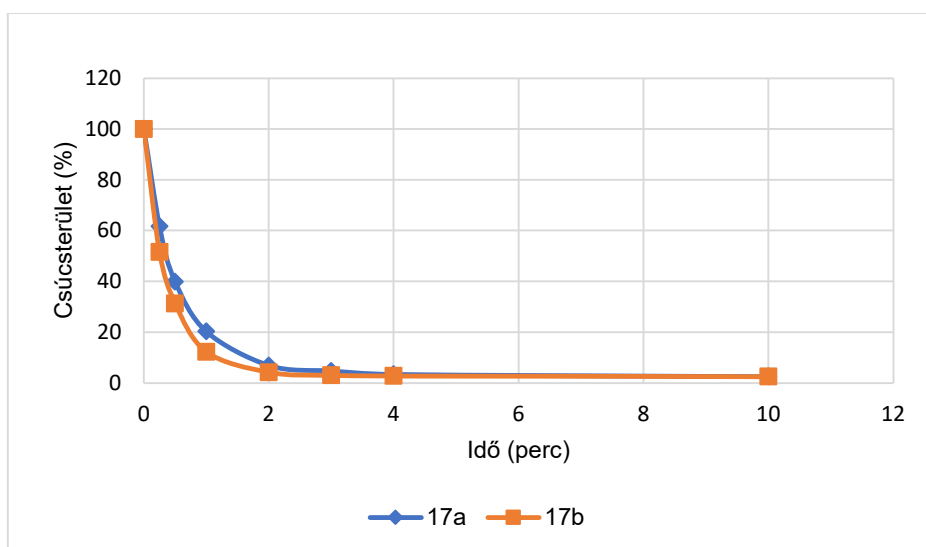
53. ábra. A **17a** kalkon glutation-inkubátumának HPLC-UV-Vis kromatogramja [D36]



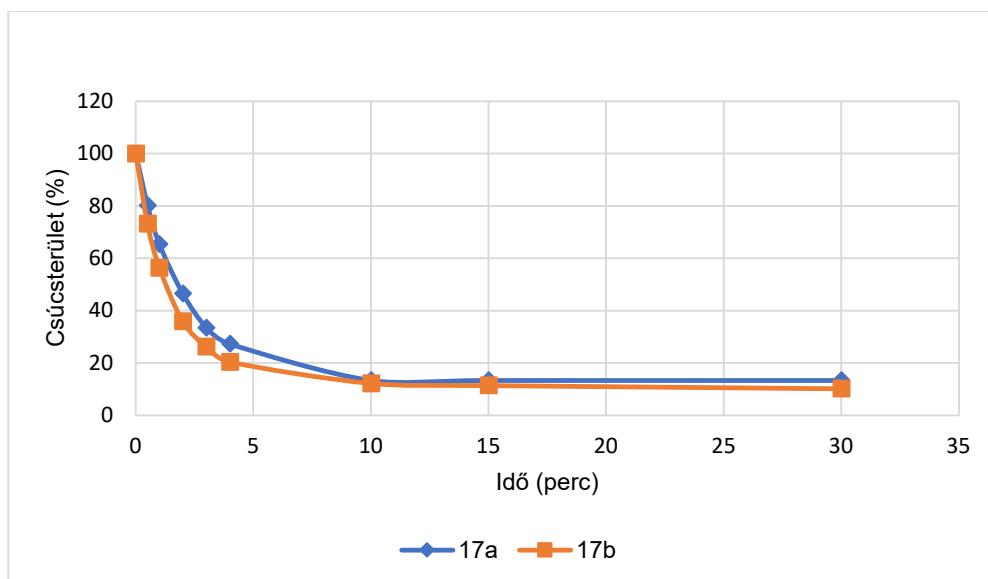
54. ábra. A **18a** kalkon glutation-inkubátumának HPLC-UV-Vis kromatogramja [D36]

Amint az 54. ábra mutatja, a **18a** GSH-inkubátumának HPLC kromatogramján (hasonlóképpen a **18b** inkubátumához) csak két csúcspár figyelhető meg, amelyek két diasztereomer addukt-párnak felelhetnek meg. A képződött diasztereomerek számának ilyen csökkenése a *transz* diasztereomerek szelektív képződésével magyarázható, mivel a C(2)-arilcsoport konformatív korlátozott helyzetben van (52. ábra). Az oxigén-analóg 2-fenil-(*E*)-3-benzilidén-kromán-4-on tiol-addíciója szintén a megfelelő *transz*-adduktok képződését eredményezte a szén-szén kettős kötésre történő addíció vonatkozásában [417]. Kísérleteinkben képződött adduktok sztereokémiájának meghatározása azonban további szintetikus és analitikai munkát igényel.

A kiindulási kalkonok (és a keletkező GSH-adduktok) retenciós idejének megrövidítésével (B módszer) lehetővé vált a relatíve gyors reakciók előrehaladásának vizsgálata. Az 55. és 56. ábra a **17a** és **17b** kalkonok kromatográfiai csúcsterületeinek csökkenését mutatja be az inkubálási idő függvényében egy magasabb (7,5 mM) (55. ábra) és egy alacsonyabb (1,875 mM) (56. ábra) GSH koncentráció alkalmazása esetén.



55. ábra. A **17a** és **17b** kalkonok HPLC-UV csúcsterületeinek változása (%) a kalkon-GSH inkubátumokban (pH 3,2; 7,5 mM GSH) az idő függvényében [D36]



56. ábra. A **17a** és **17b** kalkonok HPLC-UV csúcsterületeinek változása (%) a kalkon-GSH inkubátumokban (pH 3,2; 1,875 mM GSH) az idő függvényében [D36]

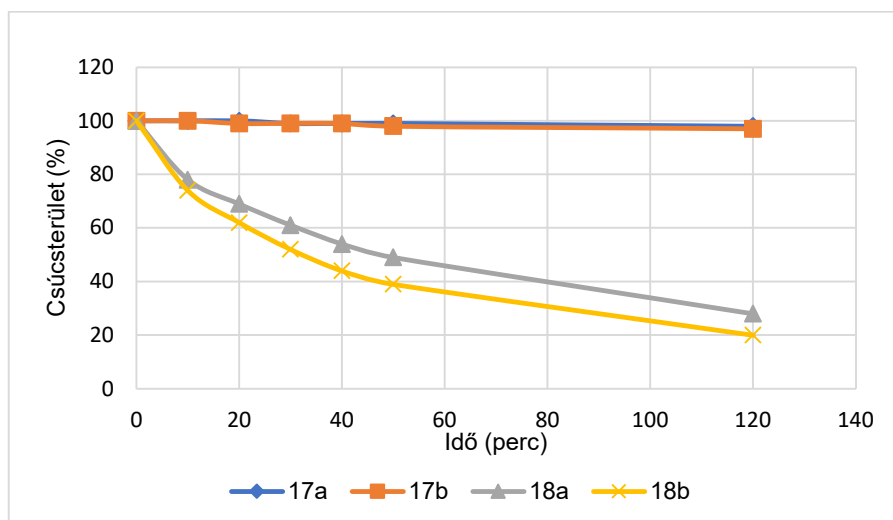
A magasabb (7,5 mM) és az alacsonyabb (1,875 mM) GSH koncentrációjú egyensúlyi elegyekben az el nem reagált **17a** és **17b** kalkonok mennyisége a kezdeti érték 2,5%-a, illetve 10,2%-a volt. A **17a** és **17b** kalkonok pH 3,2 körülmények között tapasztalt tiol-reaktivitása közel azonos a **4b** és **4c** kalkonok pH 8,0 körülmények között tapasztalt reaktivitásával. A vegyületek e nagyfokú reaktivitás növekedése a nitro- és benzolszulfonamido-csoportok elektronszívó tulajdonságával értelmezhető.

Az azonos körülmények között reagáló **18a** és **18b** vegyületek egyensúlyi elegyeiben jóval nagyobb mennyiségű el nem reagált kinolinon-kalkon volt kimutatható: a **18a** esetén: 72,3% (magasabb GSH koncentráció) és 91,6% (alacsonyabb GSH koncentráció); míg a **18b** esetén: 76,5% (magasabb GSH koncentráció) és 93,3% (alacsonyabb GSH koncentráció). Ez a tapasztalat a reakciók átmeneti állapotának nagyobb sztérikus zsúfoltságával magyarázható [D36].

Az eredmények azt mutatták, hogy mind a négy vegyület viszonylag rövid idő alatt eléri az egyensúlyi állapotot. Az egyensúlyban képződött GSH-konjugátumok mennyisége sokkal nagyobb a nyíltláncú szulfonamid-kalkonok (**17a** és **17b**), mint a gyűrűs kinolinon-kalkonok (**18a** és **18b**) esetében. A kezdeti GSH:kalkon aránynak korlátozott hatása van az egyensúlyok összetételére. Ennek megfelelően az egyensúly termodinamikailag szabályozott, és az egyensúly eléréséhez szükséges időt az oda és vissza irányuló reakciók sebessége határozza meg.

Amint korábban említésre került, a reakciókat DMSO:H₂O(pH 3,2) 9:1 arányú oldószer elegyben vizsgáltuk. Az adduktok protikus (a korábban vizsgált reakciók körülményeihez hasonló) körülmények között mutatott stabilitásának

vizsgálata céljából az egyensúlyi elegyek metanol/víz (75:25 v/v) eleggyel történt százszorosos hígításában vizsgáltuk a kiindulási kalkonok csúcsterületeink változását. Amint az 57. ábrán látható, a nyíltláncú kalkon-GSH konjugátumok (**17a-GSH**, **17b-GSH**) bomlási sebessége (retro-Michael reakció) nagyon alacsony. Ezzel szemben a gyűrűs kinolinon-kalkon-GSH adduktok (**18a-GSH**, **18b-GSH**) retro-reakciójának sebessége sokkal nagyobb. A 120. percben a **18a-GSH** konjugátum csúcsterülete 72%-kal, a **18b-GSH** konjugátum csúcsterülete 80%-kal csökkent (57. ábra). Egyidejűleg a **18a** és **18b** csúcsterületek növekedése volt megfigyelhető.



57. ábra. **17a-GSH**, **17b-GSH**, **18a-GSH** és **18b-GSH** konjugátumok HPLC csúcsterületeinek változása metanol:víz (75:25 v/v) elegyben [D36]

Összehasonlítva a nyíltláncú szulfonamido-kalkonok (**17a,b**) és a megfelelő gyűrűs kinolonszármazékaik (**18a,b**) átlagos daganatsejt citotoxikus hatását (60%, illetve 62%) megállapítható, hogy a vegyületek citotoxicitása és tiol-reaktivitása között nem állapítható meg direkt összefüggés. A nyíltláncú kalkon-molekularész gyűrűs szerkezetté történt átalakítása nagymértékben csökkentette a vegyületek tiol-reaktivitását.

5.6.2.2. Karbociklusos kalkon-analógok

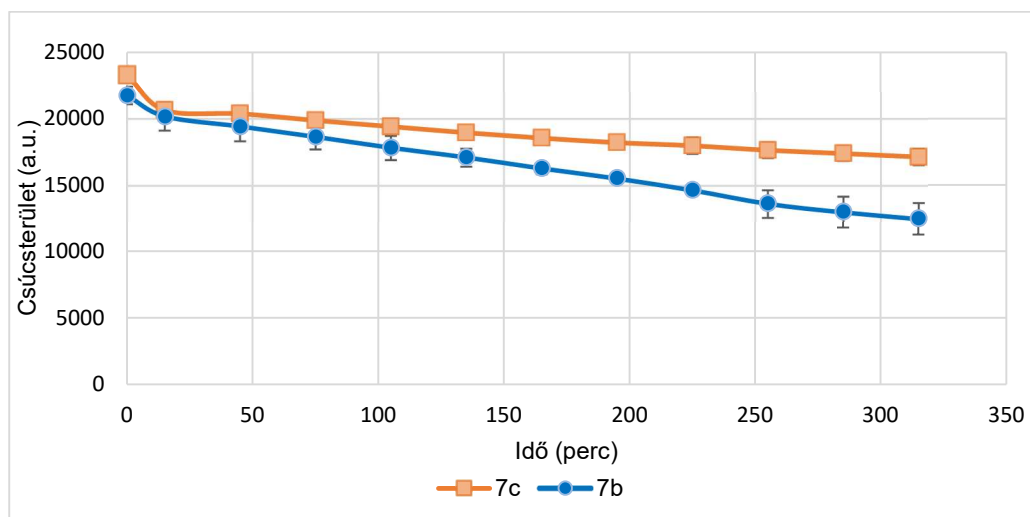
Az **5-7** vegyületek (56 származék) P388, L1210, Molt 4/C8 és CEM sejtekkel szemben meghatározott IC_{50} értékei alapján számított Átlagos Potenciál (ÁP) értékeit [D5] a 18. táblázat foglalja össze. A vizsgált vegyületek ÁP értékei alapján a leghatékonyabb származékoknak a héttagú gyűrűs kalkon-analógok (**7**) bizonyultak. A **7** vegyületek között a 4'-OCH₃ (**7c**) és a 4'-N(CH₃)₂ (**7d**) származékok bizonyultak a leghatékonyabb daganatsejt citotoxikus szerekek. Ugyanakkor, a 4'-CH₃ (**7b**) származék egy nagyságrenddel kevésbé toxikusnak bizonyult (19. táblázat). A **7b** és **7c** vegyületek citotoxikus hatása és tiol-reaktivitása közötti lehetséges kapcsolat vizsgálata céljából, a 4'-szubsztituált kalkonokhoz (**4b** és **4c**) hasonlóan, elvégeztük a vegyületek glutationnal (GSH) és

N-acetilciszteinnel (NAC) lejátszódó reakcióinak összehasonlító vizsgálatát [D30,D31].

5.6.2.2.1. (*E*)-2-(4'-*X*-benzilidén)-1-benzoszuberonok [D37,D38]

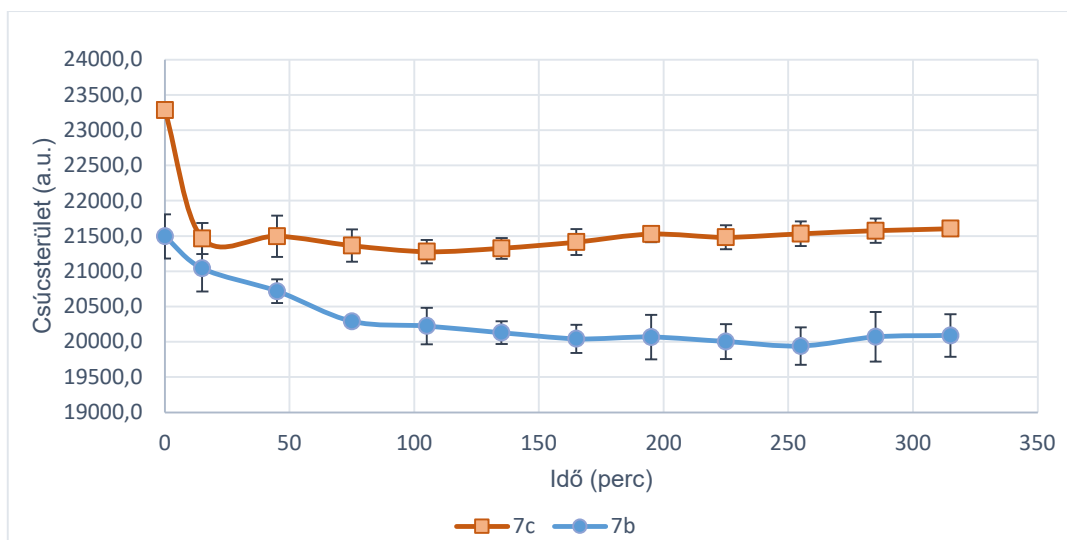
Vizsgálataink kezdetén a **7b** és **7c** származékok GSH-val szemben mutatott reaktivitását vizsgáltuk 50 °C-on, tízszeres GSH felesleget alkalmazva. A 150 és 300 perces inkubátumok mindegyikében két szeparálódó kromatográfiás csúcsként a várt kalkon-GSH adduktok HPLC-MS módszerrel voltak azonosíthatók [D37].

Későbbi vizsgálataink során a **7b** és **7c** vegyületek GSH- és NAC-reaktivitását vizsgáltuk a **4b** és **4c** nyíltláncú kalkonokkal megegyező reakciókörülmények között [D38]. A pH 8,0 körülmények között elvégzett vizsgálataink során a GSH inkubátumokban a kiindulási gyűrűs kalkon-analógok kromatográfiás csúcsterületeinek lassú, egyenletes csökkenése volt megfigyelhető. A vizsgálati periódus (315 perc) végére a GSH-inkubátumok összetétele nem érte el az egyensúlyi állapotot (58.ábra).



58. ábra. A **7b** és **7c** gyűrűs kalkon-analógok HPLC-UV csúcsterületeinek változása a kalkon-GSH inkubátumokban (pH 8,0) az idő függvényében [D38]

A NAC-inkubátumokban a **7b** és **7c** kromatográfiás csúcsterületei a 195. perctől kezdődően gyakorlatilag nem változtak (59. ábra).



59. ábra A **7b** és **7c** gyűrűs kalkon-analógok HPLC-UV csúcsterületeinek változása a kalkon-NAC inkubátumokban (pH 8,0) az idő függvényében [D38]

A **7b** GSH-val lejátszódó reakciójában a kiindulási kalkon HPLC csúcsterülete 42,5%-kal csökkent. Ez az érték a **7c** esetén 26,3% volt. Összehasonlítva ezeket az értékeket a nyíltláncú **4b** (96,3% csökkenés) és **4c** (92,1% csökkenés) megfelelő értékeivel megállapítható, hogy a gyűrűzárás eredményeként a kalkon-molekularész tiol-reaktivitása nagymértékben csökkent (35. táblázat). Hasonló eredményeket kaptunk a **4b/7b** és **4c/7c** párok GSH- és NAC-reaktivitásának összehasonlításakor mind a pH 8,0, mind a pH 6,3 (33. táblázat), valamint a **17a,b/18a,b** párok esetén pH 3,2 reakciókörülmények között (5.6.2.1.3 fejezet).

33. táblázat. A kiindulási kalkon HPLC-UV csúcsterületek százalékos csökkenése a **4b,4c** és **7b,7c** kalkonok 315 perces GSH és NAC inkubációs keverékeiben [D38]

Vegyület	pH	Reaktáns	A kiindulási csúcsterület csökkenésének mértéke (%)	Reaktáns	A kiindulási csúcsterület csökkenésének mértéke (%)
4b	8,0	GSH	96,3	NAC	94,8
7b	8,0	GSH	42,5	NAC	7,6
4c	8,0	GSH	92,1	NAC	90,2
7c	8,0	GSH	26,3	NAC	7,9
4b	6,3	GSH	90,6	NAC	75,6
7b	6,3	GSH	16,1	NAC	7,1
4c	6,3	GSH	78,3	NAC	53,3
7c	6,3	GSH	9,1	NAC	9,0
4b	3,2	GSH	19,3	NAC	10,9
7b	3,2	GSH	10,6	NAC	23,7
4c	3,2	GSH	4,2	NAC	1,5
7c	3,2	GSH	5,3	NAC	12,1

A pH 8,0 körülmények között lejátszódó GSH- és NAC-inkubátumok mintáiban minden esetben két egymástól szeparálódó kromatográfiás csúcs volt azonosítható. HPLC-MS vizsgálatok alapján a termékek a várt tiol-adduktoknak

bizonyultak. A két elkülönülő csúcs növekedésének időbeli lefolyása a GSH és a NAC inkubátumokban jellegzetes különbségeket mutatott. A **7b** és **7c** GSH-adduktjai esetében a csúcsterületek lineárisan nőttek az idő függvényében. Az inkubációs időszak végén (315 perc) a GSH inkubációk két csúcsának aránya ($A_{\text{GSH-2}}/A_{\text{GSH-1}}$) mindkét pH érték esetén közel egységnyi volt (1,13 és 1,08 a **7b**, illetve a **7c** esetében). Az NAC-adduktok esetében a görbék konkáv lefutásúak voltak. Ebben az esetben a NAC-2/NAC-1 területarányok a 315 perces mintákban 1,91 (**7b**), illetve 1,79 (**7c**) voltak. Mind a négy inkubációban (Z)-kalkonok képződése volt kimutatható.

A pH 6,3 körülmények között végzett kísérletekben a kiindulási kalkonok csúcsterületeinek csökkenése párhuzamos görbéket eredményezett. A GSH-val történő inkubációs időszak (315 perc) végére a **7b** és **7c** HPLC csúcsok kezdeti területe 16,1%-kal, illetve 9,1%-kal csökkent. Amikor a vegyületeket NAC-cal inkubáltuk, a megfelelő értékek 7,9% és 7,1% voltak. Ezek az értékek jóval alacsonyabbak, mint az azonos körülmények között reagáló **4b** és **4c** vegyületek megfelelő konverziói (33. táblázat).

A GSH- és NAC-adduktok a pH 8,0 körülmények között lejátszódó reakciókhoz hasonlóan, ez esetben is két kromatográfiás csúcsot eredményeztek. Az inkubációs időszak végén a kalkon-GSH adduktok csúcsterületeinek aránya – a pH 8,0 körülmények között lejátszódó reakciókhoz hasonlóan – egy körüli értékek voltak (1,12 a **7b** és 1,10 a **7c** esetében). Ezzel ellentétben, a NAC-2/NAC-1 csúcsterületek aránya ugyanebben az időpontban a **7b** esetén 8,6, a **7c** esetén 6,3 volt (34. táblázat).

34. táblázat. A **7b** és **7c** gyűrűs kalkon-analógok NAC-inkubátumaiban (pH 6,3)¹ azonosított (Z)-izomerek, valamint NAC-1 és NAC-2 csúcsok integrált csúcsterületei (A)² [D38]

Kalkon	Idő (perc)	A (Z)-izomer	A (NAC-1)	A (NAC-2)	$A_{\text{(NAC-2)}}/A_{\text{(NAC-1)}}$
7b	75	91,8	35,3	224,1	6,3
7b	165	107,2	52,7	349,7	6,6
7b	255	114,9	56,8	448,3	7,9
7b	315	118,9	60,0	513,9	8,6
7c	75	136,5	54,0	148,9	2,8
7c	165	159,4	59,5	249,3	4,2
7c	255	175,3	58,4	333,2	5,7
7c	315	184,5	61,8	392,1	6,3

¹A vizes NAC oldat pH értéke. ²Az adatok két független kísérlet átlagai az inkubálás 315. percében.

A különböző időpontokban elvégzett HPLC-UV/Vis vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a NAC-2/NAC-1 csúcsok aránya, a (Z) izomerek mennyiségével párhuzamosan, folyamatosan nőtt az inkubálás során. A NAC-2/NAC-1 területek arányának növekedése a NAC-2 csúcsterületek növekedésének volt az eredménye. A NAC-1 csúcsok területe az inkubálások ideje alatt gyakorlatilag

változatlan maradt (34. táblázat). Mivel az inkubálásokat fénytől elzárt körülmények között végeztük, a NAC-2/NAC-1 arányok nem várt magas értékeit az elsődleges adduktok retro-Michael reakciója eredményének tekintjük (39. ábra).

