

Szemelvények a PTE GyTK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézetének újabb (2013-2021) kutatási eredményeiből

BOGNÁR Balázs^a, LEMLI Beáta^a, KÖRÖSI László^b, AMEEN Mohamed Hiba^a,
DERDÁK Diána^a, ISBERA Mostafa^a, PREISZ Zsolt^a, ÚR Györgyi^a, P. SÁR Cecília^a,
KUNSÁGI-MÁTÉ Sándor^{a,c,*}, KÁLAI Tamás^{a,c,*}

^a PTE GyTK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézet, Honvéd utca 1., 7624 Pécs, Magyarország

^b PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Pázmány Péter utca 4., 7634 Pécs, Magyarország

^c PTE Szentágotthai János Kutatóközpont, Ifjúság u. 20., 7624 Pécs, Magyarország

1. Bevezetés

A PTE GyTK Szerves és Gyógyszerkémiai Intézete alapítói, Prof. Hideg Kálmán (1934-2018) és Dr. Hankovszky H. Olga (1934-2020) halála után is megtartotta fő profilját, a csaknem fél évszázada művelt stabilis nitroxid szabad gyökök szintézise, átalakításai és alkalmazásai tématerületet. Ugyanakkor kutatási köre kibővült anyagtudományi kutatásokkal is, amelyek kiterjednek a stabilis nitroxid szabad gyökök, a makromolekulák/szupramolekuláris rendszerek és kismolekulák másodlagos kémiai kölcsönhatásainak vizsgálatára, valamint a mezőgazdaságban is alkalmazható nanoszerkezetű anyagok bizonyos tulajdonságainak vizsgálatára is.

Az intézethez új kollégák és PhD hallgatók csatlakoztak az elmúlt nyolc évben. Többen közülük már megvédték PhD értekezésüket vagy PhD témájukon dolgoznak a Kémiai Doktori Iskola, az Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskola vagy a Gyógyszertudományok Doktori Iskola keretei között. Másik jelentős változás, hogy az intézet oktatási profilja miatt átkerült az időközben megalakult Gyógyszerésztudományi Karra. Jelen összefoglaló cikkünk a 2013-ban megjelent közleményünket¹ meghaladó főbb eredményeinket mutatja be szerves kémiai kutatások és anyagtudományi kutatások területekre bontva.

A stabilis nitroxid szabad gyökök kutatásának egyik fő célja új, a biomolekulák (fehérjék, nukleinsavak, lipidek) kovalens módosítására alkalmas u.n. spinjelző vegyületek szintézise. A spinjelzők segítségével szerezhetünk információt a biomolekula szerkezetéről és funkciójáról ESR spektroszkópiás vizsgálatokkal. Nitroxid-biomolekula vagy nitroxid-gyógyszermolekula hibridek létrehozása kutatásaink szintén fontos irányvonala szerkezet-hatás összefüggések felderítése céljából. De legalább ennyire jelentős a piperidin, tetrahidropiridin, pirrolin és pirrolidin típusú nitroxidokon, mint részben vagy teljesen telített, többszörösen szubsztituált, N-heterociklusos gyűrűkön végrehajtható szelektív (szabadgyökös centrumot nem érintő) reakciók tanulmányozása, optimalizálása.

Ami az anyagtudományi kutatásokat illeti, itt a biradikálisok részletes vizsgálatával a kettősen spinjelölt biomolekulák spinjelzői közötti spin-spin kölcsönhatást kívántuk modellezni, míg a módosított, nanoszerkezetű titán-dioxidokkal a reaktív oxigén származék generáló képességet kívántuk optimalizálni. A metotrexát (MTX) és a fototrexát (PTX) sajátosságainak tanulmányozása az optimális hatóanyag leadás, ill. a hatóanyag fényel történő aktiválásának szempontjából fontosak és további gyógyszer technológiai kutatások, valamint a célzott terápia szempontjából lehetnek jelentősek.

2. Eredmények

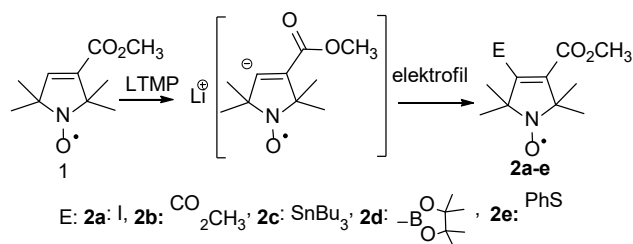
2.1. Szerves kémiai kutatások

A stabilis nitroxidok felfedezése óta eltelt kb. 70 év alatt fokozatosan ismerték fel a vegyületsalád alkalmazhatóságának számos területét. Így alkalmazzák őket spinjelzőként, ko-oxidánsként, SOD-mimetikumként, polimerizációs segédanyagként, szerves alapú ferromágnesek építőköveként, NMR és EPR kontrasztanyagként vagy akkumulátorok katódanyagaként.^{2,3} Ezen területek különböző heterociklusos alapvázú, változatosan szubsztituált nitroxidok szintézisét követelik meg, mi ebben az összefoglalóban a pirrolin-, piperidin- és pirrolidinvázú vegyületek módosításaira szorítkozunk.