Erősebben savas körülmények (pH 3,2) között a kiindulási kalkonok csúcsterületeinek csökkenése az előzőekhez képest jóval alacsonyabb volt. A kalkon-GSH inkubációk végén a **7b** és **7c** csúcsterületének kezdeti értékei 10,6%-kal, illetve 5,3%-kal csökkentek (33. táblázat). Ugyanakkor a **7b**-GSH adduktok csúcsterületének növekedése volt megfigyelhető. A **7c**-GSH adduktoknak megfelelő csúcsok nem voltak detektálhatók. A **7b**-GSH izomercsúcsok aránya (315 perc időpont) 1,48 volt. A megfelelő (Z) izomerek területei jóval alacsonyabbak voltak, mint a pH 8,0 és pH 6,3 inkubációknál. A kalkon-NAC inkubációkban a kalkonok kezdeti csúcsterülete (pH 3,2) szintén lineárisan csökkent. Ebben az esetben a **7b** és **7c** kezdeti csúcsterülete 23,7%-kal, illetve 12,1%-kal csökkent a 315 perces időpontra (35. táblázat). A vegyületek NAC-konjugátumait azonban a HPLC-UV-Vis kromatogramokon nem lehetett kimutatni. Ugyanakkor, az inkubátumok kromatogramjain több apró, szerkezetileg nem azonosított, a **7b** és **7c** vegyületeknél polárosabb csúcs jelent meg. Hasonló bomlási folyamatot a kontroll kísérletekben (tiol hozzáadása nélkül végzett inkubációk) sem pH 3,2 sem pH 6,3, illetve pH 8,0 körülmények között nem tapasztaltunk. Így a **7b** és **7c** vegyületek fogyása a NAC-cal lejátszódó reakciók eredménye. A reakció természetének megismerése további kísérleteket igényel. Mindkét inkubációban megfigyelhető volt a megfelelő (Z) izomerek képződése is.

A **4** és **7** sorozat 315 perces (pH 8,0) inkubátumai összetételét összehasonlítva látható, hogy a 4'-CH₃- és 4'-OCH₃-szubsztituált kalkonok (**4b** és **4c**) konverziói sokkal magasabbak, mint a **7b** és **7c** esetében (33. táblázat). A **7b** (138,0 ppm) és a **7c** (137,7 ppm) β -szénatomja körüli elektronsűrűséget jellemző ¹³C NMR eltolódások igen közeli értékek. Hasonló kismértékű (0,3 ppm) különbség volt megfigyelhető a megfelelő nyílt szénláncú **4b** és **4c** kalkonok esetében is [32]. Mivel a vizsgált tiolok és az aromás szubsztituensek azonosak, a két sorozat reaktivitásában megfigyelt különbségeket a gyűrűs szerkezet magyarázhatja.

Amslinger és munkatársai α -helyzetben különbözőképpen szubsztituált kalkonok vizsgálatai során a vegyületek tiol-reaktivitásának kinetikája jó korrelációt mutatott néhány, a vegyületek Michael-akceptor képességén alapuló biológiai hatásukkal [284,293]. Így például a 2,3',4,4'-tetrametoxikalkon (TMC) α -metil-szubsztitúciója csökkentette, α -ciano-, és α -nitro-szubsztitúciója pedig jelentősen növelte az α -helyzetben nem szubsztituált TMC tiol-reaktivitását [283]. E korábbi megfigyelések alapján ésszerű feltételezni, hogy a **7b** és **7c** benzoszuberonszármazékok **4b** és **4c** nyíltláncú kalkonokhoz viszonyított csökkent reaktivitása az α -alkil-szubsztitúció, valamint a kiindulási enon és a reakció köztitermék gyűrűs szerkezete által okozott konformációs korlátozás additív hatásainak következménye.

Az addíciós reakciók eredményeként, a GSH és a NAC inherens kiralitása miatt, két *cisz* és két *transz*-addukt képződhet. Korábban Armstrong és munkatársai beszámoltak a GSH és a nyílt láncú kalkon-analóg (*E*)-(4'-X-fenil)-3-butén-2-onok (PBO) GSTM 4-4 katalizált reakciójának sztereokémiájáról. A reakciókban nagyobb mennyiségben képződött a polárisabb addukt [227,228]. A nyíltláncú PBO-GSH [227] és 4-GSH [D33] adduktok diasztereomer párjainak HPLC elválasztási eredményei alapján feltételezhetjük, hogy a két elkülönülő csúcs a diasztereomer *cisz*- és *transz*-adduktok kromatográfiás jelei.

A **7b** és **7c** GSH-konjugátumok (315 perces időpont) csúcsterületeinek aránya közel egy (1,08-1,13 között) volt mind a pH 8,0, mind a pH 6,3 körülmények között. Korábbi eredményeinkhez hasonlóan [D33,D34] mindkét esetben a kevésbé poláris adduktok (GSH-2) kicsivel magasabb csúcsterületét figyeltük meg. A diasztereoszelektivitás a pH csökkentésével nőtt (**7b**: pH 3,2; 1,5). A megnövekedett szelektivitás ez esetben is a feltételezett hattagú gyűrűs intermedier képződésével értelmezhető (49. ábra).

5.6.2.2.2. (*E*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-tetralonok [D39]

A vizsgált vegyületek ÁP értékei alapján a második leghatékonyabb származékoknak a hattagú gyűrűs kalkon-analógok (**6**) bizonyultak (16. táblázat). A **6** vegyületek között a 4'-OCH₃ (**6c**) származék bizonyult a leghatékonyabb daganatsejt citotoxikus szernek. Ugyanakkor, a 4'-CH₃ (**6b**) származék citotoxicitása egy nagyságrenddel alacsonyabb (35. táblázat). Annak vizsgálata céljából, hogy a **6b** és **6c** vegyületek citotoxikus hatása és tiol-reaktivitása között milyen kapcsolat mutatható ki, a 4'-szubsztituált kalkonokhoz (**4b,4c**) és a héttagú gyűrűs kalkon-analógokhoz (**7b,7c**) hasonlóan, elvégeztük a **6b** és **6c** vegyületek glutationnal és *N*-acetilciszteinnel lejátszódó reakcióinak összehasonlító vizsgálatát is.

35. táblázat. Néhány *E*-2-(4'-X-benzilidén)-1-tetralon (**6**) és -benzoszuberon (**7**) egér P388 és L1210 sejtekkel, valamint humán Molt 4/C8 és CEM limfocita leukémia sejtekkel szemben mutatott IC₅₀ (μM) adatai^a [D5]

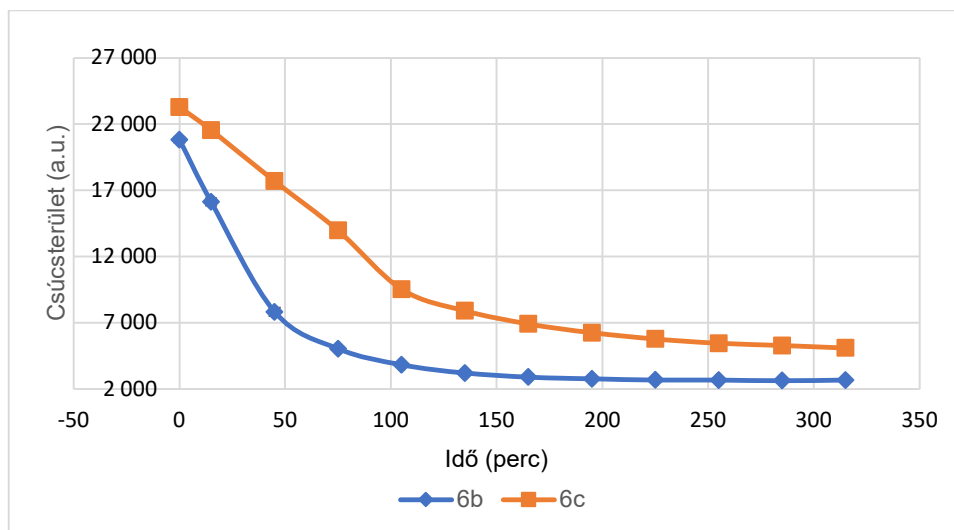
Vegyület	P388	L1210	Molt 4/C8	CEM
6a	30,2	121±104	32,4±16.6	7,42±0.56
6b	17,7	161±159	>500	460±69
6c	22,1	44.0±2.9	9,41±0.29	8,84±0.22
7a	12,7	106.0±31	42,7±3.3	28,9±0.7
7b	11,8	25.0±7.4	21,3±14.1	11,4±1.6
7c	1,6	0,34±0.02	0,47±0.33	0,35±0.04

^aÁtlag±szórás

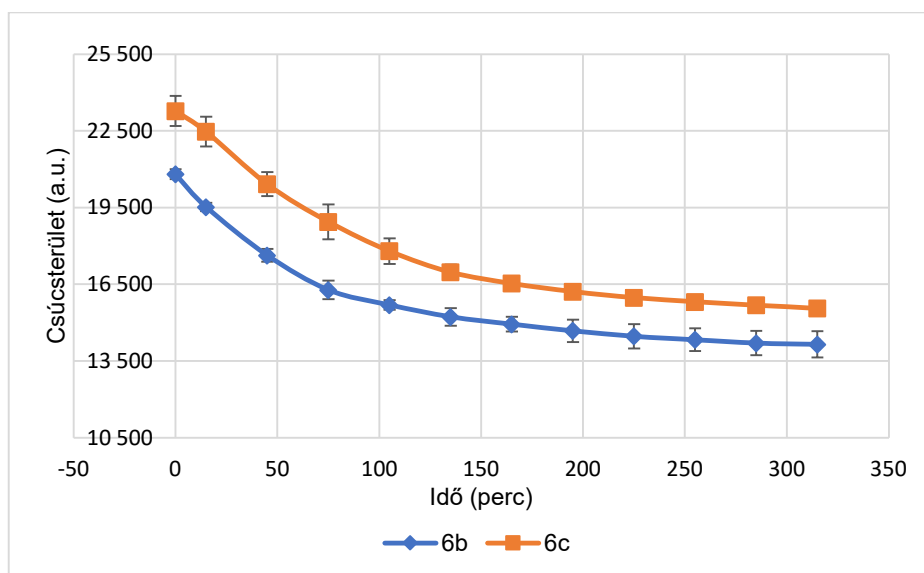
Vizsgálataink során először itt is a pH 8,0 körülmények között, HPLC-UV-Vis módszerrel követtük a reakciók lejátszódását. A GSH-val történő inkubációs időszak (315 perc) végére a **6b** és **6c** kiindulási vegyületek kezdeti HPLC-UV területe 87,2%-kal, illetve 78,1%-kal csökkent. Ezek az értékek elmaradnak a nyíltláncú **4b** (96,3% csökkenés) és **4c** (92,1% csökkenés) értékeitől, de

magasabbak a héttagú **7b** (42,5% csökkenés) és **7c** (26,3% csökkenés) esetén mért értékektől.

Amikor a **6b** és **6c** vegyületeket NAC-cal inkubáltuk, a megfelelő csökkenések 32,0% és 33,2% voltak. A kiindulási kalkonok kromatográfiás csúcsterületeinek változása az inkubációs idő függvényében azt jelezte, hogy a 315 perces adatok közel egyensúlyi összetételt tükröznek mind a GSH, mind a NAC inkubációkban (60. és 61. ábra).



60. ábra. A **6b** és **6c** gyűrűs kalkon-analógok HPLC-UV csúcsterületeinek változása a kalkon-GSH inkubátumokban (pH 8,0) az idő függvényében [D39]



61. ábra. A **6b** és **6c** gyűrűs kalkon-analógok HPLC-UV csúcsterületeinek változása a kalkon-NAC inkubátumokban (pH 8,0) az idő függvényében [D39]

A **6c** GSH-inkubációja során a HPLC-UV kromatográfiás körülmények között két különálló csúcs volt detektálható. Ezzel szemben a **6b**/GSH inkubátumok HPLC-analízise csak egy kromatográfiás csúcsot mutatott. A **6c**/GSH inkubátum 315 perces mintájának elemzése a polárisabb (GSH-1)

diasztereomerek körülbelül kétszeres (2,24-szeres) feleslegét mutatta. (Z)-izomer képződése csak a **6c** inkubátumokban volt kimutatható (36. táblázat). A GSH inkubációkkal ellentétben az NAC-inkubációk analízise két különálló kromatográfiás csúcsot mutatott mindkét kalcinon esetén. Ekkor is a polárosabb diasztereomer (NAC-1) csúcsok területe volt magasabb (**6b**: 1,80-szoros; **6c**: 1,58-szoros). (Z) izomer képződése nem volt detektálható (37. táblázat). A GSH és a NAC konjugátumok szerkezetét HPLC-MS vizsgálatokkal igazoltuk.

36. táblázat. A **6b** és **6c** gyűrűs kalkon-analógok GSH-inkubátumaiban azonosított HPLC-UV csúcsainak retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterületei (A)² [D39]

Kalkon	pH ³	t_R (E)- izomer	A_{315}/A_0 ⁴	t_R (Z)-izomer	A (Z)-izomer	t_R GSH-1	A GSH-1	t_R GSH-2	A GSH-2
6b	3,2	16,8	0,91	ND ⁵	-	14,7	753	ND ⁵	-
6c	3,2	16,3	0,95	16,7	51,3	13,3	565	13,5	171
6b	6,3	17,2	0,80	ND ⁵	-	15,3	5914	ND ⁵	-
6c	6,3	16,8	0,85	17,1	67,6	14,5	3371	14,6	1489
6b	8,0	17,1	0,13	ND ⁵	-	15,1	21325	ND ⁵	-
6c	8,0	16,9	0,22	17,2	85,9	14,6	16474	14,8	7353

¹Retenciós idő (perc); ²Az adatok két független kísérlet átlagai az inkubálás 315. percében.

³A vizes GSH oldat pH értéke. ⁴A 315. és a 0. percben mért területek hányadosa. ⁵Nem detektálható.

37. táblázat. A **6b** és **6c** gyűrűs kalkon-analógok NAC-inkubátumaiban azonosított HPLC-UV csúcsainak retenciós ideje (t_R)¹ és integrált csúcsterületei (A)² [D39]

Kalkon	pH ³	t_R (E)- izomer	A_{315}/A_0 ⁴	t_R (Z)-izomer	A (Z)-izomer	t_R NAC-1	A NAC-1	t_R NAC-2	A NAC-2
6b	3,2	16,8	0,69	ND ⁵	ND ⁵	15,8	738	16,2	412
6c	3,2	16,4	0,76	ND ⁵	ND ⁵	15,2	660	ND ⁵	-
6b	6,3	17,2	0,92	17,0	119	16,2	1607	16,3	327
6c	6,3	16,8	0,94	ND ⁵	ND ⁵	15,7	4050	ND ⁵	-
6b	8,0	16,9	0,68	ND ⁵	ND ⁵	15,9	6372	16,0	3545
6c	8,0	16,9	0,68	ND ⁵	ND ⁵	15,9	6372	16,0	3545

¹Retenciós idő (perc); ²Az adatok két független kísérlet átlagai az inkubálás 315. percében.

³A vizes NAC oldat pH értéke. ⁴A 315. és a 0. percben mért területek hányadosa. ⁵Nem detektálható.

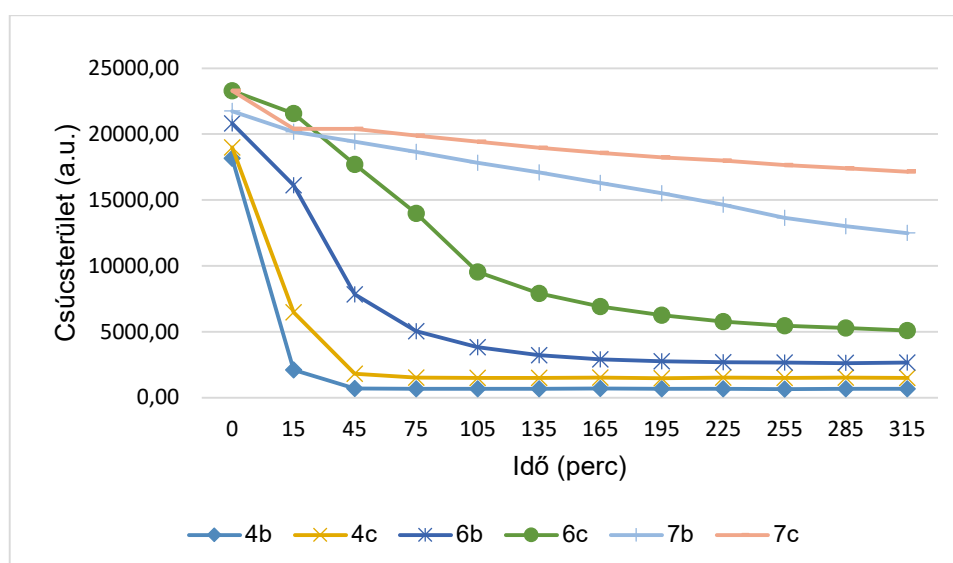
Az enyhén savas körülmények (pH 6,3) között a kalkonok reaktivitása alacsonyabb volt a pH 8,0 mellett tapasztalt értékeknél. A kiindulási **6b** és **6c** kalkonok kromatográfiás csúcsterülete (koncentrációja) a két reakcióban párhuzamosan csökkent. A GSH-val történő inkubációs időszak (315 perc) végére a **6b** és **6c** HPLC csúcsának kezdeti területe 20,1%-kal, illetve 15,1%-kal csökkent.

Amikor a vegyületeket NAC-cal inkubáltuk, a megfelelő értékek 8,3%, illetve 5,9% voltak (38. és 39. táblázat). A GSH-inkubátumokban ez esetben is csak a **6c** esetén volt detektálható két kalkon-GSH konjugátum HPLC csúcs. A 315. percben mért GSH-1/GSH-2 csúcsterület arány - a pH 8,0 körülmények között lejátszódó reakciókhoz hasonlóan – ekkor is kettő körüli érték (2,26) volt. (Z)-izomer képződése csak a **6c** inkubátumokban volt kimutatható (36. táblázat). A NAC-inkubátumok HPLC analízise során csak a **6b** esetén lehetett két konjugátumot detektálni. A NAC-1/NAC-2 csúcsterületek aránya magas, 4,91 volt. Ugyanakkor, (Z) izomer képződése volt tapasztalható (37. táblázat).

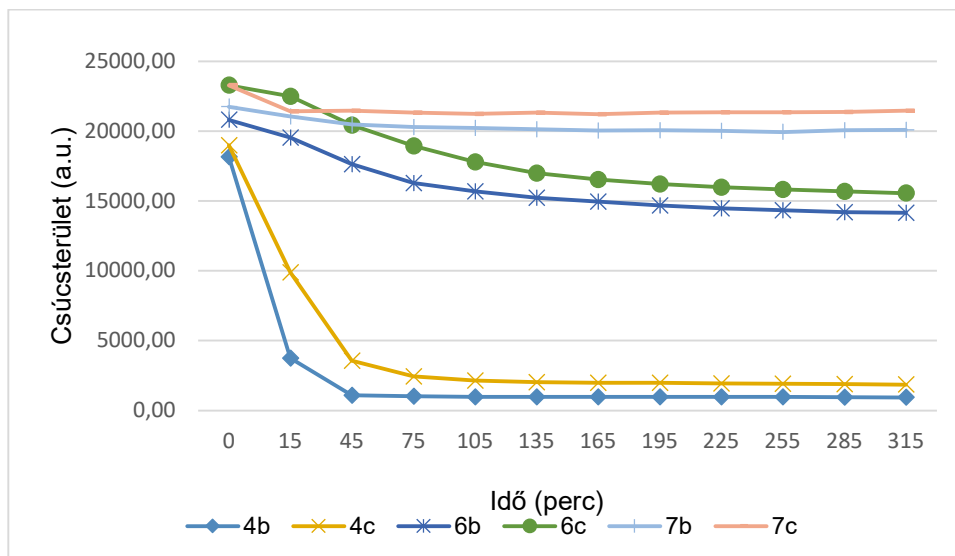
A pH 3,2 körülmények között végzett GSH-inkubálások esetén – az előzőekhez hasonlóan – egy **6b**-GSH és két **6c**-GSH kromatográfias csúcs volt detektálható. A **6c** esetén a 315. perces mintában mért GSH-1/GSH-2 csúcsterület arány 3,30 volt. (Z) izomer képződése ekkor is megfigyelhető volt (36. táblázat). A pH 3,2 körülmények között végzett NAC-inkubálások esetén szintén csak a **6b** kalkon reakciójában volt két kromatográfias csúcs detektálható. A két csúcsterület aránya a vizsgálat 315. percében 1,79 volt. (Z) izomer képződése egyik kalkon esetén sem volt detektálható.

Összehasonlítva a **6b,c** és **7b,c** kalkonok GSH-inkubátumaiban mért konjugátumok csúcsterületeinek arányait, azt tapasztaltuk, hogy a reakciók diasztereoselektivitása a pH csökkenésével enyhén nő. A NAC-inkubátumok esetén ilyen tendencia nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor, figyelemre méltó, hogy a **6b,c** és **7b** gyűrűs kalkonok pH 6,3 körülmények között lejátszódó reakcióiban igen magas (rendre 8,57-, 6,34- és 4,91-szeres) feleslegben mutatható ki a kedvezményezett diasztereomer addukt, miközben a megfelelő (Z) izomer képződése detektálható. Így ezekben az esetekben a megfigyelt diasztereomer-szelektivitás valószínűsíthetőleg nem az elsődleges addíciós reakció sztereokémiájának az eredménye.

A **4b,c**, **6b,c**, **7b,c** vegyületek GSH- és NAC-reaktivitásának összehasonlítását (pH 8,0 körülmények között) a 62. és a 63. ábra mutatja.



62. ábra. A **4b**, **4c**, kalkonok és a **6b**, **6c**, **7b** és **7c** karbociklusos kalkon-analógok HPLC-UV csúcsterületeinek változása a kalkon-GSH inkubátumokban (pH 8,0) az idő függvényében [D39]



63. ábra. A **4b**, **4c** kalkonok és a **6b**, **6c**, **7b** és **7c** karbociklusos kalkon-analógok HPLC-UV csúcsterületeinek változása a kalkon-NAC inkubátumokban (pH 8,0) az idő függvényében [D39]

A **4b,c**, **6b,c**, **7b,c**, **17a,b** és **18a,b** kalkonok összehasonlító tiol-reaktivitás vizsgálatainak elsődleges célja a vegyületek reaktivitása és daganatsejtekkel szemben mutatott *in vitro* citotoxicitása közötti összefüggés vizsgálata volt. Amint az ábrákon összefoglalt adatok mutatják, a leghatékonyabb daganatsejt citotoxicitással bíró **7c** származék a legkisebb spontán tiol-reaktivitással bír. Így feltételezhető, hogy a **7c** és a további héttagú gyűrűs kalkon-analógok megfigyelt citotoxicitása celluláris makromolekulákkal való nem-kovalens kölcsönhatásokon alapszik [418]. Ugyanakkor, a nyíltláncú kalkonok (**4**) tiol-reaktivitása jóval meghaladja a karbociklusos analógokét (**6** és **7**). Bár a **4** vegyületek citotoxicitási adatai és tiol-reaktivitásai között közvetlen kapcsolat nem állapítható meg, a tiol-reaktivitás és a hatás közötti összefüggések további vizsgálata egyik perspektivikus területe az e téren folytatandó jövőbeli kutatásoknak.

6. Összefoglalás

3.1. Szintetikus módszereket dolgoztam ki korábban alacsony hozammal előállítható, a benzilidén-molekularészen nitro-, hidroxil- és dimetilamino-szubsztituált kalkonok (**4**) és analóg (*E*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-indanonok (**5**), -tetralonok (**6**) és -benzoszuberonek (**7**) előállítására, valamint oszlopkromatográfiás tisztítására. A módszerek eredményesen alkalmazhatók voltak a tetralonszármazékok (**6**) oxigén- (**8**) és kénatomot (**9**) tartalmazó, valamint a benzilidén-molekularészt ferrocénmetilén-molekularésszel helyettesített analógok (**10-14**) előállítására is [D4-D14].

3.2. HPLC-UV módszert fejlesztettem ki a szintetizált **5-7** (*E*)-izomerek tisztaságvizsgálatára, valamint az (*E*)-izomerekből keletkező (*Z*)-izomerektől történő elválasztására. Utóbbi módszer segítségével meghatároztam a különböző gyűrűtagszámú (*E*)- és (*Z*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-indanon (**5**), -tetralon (**6**) és -benzoszuberonek (**7**) geometriai izomerpárok fotostacionárius elegyeinek összetételét. HPLC vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az azonos körülmények között besugárzott minták izomerelegyének összetételére mind a gyűrűtagszám, mind a benzilidén-molekularész szubsztituense hatást gyakorol [D16,D17].

3.3. A 4'-N(CH₃)₂-kalkon (**4d**), valamint a (*E*)-2-(4'-(N(CH₃)₂-benzilidén)-1-indanon (**5d**), -tetralon (**6d**) és -benzoszuberonek (**7d**) származékok különböző oldószerekben felvett UV-Vis abszorpciós maximumainak oldószer-indukált batokróm eltolódása a TOL<ACN<MeOH≈DMSO sorrendet követte. A vegyületek batokróm eltolódásainak sorrendje a vizsgált oldószerhatás-paraméterek közül a DN értékekkel mutatott hasonlóságot. Ez a tapasztalat jól értelmezhető a vizsgált oldószerek és a **4d-7d** vegyületek karbonilcsoportja között kialakuló kölcsönhatás eredményeként [D18-D20].

3.4. Az (*E*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-indanonok (**5**), -tetralonok (**6**) és -benzoszuberonek (**7**) elektron- és térszerkezetének vizsgálata céljából a vegyületek IR karbonil vegyértékrezgési sávjainak, valamint az enon-molekularész ¹³C NMR kémiai eltolódásértékei alapján, egy- és kétdimenziós regresszió analízis segítségével vizsgáltam a 4'-szubsztituensek elektronikus hatásainak tovaterjedését. A kapott adatok alapján megállapítható volt, hogy a benzilidén-szubsztituensek induktív és rezonancia hatásai a leghatékonyabban az öttagú (**5**), a legkisebb hatékonysággal a héttagú gyűrűs (**7**) származékok körében érvényesülnek [D15, D21]. A C(β) atom ¹³C NMR δC(β) értékei és a tér (induktív) szubsztituensállandók, valamint a Hammett-féle szigma (σ_p) állandók közötti regresszió analízisével kapott ρ értékek és vegyületek GSH-val és NAC-cal szemben mutatott reaktivitása [D33, D38, D39] hasonló sorrendet mutatott.

3.5. Közel 150, a benzilidén-molekularészen különbözőképpen szubsztituált (*E*)-2-(X-benzilidén)-1-indanon (**5**), -tetralon (**6**), -benzoszuberonek (**7**), valamint (*E*)-3-(X-benzilidén)-2,3-dihidro-1-benzopirán-4-on (**8**) és -tiopirán-4-on (**9**) származékot

állítottam elő, melyek különböző rágszáló és human karcinóma sejtvonalakon daganatellenes hatásúnak bizonyultak. Az **5-7** vegyületek *in vitro* citotoxicitásának P388, L1210 leukémia sejtekkel, valamint Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben végzett vizsgálatai alapján a héttagú gyűrűs, 4'-helyzetben metoxi- (**7c**), valamint dimetilamino-szubsztituált (**7d**) benzoszuberón-származékok bizonyultak a leghatékonyabb citotoxikus származékoknak. A **7** és az analóg (*E*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-cikloheptanon (**3**) származékok IC₅₀ értékeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy a cikloheptanon gyűrűvel kondenzált benzolgyűrű jelenléte (**7**) megnöveli az vegyületek daganatsejtekkel szemben mutatott citotoxicitását [D5,D9,D11].

3.6. Az **5-9** fenil és az analóg **10-14** ferrocenil kalkonok log P_{VRK} értékeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy a ferrocénszármazékok átlagosan 0,94 egységgel magasabb log P_{VRK} értékkel rendelkeznek [D25]. A **8a-I** 3(4'-X-benzilidén)-4-kromanon-származékok és a ferrocenil analóg **13** L1210 sejtekkel, illetve Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben kapott IC₅₀ értékei hasonló (5-10 μ M) nagyságrendűnek bizonyultak [D29]. Hasonló eredményt mutatott az **5-9** és **10-14** párok P388 sejtekkel szemben meghatározott IC₅₀ értékeinek összehasonlítása is [D25]. Mivel a **10-14** ferrocenil-kalkonok nem rendelkeznek spontán-tiol reaktivitással, így feltételezhető, hogy a vegyületek hatása a ferrocenil molekulafragmens redox tulajdonságai és/vagy a molekulák nem-kovalens kölcsönhatásainak eredményeként értéklehetők.

3.7. A daganatsejtekkel szemben mutatott toxikus hatások molekuláris mechanizmusának megismerése céljából megvizsgáltuk két különböző toxicitással bíró (*E*)-2-(4'-X-benzilidén)-1-benzoszuberón származék (**7b** és **7c**) Jurkat T-sejtek sejtciklusára gyakorolt hatását. A két vegyület ekvitoxikus dózisa hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a vegyületek erős apoptózist indukáló szerek. A hatékonyabb vegyület (**7c**) esetén kifejezett G₂/M fázisú sejtciklus gátlás és poliploid sejtek képződése volt megfigyelhető. A vegyületek sejtciklusra gyakorolt hatása alapján feltételezhető, hogy azok kölcsönhatást alakítanak ki celluláris makromolekulákkal (pl. tubulinnal, DNS-sel) [D28].

3.8. A 4'-metoxi-szubsztituált héttagú gyűrűs kalkonszármazék (**7c**), valamint nyíltláncú kalkon (**4c**) és további karbociklusos analógok (**5c,6c**) erős *in vitro* CYP 1A enzimgátló hatást mutattak [D31]. A hatást a **7c** vegyület tumorspecifikus gének expressziójára gyakorolt hatása alapján *in vivo* állatkísérletekben is igazoltuk. A vegyület csökkentette a 7,12-dimetilbenz[*a*]antracén (DMBA) okozta expresszió növekedését a c-myc, Ha-ras és p53 géneknek [D30]. Az eredmények alapján a **7c** hatékony duális (kemopreventív és daganatsejt citotoxikus) hatású vegyületek tervezésének és szintézisének kiindulási anyagának tekinthető.

3.9. Fordított fázisú vékonyréteg kromatográfiás (RF-VRK) módszer alkalmazásával igazoltuk, hogy a szintézisek során izolált (*E*)-konfigurációjú **5-7** származékok fény hatására reverzibilis (*E*)/(Z) izomerizációt szenvednek [D16]. Az (*E*)/(Z) izomer párok elválasztására GC-FID és HPLC-UV-Vis módszereket

dolgoztam ki, melyeket vizsgálataink során rutinszerűen alkalmaztunk a kiindulási kalkonszármazékok kémiai és sztereokémiai tisztaságvizsgálatára. GC vizsgálataink során összefüggést állapítottunk meg az izomerek planaritása és retenciós ideje között [D16].

3.10. Az **5-7** származékok (*E*) és (*Z*) izomerjeinek lipofilitását RF-VRK és HPLC-UV-Vis módszerekkel jellemeztük. A vegyületek RF-HPLC módszerrel meghatározott retenciós tényező (k') értékeinek összehasonlításával felismertem, hogy a gyűrűtagszám és az enon-molekularész konfigurációjának megváltoztatásával (az (*E*)-konfigurációjú vegyületek (*E*)/(*Z*)-izomerizációjával) a nyíltláncú kalkonok (**4**) mind nagyobb, mind kisebb lipofilitással rendelkező származékai állíthatók elő. A (*Z*) izomerek (*E*) izomerekhez viszonyított lipofilitása a gyűrűtagszám növekedésével párhuzamosan csökkent [D17].

3.11. Az (*E*)-konfigurációjú vegyületek körében szerkezet-hatás összefüggéseket ismertünk fel a vegyületek $\log P_{VRK}$ értékei, valamint a gyűrűtagszám és a benzilidén-molekularész szubsztituenseinek minősége és helyzete között. A **7** benzoszuberonszármazékok esetén azt találtuk, hogy egy adott szubsztituenst *orto*-, *meta*-, illetve *para*-helyzetben tartalmazó vegyületek $\log P$ értékei a $\log P_{VRK}(orto) \leq \log P_{VRK}(para) \leq \log P_{VRK}(meta)$ sorrend szerint változnak [D23].

3.12. *In vivo* állatkísérletes modellen megvizsgáltuk egy 4-hidroxikalkon (**4q**) és egy 4-hidroxikalkon *bisz*-Mannich-származékának (**16a**) vékonybélből történő felszívódását és metabolizmusát. Megállapítottuk, hogy a két kalkonszármazék vékonybélből történő felszívódása jellegzetes különbségeket mutat: a *bisz*-Mannich-származék felszívódása lassúbb. A vegyületek szulfát-, glükuronid- és glutation-konjugátumait HPLC-MS módszerrel azonosítottuk a perfúziós oldatokban [D27].

3.13. 4'-helyzetben különbözőképpen szubsztituált kalkonok (így a 4'-metil- (**4b**) és 4'-metoxikalkon (**4c**), a **4r** és **4s** 4-hidroxikalkonok, a **16a** és **16b** 4-hidroxikalkon *bisz*-Mannich-származékok, valamint a **17a** és **17b** 2-szulfonamido-3'- és 4'-nitrokalkonok, és kinolinon gyűrűs analógjai (**18a** és **18b**) GSH és NAC modell tiolvegyületekkel különböző pH értékeken lejátszódó reakciói során felismertem, hogy a **17a** és **17b** 2-szulfonamido-nitrokalkonok [D36], valamint a **16a** és **16b** 4-hidroxikalkon *bisz*-Mannich-származékok [D34] még savas (pH 3,2) körülmények között is szignifikánsan reaktívabbak mint a **4b**, **4c**, **4r** és **4s** származékok. A **16a,b** vegyületek GSH-val lejátszódó reakcióját az addíció sztereoszelektivitásának megnövekedése kísérte, ami feltételezhetően a vegyületeknek a GSH protonált amino- és tiolcsoportjával kialakított kölcsönhatásainak következménye [D35].

3.14. A **4b**, **4c** kalkonok [D33] és a karbociklusos **6b**, **6c** [D39], illetve **7b**, és **7c** gyűrűs kalkon-analógok [D38] különböző pH körülmények között lejátszódó Michael-addíciós reakciói kezdeti sebességeinek és egyensúlyi elegyeik összetételének összehasonlítása során azt találtuk, hogy a megfelelő **4** kalkonok reaktivitása nagyobb, a **7** kalkonok reaktivitása kisebb, mint a **6b**, illetve **6c** hattagú gyűrűs kalkon-analógoké. A tapasztalatok a negatív töltésű átmeneti termékek α -

helyzetű alkilcsoportok elektronküldő hatása és cikloalkén gyűrűk konformációs korlátozása okozta magasabb energiatartalmával értelmezhetők. Minden sorban a 4'-metil-szubsztituált-származékok (**4b,6b,7b**) reaktivitása meghaladta a 4'-metoxi-szubsztituált (**4c,6c,7c**) vegyületekét. Ez a 4'-metoxycsoport hatékonyabb elektronsűrűség-növelő (pozitív rezonancia) hatásával magyarázható. A citotoxicitási adatokkal történő összehasonlítás alapján megállapítható, hogy a legkiemelkedőbb daganatsejt citotoxikus hatással bíró **7c** származék hatásának kialakítása a vegyület celluláris makromolekulákkal kialakított nem-kovalens kölcsönhatásának az eredménye.

7. Eredmények hasznosíthatósága

A kalkonokkal, illetve gyűrűs kalkon-analógokkal kapcsolatos kutatások elsődleges célja új, daganatsejt citotoxikus származékok szintézise, toxicitásuk szerkezet-hatás összefüggéseinek elemzése és citotoxikus hatásuk molekuláris szintű megismerése volt. Az eddigi eredmények alapján megállapítható volt, hogy a kalkon szerkezeti egység szubsztitúciója, valamint gyűrűs származékokká történő átalakítása a vegyületek biológiai hatásai módosításának alkalmas eszközei. A két területen megismert összefüggések új szerkezettel bíró – várhatóan hatékonyabb – származékok tervezésének alapjait képezhetik.

Vizsgálataim során felismertük, hogy a kalkonok és gyűrűs analógjaik oldataiban fény-inicializált (*E*)(*Z*)-izomerizáció történik. Mivel az (*E*)- és (*Z*)-izomerek tér- és elektronszerkezete, valamint lipofilitása is különbözik, felismerésünk hozzásegített az igazoltan sztereoegységes vegyületek biológiai és kémiai vizsgálatainak reprodukálható elvégzéséhez.

Felismertem, hogy a kalkonok és vizsgált gyűrűs analógjaik lipifilitása – a biológiai hatásukat befolyásoló egyik meghatározó fizikai-kémiai tulajdonsága – hogyan változik a gyűrűtagszám, a kalkon molekuláris geometriai (*E/Z*) izomériájának, valamint a benzilidén csoport szubsztituenseinek függvényében. A szerkezet-lipofilitás összefüggések megismerése lehetőséget nyújt új kalkon-származékok log*P* tulajdonságának optimalizálásához.

A testidegen anyagok vékonybélből történő felszívódásának, metabolizmusának, valamint a vékonybél lumenbe történő kiválasztásának vizsgálatára alkalmazott állatkísérletes modell – megfelelő analitikai (HPLC-UV és HPLC-MS) módszerek kifejlesztésével kombinálva – alkalmas *in vivo* módszer új hatóanyagok vékonybélben történő komplex metabolizmusának és kiválasztódásának vizsgálatára. Saját kísérleteink során a módszert eredményesen alkalmaztuk modelvegületek (pl. 4-nitrofenol), nem-szteroid gyulladásgátlók (pl. ibuprofén), valamint kapszaicinoidok (kapszaicin és dihidrokapszaicin) vékonybélből történő eliminációjának és metabolizmusának vizsgálatára. Utóbbi vizsgálatok részét képezték a PTE Regionális Tudáscentrum keretében kifejlesztett és szabadalmaztatott, kapszaicin tartalmú *per os* gyógyszerkészítmény preklinikai vizsgálati anyagának.

A módszer – folyamatban lévő – *in vitro* körülmények közötti adaptálása alkalmazható a humán vékonybél metabolikus és transzport aktivitásának vizsgálatára is

A vegyületek tiol-reaktivitásának vizsgálati eredményei rámutattak, hogy a 4'-szubsztituált nyíltláncú kalkonok (**4**), a 2-szulfonamido-3'- és 4'-nitrokalkonok (**17a,b**) valamint a 4-hidroxikalkonok *bisz*-Mannich-származékai (**16a,b**) nagyfokú spontán tiol-reaktivással bíró származékok. Így biológiai hatásaik kialakulásában a celluláris makromolekulák reaktív tiolcsoportjaival szemben mutatott spontán tiol-reaktivitás szerepet játszhat. További származékok tervezése és szintézise új típusú kovalens-módosító hatásmechanizmussal bíró biológiailag aktív vegyületek fejlesztésének kiindulási szerkezetei lehetnek.

Ugyanakkor, a karbociklusos (**5-7**) és heterociklusos (**18a,b**) származékok tiol-reaktivása messze elmarad a nyíltláncú analógokétól. Így a két sorozat további származékainak tervezésénél utóbbi esetben az új kalkon-származékok és a célmolekula nem-kovalens kölcsönhatásának optimalizálása lehet a sikeres gyógyszerfejlesztés stratégiája.

A vegyületek spontán tiol-reaktivitásának további vizsgálata (különösképpen a nem-ionizált tiolok Michael-addíciós reakciójának mechanizmusa és sztereokémiája), a keletkező GSH-konjugátumok profarmakonként történő alkalmazása (tiol-kicserélődési reakcióinak vizsgálata) az eddigi vizsgálatok folytatásának perspektivikus területeit jelentik, mind elméleti mind gyakorlati szempontokból.

Ugyanakkor, a kifejezett ICT szerkezettel bíró (pl. dimetilamino- és metoxi-szubsztituált) kalkonok és gyűrűs kalkon analógok nemlineáris optikai rendszerek. Bár e területen ezideig nem kerestem kooperáló partnereket, a meglévő származékok vizsgálatainak eredményei alapján ez az alkalmazási lehetőség új származékok tervezését és szintézisét teheti indokolttá.

A kalkonok (különösképpen a hidrox- és metoxi-szubsztituált származékok reaktív gyökökkel lejártszódó reakcióin alapuló antioxidáns hatása jól dokumentált az irodalomban. E kémiai tulajdonságai alapján a vegyületek többek között oxidációra hajlamos (lipofil tulajdonságú) termékek stabilitásának biztosítására felhasználható vegyületek lehetnek. Egy, az anapoliszi kutatócsoporttal (Hamilton B. Napolitano, State University of Goiania, Anapolis, GA, Brazília) történő együttműködés keretében e téren új, a biodízel üzemanyag stabilitásának megnövelésére alkalmas származékok szintézise és antioxidáns (gyökfogó) hatásának szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata van folyamatban.

7. Irodalomjegyzék

7.1. Irodalomjegyzék I

I.D. Az értekezés alapját képező közlemények (*Levelező szerző)

D1. Rozmer, Z.; **Perjési, P.*** Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochem. Rev.* **2016**, *15*, 87–120. doi:10.1007/s11101-014-9387-8

D2. **Perjési, P.***; Perez, C.N.; Kulcsár, G. Synthesis of chalcones and conformationally restricted chalcone analogs. In *Chalcones and their synthetic analogs*; **Perjési, P.**, Ed.; Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, **2020**, 3-37. ISBN 9781536187946

D3. Vasková*, J.; Kocan, L.; Vasko, L.; **Perjési, P.*** Glutathione-related enzymes and proteins: A review. *Molecules.* **2023**, *28*, 1447. doi:10.3390/molecules28031447

D4. **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**, 373-403. ISBN 978-1-5361-4740-7

D5. Dimmock, J.R.; Kandepu, N.M.; Nazarali, A.J.; Kowalchuk, T.P.; Motaganahalli, N.; Quail, J.W.; Mykytiuk, P.A.; Audette, G.F.; Prasad, L.; **Perjési, P.**; Allen, T.M.; Santos, C.L., Szydlowski, J.; De Clercq, E.; Balzarini J. Conformational and quantitative structure–activity relationship study of cytotoxic 2-arylidenebenzocycloalkanones. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1358–1366. doi:10.1021/jm9806695

D5a. Dimmock, J.R.; **Perjési, P.** Gyűrűs kalkonszármazékok szintézise és tumorellenes hatásának vizsgálata. *Gyógyszerészet*, **2001**, *45*, 210-215.

D6. **Perjési, P.**; Nusser, T.; Tarczay, G.; Sohár, P. *E*-2-Benzylidenebenzocycloalkanones. Stereostructure and NMR spectroscopic investigation. *J. Mol. Struct.* **1999**, *479*, 13-19. doi:10.1016/S0022-2860(98)00805-9

D7. Tarczay, G.; Vékey, K.; Ludányi, K.; **Perjési, P.**; Sohár, P. *E*-2-Benzylidenebenzocycloalkanones. II. IR and mass spectrometric investigations. *J. Mol. Struct.* **2000**, *520*, 97-102. doi:10.1016/S0022-2860(99)00330-0

D8. Sohár, P.; **Perjési, P.**; Tornroos, K.; Husebye, S.; Vértes, A.; Vankó, G.; Bozak, R. Study on ferrocenes, Part 7. *E*-2-Ferrocenemethylene-1-benzocycloalkanones. Synthesis, stereostructure, NMR, IR X-Ray, and Mossbauer spectroscopic investigation. *J. Mol. Struct.* **2000**, *524*, 297-304. doi:10.1016/S0022-2860(00)00380-X

D9. Dimmock, J.R.; Zello, G.A.; Oloo, E.O.; Quail, J.W.; Kraatz, H.-B.; **Perjési, P.**; Aradi, F.; Takács-Novák, K.; Allen, T.M.; Santos, C.L.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Stables J.P. Correlations between cytotoxicity and topography of some 2-arylidenebenzocycloalkanones determined by X-ray crystallography. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3103–3111. doi:10.1021/jm010559p

- D10.** Sohár, P.; Csámpai, A.; **Perjési, P.** Synthesis and structure of some (*E*)-ferrocenemethylene-cycloalkanones and their benzylidene analogues.- Study on ferrocenes, Part 11. *ARKIVOC* **2003**, 2003, 114–120. doi:10.3998/ark.5550190.0004.511
- D11.** **Perjési, P.**; Das, U.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Kawase, M.; Sakagami, H.; Stables, J.P.; Loránd, T.; Rozmer, Z.; Dimmock, J.R. Design, synthesis and antiproliferative activity of some 3-benzylidene-2,3-dihydro-1-benzopyran-4-ones which display selective toxicity for malignant cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 839-845. doi:10.1016/j.ejmech.2007.06.017
- D12.** Valkonen, A.; Laihia, K.; Kolehmainen, E.; Kauppinen, R.; **Perjési, P.** Structural studies of seven homoisoflavonoids, six thio homoisoflavonoids and four structurally related compounds. *Struct. Chem.* **2012**, 23, 209–217. doi:10.1007/s11224-011-9860-6
- D13.** Oloo, E.; Quail, J.; **Perjési, P.**; Dimmock, J. 2-(2,4-dichlorophenylhydroxymethyl)-1-tetralone. *Acta Crystallogr. Sect. E-Struct. Rep. ONLINE* **2002**, 58, o582–o583. doi:10.1107/S1600536802007481
- D14.** Oloo, E.; Quail, J.; **Perjési, P.**; Dimmock, J. 2-(2,4-Dichlorophenylmethylene)-1-tetralone. *Acta Crystallogr. Sect. E-Struct. Rep. ONLINE* **2002**, 58, o580–o581. doi:10.1107/S160053680200747X
- D15.** **Perjési, P.***; Perjessy, A.; Kolehmainen, E.; Ősz, E.; Samalikova, M.; Linnanto, J.; Virtanen, E. *E*-2-Benzylidenebenzocycloalkanones III. Studies on transmission of substituent effects on IR carbonyl stretching frequencies and ¹³C NMR chemical shifts of *E*-2-(X-benzylidene)-1-indanones. Comparison with the IR data of *E*-2-(X-benzylidene)-1-indanones, -tetralones, and -benzosuberones. *J. Mol. Struct.* **2004**, 697, 41-47. doi:10.1016/j.molstruc.2004.02.006
- D16.** **Perjési, P.***; Takács, M.; Ősz, E.; Pintér, Z.; Vámos, J.; Takács-Novák, K. In-solution and on-plate light-catalyzed *E/Z* isomerization of cyclic chalcone analogues. Lipophilicity of *E*- and *Z*-2-(X-benzylidene)-1-benzosuberones. *J. Chromatogr. Sci.* **2005**, 43, 289–295. doi:10.1093/chromsci/43.6.289
- D17.** **Perjési, P.*** (*E*)-2-Benzylidenebenzocycloalkanones: Part XIII. (*E*)/(*Z*)-Isomerization of some cyclic chalcone analogues. Effect of ring size on lipophilicity of geometric isomers. *Monatsh. Chem.* **2015**, 146, 1275–1281. doi:10.1007/s00706-015-1463-2
- D18.** Fodor, K.; Tomeckova, V.; Kőszegi, T.; Kron, I.; **Perjési, P.*** (*E*)-2-Benzylidenebenzocycloalkanones: Part VI. Solvent effect on the UV and fluorescence properties of some chalcones and their cyclic analogues. Interaction of 4-dimethylaminochalcones with bovine and human serum albumin: A UV-vis study. *Monatsh. Chem.* **2011**, 142, 463-468. doi: 10.1007/s00706-011-0463-0
- D19.** Lóránd, T.; Kulcsár, G.; Horváth, P.; **Perjési, P.*** Ultra-violet and infrared spectroscopy of chalcones and cyclic chalcone analogs. Effect of the ring size and the substituents. In *Chalcones and their synthetic analogs*; **Perjési, P.**, Ed.; Nova