2.1.1. Nitroxidok funkcionálizálása

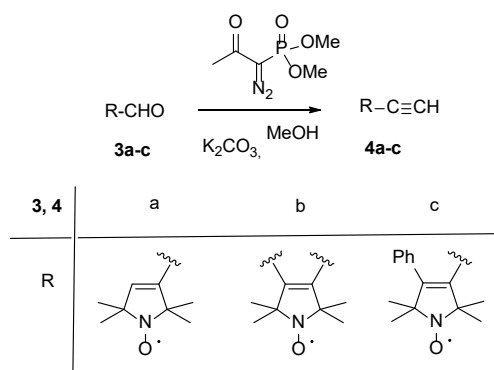
Munkánk során sikerült megvalósítanunk a könnyen hozzáférhető, monofunkcionális **1** észtervegyületből a 3,4-bifunkcionális pirrolin nitroxidszármazékok szintézisét, így a **2a-c** vegyületeket állítottunk elő, Li-TEMP-nel végzett deprotonálással, majd a szubsztrátum elektrofilekkel történő reagáltatásával (1. ábra).⁴

* Tel.: +36 72 536 220; e-mail: tamas.kalai@aok.pte.hu, sandor.kunsagi-mate@aok.pte.hu



1. ábra. 3,4-Diszubsztituált pirrolin nitroxidok egyszerűsített szintézise.

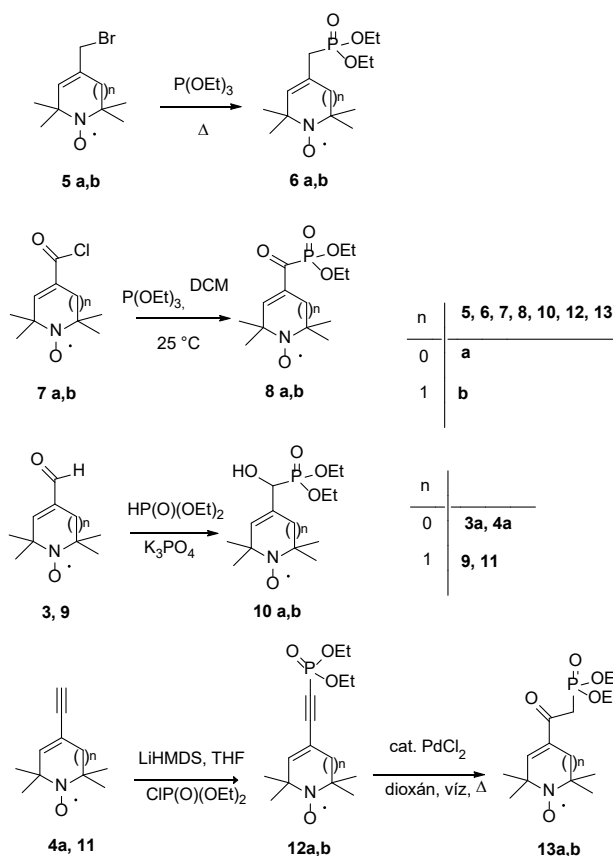
A paramágneses acetilénvegyületek előállítására a Bestmann-Ohira reagenst alkalmaztuk, ily módon a könnyen hozzáférhető **3a-c** aldehidekből egylépéses reakcióban kaptuk a megfelelő **4a-c** acetiléneket (2. ábra).⁵



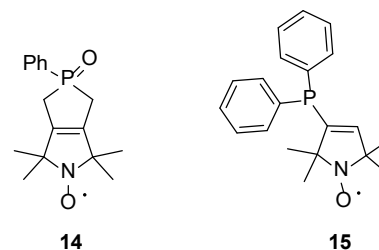
2. ábra. Egylobbikos módszer paramágneses acetilén előállítására aldehidekből.

Korábbi célunk volt a foszforkémiában alkalmazott szintetikus módszerek adaptálása paramágneses foszforvegyületek előállítására: így a **6a,b**⁶ allil-foszfonát-észterek és a **8a,b**⁷ α-keto-foszfonát-észterek szintézise Arbuzov-reakcióval, a **10a,b**⁶ α-hidroxi-foszfonát-észterek szintézise Pudovik-reakcióval, valamint a **13a,b** β-keto-foszfonát-észterek szintézise a **12a,b** etinil-foszfonátok Pd(II)-katalizált hidratálásával.⁷

Bár paramágneses foszfortartalmú vegyületekre vonatkozó szintéziseket szép számmal közöltek,^{8,9} az előbb felsorolt fontos vegyületcsaládok pirrolin illetve piperidin nitroxidokra nem voltak leírva (3. ábra). Az előállított vegyületek jól használhatók voltak C-C kötés kialakítására Horner-Wadsworth-Emmons-reakciókban, valamint acilezésre. A közelmúltban elsőként írtuk le a pirrolin nitroxiddal kondenzált **14** foszfolén-oxid szintézisét McCormac-reakcióval illetve a **15** pirrolin nitroxid difenilfoszfín vegyület szintézisét (4. ábra).¹⁰