Science Publishers: Hauppauge, NY, USA, **2020**, 57-92. ISBN 978-1-5361-8794-6

D20. Tomecková, V.; Veliká, B.; Malhotra, S.; Revická, M.; **Perjési, P.** Determination of excited singlet-state dipole moments of methoxy and dimethylamino substituted benzylidenebenzosuberones using solvatochromic method. *Spectrosc. Lett.* **2015**, *48*, 317-323. doi:10.1080/00387010.2014.881378

D21. **Perjési, P.***; Linnanto, J.; Kolehmainen, E.; Ősz, E.; Virtanen, E. *E*-2-Benzylidenebenzocycloalkanones. IV. Studies on transmission of substituent effects on ^{13}C NMR chemical shifts of *E*-2-(X-benzylidene)-1-tetralones, and-benzosuberones. Comparison with the ^{13}C NMR data of chalcones and *E*-2-(X-benzylidene)-1-indanones. *J. Mol. Struct.* **2005**, *740*, 81-89. doi:10.1016/j.molstruc.2004.10.013

D22. Takács-Novák, K.; **Perjési, P.**; Vámos, J. Determination of $\log P$ for biologically active chalcones and cyclic chalcone analogs by RPTLC. *JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* **2001**, *14*, 42-46. doi:10.1556/JPC.14.2001.1.8

D23. Rozmer, Z.; **Perjési, P.**; Takács-Novák, K. Use of RP-TLC for determination of $\log P$ of isomeric chalcones and cyclic chalcone analogues. *JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* **2006**, *19*, 124-128. doi:10.1556/JPC.19.2006.2.7

D24. Rozmer, Z.; **Perjési, P.*** (*E*)-2-Benzylidenebenzocyclanones: Part X. Determination of $\log P$ of (*E*)-3-benzylidene-2,3-dihydro-1-benzopyran-4-ones by RP-TLC. Effect on $\log P$ of incorporation of oxygen atom into carbocyclic chalcone analogues. *JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* **2013**, *26*, 284-288. doi:10.1556/JPC.26.2013.3.14

D25. **Perjési, P.***; Takács-Novák, K.; Rozmer, Z.; Sohár, P.; Bozak, R.; Allen, T. Comparison of structure, $\log P$ and P388 cytotoxicity of some phenyl and ferrocenyl cyclic chalcone analogues. Application of RP-TLC for $\log P$ determination of the ferrocenyl analogues. *Cent. Eur. J. Chem.* **2012**, *10*, 1500-1505. doi:10.2478/s11532-012-0088-0

D26. Bernardes, A.; Kuzma, M.; Almási, A.; Mayer, M.; Pérez, C.N.; **Perjési, P.*** HPLC and HPLC-MS analysis of intestinal elimination and phase 2 metabolism of 4'-hydroxy-4-methoxychalcone and its bis-Mannich analog in the rat. *Open Med. Chem. J.* **2022**, *16*, e187410452208110. doi:10.2174/18741045-v16-e2208110

D27. Das, U.; Loránd, T.; Dimmock, S.G.; **Perjési, P.**; Dimmock, J.R. 3-Benzylidene-4-chromanones: A novel cluster of anti-tubercular agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, *30*, 259-263. doi:10.3109/14756366.2014.913036

D28. Rozmer, Z.; Berki, T.; **Perjési, P.*** Different effects of two cyclic chalcone analogues on cell cycle of Jurkat T cells. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 1354-1362. doi:10.1016/j.tiv.2006.05.006.

D29. Vasková, J.; Daniel, Z.; Vasko, L.; **Perjési, P.**; Porácová, J.; Mojzisoová, G. Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2015**, *51*, 964-974. doi:10.1007/s11626-015-9919-6

- D30. Perjési, P.***; Bayer, Z.; Ember, I.A. Effect of *E*-2-(4-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo I: A 24-hour experiment. *Anticancer Res.* **2000**, 20, 475–482.
- D31.** Monostory, K.; Tamási, V.; Vereczkey, L.; **Perjési, P.*** A study on CYP1A inhibitory action of *E*-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone and some related chalcones and cyclic chalcone analogues. *Toxicology* **2003**, 184, 203–210. doi:10.1016/S0300-483X(02)00578-4
- D32.** Rozmer, Z.; Berki, T.; Maász, G.; **Perjési, P.*** Different effects of two cyclic chalcone analogues on redox status of Jurkat T cells. *Toxicol. In Vitro* **2014**, 28, 1359-1365. doi:10.1016/j.tiv.2014.06.006
- D33.** 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
- D34.** Bernardes, A.; Pérez, C.N.; Mayer, M.; daSilva, C.C.; Martins, F.T.; **Perjési, P.*** Study of reactions of two Mannich bases derived of 4'-hydroxychalcones with glutathione by RP-TLC, RP-HPLC and RP-HPLC-ESI-MS analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, 28, 1048–1062. doi: 10.21577/0103-5053.20160260
- D35.** Bernardes, A.; D'Oliveira, G.D.; Silezin, A.; Kuzma, M.; Molnár, S.; Noda Pérez, C.; **Perjési, P.*** Reagent-induced asymmetric induction in addition reaction of reduced glutathione onto bis-Mannich chalcones. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2018**, 351, 1700386. doi: 10.1002/ardp.201700386
- D36.** d'Oliveira, G.D.; Custodio, J.M.; Moura, A.F.; Napolitano, H.B.; Pérez, C.N.; Moraes, M.O.; Prókai, L.; **Perjési, P.*** Different reactivity to glutathione but similar tumor cell toxicity of chalcones and their quinolinone analogues. *Med. Chem. Res.* **2019**, 28, 1448–1460. doi: 10.1007/s00044-019-02384-8
- D37. Perjési, P.***; Maász, G.; Reisch, R.; Benkő, A. (*E*)-2-Benzylidenecyclanones: Part VII. Investigation of the conjugation reaction of two cytotoxic cyclic chalcone analogues with glutathione: An HPLC–MS study. *Monatsh. Chem.* **2012**, 143, 1107–1114. doi:10.1007/s00706-012-0768-7
- D38.** 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. doi:10.3390/ijms24108557
- D39.** Kenari, F.; Pintér, Z.; Molnár, S.; Borges, I.D.; Camargo, A.J.; Napolitano, H.B.; **Perjési, P.*** (*E*)-2-Benzylidenecyclanones: Part XIX. Reaction of (*E*)-2-(4'-X-benzylidene)-1-tetralones with cellular thiols: Comparison of thiol reactivities of open-chain chalcones and their six- and seven-membered cyclic analogs. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 7773. <https://doi.org/10.3390/ijms25147773>

I.S. Az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények (*Levelező szerző)

S1. Bognár, G.; Kenari, F.; Pintér, Z.; Borges, I.D.; Camargo, A.J.; Oliveira, H.C B.; Sanches-Neto, F.O.; Carvalho-Silva, V.H.; Napolitano, H.B.; **Perjési, P.*** (*E*)-2-Benzylidenecyclanones: Part XX. Reaction of cyclic chalcone analogs with cellular thiols: Unexpected increased reactivity of 4-chromanone- compared to 1-tetralone analogs in thia-Michael reactions. *Molecules* **2024**, 29, 5493. doi:10.3390/molecules29235493

S2. Perjési, P. (Editor). *Glutathione. Chemistry and Biochemistry*. MDPI. Basel, Switzerland, **2023**. ISBN 9783036586670

S3. Kenari, F.; Molnár, S.; Zoltán, P.; Sobhan, B.; **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

S4. Aguiar, A.S.N.; Borges, I.D.; Borges, L.L.; Dias, L.D.; Camargo, A.J.; **Perjési, P.**; Napolitano, H.B. New insights on glutathione's supramolecular arrangement and its in silico analysis as an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Molecules* **2022**, 27, 7958. doi:10.3390/molecules27227958

S5. Duarte, V.S.; Paula, R.L.G.; Custodio, J.M.F.; D'Oliveira, G.D.C.; Borges, L.L.; Pérez, C.N.; **Perjési, P.**; Oliver, A.G.; Napolitano, H.B. A new quinolinone-chalcone hybrid with potential antibacterial and herbicidal properties using in silico approaches. *J. Mol. Model.* **2022**, 28, 176. doi:10.1007/s00894-022-05140-9

S6. Perjési, P.* Bevezető a Pécsi Tudományegyetemen folyó újabb kutatások néhány eredményének bemutatásához. *Magy. Kém. Foly.* **2022**, 128, 50-52. doi: 10.24100/MKF.2022.02.50

S7. 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.* **2022**, 128, 53-59. doi: 10.24100/MKF.2022.02.53

S8. Custodio, J.M.F.; Vaz, W.F.; Bernardes, A.; Moura, A.F.; Oliver, A.G.; Molnár, S.; **Perjési, P.**; Perez, C.N. Alternative mechanisms of action for the apoptotic activity of terpenoid-like chalcone derivatives. *New J. Chem.* **2021**, 45, 15267-15279. doi:10.1039/D1NJ02086B

S9. Ferreira, L.O.A.; Molnár, S.; Martins, F.T.; **Perjési, P.**; Keng Queiroz, L.H.; Perez, C.N. Michael addition reaction of symmetrically halogenated bischalcones with reduced glutathione assessed by RP-HPLC and RP-HPLC-ESI-MS. *Microchem. J.* **2021**, 169, 106603. doi:10.1016/j.microc.2021.106603

S10. Perjési, P. (Editor). *Chalcones and their synthetic analogs*. Nova Science Publishers. Hauppauge, NY, USA. **2020**. ISBN 9781536187946

- S11.** Prókai, L.; Molnár, S.; **Perjési, P.** Mass Spectrometry of Natural and Synthetic Chalcones. In *Chalcones and their synthetic analogs*; **Perjési, P.** (Editor). Nova Science Publishers. Hauppauge, NY, USA. **2020**, 39–56. ISBN 9781536187946
- S12.** Vasková, J.; **Perjési, P.** Antioxidant and prooxidant effects of cyclic chalcones and ferrocenylchalcone analogs in mitochondria. In: *Chalcones and their synthetic analogs*; **Perjési, P.** (Editor). Nova Science Publishers. Hauppauge, NY, USA. **2020**, 135-173. ISBN 9781536187946
- S13.** Rozmer, Z.; Bernardes, A.; Pérez, C.N.; **Perjési, P.*** Study on the interaction of 4'-hydroxychalcones and their Mannich derivatives with calf thymus DNA by TLC and spectroscopic methods, a DNA cleavage study. *Open Med. Chem. J.* **2020**, 14, 122-131. doi:10.2174/1874104502014010122
- S14.** Rozmer, Z.; **Perjési, P.** Study on the interaction of some (*E*)-2-benzylidenebenzosuberone derivatives with serum albumin by UV-Vis method, Inhibitory effect on topoisomerase. *J. Pharm. Biopharm. Res.* **2020**, 2, 118-125. doi:10.25082/JPBR.2020.01.003
- S15.** **Perjési, P.** (Editor). *Glutathione: Biosynthesis, Functions and Biological Implications*. Nova Science Publishers. Hauppauge, NY, USA, **2019**. ISBN 9781536147407
- S16.** **Perjési, P.***; Perez, C.N.; Napolitano, H.B.; Mohammed, H. Physico-chemical characterization of glutathione (GSH). In *Glutathione: Biosynthesis, Functions and Biological Implications*; **Perjési, P.** (Editor). Nova Science Publishers. Hauppauge, NY, USA. **2019**, 3-53. ISBN 9781536147407
- S17.** **Perjési P.***; Perez, C.N.; Bernardes A.; d'Oliveira, G.D.; Kenari, F. The chemistry of GST-catalyzed reactions. In *Glutathione: Biosynthesis, Functions and Biological Implications*; **Perjési, P.** (Editor). Nova Science Publishers. Hauppauge, NY, USA. **2019**, 373-403. ISBN 9781536147407
- S18.** Konkolová, E.; Janocková, J.; **Perjési, P.**; Vasková, J.; Kozurková, M. Selected ferrocenyl chalcones as DNA/BSA-interacting agents and inhibitors of DNA topoisomerase I and II activity. *J. Organomet. Chem.* **2018**, 861, 1-9. doi:10.1016/j.jorganchem.2018.01.031
- S19.** Custodio, J.; d'Oliveira, G.; Perez, C.N.; **Perjési, P.**; Napolitano, H. Structural changes and control on conjugation of glutathione with chalcones and their quinolinone analogues. *Acta Crystallogr. Found. Adv.* **2018**, 74, A271–A271. doi:10.1107/S0108767318097283
- S20.** **Perjési, P.***; Földesi, A.; Batta, G. (*E*)-2-Benzylidenecyclanones: Part XV. Stereochemistry of reaction of 2-arylidene-cyclopentanones with dithiocarbamic acid. *MOJ Bioorg. Inorg. Chem.* **2018**, 2, 00046.
- S21.** Rozmer, Z.; Marton, E.; **Perjési, P.*** (*E*)-2-Benzylidenecyclanones: Part XIV. Study on interaction of some (*E*)-2-benzylidenebenzosuberone derivatives with calf thymus DNA by TLC and UV-Vis methods, a DNA cleavage study. *Med. Chem. Res.* **2017**, 26, 2172–2179. doi:10.1007/s00044-017-1924-8

- S22.** Kello, M.; Drutovic, D.; Pilatova, M.B.; Tischlerova, V.; **Perjési, P.**; Mojzis, J. Chalcone derivatives cause accumulation of colon cancer cells in the G2/M phase and induce apoptosis. *Life Sci.* **2016**, *150*, 32-38. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.073
- S23.** Velika B.; Tomeckova, V.; Fodor, K.; Kron, I.; **Perjési, P.*** (E)-2-Benzylidenecycloalkanones XIII. Kinetic measurement of bovine and human serum albumine interaction with selected chalcones and their cyclic chalcone analogues by UV spectrophotometry. *Spectr. Anal. Rev.* **2015**, *3*, 1-8. doi:10.4236/sar.2015.31001
- S24.** Tomeckova, V.; Revicka, M.; Sassen, A.; Velika, B.; Stupak, M.; **Perjési, P.** Spectroscopic study on the interaction of 4-dimethylaminochalcones with phospholipids. *J. Appl. Spectrosc.* **2014**, *81*, 812-819. doi:10.1007/s10812-014-0010-y
- S25.** Drutovic, D.; Chripkova, M.; Pilatova, M.; Kruzliak, P.; **Perjési, P.**; Sarissky, M.; Lupi, M.; Damia, G.; Broggin, M.; Mojzis, J. Benzylidenetetralones, cyclic chalcone analogues, induce cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 9967-9975. doi:10.1007/s13277-014-2289-y
- S26.** Ivanova, L.; Varinska, L.; Pilatova, M.; Gal, P.; Solar, P.; **Perjési, P.**; Smetana, K.J.; Ostro, A.; Mojzis, J. Cyclic chalcone analogue KRP6 as a potent modulator of cell proliferation: An in vitro study in HUVECs. *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 4571-4580. doi:10.1007/s11033-013-2547-x
- S27.** Varinska, L.; Van, W.M.; Belleri, M.; Mitola, S.; **Perjési, P.**; Presta, M.; Koolwijk, P.; Ivanova, L.; Mojzis, J. Anti-angiogenic activity of the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *691*, 125-133. doi:10.1016/j.ejphar.2012.06.017
- S28.** Kron, I.; Pudychová-Chovanová, Z.; Veliká, B.; Guzy, J.; **Perjési, P.** (E)-2-Benzylidenebenzocycloalkanones, Part VIII: Spectrophotometric determination of pK_a values of some natural and synthetic chalcones and their cyclic analogues. *Monatsh. Chem.* **2012**, *143*, 13-17. doi:10.1007/s00706-011-0633-0
- S29.** Budán, F.C.; Szabó, I.; Varjas, T.; Nowrasteh, G.; Balogh, S.; Németh, Á.; Huszár, A.; Iványi, J.; Pajkos, G.; Varga, Z.; Orsós, Z.; Boncz, I.; Csejtej, A.; Sebestyén, A.; **Perjési, P.**; Ember, I.; Kiss, I. The potential chemopreventive effect of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on gene expression levels of mice exposed to N-methyl-N-nitrosourea. *J. Proactive Med.* **2012**, *1*, 5-12.
- S30.** Pilatova, M.; Varinska, L.; **Perjési, P.**; Sarissky, M.; Mirossay, L.; Solar, P.; Ostro, A.; Mojzis, J. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1347-1355. doi:10.1016/j.tiv.2010.04.013
- S31.** Tomeckova, V.; Poskrobova, M.; Stefanisinova, M.; **Perjési, P.** Some fluorescence properties of dimethylaminochalcone and its novel cyclic analogues. *Spectrochim. Acta Part Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *74*, 1242-1246. doi:10.1016/j.saa.2009.09.048

S32. Ember, I.A.; Németh, Á.; Varga, C.; **Perjési, P.**; Arany, I.; Fehér, K.; Németh, K.; Dombi, Z.; Kiss, I. Molecular epidemiologic markers: A new concept in the preventive medicine with special attention to the prevention of cancer. *Central Eur. J. Occup. Environ. Med.* **2005**, *11*, 3-15.

S33. **Perjési, P.***; Gyöngyi, Z.; Bayer, Z. Effect of *E*-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo II: A 48-hour experiment. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 1839–1848.

S34. Sohár, P.; Csámpai, A.; **Perjési, P.**; Zsoldos-Mády, V.; Ábrán, Á.; Túrós, Gy. Ferrocénszubsztituált heterociklusok szintézise és szerkezetvizsgálata. In: Majdik, K (szerk.) VI. Nemzetközi Vegyészkonferencia. Kolozsvár, Románia. Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság (EMT). **2000**, 160-163.

S35. Al-Nakib, T.; **Perjési, P.**; Varghese, R.; Meegan, M. Benzylideneindanones and benzylidenebenzosuberones. Relationship between structure, antimycotic activity and acute toxicity. *Med. Princ. Pract.* **1997**, *6*, 14-21. doi:10.1159/000157418

S36. Perjessy, A.; Loos, D.; **Perjési, P.**; Lacova, L. Investigation of transmission of substituent effects in 2-arylidene derivatives of cyclohexanone, tetralone and 3-oxo-2,3-dihydro-1-thia-3a,8-diazacyclopent[a]Indene by infrared spectroscopy and theoretical methods. *Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comen. - Genet. Biol. Mol.* **1992**, *40*, 33-53.

S37. Geribaldi, S.; Girault, Y.; **Perjési, P.**; Tortajada, J. Transmission of substituent effects through unsaturated systems Part 71. Influence of substituent on infrared and ¹³C NMR properties in rigid cisoid and transoid conformations of α-enones. *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.* **1992**, *48*, 879-892. doi:10.1016/0584-8539(92)80085-B

I.N. Az értekezés témájához nem kapcsolódó saját közlemények

N1. Morais, A.C.B.; Aguiar, A.S.N.; **Perjési, P.**; Napolitano, H.B.; Borges, L.L. A comprehensive molecular description of sertraline hydrochloride: From solid state to electronic structure. *Comput. Theor. Chem.* **2024**, *1242*, 114957.

N2. Turones, L.C.; Moreira, C.V.L.; Ogbu, J.I.; **Perjési, P.**; Borges, I.D.; Napolitano, H.B.; Ibrahim, M.A.; Costa, E.A.; Fajemiroye, J.O. Centrally acting chalcones: From anticancer and antinociceptive properties to molecular considerations *Curr. Pharmacol. Reports* **2024**, *11*, 1. doi: 10.1007/s40495-024-00385-9

N3. Monteiro, M.S.M.; Aguiar, A.S.N.; Camargo, A.J.; **Perjési, P.**; Catao, A.J.L.; Napolitano, H.B. Chlorine counterion effect into the supramolecular arrangement of phenylephrine solid state. *Comput. Theor. Chem.* **2023**, *1220*, 113992. doi:10.1016/j.comptc.2022.113992.

N4. Santos, J.R.; Sallum, L.O.; Silva, M.C.; Aguiar, A.S.N.; Martins, J.L.R.; **Perjési, P.**; Camargo, A.J.; Napolitano, H.B. Molecular modeling and solubility of olopatadine hydrochloride polymorphs. *Comput. Theor. Chem.* **2023**, *1224*, 114110. doi:10.1016/j.comptc.2023.114110

- N5.** Duarte, V.S.; Paula, R.L.G.; Custodio, J.M F.; d'Oliveira, G.D.C.; Borges, L.L.; Pérez, C.N.; **Perjési, P.**; Oliver, A.G.; Napolitano, H.B. A new quinolinone-chalcone hybrid with potential antibacterial and herbicidal properties using in silico approaches. *J. Mol. Model.* **2022**, *28*, 176. doi: 10.1007/s00894-022-05140-9
- N6.** Molnár, S.; Kulcsár, G.; **Perjési, P.** Determination of steroid hormones in water samples by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry using parallel reaction monitoring. *Microchem. J.* **2022**, *175*, 107105. doi:10.1016/j.microc.2021.107105.
- N7.** Santos, M.O.; Borges, I.D.; Santin, L.G.; Oliveira, S.S.; Rosseto, L.P.; Sallum, L.O.; Camargo, A.J.; Fajemiroye, J.O.; **Perjési, P.**; Napolitano, H.B. Structural insights and supramolecular description of gliclazide and its impurity F. *Comput. Theor. Chem.* **2022**, *1212*, 113707. doi:10.1016/j.comptc.2022.113707
- N8.** Mohammed, H.; Almási, A.; Molnár, S.; **Perjési, P.** The intestinal and biliary metabolites of ibuprofen in the rat with experimental hyperglycemia. *Molecules* **2022**, *27*, 4000. doi:10.3390/molecules27134000
- N9.** Mohammed, H.; Almási, A.; **Perjési, P.** Effect of experimental hyperglycemia on intestinal elimination and biliary excretion of ibuprofen enantiomers in hyperglycemic rats. *J. Pharm. Biopharm. Res.* **2022**, *4*, 283-295. doi:10.25082/JPBR.2022.02.001.
- N10.** Lóránd, T.; **Perjési, P.** Heterociklusos vegyületek szintézise a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Kémiai Intézetében. *Magy. Kém. Foly.* **2022**, *128*, 92-101.
- N11.** Silva, O.N.; Neves, B.J.; Rosseto, L.P.; Moura, R.S.; Napolitano, H.B.; Brito, W.; Fajemiroye, J.O.; Pinto, E.; **Perjési, P.**; Martins, J.L.R. Starting anti-COVID-19 drug discovery with natural products. *Front. J. Soc. Technol. Environ. Sci.* **2021**, *10*, 241-270. doi:10.21664/2238-8869.2021v10i1
- N12.** Wenceslau, P.R.S.; de Paula, R.L.G.; Duarte, V.S.; D'Oliveira, G.D.C.; Guimaraes, L.M.M.; Perez, C.N.; Borges, L.L.; Martins, J.L.R.; Fajemiroye, J.O.; Franco, C.H.J.; **Perjési, P.**; Napolitano, H.B. Insights on a new sulfonamide chalcone with potential antineoplastic application. *J. Mol. Model.* **2021**, *27*, 211. doi:10.1007/s00894-021-04818-w
- N13.** Almási, A.; **Perjési, P.**; Fischer, E. The relative importance of the small intestine and the liver in Phase II metabolic transformations and elimination of *p*-nitrophenol administered in different doses in the rat. *Sci. Pharm.* **2020**, *88*, 51. doi:10.3390/scipharm88040051.
- N14.** Huber, I.; Rozmer, Z.; Gyöngyi, Z.; Budán, F.; Horváth, P.; Kiss, E.; **Perjési, P.** Structure activity relationship analysis of antiproliferative cyclic C5-curcuminoids without DNA binding: Design, synthesis, lipophilicity and biological activity. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1206*, 127661. doi:10.1016/j.molstruc.2019.127661
- N15.** Kuzma, M.; Murányi, V.; Mayer, M.; Rozmer, Z.; **Perjési, P.** Development and validation of a stability-indicating HPLC assay method for determination of ethacrynic acid in solution formulation. HPLC-MS identification of hydrolytic and

oxidative degradation products. *J. Pharm. Biopharm. Res.* **2020**, *2*, 131-144. doi:10.25082/JPBR.2020.01.005

N16. Vasková, J.; **Perjési, P.** Antioxidant and prooxidant effects of cyclic chalcones and ferrocenylchalcone analogs in mitochondria. In *Chalcones and their Synthetic Analogs*; **Perjési, P.** (Editor). Nova Science Publishers, Inc., **2020**, 135-173. ISBN 978-153618794-6.

N17. Zatko, D.; Vasková, J.; **Perjési, P.**; Haus, M.; Vasko, L. Pro-oxidative and antioxidant effects of salicylates. *Chem. Papers* **2020**, *74*, 3161-3168. doi:10.1007/s11696-020-01152-y

N18. Szolcsányi, J.; Mózsik, G.; **Perjési, P.**; Past, T. Compositions Containing Capsaicinoids. Európai szabadalom. EP2219610A2. **2019**.

N19. Kuzma, M.; Fodor, K.; Almási, A.; Mózsik, G.; Past, T.; **Perjési, P.** Toxicokinetic study of a gastroprotective dose of capsaicin by HPLC-FLD method. *Molecules* **2019**, *24*, 2848. doi:10.3390/molecules24152848

N20. Huber, I.; Zupkó, I.; Gyovai, A.; Horváth, P.; Kiss, E.; Gulyás-Fekete, G.; Schmidt, J.; **Perjési, P.** A Novel cluster of C5-curcuminoids: Design, synthesis, in vitro antiproliferative activity and DNA binding of bis(arylidene)-4-cyclanone derivatives based on 4-hydroxycyclohexanone scaffold. *Res. Chem. Intermed.* **2019**, *45*, 4711-4735. doi:10.1007/s11164-019-03859-4

N21. Kovács, N.-P.; Almási, A.; Garai, K.; Kuzma, M.; Vancea, S.; Fischer, E.; **Perjési, P.** Investigation of intestinal elimination and biliary excretion of ibuprofen in control and hyperglycemic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2019**, *97*, 1080-1089. doi:10.1139/cjpp-2019-0164

N22. Almási, A.; Pinto, E.; Kovács, N.-P.; Fischer, T.; Markovics, Z.; Fischer, E.; **Perjési, P.** Changes in hepatic metabolic enzyme activities and biliary excretion of 4-nitrophenol in streptozotocin induced diabetic rats. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2018**, *54*, e17347. doi:10.1590/s2175-97902018000117347.

N23. Kuzma, M.; Kovács, N.; Sziva, L.; Maász, G.; Avar, P.; **Perjési, P.** Oxidation of hydroxy- and dihydroxybenzoic acids under the Udenfriend's conditions. An HPLC study. *Open Med. Chem. J.* **2018**, *12*, 13-22. doi:10.2174/1874104501812010013

N24. Fliszár-Nyúl, E.; Kuzma, M.; Mayer, M.; Lakatos, S.; Almási, A.; **Perjési, P.** HPLC study on Fenton-reaction initiated oxidation of salicylic acid. Biological relevance of the reaction in intestinal biotransformation of salicylic acid. *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 1040-1051. doi:10.1080/10715762.2018.1517260

N25. Kuzma, M.; Fliszár-Nyúl, E.; Mayer, M.; Fischer, E.; **Perjési, P.** HPLC analysis of in vivo intestinal absorption and oxidative metabolism of salicylic acid in the rat. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30*, 2044-2052. doi:10.1002/bmc.3783

N26. Kuzma, M.; Fodor, K.; Maász, G.; Avar, P.Á.; Mózsik, G.; Past, T.; Fischer, E.; **Perjési, P.** A validated HPLC-FLD method for analysis of intestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in the rat. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *103*, 59-66. doi:10.1016/j.jpba.2014.10.007

- N27.** Kuzma, M.; Fodor, K.; Boros, B.; **Perjési, P.** Development and validation of an HPLC-DAD analysis for pharmacopoeial qualification of industrial Capsicum extracts. *J. Chromatogr. Sci.* **2015**, *53*, 16-23. doi:10.1093/chromsci/bmu004.
- N28.** Fischer, E.; Almási, A.; Bojcsev, S.; Fischer, T.; Kovács, N.-P.; **Perjési, P.** Effect of experimental diabetes and insulin replacement on intestinal metabolism and excretion of 4-nitrophenol in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *93*, 459-464. doi:10.1139/cjpp-2015-0065
- N29.** Huber, I.; Zupkó, I.; Kovács, J.I.; Minorics, R.; Gulyás, G.; Maász, G.; **Perjési, P.** Synthesis and antiproliferative activity of cyclic arylidene ketones: Direct comparison of monobenzylidene and dibenzylidene derivatives. *Monatsh. Chem.* **2015**, *146*, 973-981. doi:10.1007/s00706-015-1426-7
- N30.** Poór, M.; Kuzma, M.; Matisz, G.; Li, Y.; **Perjési, P.**; Kunsági-Máté, S.; Kőszegi, T. Further aspects of ochratoxin A – cation interactions: Complex formation with zinc ions and a novel analytical application of ochratoxin A – magnesium interaction in the HPLC-FLD system. *Toxins* **2014**, *6*, 1295-1307. doi:10.3390/toxins6041295
- N31.** Almási, A.; Bojcsev, S.; Fischer, T.; Simon, H.; **Perjési, P.**; Fischer, E. Metabolic enzyme activities and drug excretion in the small intestine and in the liver in the rat. *Acta Physiol. Hung.* **2013**, *100*, 478–488. doi:10.1556/APhysiol.100.2013.015
- N32.** Bojcsev, S.; Almási, A.; Simon, H.; **Perjési, P.**; Fischer, E. Investigation of drug metabolism in various segments of small intestine in the rat. *Acta Physiol. Hung.* **2013**, *100*, 115-123. doi:10.1556/APhysiol.99.2012.002
- N33.** Kuzma, M.; Past, T.; Mózsik, G.; **Perjési, P.** Pharmacobotanical analysis and regulatory qualification of capsicum fruits and capsicum extracts. A survey. In *Current Topics in Gastritis - 2012*; Mózsik, G., Ed.; IntechOpen: Rijeka, **2013**, 21-74. ISBN 978-953-51-0907-5
- N34.** Mózsik, G.; Past, T.; Habon, T.; Keszthelyi, Z.; **Perjési, P.**; Kuzma, M.; Sándor, B.; Szolcsányi, J.; Abdel-Salam, O.; Szalai, M. Capsaicin is a new gastrointestinal mucosal protecting drug candidate in humans: Pharmaceutical development and production based on clinical pharmacology. In *Current Topics in Gastritis - 2012*; Mózsik, G., Ed.; IntechOpen: Rijeka, **2013**, 265-364. ISBN 978-953-51-0907-5.
- N35.** Vaskova, J.; Reisch, R.; Vasko, L.; Poskrobova, M.; Kron, I.; Guzy, J.; **Perjési, P.** Effect of selected dimethylaminochalcones on some mitochondrial activities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2013**, *49*, 354-359. doi:10.1007/s11626-013-9600-x.
- N36.** Almási, A.; Fischer, E.; **Perjési, P.** HPLC quantification of 4-nitrophenol and its conjugated metabolites from bile. *Sci. Pharm.* **2011**, *79*, 837-847. doi:10.3797/scipharm.1106-22
- N37.** Budán, F.C.; Szabó, I.; Ember, Á.; Horváth, Ö.P.; Illényi, L.; Orsós, Z.; De Blasio, A.; Magda, I.; Gracza, T.; **Perjési, P.**; Dávid, T.; Nowrasteh G.; Ember, I.

Effect of *Unicaria* and *Tabebuia* extracts on molecular epidemiological biomarkers in patients with colorectal cancer. *Acta Aliment. Int. J. Food Sci.* **2011**, *40*, 356-363. doi:10.1556/AAlim.2010.0012

N38. Ember, Á.; Budán, F.C.; Nowrasteh, G.; Varjas, T.; Prantner, I.; Göbel, G.; Horváth, Ö.P.; Illényi, L.; Cseh, J.; **Perjési, P.**; Orsós, Z.; Gergely, P.; Fehér, K.; Ember, I.; Kiss, I. Application of molecular epidemiological biomarkers by monitoring the effects of treatment in colorectal cancer during follow-up study. *Eur. J. Oncol.* **2011**, *16*, 99-104.

N39. Hajtó, T.; Fodor, K.; **Perjési, P.**; Németh, P. Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence-based medicine. *Evid. Based Compl. Alternat. Med.* **2011**, *2011*, 298972. doi:10.1093/ecam/nep191

N40. **Perjési, P.**; Rozmer, Z. Kinetic analysis of some chalcones and synthetic chalcone analogues on the Fenton-reaction initiated deoxyribose degradation assay. *Open Med. Chem. J.* **2011**, *5*, 61-67. doi:10.2174/1874104501105010061

N41. Guzy, J.; Vasková-Kubalkova, J.; Rozmer, Z.; Fodor, K.; Marekova, M.; Poskrobova, M.; **Perjési, P.** Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 567-570. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.098

N42. Mózsik, G.; Past, T.; Dömötör, A.; Kuzma, M.; **Perjési, P.** Production of orally applicable new drug or drug combinations from natural origin Capsaicinoids for human medical therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1197-1208. doi:10.2174/138161210790945896

N43. Budán, F.C.; Varjas, T.; Nowrasteh, G.; Prantner, I.; Varga, Z.; Ember, Á.; Cseh, J.; Gombos, K.; Pázsit, E.; Göbel, G.; Bauer, M.; Gracza, T.; Arany, I.; **Perjési, P.**; Ember, I.; Kiss, I. Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by chemical carcinogens (DMBA, MNU). *In Vivo* **2009**, *23*, 591-598.

N44. Ember, Á.; Budán, F.C.; Nowrasteh, G.; Varjas, T.; Göbel, G.; Horváth, Ö.P.; Illényi, L.; Cseh, J.; **Perjési, P.**; Gergely, P.; Ember, I.; Kiss, I. Molekuláris biomarkerek alkalmazása kolorektális karcinómás betegekben, a műtéti hatás monitorozása követéses vizsgálattal. *Egészségtudomány* **2009**, *53*, 50-60.

N45. Kubalkova, J.; Tomescova, V.; **Perjési, P.**; Guzy, J. Assessment of the effect of cyclic chalcone analogues on mitochondrial membrane and DNA. *Cent. Eur. J. Biol.* **2009**, *4*, 90-96. doi:10.2478/s11535-008-0057-y

N46. Mózsik, G.; Past, T.; E Abdel Salam, O.M.; Kuzma, M.; **Perjési, P.** Interdisciplinary review for correlation between the plant origin Capsaicinoids, nonsteroidal inflammatory drugs, gastrointestinal mucosal damage and prevention in animals and human beings. *Inflammopharmacology* **2009**, *17*, 113-150. doi:10.1007/s10787-009-0002-3

N47. Mózsik, G.; Dömötör, A.; Past, T.; Vas, V.; **Perjési, P.**; Kuzma, M.; Blazics, G.; Szolcsányi, J. *Capsaicinoids. From the Plant Cultivation to the Production of*

the Human Medical Drug. Akadémiai Kiadó, Budapest, **2009**. ISBN 9789630586948

N48. Budán, F.C.; Varjas, T.; Varga, Z.; Cseh, J.; Ungár Tamás Lászlóné Polyák, É.; **Perjési, P.**; Gyöngyi, Z.; Ember, I.A. Környezeti metil-nitrozo-urea expozíció lehetséges molekuláris biomarkereinek vizsgálata. *Magy. Epidemiológia* **2008**, 5, 55–62.

N49. Fehér, K.; Prantner, I.; Kiss, I.; Varjas, T.; Gyöngyi, Z.; **Perjési, P.**; Németh, K.; Nowrasteh, G.; Dombi, Z.; Ember, I.A. Molekuláris epidemiológiai biomarkerek a preventív és prediktív medicinában, különös tekintettel a daganat kemoprevenzióra. *Bull. Med. Sci. Orvostudományi Ért.* **2008**, 81, 163-168.

N50. **Perjési, P.**; Kubalkova, J.; Chovanova, Z.; Marekova, M.; Rozmer, Z.; Fodor, K.; Chavkova, Z.; Tomeckova, V.; Guzy, J. Comparison of effects of some cyclic chalcone analogues on selected mitochondrial functions. *Pharmazie* **2008**, 63, 899-903. doi:10.1691/ph.2008.8629.

N51. Prókai-Tátrai, K.; **Perjési, P.**; Rivera-Portalatin, N.M.; Simpkins, J.W.; Prókai, L. Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids* **2008**, 73, 280-288. doi:10.1016/j.steroids.2007.10.011

N52. Hajtó, T.; Fodor, K.; Aponyi, I.; Pallai, Z.; Balogh, P.; Németh, P.; **Perjési, P.** Unexpected different binding of mistletoe lectins from plant extracts to immobilized lactose and N-acetylgalactosamine. *Anal. Chem. INSIGHTS* **2007**, 2007, 43-50.

N53. Almási, A.; Fischer, E.; **Perjési, P.** A simple and rapid ion-pair HPLC method for simultaneous quantitation of 4-nitrophenol and its glucuronide and sulfate conjugates. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, 69, 43-50. doi:10.1016/j.jbbm.2006.05.002

N54. Fodor, K.; Léhman, A.; **Perjési, P.** Néhány nem-szteroid gyulladáscsökkentő és izomer dihidroxi-benzoésavak hatásának vizsgálata a krocín AAPH-indukálta degradációjára. *Acta Pharm. Hung.* **2006**, 76, 140–144.

N55. **Perjési, P.**; Ember, I.A.; Bozak, R.E.; Nádas, E.; Rozmer, Z.; Varjas, T.; Hicks, R.J. Effect of the chalcone analog *E,E*-bis(2-hydroxybenzylidene) acetone on the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced Ha-Ras gene action in vivo. *In Vivo* **2006**, 20, 141-146.

N56. Tomeckova, V.; Guzy, J.; Kusnir, J.; Marekova, M.; Chavkova, Z.; **Perjési, P.** Comparison of the effects of selected chalcones, dihydrochalcones and some cyclic flavonoids on mitochondrial outer membrane determined by fluorescence spectroscopy. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, 69, 143-150. doi:10.1016/j.jbbm.2006.05.004

N57. Prókai, L.; Prókai-Tátrai, K.; **Perjési, P.**; Simpkins, J.W. Mechanistic insights into the direct antioxidant effects of estrogens. *Drug Dev. Res.* **2005**, 66, 118-125. doi:10.1002/ddr.20050

- N58.** Rozmer, Z.; **Perjési, P.** Néhány nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata a 2-dezoxi-*D*-ribóz Fenton-reakció inicializálta degradációjára. *Acta Pharm. Hung.* **2005**, *75*, 69-75.
- N59.** Németh, K ; Fehér, K ; Muszil, Z ; Kiss, I ; Nowrasteh, G ; Varjas, T ; Nádas, E ; Mészáros, A ; Gyöngyi, Z ; Varga, Cs.; **Perjési, P.**; Ember I. Molekuláris epidemiológiai biomarkerek: új koncepció a preventív és prediktív medicinában. In: Ember, I; Kiss, I (szerk.) Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája. Medicina Könyvkiadó, Budapest, Magyarország, **2005**, 11-23. ISBN 9632429834
- N60.** Prókai, L.; Prókai-Tátrai, K.; Zharikova, A.D.; Nguyen, V.; **Perjési, P.**; Stevens, S.M. Centrally acting and metabolically stable thyrotropin-releasing hormone analogues by replacement of histidine with substituted pyridinium. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6025-6033. doi:10.1021/jm020531t
- N61.** Tomeckova, V.; **Perjési, P.**; Guzy, J.; Kusnir, J.; Chovanova, Z.; Chakova, Z.; Marekova, M. Comparison of effect of selected synthetic chalcone analogues on mitochondrial outer membrane determined by fluorescence spectroscopy. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *61*, 135-141. doi:10.1016/j.jbbm.2004.04.010
- N62.** Prókai, L.; Prókai-Tátrai, K.; **Perjési, P.**; Zharikova, A.D.; Perez, E.J.; Liu, R.; Simpkins, J.W. Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 11741-11746. doi:10.1073/pnas.2032621100
- N63.** Prókai, L.; Prókai-Tátrai, K.; **Perjési, P.**; Zharikova, A.D.; Simpkins, J.W. Quinol-Based Metabolic Cycle for Estrogens in Rat Liver Mitochondria. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 701-704. doi:10.1124/dmd.31.6.701
- N64.** **Perjési, P.**; Kim, T.; Zharikova, A.D.; Li, X.; Ramesh, T.; Ramasubbu, J.; Prókai, L. Determination of clodronate content in liposomal formulation by capillary zone electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 929-935. doi:10.1016/S0731-7085(02)00673-8.S90
- N65.** Prókai-Tátrai, K.; **Perjési, P.**; AD, Z.; X, L.; Prókai, L. Design, synthesis, and biological evaluation of novel, centrally acting thyrotropin-releasing hormone analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2171-2174. doi:10.1016/S0960-894X(02)00368-2
- N66.** **Perjési, P.**; Pintér, Z.; Gyöngyi, Z.; Ember, I.A. Effect of rancid corn oil on some onco/suppressor gene expression *in vivo*. A short term study. *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 225–230.
- N67.** Prókai, L.; Zharikova, A.; Janáky, T.; Li, X.; Braddy, A.; **Perjési, P.**; Matveeva, L.; Powell, D.; Prókai-Tátrai, K. Integration of mass spectrometry into early-phase discovery and development of central nervous system agents. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 1211-1219. doi:10.1002/jms.227
- N68.** Gregus, Z.; **Perjési, P.**; Gyurasics, A. Enhancement of selenium excretion in bile by sulfobromophthalein: Elucidation of the mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1391-1402. doi:10.1016/S0006-2952(98)00190-7

- N69.** Gyurasics, A.; **Perjési, P.**; Gregus, Z. Role of glutathione and methylation in the biliary excretion of selenium. The paradoxical effect of sulfobromophthalein. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1381-1389. doi:10.1016/S0006-2952(98)00189-0
- N70.** **Perjési, P.**; Sohár, P.; Bocskai, Z.; Magyarfalvi, G.; Farkas, Ö.; Mák, M. Synthesis, structure and conformational analysis of imidazo-thiazines. *J. Mol. Struct.* **1996**, *377*, 277-288. doi:10.1016/0022-2860(95)09123-8
- N71.** **Perjési, P.**; Batta, G.; Földesi, A. Reaction of benzylidenecycloalkanones with dithiocarbamic acid and thiourea. *Monatsh. Chem.* **1994**, *125*, 433-439. doi:10.1007/BF00811861
- N72.** **Perjési, P.**; Földesi, A.; Tamás, J. Synthesis and structure of 2-phenyl-4-aryl-3,4,5,6-tetrahydrobenzo[h]quinazolines. *Monatsh. Chem.* **1993**, *124*, 167-175. doi:10.1007/BF00808676
- N73.** **Perjési, P.**; Batta, G. Relationship between dominant conformation and diastereoselectivity of O-acetal formation of saturated 3,1-benzothiazine-2(1H)-thiones. *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 1951-1953. doi:10.1002/cber.19931260827
- N74.** **Perjési, P.**; Sohár, P. Synthesis of partially saturated N-substituted 4H-3,1-benzothiazine-2(1H)-thiones. *Monatsh. Chem.* **1991**, *122*, 1047-1051. doi:10.1007/BF00811113
- N75.** **Perjési, P.**; Földesi, A.; Batta, G.; Tamás, J. Synthesis and stereochemistry of saturated and partially saturated 4-aryl-4H-3,1-benzothiazine-2(1H)-thiones. *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 651-656. doi:10.1002/cber.19891220411
- N76.** Kálmán, A.; Argay, G.; **Perjési, P.**; Szabó, D. Structure of (2*R*^{*}, 8*R*^{*})-2-[a-(thiocarbamoylthio)benzyl]indan-1-one. *Acta Crystallogr. Sect. C* **1988**, *44*, 1955-1957. doi:10.1107/S0108270188007632
- N77.** **Perjési, P.**; Földesi, A.; Szabó, D.; Batta, G. Synthesis of 1,3-thiazines with condensed skeleton. *Stud. Org. Chem.* **1988**, *35*, 466-468.
- N78.** Argay, G.; Kálmán, A.; **Perjési, P.**; Szabó, D. Structure of 7a-hydroxy-4-phenyl-1,2,4,4a,5,6,7,7a-octahydro-cyclopenta[d][1,3]thiazine-2-thione. *Acta Crystallogr. Sect. C* **1987**, *43*, 324-326. doi:10.1107/S0108270187095969
- N79.** **Perjési, P.**; Földesi, A.; Szabó, D.; Zschunke, A.; Mák, M. Reaction of cyclic thioureas with 2-benzylidenecycloalkanones. *Chem. Ber.* **1987**, *120*, 1449-1450. doi:10.1002/cber.19871200827.
- N80.** **Perjési, P.**; Szabó, D.; Batta, G.; Földesi, A. The stereochemistry of reaction of 2-benzylidenecyclohexanone with dithiocarbamic acid. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 571-572. doi:10.1016/S0040-4039(00)95784-8
- N81.** Bernáth, G.; Kóbor, J.; Fülöp, F.; **Perjési, P.**; Ezer, E.; Hajós, G.; Pálosi, É.; Dénes, L.; Szporny, L. Eljárás izokinolinszármazékok előállítására, II. Magyar szabadalom. Hung. Pat. 189765. **1986**.
- N82.** **Perjési, P.**; Szabó, D.; Földesi, A. Synthesis of 4,6-diaryl-2,3-dihydro-6H-1,3-thiazine-2-thiones by the reaction of chalcones with dithiocarbamic acid. *Acta Chim. Hung.* **1986**, *122*, 119-125.

N83. Bernáth, G.; Kóbor, J.; Fülöp, F.; Sohár, P.; **Perjési, P.**; Ezer, E.; Hajós, G.; Pálosi, E.; Dénes, L.; Szporny, L. [1,3]Oxazino[4,3-a]isoquinoline derivatives and their therapeutic uses. Német szabadalom. DE 3439131. **1985.**

N84. Bernáth, G.; Kóbor, J.; Fülöp, F.; Sohár, P.; Ezer, E.; Hajós, G.; Pálosi, É.; Dénes, L.; Szporny, L.; **Perjési, P.** Eljárás 1,3-oxazino[4,3-a]izokinolin-származékok előállítására. Magyar szabadalom. Hung. Pat. 190458B. **1985.**

7.2. Irodalomjegyzék II

- [1] Perjési, P. MTA Kandidátusi értekezés, Pécs, 1993.
- [2] Amslinger, S. *Chem. Med. Chem.* **2010**, 5, 351-356.
- [3] Liua, W.; Hea, M.; Lic, Y.; Pengd, Z.; Wang, G. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2022**, 37, 9-38.
- [4] Drug Metabolism Handbook. Concepts and Applications. (Nassar, A.F.; Hollenberg, P.F.; Scatina, J. Eds.), John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA, **2009**. ISBN 9780470118030.
- [5] Mohamed, M.F.A.; Abuo-Rahma, G.E.-D.A. *RSC Adv.* **2020**, 10, 31139.
- [6] Jackson, P.A.; Widen, J.C.; Harki, D.A.; Brummond, K.M. Covalent modifiers: *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 839-885.
- [7] Srinivasan, B.; Johnson, T.E.; Lad, R.; Xing, C. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7228-7235.
- [8] Bukhari, S.N.A.; Jasamai, M.; Jantan, I. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, 12, 1394-1403.
- [9] Sahu, N.K.; Balbhadra, S.S.; Choudhary, J.; Kohli, D.V. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 209-225.
- [10] Sharma, V.; Kumar, V.; Kumar, P. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2013**, 13, 422-432.
- [11] Singh, P.; Anand, A.; Kumar, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 85, 758-777.
- [12] Mahapatra, D.K.; Bharti, S. K.; Asati, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 101, 496-524.
- [13] Zhou, B.; Xing, C. *Med. Chem.* **2015**, 5, 388-404.
- [14] Gomes, M.N.; Muratov, E.N.; Pereira, M.; Peixoto, J.C.; Rosseto, L.P.; Cravo, P.V.L.; Andrade, C.H.; Neves, B.J. *Molecules*. **2017**, 22, 1210.
- [15] Gaonkar, S.L.; Vignesh, U.N. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, 43, 6043-6077.
- [16] Zhuang, C.; Zhang, W.; Sheng C.; Zhang, W.; Xing C.; Miao Z. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 7762-7810.
- [17] Rammohan, A.; Reddy, J.S.; Sravya, G.; Rao, C.N.; Zyryanov, G.V. *Environ. Chem. Letters* **2020**, 18, 433-458.
- [18] Salehi, B.; Quispe, C.; Chamkhi, I.; El Omari, N.; Balahbib, A.; Sharifi-Rad, J.; Bouyahya, A.; Akram, M.; Iqbal, M.; Docea, A.O.; Caruntu, C.; Leyva-Gómez, G.; Dey, A.; Martorell, M.; Calina, D.; López, V.; Les, F. *Front. Pharmacol.* **2021**, 11, 592654.

- [19] Rudrapal, M.; Khan, J.; Dukhyil, A.A.B.; Alarousy, R.M.I.I.; Attah, E.I.; Sharma, T.; Khairnar, S.J.; Bendale, A.R. *Molecules* **2021**, *26*, 7177.
- [20] Rajendran, G.; Bhanu, D.; Aruchamy, B.; Ramani, P.; Pandurangan, N.; Bobba, K.N.; Oh, E.J.; Chung, H.Y.; Gangadaran, P.; Ahn, B.-C. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1250.
- [21] Shalaby, M.A.; Rizk, S.A.; Fahim, A.M. *Org. Biomol. Chem.*, **2023**, *21*, 5317-5346.
- [22] Mazumder, R.; Ichudaule; Ghosh, A.; Deb, S.; Ghosh, R. *Topics Curr. Chem.* **2024**, *382*, 22.
- [23] Villa, S.M.; Heckman, J.; Bandyopadhyay, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 9623.
- [24] [24a] Claisen, L.; Claparède, A. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 2460-2468. [24b] Schmidt, J. G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 1459-1461.
- [25] Esmaeili, A.A.; Tabas, M S.; Nasserli, M.A.; Kazemi, F. *Monatsh. Chem.* **2005**, *136*, 571-576.
- [26] Bhagat, S.; Sharma, R.; Sawant, D.M.; Sharma, L.; Chakraborti, A K. *J. Mol. Catal. Chem.* **2006**, *244*, 20-24.
- [27] Narender, T.; Reddy, K.P. A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3177-3180.
- [28] Bogdal, D.; Loupy, A. *Org. Process. Res. Dev.* **2008**, *12*, 710-722.
- [29] Bukhari, S.N.A.; Jasamai, M.; Jantan, I.; Ahmad, W. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2013**, *10*, 73-83.
- [30] Rayar, A.; Veitía, M.S.-I.; Ferroud, C. *SpringerPlus.* **2015**, *4*, 221.
- [31] Siddiqui, Z.N. *Arab. J. Chem.* **2015**, *8*, 2788-2797.
- [32] Li, W.; Xu, K.; Xu, L.; Hu, J.; Ma, F.; Guo, Y. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256*, 3183-3190.
- [33] Ahmad, R.M.; Sastry, V.G.; Bano, N.; Anwar, S. *Arab. J. Chem.* **2016**, *9*, S931-S935.
- [34] Winter, C.; Caetano, J N.; Araújo, A.B.C.; Chaves, A.R.; Ostroski, I.C.; Vaz, B.G.; Pérez, C.N.; Alonso, C.G. *Chem. Eng. J.* **2016**, *303*, 604-610.
- [35] Sazegar, M.R.; Mahmoudian, S.; Mahmoudi, A.; Triwahyono, S.; Jalil, A.A.; Mukti, R.R.; Kamarudin, N.H.N.; Ghoreishi, M.K. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 11023-11031.
- [36] Ducki, S.; Forrest, R.; Hadfield, J.A.; Kendall, A.; Lawrence, N.J.; McGown, A.T.; Rennison, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1051-1056.
- [37] Yamin, L.J.; Gasull, E.I.; Blanco, S.E.; Ferretti, F.H. *J. Mol. Struct.-Theochem.* **1998**, *428*, 167-174.
- [38] Perrin, C.R.; Chang, K.L. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 5631-563.
- [39] Széll, T.; Sohár, I. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 1254-1258.
- [40] Das, L.; Gupta, S.; Dasgupta, D.; Poddar, A.; Janik, M.E.; Bhattacharyya, B. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1628-1635.
- [41] Shih, H.; Deng, L.; Carrera, C.J.; Adachi, S.; Cottam, H.B.; Carson, D.A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 487-490.

- [42] Prakasham, A.P.; Saxena, A.K.; Luqman, S.; Chanda, D.; Kaur, T.; Gupta, A.; Yadav, D.K.; Chanotiya, C.S.; Shanker, K.; Khan, F.; Negi, A.S. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 3049-3057.
- [43] Singh, A.; Fatima, K.; Singh, A.; Behl, A.; Mintoo, M.J.; Hasanain, M.; Ashraf, R.; Luqman, S.; Shanker, K.; Mondhe, D.M.; Sarkar, J.; Chanda, D.; Negi, A.S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 57-67.
- [44] Srivastava, A.; Fatima, K.; Fatima, E.; Singh, A.; Singh, A.; Shukla, A.; Luqman, S.; Shanker, K.; Chanda, D.; Khan, F.; Negi, A.S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *154*, 105513.
- [45] Menezes, J.C.J.M.D.S. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9357-9372.
- [46] Böhler, P.; Tamm, Ch. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 3479-3483.
- [47] Lévai, A. *Arkivok.* **2004**, (vii), 15-33.
- [48] Lévai, A.; Schág, J.B. *Pharmazie* **1979**, *34*, 748-749.
- [49] Lévai, A.; Dinya, Z.; Schág, J.B.; Tóth, G.; Szöllösy, A. *Chem. Inf.* **1981**, *36*, 465.
- [50] Al Nakib, T.; Bezjak, V.; Meegan, M.J.; Chandy, R. *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, *25*, 455-462.
- [51] Pijewska, L.; Kamecki, J.; Perka-Karolczak, W. *Pharmazie* **1993**, *48*, 254-257.
- [52] Adamus-Grabicka, A.A.; Markowicz-Piasecka, M.; Ponczek, M.B.; Kusz, J.; Małecka, M.; Krajewska, U.; Budzisz, E. *Molecules* **2018**, *23*, 3172.
- [53] Biot, C.; Glorian, G.; Maciejewski, L.A.; Brocard, J.S. *J Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715-3718.
- [54] Domarle, O.; Blampain, G.; Agnani, H.; Nzadiyabi, T.; Lebibi, J.; Brocard, J.; Maciejewski, L.; Biot, C.; Georges, A.J.; Millet, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 540-544.
- [55] Top S., Tang J., Vessièrès A., Carrez D., Provot C., Jaouen G. *Chem. Commun.* **1996**, 955-956.
- [56] Top, S.; Dauer, B.; Vaissermann, J.; Jaouen, G. *J. Organomet. Chem.* **1997**, *541*, 355-361.
- [57] Adoke, Y.; Zoleko-Manego, R.; Ouoba, S.; Tiono, A.B.; Kaguthi, G.; Bonzela, J.E.; Duong, T.T.; Nahum, A.; Bouyou-Akotet, M. et al. *Malaria J.* **2021**, *20*, Article Number 222.
- [58] Idlas, P.; Lepeltier, E.; Jaouen, G.; Passirani, C. *Cancers* **2021**, *13*, 2291.
- [59] Patra, M.; Gasser, G. *Nature Rev. Chem.* **2017**, *1*, 0066.
- [60] Singh, A. Lumb, I. Mehra, V., Kumar, V. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 2840-2860.
- [61] Sharma, B.; Kumar, V. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 16865–16921.
- [62] Ornelas, C.; Astruc, D. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2044.
- [63] Nagy, Á.G.; Sohár, P. *J. Organomet. Chem.* **1990**, *390*, 217.
- [64] Sohár, P. *Magy. Kém. Foly.* **2007**, *113*, 62-73.
- [65] Zsoldos-Mándy, V.; Csámpai, A.; Szabó, R.; Mészáros-Alapi, E.; Pásztor, J.; Hudecz, F.; Sohár, P. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1119-1125.

- [66] Kocsis, L.; Szabó, I. Bősze, Sz.; Jernei, T.; Hudecz, F.; Csámpai, A. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2016**, 26, 946-949.
- [67] Podolski-Renic, A.; Bősze, S.; Dinic, J.; Kocsis, L.; Hudecz, F.; Csámpai, A.; Pesic, M. *Metallomics*, **2017**, 9, 1132-1141.
- [68] Jernei, T.; Duró, C.; Dembo, A.; Lajkó, E.; Takács, A.; Kőhidai, L.; Schlosser, G.; Csámpai, A. *Molecules* **2019**, 24, 4077.
- [69] Ferenczi, E.; Keglevich, P.; Tayeb, B.A.; Minorics, R.; Papp, D.; Schlosser, G.; Zupkó, I.; Hazai, L.; Csámpai, A. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 7428.
- [70] Montes-González, I.; Alsina-Sánchez, A.M.; Aponte-Santini, J.C.; Delgado-Rivera, S.M.; Durán-Camacho, G.L. *Pure Appl. Chem.* **2019**, 91, 653-669.
- [71] Thirunarayanan, G.; Gopalakrishnan, M.; Vanangamudi, G. *Spectrochim. Acta Part A* **2007**, 67, 1106-1112.
- [72] Xue, Y.; Gong, X. *J. Mol. Struct. Theochem* **2009**, 901, 226-231.
- [73] Baas, P.; Cerfontain, H. *Tetrahedron* **1977**, 33, 1509-1511.
- [74] Hayes, W.P.; Timmons, C.J. *Spectrochim. Acta Part A* **1968**, 24, 323-334.
- [75] Schuster, I. The photochemistry of enones. In *The Chemistry of Enones*. (Patai, S.; Rappoport, Z. Eds.) John Wiley and Sons, Chichester, U.K. **1989**, 623-756. ISBN 9780471915638.
- [76] Sidharth, S.N.; Yuvaraj, A.R.; Hui, T.J.; Sarojini, B.K.; Mashitah, M.Y.; Hegde, G. *Adv. Mater. Res.* **2014**, 1033-1034, 1149-1153.
- [77] Miquel, J.F. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1961**, 1961, 1369-1376.
- [78] Iwata, S.; Nishino, T.; Inoue, H.; Nagata, N.; Satomi, Y.; Nishino, H.; Shibata, S. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, 20, 1266-1270.
- [79] Schleuder, M.; Ali, F.A.M.; Otto, H.-H. *Die Pharmazie* **2003**, 58, 308-311.
- [80] Imbach, J.L.; Pohland, A.E.; Weiler, E.D.; Cromwell, H.H. *Tetrahedron* **1967**, 23, 3931-3941.
- [81] Kevill, D.N.; Weiler, E.D.; Cromwell, H.H. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 1276-1278.
- [82] Azzolina, O.; Desimoni, G.; Di Toro, V.; Gishlandi, V.; Tacconi, G. *Gazz. Chim. Ital.* **1975**, 105, 971-983.
- [83] Shin, D.; Song, D.; Jung, K.-H.; Moon, J.-H. *J. Photosci.* **2001**, 8, 9-12.
- [84] Gelsomini, N.; Mazza, L.J.; Guarna, A. *J. Chromatogr.* **1974**, 101, 182-184.
- [85] Walczak, B.; Lafosse, M.; Chretien, J.R.; Dreux, M.; Morin-Allory, L. *J. Chromatogr.* **1986**, 369, 27-37.
- [86] Issa, F.M.; El-Ansary A.L.; El-Kerch, M.M.; Issa, R.M. *Commun. Fac. Sci. Univ. Ankara Ser. B: Chem. Chem. Eng.* **1983**, 29, 256-268.
- [87] Braun, R.U.; Ansorge, M.; Müller, T.J.J. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 9081-9094.
- [88] Kamakshi, R.; Reddy, B.S.R. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2008**, 46, 1521-1531.
- [89] Vanangamudi, G.; Subramanian, M.; Jayanthi, P.; Arulkumaran, R.; Kamalakkannan, D.; Thirunarayanan, G. *Arab J. Chem.* **2016**, 9(S1), S717-S724.
- [90] Mala, V.; Sathiyamoorthi, K.; Sakthinathan, S.P.; Kamalakkannan, D.; Suresh, R.; Vanangamudi, G.; Thirunarayanan, G. *Q-Science Connect* **2013**, 7.

- [91] Thirunarayanan, G. *Int. J. Chem. Sci.* **2003**, *1*, 215-220.
- [92] Thirunarayanan, G.; Ranganathan, K.; Arulkumaran, R.; Kamalakkannan, D.; Vanangamudi, G. *IUP J. Chem.* **2011**, *4*, 60-70.
- [93] Al-Ansari, I.A.Z. *Chem. Select.* **2016**, *1*, 5618-5623.
- [94] Botelho, J.R.S.; Caeiro, A.; Sousa, H.C.; Braga, M.E.M.; Campos, M.G. *MethodsX* **2025**, *14*, 103119.
- [95] Wangngae S.; Chansaenpak, K.; Nootem, J.; Ngivprom, U.; Aryamueang, S.; Lai, R.-Y.; Kamkaew, A. *Molecules* **2021**, *26*, 2979.
- [96] Mabry, T.J.; Markham, K R.; Thomas, M.B. Part II. The Structure Analysis of Flavonoids by Ultraviolet Spectroscopy. In *The Systematic Identification of Flavonoids*, 1st edition.; Springer-Verlag, Berlin, Germany, **1970**, 35-230. ISBN 9783642884603
- [97] Oumi, M.; Maurice, D.; Head-Gordon, M. *Spectrochim. Acta A* **1999**, *55*, 525-537.
- [98] Xue, Y.; Mou, J.; Liu, Y.; Gong, X.; Yang, Y.; An, L. *Cent. Eur. J. Chem.* **2010**, *8*, 928-936.
- [99] Wei, Y.; Qin, G.; Wang, W.; Bian, W.; Shuang, S.; Dong, C. *J. Lumin.*, **2011**, *131*, 1672-1676.
- [100] Pannipara, M.; Asiri, A.M.; Alamry, K.A.; Arshad, M.N.; El-Daly, S.A. *Spectrochim. Acta A*, **2015**, *136 Part C*, 1893-1902.
- [101] Komarova, K.G.; Sakipov, S.N.; Plotnikov, V.G.; Alfimov, M.V. *J. Luminesc.* **2015**, *164*, 57-63.
- [102] Shin, D.-M.; Song, D.-M.; Jung, K.H.; Moon, J.-H. *J. Photosci.* **2001**, *81*, 9-12.
- [103] Vitha, M. F. *Spectroscopy. Principles and Instrumentation*. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA. **2018**. ISBN 9781119436607.
- [104] Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-2358.
- [105] Wang, P.; Wu, S. *J. Photochem. Photobiol. A* **1995**, *86*, 109.
- [106] Rurack, K.; Dekhtyar, M.L.; Bricks, J.L.; Resh-Genger, U.; Rettig, W. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 9626-96352.
- [107] Komarov, P.V.; Plotnikov, V.G. *J. Luminesc.* **2012**, *132*, 1139-1143.
- [108] Grabowski, Z.R.; Dobkowski, J. *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 245-252.
- [109] Jiang, Y.-B.; Wang, X.-J.; Lin, L. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 12367-12372.
- [110] Sucre-Rosales, E.; Fernández-Terán, R.; Urdaneta, N.; Hernández, F.E.; Echevarria, L. *Chem. Phys.* **2020**, *537*, 110854.
- [111] Nair, A.R.; Raksha, C.; Heera, R.; Mohan, M.G.; Manoj, P.; Sivan, A. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2024**, *451*, 115511.
- [112] Mellado, M.; Sariego-Kluge, R.; Valdes-Navarro, F.; C. Gonzalez, C.; Sanchez- Gonzalez, R.; Pizarro, N.; Villena, J.; Jara-Gutierrez, C.; Cordova, C.; Bravo, M.A.; Aguilar, L.F. *Spectrochim. Acta A*. **2023**, *291* 122332.
- [113] Neto, B.A.D.; Lapis, A.A.M. *Molecules*, **2009**, *14*, 1725-1746.

- [114] Alvim, H.G.; Fagg, E.L.; de Oliveira, A.L.; de Oliveira, H C.; Freitas, S M.; Xavier, M.A.E.; Soares, T.A.; Gomes, A.F.; Gozzo, F.C.; Silva, W.A.; Neto, B.A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4764–4777.
- [115] Wells, P.R. *Chem. Rev.* **1963**, *63*, 171-219.
- [116] Johnson, C.D. *Chem. Rev.* **1975**, *75*, 755-765.
- [117] Brønsted, J.N.; Pedersen, K.J. *Z. Phys. Chem.* **1924**, *108*, 185-235.
- [118] Hammett, L.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 96-103.
- [119] Silver, N.L.; Boykin Jr., D.W. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 759-764.
- [120] Thirunarayanan, G.; Gopalakrishnan, M.; Vanangamudi, G. *Spectrochim. Acta Part A* **2007**, *67*, 1106-1112.
- [121] Aksöz, B.E.; Ertan, R. *FABAD J. Pharm. Sci.* **2012**, *37*, 205-216.
- [122] Sathiyamoorthi, K.; Mala, V.; Suresh, R.; Sakthinathan, S.P.; Kamalakkannan, D.; Ranganathan, K.; Arulkumaran, R.; Sundararajan, R.; Vijayakumar, S.; Vanangamudi, G.; Thirunarayanan, G. *Der Pharma Chemica (DPC)* **2014**, *6*, 97-110.
- [123] Jaffe, H.H. *Chem. Rev.* **1953**, *53*, 191-261.
- [124] Brown, H.C.; Okamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4979-4987.
- [126] Taft, R.W.; Ehrenson, S.; Lewis, I.C.; Glick, R.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5352-5361.
- [125] Taft, R.W. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 1805-1815.
- [127] McDaniel, D.H.; Brown, H.C. *J. Org. Chem.* **1958**, *23*, 420-427.
- [128] Hansch, C. Leo, A.; Taft, R.W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165-195.
- [129] Swain, C.G.; Lupton, E.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4328-4337.
- [130] Hansch, C.; Leo, A.; Unger, S.H.; Kim, K.H.; Nikaitani, D.; Lien, E.J. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1207-1216.
- [131] Ehrenson, S.; Brownlee, R.T.C.; Taft, R.W. *Prog. Phys. Org. Chem.* **1973**, *10*, 1-80.
- [132] Bromilow, J.; Brownlee, R.T.C.; Lopez, V.O.; Taft, R.W. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4766-4770.
- [133] Ruff, F.; Csizmadia, G.I. Szerves reakciómechanizmusok vizsgálata. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, **2000**, 175-219. ISBN 9631903508.
- [134] Reynolds, W. F.; Gomes, A.; Maron, A.; MacIntyre, D.W.; Tanin, A.; Hamer, G.; Peat, I.R. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 2376-2384.
- [135] Winecoff, III, W.F.; Boykin, Jr., D.W. *J. Org. Chem.* **1972**, *87*, 674-676.
- [136] Dinya, Z.; Lévai, A.; Schág, J.B.; Pócsfalvi, G; Somogyi, Á.; Galamb V. *Spectrochim. Acta Part A* **1992**, *48*, 25-30.
- [137] Perjessy, A. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 3189-3194.
- [138] Perjéssy, A.; Boykin, Jr., D.W.; Fisera, L.; Krutosikov, A.; Kovac, J. *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 1807-1810.
- [139] de Dios, A.C. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1996**, *29*, 229-278.
- [140] Jameson, C.J. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1996**, *47*, 135-169.
- [141] Mulder, F.A.A.; Filatov, M. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 578-590.

- [142] Casabianca, L.B. *Magn. Reson. Chem.* **2020**, *58*, 611-624.
- [143] Sohár, P. (szerkesztő) A gyógyszerkutatás műszeres módszerei. Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 2015. ISBN: 9789639970618.
- [144] Dhami, K.S.; Stothe, J.B. *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 510-520.
- [145] Hamer, G.K.; Peat, I.R.; Reynold, W.F. *Can. J. Chem.*, **1973**, *51*, 897-914.
- [146] Solaniova, E.; Toma, S.; Gronowitz, S. *Org. Magn. Res.* **1976**, *8*, 439-443.
- [147] Solaniova, E.; Toma, S. *Org. Magn. Res.* **1980**, *14*, 138-140.
- [148] Hayamizu, K.; Yanagisawa, M.; Ishii, T. *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 899-904.
- [149] Nagy, Á.G. *J. Organomet. Chem.* **1985**, *291*, 335-340
- [150] Reynolds, W.F.; Dais, P.; MacIntyre, D.W.; Hamer, G.K.; Peat, I.R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *43*, 81-89.
- [151] Jovanovic, B.Z.; Misic-Vukovic, M.; Marinkovic, A.D.; Csanádi, J. *J. Mol. Struct.* **1999**, *482-483*, 371-374.
- [152] Lee, I.-S.H.; Jeon, H.J.; Yu, J.S.; Lee, C.K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 1689-1694.
- [153] Arulkumaran, R.; Sundararajan, R.; Vijayakumar, S.; Sakthinathan, S.P.; Suresh, R.; Kamalakkannan, D.; Ranganathan, K.; Vanangamudi, G.; Thirunarayanan, G. *J. Saudi Chem. Soc.* **2016**, *20*, S122-S131.
- [154] Jeong, E.J.; Lee, I.-S.H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2019**, *40*, 668-673.
- [155] Solcaniova, E.; Toma, S.; Fiedlerova, A. *Org. Magn. Reson.* **1980**, *14*, 181-185.
- [156] Nagy, Á.G.; Toma, S. *J. Organomet. Chem.* **1985**, *282*, 267-275.
- [157] Bilginer, S.; Gul, H.I.; Mete, E.; Das, U.; Sakagami, H.; Umemura, N.; Dimmock, J.R. *J. Enzyme Inhibit. Med. Chem.* **2013**, *28*, 974-980.
- [158] de Castro, M.R.C.; Aragao, A.Q.; da Silva, C.C.; Perez, C.N.; Queiroz, D.P.K.; Queiroz, Jr., L.H.K.; Barreto, S.; de Moraes, M.O.; Martins, F.T. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 884-898.
- [159] Reddy, N.P.; Aparoy, P.; Reddy, T.C.M.; Achari, C.; Sridhar, P.R.; Reddanna, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5807-5815.
- [160] Zhang, N. Geronimo, I.; Paneth, P.; Schindelka, J.; Schaefer, T.; Herrmann, H.; Vogt, C.; Richnow, H.H. *Sci. Total Environ. Part A* **2016**, *542*, 484-494.
- [161] Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 4916-4922.
- [162] Urbaniak, A.; Molski, M.; Szeląg, M. *Comp. Meth. Sci. Technol.* **2012**, *18*, 117-128.
- [163] Martins, T.; Silva, V.L.M.; Silva, A.M.S.; Lima, J.L.F.C.; Fernandes, E.; Ribeiro, D. *Med. Chem.* **2022**, *18*, 88-96.
- [164] Lóránd, T. MTA kandidátusi értekezés. Pécs, 1988.
- [165] El-Gohary, N.S. *O. A. Lib. J.* **2014**, *1*, 1-47.
- [166] Bruckner, R. Additions of heteroatom nucleophiles to carbonyl compounds and subsequent reactions - Condensations of heteroatom nucleophiles with

carbonyl compounds. In: Harmata, M. (ed.) *Organic Mechanisms*. Springer, Berlin, Heidelberg, **2010**. 359-395. ISBN 9783642036507.

[167] Krenske, E.H.; Petter, R.C.; Zhu, Z.; Houk, K.N. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5074–5081.

[168] Li, W.; Werner, T. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2568–2571.

[169] Nagata, W.; Yoshioka, M. *Org. React.* **1977**, *25*, 255-476.

[170] Pearson, R.G. *Science* **1966**, *151*, 172-177.

[171] Pearson, R.G.; Songstad, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 1827-1836.

[172] Klopman G. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *90*, 223-234.

[173] Ho, T.-L. *Chem. Rev.* **1975**, *75*, 1-20.

[174] Klopman G. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1983**, *103*, 121-129.

[175] Kalinina, E.; Novichkova, M. *Molecules* **2021**, *26*, 435.

[176] Kerns, E.H. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1838-1858.

[177] Avdeef, A.; Testa, B. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1681-1689.

[178] Kerns, E.H.; Di, L. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 316-323.

[179] Takácsné Novák, K.; Völgyi, G. *Magy. Kém. Foly.* **2005**, *111*, 169-176.

[180] Smith, D.A.; Jones, B.C.; Walker, D.K. *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 242-266.

[181] Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.

[182] Miller, R.R.; Madeira, M.; Wood, H.B.; Geissler, W.M.; Raab, C.E.; Martin, I.J. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12156-12170.

[183] Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 525-616.

[184] Arnott, J.A.; Planey, S.L. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 863-875.

[185] Mannhold, R.; Poda G.I.; Osterman C.; Tetko I.V. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 861-893.

[186] Guha R., Willighagen E. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1946-1956.

[187] Roy, D.; Patel, C. *Molecules*, **2023**, *28*, 801.

[188] Caron, G.; Reymond, F.; Carrupt, P.A.; Girault, H.H.; Testa, B. *Pharm. Sci. Technol. Today* **1999**, *2*, 327-335.

[189] OECD. Test No. 107: Partition Coefficient (n-Octanol/Water): Shake Flask Method. *OECD Publishing*, Paris, France, **2022**.

[190] Roman, I.P.; Mastromichali, A.; Tyrovola, K.; Canals, A.; Psillakis, E. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1330*, 1-5.

[191] OECD Guidelines For The Testing of Chemicals. Proposal for a new guideline 122. Partition coefficient (n-octanol/water), pH-metric method for ionisable substances. *OECD Publishing*, Paris, France, **2000**, Corpus ID: 36239894.

[192] Soares, J.X.; Santos, Á.; Fernandes, C.; Pinto, M.M.M. *Chemosensors* **2022**, *10*, 340.

[193] Almási, J.; Takács-Novák, K.; Kökösi, J.; Vámos, J. *Int. J. Pharm.* **1999**, *180*, 13-22.

- [194] Schanker, L.S.; Tocco, D.J.; Brodie, B.B.; Hogben, C.A.M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1958**, *123*, 81-88.
- [195] Dolusio, J.T.; Billups, N.F.; Dittert, L.W.; Sugita, E.T.; Swintosky, J.V. *J. Pharm. Sci.*, **1969**, *58*, 1196-1200.
- [196] Zhao, W.H.; Abraham, M.H.; Le, J.; Hersey, A.; Luscombe, C.N.; Beck, G.; Sherborne, B.; Cooper, I. *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, *38*, 233-243.
- [197] Chiou, W.L.; Barve, A. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 1792-1795.
- [198] Chiou, W.L.; Ma, C.; Chung, S.M.; Wu, T.C.; Jeong, H.Y. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, *38*, 532-539.
- [199] Yee, S. *Pharm. Res.*, **1997**, *14*, 763-766.
- [200] Parkinson, A.; Ogilvie, B.W.; Buckley, D.B.; Kazmi, F.; Czerwinski, M.; Parkinson, O. Biotransformation of xenobiotics. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 8th Edition (Klassen, C.D. Ed.). McGraw-Hill Education, New York, N.Y., **2013**, 185-366. ISBN 9780071769228
- [201] Nagy, I.; Tóth, B.; Gáborik, Z.; Erdo, F.; Krajcsi, P. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 5347-5372.
- [202] Hollman, P.C.H.; Buijsman, M.N.C.P.; van Gameren, Y.; Cnossen, P.J.; de Vries J.H.M.; Katan, M.B. *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, 569-573.
- [203] Crespy, V.; Aprikian, O.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigné, C.; Rémésy, C. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 3227-3230.
- [204] Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigné, C.; Rémésy, C. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2109-2114.
- [205] Qiao, H.; Zhang, X.; Wang, T.; Liang, L.; Chang, W.; Xia, H. *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 228-236.
- [206] Hollmann, P.C.H. *Pharm. Biol.* **2004**, *42S*, 74-83.
- [207] Zhang, Q.Y.; Wikoff, J.; Dunbar, D.; Kaminsky, L. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, *24*, 322-328.
- [208] Hammer, H.; Schmidt, F.; Marx-Stoelting, P.; Pötz, O.; Braeuning, A. *Arch. Toxicol.* **2020**, *95*, 117-133.
- [209] Luckert, C.; Ehlers, A.; Buhrke, T.; Seidel, A.; Lampen, A.; Hessel, S. *Toxicol. Letters* **2013**, *222*, 180-188.
- [210] Kohno, Y.; Kitamura, S.; Sanoh, S.; Sugihara, K.; Fujimoto, N.; Ohta, S. *Drug Metabol. Dispos.* **2005**, *33*, 1115-1123.
- [211] Cuendet, M.; Guo, J.; Luo, Y.; Chen, S.; Oteham, C.P.; Moon, R.C.; van Breemen, R.B.; Marler, L.E.; John M. Pezzuto, J.M. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **2010**, *3*, 221-232.
- [212] Cuendet, M.; Oteham, C.P.; Moon, R.C.; Pezzuto, J.M. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 460-463.
- [213] Huang, L.; Nikolic, D.; van Breemen, R.B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 6937-6948.
- [214] Yang-Liu; X.; Tong-Yi, D.; Xia, L.; Guang-Bo, G. *Xenobiotica* **2019**, *49*, 671-677.

- [215] Zenger, K.; Agnolet, S.; Schneider, B.; Kraus, B. *J. Agricult. Food Chem.* **2015**, *63*, 6376-6385.
- [216] Nookandeh A.; Frank N.; Steiner F.; Ellinger R.; Schneider B.; Gerhauser C.; Becker H. *Phytochemistry* **2004**, *65* 561-570.
- [217] Wu L.; Tang Y.; Shi X.; Lin L.; Tan R.; Wu L.; Shi X.; Ding N.; Wang J.; Shan C.; Chai C.; Zhou Z. *J. Mass Spectrom.* **2018**, *53*, 99-108.
- [218] Gutteridge, C.E.; Thota, D.S.; Curtis, S.M.; Kozar, M.I.P.; Li, Q.; Xie, L.; Zhang, J.; Melendez, V.; Asher, C.O.; Luong, T.T.; Gerena, L.; Nichols, D.A.; Montip, G. *Pharmacology* **2011**, *87*, 96-104.
- [219] Zhang, Y.; Guo, X.; Lin, E.T.; Benet, L.Z. *Pharmacology* **1999**, *58* 147-159.
- [220] Schaefer, F.Q.; Buettner, G.R. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191-1212.
- [221] Lu, S.C. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3143-3153.
- [222] Deponte, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3217-3266.
- [223] Sherratt, P.J.; Hayes, J.D. *Enzyme Syst. Metab. Drugs Xenobiotics* **2001**, 319-352.
- [224] Sharma, R.; Ansari, G.S.; Awasthi, Y.C. Physiological substrates of glutathione s-transferases. In Awasthi, J.C. (ed.) *Toxicology of Glutathione Transferases*. CRC Press Boca Reton, FL, USA. **2006**, 179-204. ISBN 9781420004489.
- [225] Wu, B.; Dong, D. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 656-668.
- [226] Zimniak, P. Substrates and reaction mechanisms of glutathione transferases. In Awasthi, J.C. (ed.) *Toxicology of Glutathione Transferases*. CRC Press Boca Reton, FL, USA. **2006**, 71-102. ISBN 9781420004489.
- [227] Armstrong, R. N. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 131-140.
- [228] Armstrong, R.N. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 2-18.
- [229] Leon-Gonzalez, A.J.; Acero, N.; Munoz-Mingarro, D.; Navarro, I.; Martin-Cordero, C. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3407-3425.
- [230] Venturelli, S.; Burkard, M.; Biendl, M.; Lauer, U.M.; Frank, J.; Busch, C. *Nutrition* **2016**, *32*, 1171-1178.
- [231] Redondo-Blanco, S.; Fernández, J.; Gutiérrez-del-Río, I.; Villar, C.J.; Lombó F. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 109.
- [232] Constantinescu, T.; Lungu, C.N. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11306.
- [233] Bustos, L.; Echiburú-Chau, C.; Castro-Alvarez, A.; Bradshaw, B.; Simirgiotis, M.J.; Mellado, M.; Parra, C.; Cuellar, M. *Molecules* **2022**, *27*, 4387.
- [234] de Souza, P.S.; Bibá, G.C.C.; Melo, E.D.N.; Muzitano, M.F. *Nat. Prod. Res.* **2022**, *36*, 4803-4820.
- [235] Michalkova, R.; Mirossay, L.; Kello, M.; Mojziso, G.; Baloghova, J.; Podracka, A.; Mojzis, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10354.
- [236] Palanikarasu, P.; Surajambika, R.R.; Ramalakshmi, N. *Curr. Bioact. Comp.* **2022**, *18*, 84-107.
- [237] Sharma, V.; Kumar, V.; Kumar, P. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 422-432.

- [238] Karthikeyan, C.; Moorthy, N.S.; Ramasamy, S.; Vanam, U.; Manivannan, E.; Karunakaran, D.; Trivedi, P. *Anticancer Drug Discov.* **2015**, *10*, 97-115.
- [239] Mahapatra, D.K.; Bharti, S.K.; Asati, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *98*, 69-114.
- [240] Das, M.; Manna, K. *J. Toxicol.* **2016**, *2016*, Article ID 7651047.
- [241] Gao, F.; Huang, G.; Xiao, J. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 2049-2084.
- [242] Shukla, S.; Sood, A.K.; Goyal, K.; Singh, A.; Sharma, V.; Guliya, N.; Gulati, S.; Kumar, S. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2021**, *21*, 1650-1670.
- [243] Ouyang, Y.; Li, J.; Chen, X.; Fu, X.; Sun, S.; Wu, Q. *Biomolecules* **2021**, *11*, 894.
- [244] Hawash, M. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1843.
- [245] WalyEldeen, A.A.; Sabet, S.; El-Shorbagy, H.M.; Ismail A. Abdelhamid, I.A.; Ibrahim, S.A. *Chem-Biol. Interact.* **2023**, *369*, 110297.
- [246] Ferenczi, E.; Keglevich, P.; Tayeb, B.A.; Minorics, R.; Papp, D.; Schlosser, G.; Zupkó, I.; Hazai, L.; Csámpai, A. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 7428.
- [247] Gao, S.S.; Chen, X.Y.; Zhu, R.Z.; Choi, B.M.; Kim, S.J.; Kim, B.R. *Biofactors* **2012**, *38*, 34-43.
- [248] Couto, M.; de Ovalle, S.; Cabrera, M.; Cerecetto, H.; González, M. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 857-871.
- [249] Mittal, A.; Vashistha, V.K.; Das, D.K. *Free Radic. Res.* **2022**, *56*, 378-397.
- [250] Birsá, M.L.; Sarbu, L.G. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10667.
- [251] Nabi, G.; Liu, Z.-Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 944-946.
- [252] Ducki, S. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 336-347.
- [253] Constantinescu, T.; Mihis, A.G. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11595.
- [254] Joshi, A.; Bhojwani, H.; Wagal, O.; Begwani, K.; Joshi, U.; Sathaye, S.; Kanchan, D. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2022**, *22*, 328-343.
- [255] Sánchez-Martínez, C.; Lallena, M.J.; Sanfeliciano, S.G.; de Dios, A. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2019**, *29*, 126637.
- [256] Chagaleti, B.K.; Kumar B., S.; Anjana, G.V.; Rajagopal, R.; Alfarhan, A.; Arockiaraj, J.; Kumaradoss, K.M.; Namasivayam, S.K.R. *Comput. Biol. Chem.* **2024**, *112*, 108134.
- [257] Yang, E.B.; Zhang, K.; Cheng, L.Y.; Mack, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*, 435-4388.
- [258] Yang, E.B.; Guo, Y.J.; Zhang, K.; Chen, Y.Z.; Mack, P. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* **2001**, *1550*, 144-152.
- [259] Leechaisit, R.; Mahalapbutr, P.; Boonsri, P.; Karnchanapandh, K.; Rungrotmongkol, T.; Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V.; Pingaew, R. *ACS Omega* **2023**, *8*, 32593-32605.
- [260] Lee, S.H.; Kim, H.J.; Lee, J.S.; Lee, I.-S.; Kang, B.Y. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 1435-1439.
- [261] Nitiss, J.L. *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, *9*, 338-350.
- [262] Stefanisinová, M.; Tomeckova, V.; Kozurkova, M.; Ostró, A.; Marekova, M. *Spectrochim. Acta Part A* **2011**, *81*, 666-671.

- [263] Jeon, K.-H. Yu, H.-B.; Kwak, S.Y.; Kwon, Y.; Na, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 5921-5928.
- [264] Sangpheak, K.; Mueller, M.; Darai, N.; Wolschannb, P.; Suwattanasophon, C.; Ruga, R.; Chavasirid, W.; Seetaha, S.; Choowongkomone, K.; Kungwan, N.; Rungnimh, C.; Rungrotmongkol, T. *J. Enzyme Inhibit. Med. Chem.* **2019**, *34*, 134-143.
- [265] Pandey, M.K.; Sandur, S.K.; Sung, B.; Sethi, G.; Kunnumakkara, A.B.; Aggarwal, B.B. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17340-17350.
- [266] Funakoshi-Tago, M.; Tanabe, S.; Tago, K.; Itoh, H.; Mashino, T.; Sonoda, Y.; Kasahara, T. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 745-753.
- [267] Harikumar, K.B.; Kunnumakkara, A.B.; Ahn, K.S.; Anand, P.; Krishnan, S.; Guha, S.; Aggarwal B.B. *Blood*. **2009**, *113*, 2003-2013.
- [268] Al-Ghulikah, H.A.; Mughal, E.U.; Elkaeed, E.B.; Naeem, N.; Nazir, Y.; Alzahrani, A.Y.A.; Sadiq, A.; Shah, S.W.A. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1275*, 134658.
- [269] van Vuuren, R.J.; Visagie, M.H.; Theron, A.E.; Joubert, A.M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *76*, 1101-1112.
- [270] Peyrot, V.; Leynadier, D.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Rodriguez, A.; Nieto, J.M.; Andreu, J.M. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21296-21301.
- [271] Peyrot, V.; Leynadier, D.; Sarrazin, M.; Briand, C.; Menendez, M.; Laynez, J.; Andreu, J.M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11125-11132.
- [272] Arnst, K.E.; Banerjee, S.; Chen, H.; Deng, S.; Hwang, D.-J.; Li, W.; Miller, D.D. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 1398-1426.
- [273] Esterbauer, H.; Zöllner, H.; Scholz, N. *Z. Naturforsch.* **1975**, *30c*, 466-473.
- [274] Ballatori, N.; Krance, S.M.; Notenboom, S.; Shi, S.; Tieu, K.; Hammond, C.L. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 191-214.
- [275] Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191-1212.
- [276] Lagoutte, R.; Patouret, R.; Winssinge, N. *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2017**, *39*, 54-63.
- [277] Jackson, P.A.; Widen, J.C.; Harki, D.A.; Brummond, K.M. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 839-885.
- [278] Schaefer, D.; Cheng, X. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 663.
- [279] Baillie, T.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13408-13421.
- [280] Kumalo, H.M.; Bhakat, S.; Soliman, M.E.S. *Molecules*, **2015**, *20*, 1984-2000.
- [281] Petri, L.; Ábrányi-Balogh, P.; Varga, P.R.; Imre, T.; Keserű, G.M. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115357.
- [282] Ghosh, A.K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W.R. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 889-906.
- [283] Al-Rifai, N.; Rücker, H.; Amslinger, S. *Chemistry Eur. J.* **2013**, *19*, 15384-15395.
- [284] Rücker, H.; Al-Rifai, N.; Rascle, A.; Gottfried, E.; Brodziak-Jarosz, L.; Gerhäuser, C. Dick, T.P.; Amslinger, S. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3040.

- [285] de Freitas Silva, M.; Pruccoli, L.; Morroni, F.; Sita, G.; Seghetti, F.; Viegas, Jr. C.; Tarozzi, A. *Molecules* **2018**, *23*, 1803.
- [286] Benson, A.M.; Hunkeler, M.J.; Talalay, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 5216-5220.
- [287] Talalay, P.; De Long, M.J. Prochaska, H.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 8261-8265.
- [288] Fahey, J.W.; Zhang, Y.; Talalay, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 10367-10372.
- [289] Nakamura, Y.; Miyamoto, M.; Murakami, A.; Ohigashi, H.; Osawa, T.; Uchida, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 593-600.
- [290] Issaenko, O.A.; Amerik, A.Y. *Cell. Cycle*, **2012**, *11*, 1804-1817.
- [291] Mai, C.W.; Yaeghoobi, M.; Abd-Rahman, N.; Kang, Y.B.; Pichika, M.R. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 378-387.
- [292] Ramalho, S.D.; Bernades, A.; Demetrius, G.; Perez, C.N.; Vieira, P.C.; dos Santos, C.Y.; da Silva, J.A.; de Moraes, M.O.; Mousinho, K.C. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 1999-2006.
- [293] Amslinger, S.; Al-Rifai, N.; Winter, K.; Wörmann, K.; Scholz, R.; Baumeister, P.; Wild, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 549-554.
- [294] Dinkova-Kostova, A.T.; Massiah, M.A.; Bozak, R.E.; Hicks, R.J.; Talalay, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **2001**, *98*, 3404-3409.
- [295] Chomczynski, P.; Sacchi, N. *Anal. Biochem.* **1989**, *162*, 156-159.
- [296] Baddeley, T.C.; Gomes, L.R.; Low, J.N.; Skakle, J.M.S.; Turner, A.B.; Wardell, J.L.; Watson, G.R.J. *Zeitschr. Kristallogr.-Cryst. Mater.* **2017**, *4*, 317-333.
- [297] Baddeley, T.C.; Gomes, L.R.; Low, J.N.; Turner, A.B.; Wardell, J.L.; Watson, G.R.J. *Zeitschr. Kristallogr.-Cryst. Mater.* **2017**, *10*, 697-718.
- [298] Seaman, L.S.; da Costa, C.F.; de Souza, M.V.N.; Wardell, S.M.S.V.; Wardell, J.L.; Harrison, W.T.A. *Acta Cryst.* **2019**, *E75*, 1741-1747.
- [299] Perjéssy, A. *Chem. Zvesti* **1969**, *23*, 905-915.
- [300] Dugave, C.; Demange, L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475.
- [301] Reichardt, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 98
- [302] Kosower, E.M. An introduction to physical organic chemistry. Wiley, New York, NY, USA. Part 2, 1968, 259-386. ISBN 9780471504504.
- [303] Reichardt, C. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1903-1919.
- [304] Ballistreri, F.P.; Fortuna, C.G.; Musumarra, G.; Pavone, D.; Scire, S. *ARKIVOC* **2002**, *XI*, 54-64.
- [305] Abboud, J.-L.M.; Notario, R. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 645-718.
- [306] Gutmann, V. *Coord. Chem. Rev.* **1967**, *2*, 239-256.
- [307] Mayer, U.; Gutmann, V.; Gerger, W. *Monatsch. Chem.* **1975**, *106*, 1235-1257.
- [308] Taft, R.W.; Kamlet, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2886-2894.
- [309] Kamlet, M.J.; Taft, R.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377-383.

- [310] Mannhold, R.; Poda, G.I.; Ostermann, C.; Tetko, I.V. Calculation of molecular lipophilicity: state-of-the-art and comparison of log p methods on more than 96,000 compounds. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 861-893.
- [311] Rabtti, E.-H.M.A.; Natic, M.M.; Milojkovic-Opsenica, D.M.; Trifkovic, J.D.; Vuckovic, I.M.; Vajs, V.E.; Tesic, Z.L. RP TLC-based lipophilicity assessment of some natural and synthetic coumarins. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 522-530.
- [312] Perrin, D.D.; Dempsey, B.; Serjeant, E.P. pK_a prediction for organic acids and bases. Chapman and Hall, London, England, **1981**. ISBN 978-0412221903.
- [313] Hallgas, B.; Dobos, Z.; Ősz, E.; Hollósy, F.; Schwab, R.E.; Szabó, E.Z.; Erős, D.; Idei, M.; Kéri, G.; Lóránd, T. Characterization of lipophilicity and antiproliferative activity of *E*-2-arylmethylene-1-tetralones and their heteroanalogues., *J. Chrom. B.* **2005**, *819*, 283-291.
- [314] Testa, B.; Carrupt, P.A.; Gaillard, P.; Tsaiin, R.-S. Intramolecular interactions encoded in lipophilicity: Their nature and significance. In: Pliska, V.; Testa, B.; van de Waterbeemd, H. (Eds) *Lipophilicity in drug action and toxicology*. VCH Publishers, Weinheim, Germany, **1996**. ISBN 978-3-527-29383-4.
- [315] Dearden, J.C. Partitioning and lipophilicity in quantitative structure-activity relationships. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *61*, 203-228.
- [316] Kawada, T.; Suzuki, T.; Takahashi, M.; Iwai, K. Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats¹. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1984**, *72*, 449-456.
- [317] Schanker, L.S.; Tocco, D.J.; Brodie, B.B.; Hogben, C.A. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1958**, *123*, 81-88.
- [318] Boisset, M.; Botham, R.P.; Haeghele, K.D.; Lenfant, B. Pachot, J.I. Absorption of angiotensin II antagonists in Ussing chambers, Caco-2, perfused jejunum loop and *in vivo*: Importance of drug ionisation in the *in vitro* prediction of *in vivo* absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *10*, 215-224.
- [319] Gleeson, M.P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 817-834.
- [320] Manallack, D.T.; Prankerd, R.J.; Yuriev, E.; Oprea, T.I.; Chalmers, D.K. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 485-496.
- [321] Cantu, M.D.; Hillebranda, S.; Carrilho, E. *J. Chrom. A.* **2005**, *1068*, 99-105.
- [322] Kim, M.K.; Shim, C. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 605-616.
- [323] Koepsell, H. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2015**, *11*, 1619-1633.
- [324] Zhang, Q.Y.; Wikoff, J.; Dunbar, D.; Kaminsky, L. *Drug Metab. Dispos.* **1996**, *24*, 322-328.
- [325] Dubey, R.K.; Singh, J. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *37*, 169-176.
- [326] Nijhoff, W.A.; Groen, G.M.; Peters, W.H.M. *Int. J. Oncol.* **1993**, *3*, 1131-1139.
- [327] Zhou, T.; Chen, Y.; Huang, C.; Chen, G. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, *32*, 804-809.
- [328] Maiti, S.; Chen, G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *418*, 161-168.
- [329] Kobayashi, T.; Yokota, H.; Ohgiya, S.; Iwano, H.; Yuasa, A. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *259*, 948-955.

- [330] Arana, M.R.; Tocchetti, G.N.; Rigalli, J.P.; Mottino, A.D.; Villanueva, S.S.M. *Pharmacol. Res.* **2016**, *109*, 32-44.
- [331] Silverman R.B. The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions, Revised edition. Elsevier, London, **2002**. ISBN 978-0126437317.
- [332] Mottaghipisheh, J.; Stuppner, H. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2735.
- [333] Abegaz, B.M.; Kinf, H.H. *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*, 1-20.
- [334] Abegaz B.M.; Mutanyatta-Comar J.; Nindi, M. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 475-498.
- [335] Castelli, M.V.; López S.N. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2017**, *54*, 315-354.
- [336] Kwon, S.; Lee, S.; Heo, M.; Lee, B.; Fei, X.; Corson, T.W.; Seung-Yong Seo, S.-Y. *ACS Omega* **2020**, *5*, 11043-11057.
- [337] Vashishtha, S.C., Nazarali, A.J., Dimmock, J.R. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1998**, *18*, 437-445.
- [338] Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelinsperger, C. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39-51.
- [339]. Del Bino, G.; Darzynkiewicz, Z.; Degraef, C.; Mosselmans, R.; Fokan, D.; Galand, P. *Cell Proliferation* **1999**, *32*, 27-37.
- [340] Schoene, N.W.; Kamara, K.S. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *27*, 364-369.
- [341] Murray, A. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 872-876.
- [342] Lepley, D.M.; Li, B.; Birt, D.F.; Pelling, J.C. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2367-2375.
- [343] Rao, Y.K.; Fang, S.H.; Tzeng, Y.M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2679-2686.
- [344] Rao, Y.K.; Fang, S.H.; Tzeng, Y.M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6850-6855.
- [345] Hsu, Y.L.; Kuo, P.L.; Tzeng, W.S.; Lin, C.C. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 704-713.
- [346]. Kimler, B.F.; Schneiderman, M.H.; Leeper, D.B. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 809-814.
- [347] Konopa, J. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2303-2309.
- [348] Erenpreisa, J.; Cragg, M.S. *Cancer Cell Int.* **2001**, *1*, 1-7.
- [349] Stanton, R.A.; Gernert, K.M.; Nettles, J.H.; Aneja, R. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.
- [350] Janssen, A.; Medema, R.H. *Oncogene* **2011**, *30*, 2799-2809.
- [351] Shi, J.; Zhou, Y.; Huang, H.-C.; Mitchison, T.J. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 4518-4526.
- [352] Orth, J.D.; Loewer, A.; Lahav, G.; Mitchison, T.J. *Mol. Biol. Cell.* **2012**, *23*, 567-576.
- [353] Katrusiak, A.; Ratajczak-Sitarz, M.; Kaluski, Z.; Orlov, V.D. *Acta Crystallogr.* **1987**, *C43*, 103-105.
- [354] Kaluski, Z.; Skrzypczak-Jankun, E.; Orlov, V.D.; Borovoi, I.A. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Chim.* **1978**, *26*, 869-876.

- [355] Abraham, M.H.; Benjelloun-Dakhama, N.; Gola, J.M.R.; Acree, Jr. W.E.; Cain, W.S.; Cometto-Muniz, J.E. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 825-829.
- [356] Attar, S.; O'Brien, Z.; Alhaddad, H.; Golden, M.L.; Calderón-Urrea, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2055-2073.
- [357] Ember, I. MTA Disszertáció, **1997**. Pécs.
- [358] Ember, I.; Kiss, I.; Ghodrattollah, N.; Raposa, T. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 1149-1152.
- [359] Ember, I.; Kiss, I.; Gombkötő, G.; Müller, E.; Szeremi, M. *Cancer Det. Prevent.* **1998**, *22*, 241-245.
- [360] Ember, I.; Kiss, I.; Vermes, É. *In Vivo* **1998**, *12*, 201-208.
- [361] Ember, I.; Kiss, I.; Pusztai, Zs. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 445-448.
- [362] International Agency for Research on Cancer (IARC) Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, **2010**, *92*, 1-853.
- [363] Wilson, N.M.; Christou, M.; Turner, C.R.; Wrighton, S.A.; Jefcoate, C.R. *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 1475-1483.
- [364] Gao, J.; Lauer, F.T.; Mitchell, L.A.; Burchiel, S.W. *Toxicol. Sci.* **2007**, *98*, 137-144.
- [365] Antstead, G.M.; Wilson, S.R.; Katzenellenbogen, J.A. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2163-2171.
- [366] Bayer, H.; Batzl, C.; Hartmann, R.W.; Mannschreck, A. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2685-2691.
- [367] Lewis, D.F.V.; Ioannides, C.; Parke, D.V. *Chem. Biol. Interact.* **1987**, *64*, 39-60.
- [368] Lewis, D.F.V.; Ioannides, C.; Parke, D.V. *Biochem. Toxicol.* **1986**, *35*, 2179-2185.
- [369] Sridhar, J.; Goyal, N.; Liu, J.; Foroozesh, M. *Molecules*, **2017**, *22*, 1143.
- [370] Strobl, W.G.; Greim, H. Structural models for substrates and inhibitors of cytochrome P-450 enzymes. In: Schenkman, J.B.; Greim, H. (Eds.), *Cytochrome P450* (Chapter 13), Springer, Berlin, **1993**, 195-207. ISBN 9783540559085.
- [371] Lewis, D.F.V.; Lake, B.G.; George, S.G.; Dickins, M.; Eddershaw, P.J.; Tarbit, M.H.; Beresford, A.P.; Goldfarb, P.S.; Guengerich, F.P. *Toxicology* **1999**, *139*, 53-79.
- [372] Lewis, D.F.V. *Toxicology*, **2000**, *144*, 197-203.
- [373] Sridhar, J.; Liu, J.; Foroozesh, M.; Stevens, C.L.K. *Molecules* **2012**, *17*, 9283-9305.
- [374] Dai, Z.; Wu, Y.; Xiong, Y.; Wu, J.; Wang, M.; Sun, X.; Ding, X.; Yang, L.; Sun, X.; Ge, G. *Med. Res. Rev.* **2024**, *44*, 169-234.
- [375] Ellmann, G.L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 443-450.
- [376] Gul, M.; Gul, H.I.; Hanninen, O. *Toxicol. in Vitro* **2002**, *16*, 107-112.

- [377] Michaelsen, J.T.; Dehnert, S.; Giustarini, D.; Beckmann, B.; Tsikas, D. *J. Chromat. B.* **2009**, *877*, 3405-3417.
- [378] Lóránd, T.; Kocsis, B.; Sohár, P.; Nagy, G.; Kispál, G.; Krane, H.G.; Schmitt, H.; Weckert, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 705-717.
- [379] Hughes, H.; Taeschke, H.; Mitchell, J.R. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 681-685.
- [380] Winter, E.; Chiaradia, L.D.; Cordova, C.A.S.; Nunes, R.J.; Yunes, R.A.; Creczynski-Pasa, T.B. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8026-8034.
- [381] Wang, J.; Wang, S.; Song, D.; Zhao, D.; Sha, Y.; Jiang, Y.; Jing, Y.; Cheng, M. *Chem. Biol. Drug Design* **2009**, *73*, 511-514.
- [382] Miyamoto, T.; Silva, M.; Hammock, B.D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *254*, 203-213.
- [383] Zhang, K.; Das, N.P. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 2063-2068.
- [384] Mccaughan, F.M.; Brown, A.L.; Harrison, D.J. *J. Pathol.* **1994**, *172*, 357-362.
- [385] Townsend, D.M.; Tew, K.D. *Oncogene* **2003**, *22*, 7369-7375.
- [386] Caccuri, A.M.; Antonini, G.; Board, P.G.; Parker, M.W.; Nicotra, M.; Bello, M.L.; Federici, G.; Ricci, G. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 419-425.
- [387] Mannervick, B. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1749.
- [388] Rohani, N.; Hao, L.; Alexis, M.; Joughin, B.; Krismer, K.; Moufarrej, M.; Soltis, A.; Lauffenburger, D.; Yaffe, M.; Burge, C.; Bhatia, S.N.; Gertler, F.B. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1952-1966.
- [389] Aldini, G.; Altomare, A.; Baron, G.; Vistoli, G.; Carini, M.; Borsani, L.; Sergio, F. *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 751-762.
- [390] LoPachin, R.M.; Gavin, T. *Free Radic. Res.* **2016**, *50*, 195-205.
- [391] Bernasconi, C.R. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 4017-4090.
- [392] Allen, C.F.H.; Humphlett, W.J. *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 2315-2321.
- [393] Katsori, A.-M.; Hadjipavlou-Litina, D. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1062-1081.
- [394] Repanas, A.; Katsori, A.M.; Hadjipavlou-Litina, D. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 952-970.
- [395] Gul, H.I.; Yerdelen, K.O.; Gul, M.; Das, U.; Pandit, B.; Li, P.K.; Secen, H.; Sahin, F. *Arch. Pharm.* **2007**, *340*, 195-201.
- [396] Reddy, M.V.B.; Su, C.R.; Chiou, W.F.; Liu, Y.N.; Chen, R.Y.H.; Bastow, K.F.; Lee, K.H.; Wu, T.S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7358-7370.
- [397] Gul, H.I.; Yerdelen, K.O.; Das, U.; Gul, M.; Pandit, B.; Li, P.K.; Dimmock, J.R. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1675-1681.
- [398] Reddy, M.V.B.; Chen, S.S.; Lin, M.L.; Chan, H.H.; Kuo, P.C.; Wu, T.S. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1549-1554.
- [399] Hieu, B.T.; Thuy, L.T.; Thuy, V.T.; Tien, H.X.; Chinh, L.V.; Hoang, V.D.; Vu, T.K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, *33*, 1586-1592.
- [400] Bilginer, S.; Gul, H.I.; Mete, E.; Das, U.; Sakagami, H.; Umemura, N.; Dimmock, J.R. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 974-980.

- [401] Modzelewska, A.; Pettit, C.; Achanta, G.; Davidson, N. E.; Huang, P.; Khan, S. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3491-3495.
- [402] Solcaniova, E.; Toma, S.; Gronowitz, S. *Org. Magn. Reson.* **1976**, *8*, 439-443.
- [403] Dimmock, J. R.; Kandepu, N. M.; Hetherington, M.; Quail, J. W.; Pugazhenth, U.; Sudom, A. M.; Chamankhah, M.; Rose, P.; Pass, E.; Allen, T. M.; Halleran, S.; Szydowski, J.; Mutus, B.; Tannous, M.; Manavathu, E. K.; Myers, T. G.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1014-1026.
- [404] Bala, S.; Sharma, N.; Kajal, A.; Kamboj, S.; Saini, V. *Int. J. Med. Chem.* **2014**, Article ID 191072.
- [405] Bilginer, S.; Gul, H.I.; Mete, E.; Das, U.; Sakagami, H.; Umemura, N.; Dimmock, J.R. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 974-980.
- [406] Gul, H.I.; Yerdelen, K O.; Das, U.; Gul, M.; Pandit, B.; Li, P.K.; Dimmock, J.R. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1675-1681.
- [407] Lutolf, M.P.; Tirelli, N.; Cerritelli, S.; Cavalli, L.; Hubbell, J.A. *Bioconj. Chem.* **2001**, *12*, 1051-1056.
- [408] Boutureira, O.; Bernardes, G.J. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174-2195.
- [409] Gitler, C.; Zarmi, B.; Kalef, E. *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 366-375.
- [410] Zimmerman, H.R. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 263-268.
- [411] Kubo, Y.; Armstrong, R.N. *Chem. Res. Toxicol.* **1989**, *2*, 144-145.
- [412] Kelley, M.; Donley, A.; Clark, S.; Clark, A. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 15652-15661.
- [413] Zhao, C.; Rakesh, K.P.; Ravidar, L.; Fang, W.-Y.; Qin, H.-Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *162*, 679-734.
- [414] Ovung, A.; Bhattacharyya, J. *Biophys. Rev.* **2021**, *13*, 259-272.
- [415] Zafar, W.; Sumrra, S.H.; Hassan, A.U.; Chohan, Z.H. *J. Coord. Chem.* **2023**, *76*, 546-580.
- [416] de Araújo, G.S.; Moura, A.F.; Barros, A.B.; Moraes, M.O.; Pessoa, C.; Perez, C.N.; de Castro, M.R.C.; Ribeiro, F.O.S.; da Silva, D.A.; Sousa, P.S.A.; Rocha, J.A.; Filho, J.D.B.M.; Araujo, A.J. *Chem. Biol. Interact.* **2024**, *398*, 111115.
- [417] Osama, M.; Hussain, W.; Hussain, H.T. *Int. J. Modern Org. Chem.* **2014**, *3*, 18-33.
- [418] Kozurkova, M.; Tomescova, V. Interaction of chalcone derivatives with important biomacromolecules. In *Chalcones and their synthetic analogs*; Perjési, P., Ed.; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA, **2020**, 95-133. ISBN 9781536187946.

Köszönetnyilvánítás

Bár a jelen dolgozat a kandidátusi értekezésemet követő időszakban végzett munkám eredményei, azok létrejöttében számos, a fokozat megszerzése előtti években szakmai ismeretek és kísérleti tapasztalatok átadása útján kapott támogatásért tartozom több általam igen tisztelt témavezetőmnek köszönettel.

Így meghatározó jelentőségűnek tartom a szegedi tanulmányaim és az ún. „kisdoktori” munkáim során Schneider Gyula, Stájer Géza, Bernáth Gábor és Fülöp Ferenc professzoroktól kapott szakmai ismereteket. Elsőként nekik szeretném megköszönni, hogy a kapott ismertek birtokában a későbbiekben önállóan tudtam kutatásokat folytatni.

A „szegedi évek” után az önálló kutatómunkát az akkori Pécsi Orvostudományi Egyetem Orvosi Kémiai Intézetében (ma Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet), Szabó Dezső professzor által vezetett munkacsoportban kezdtem meg. Ezúton is köszönöm Szabó Dezső professzornak, hogy lehetőséget adott, hogy munkacsoportjában az általam javasolt kutatási területeken dolgozhassak, valamint Lóránd Tamás egyetemi docensnek és néhai Oszbach György egyetemi adjunktusnak akikkel a sikeres és sikertelen kísérletek megbeszélése, értelmezése, nagyban segítette a további eredményes kísérletek tervezését és kivitelezését.

Ugyancsak köszönettel tartozom Sidney D. Nelson professzornak (Washington Egyetem, Seattle, WA, USA), akinek laboratóriumában – a Fogarty Alapítvány támogatásával – megismerkedhettem a testidegen anyagok metabolikus transzformációinak mechanizmusaival és (*in vitro* és *in vivo*) kísérletes vizsgálatuk módszereivel.

A szintetizált vegyületek szerkezetigazolása kapcsán kialakult eredményes együttműködésért köszönettel tartozom néhai Sohár Pál professzornak, Batta Gyula professzornak, Földesi András egyetemi docensnek és néhai Ősz Erzsébet egyetemi docensnek.

A vegyületek széleskörű biológiai hatásai, és spektroszkópiai tulajdonságai közötti szerkezet-hatás, illetve szerkezet-spektroszkópiai paraméter összefüggések megismerése nem jöhetett volna létre Jonathan R. Dimmock (University of Saskatchewan, Saskatoon, SA, Kanada) és Erkki Kolehmainen (University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finnország) professzorokkal kialakult szoros együttműködések nélkül.

A vegyületek biológiai vizsgálatainak területén a hazai együttműködő partnerek között külön szeretném megköszönni dr. Vereczkey Lászlóval és dr. Monostory Katalinnal, Berki Tímea professzorral, valamint néhai Ember István professzorral kialakult szakmai együttműködésükért. Ugyancsak kitüntetett köszönettel tartozom Fischer Emil, Mózsik Gyula professzoroknak és Past Tibor tudományos főmunkatársnak, akikkel történt együttműködésem során elsajátíthattam a kísérletes és klinikai farmakokinetikai vizsgálatok elméletét és gyakorlatát.

Köszönetem fejezem ki néhai Szolcsányi János professzornak, a pécsi gyógyszerészképzés megalapítójának, akinek támogatásával, egyesült államokbeli kutatómunkám abbahagyásával, az újonnan megalakult Gyógyszerészi Kémiai intézet alapító igazgatója lehettem.

A hazai kooperáló partnerek között megkülönböztetett köszönettel tartozom Takácsné Novák Krisztina és Fischer Emil professzoroknak, akik azon túlmenően, hogy eredményes kutatási együttműködést folytattak velem és munkatársaimmal, önzetlenül felajánlották az általuk kimunkált laboratóriumi vizsgálati módszereknek a Gyógyszerészi Kémiai Intézet laboratóriumaiban történő beállítását és alkalmazását.

Külön szeretnék köszönetet mondani néhai Gregus Zoltán és Sohár Pál professzoroknak, valamint Prókai László professzornak, akik azokban az években biztosítottak számomra kutatási lehetőséget laboratóriumaikban, amikor az elsődleges munkahelyem körülményei nem tették azt lehetővé. A velük együtt végzett munka során tovább szélesedtek szakmai ismereteim, a metabolikus transzformációk biokémiája, a ferrocén-származékok kémiája, valamint a metabolikus transzformációk tömegspektrometriai vizsgálati lehetőségei területén.

Ugyancsak köszönettel tartozom korábbi (Almási Attila, Rozmer Zsuzsanna, Kuzma Mónika, Székely Noémi, Aline Bernardes, Guilio D. D'Oliviera, Fatemeh Kenari, Hawsar O. Mohammed) és jelenlegi (Bognár Gábor) doktoranduszaimnak, valamint a szakképzett technikusoknak (Szemmelróthné Mátrai Erika, Ódoré Fábrián Erika, Moravec Zsuzsanna, Kadlecsik Csaba) akiknek a kísérletes munkákban történt részvétele nélkül nem születhettek volna meg a dolgozatban leírt és abban nem említett eredmények.

Köszönet illeti a megjelent közleményeim minden egyes társszerzőjét, akik hozzájárultak a kutatási eredmények eléréséhez. Közülük külön szeretnék köszönetet mondani Molnár Szilárdnak és Pintér Zoltánnak, akik hosszú időn keresztül, mint „fizetés nélküli tanársegéd” vettek részt, illetve vesznek ma is részt, a kutatócsoportom munkájában.

Köszönettel tartozom korábbi (PTE Orvosi Kémiai Intézet) és jelenlegi munkahelyem (PTE Gyógyszerészi Kémiai Intézet) munkatársainak, akik szakmai segítségükkel közvetve vagy közvetlenül segítették munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek (Szárász Eszternek és Perjesi Andrásnak), hogy támogattak a tanulmányaimban, feleségemnek (Hámori Ildikónak), a kutató munka és az egyéb egyetemi feladataim természetéből eredő „nem-tradicionális” időbeosztásom elfogadásának, ezáltal munkám támogatásának, valamint gyermekeinek (Katalinnak és Zsófiának), akik nélkül a dolgozatban leírt munkák végzésének hétköznapija sokkal szegényesebbek lettek volna.