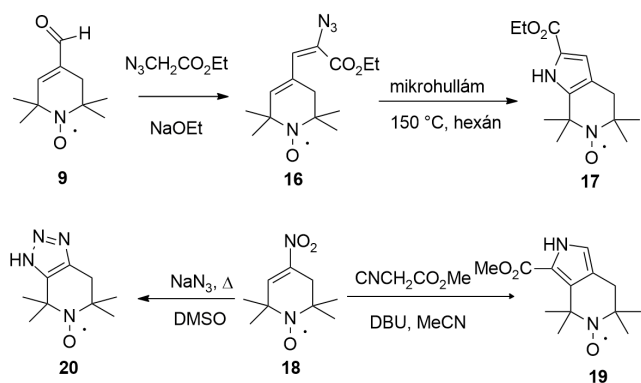
3. ábra. Pirrolin és tetrahidropiridin foszfonát-észterek szintézise



4. ábra. Pirrolin nitroxiddal kondenzált foszfolén-oxid és pirrolin nitroxid difenilfoszfín

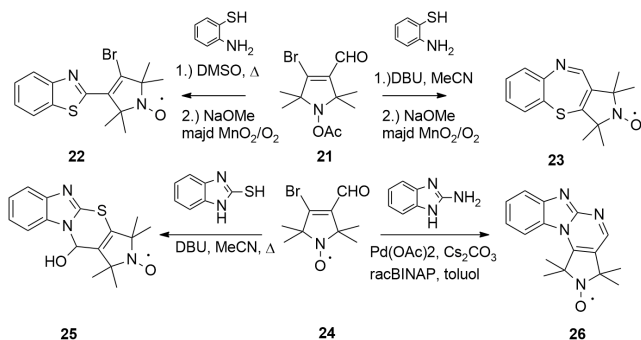
2.1.2. Nitroxidokkal kondenzált heterociklusok szintézise

Tetrahidropiridin nitroxiddal kondenzált pirrol izomereket (**17**, **19**) állítottunk elő Hemetsberger-Knittel-reakció és Barton-Zard-reakció segítségével. A **18** nitrovegyületből a **20** triazolo[4,5-c]piridinvázas vegyületet állítottuk elő nátrium-aziddal (5. ábra).¹¹



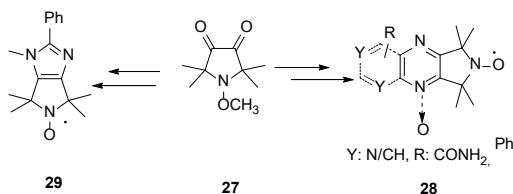
5. ábra. Tetrahidropiridinnel kondenzált azolok szintézise.

A nitroxid funkciós csoporton védett **21** β -bróm- α,β -telítetlen aldehid 2-aminotiofenollal való reakciója a reakciókörülményektől függően a **22** 2-szubsztituált benzotiazolhoz vagy a **23** 1,5-benzotiazepin-vázis vegyülethez vezetett.¹² A **24** β -bróm- α,β -telítetlen aldehid reakciója benzimidazol-2-tiollal a **25** nitroxiddal anellált 1,3-tiazinszármazékot adta, míg a 2-aminobenzimidazollal kondenzációs reakció és Buchwald-Hartwig-kapcsolás eredményeként a **26** benzimidazo[1,2-a]pirrolo[3,4-e]pirimidin származékhoz vezetett (6. ábra).¹³



6. ábra. Nitroxidokkal kondenzált ill. nitroxidokhoz kapcsolt heterociklusok szintézise.

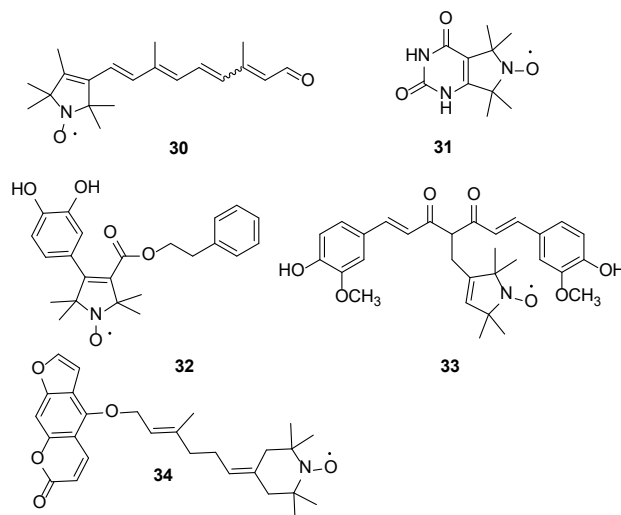
A **28** 1,4-diazinokkal és a **29** 1,3-imidazollal kondenzált vegyületekhez a kulcs a **27** 1,2-dion szintézisének a kidolgozása volt (7. ábra).¹⁴ Az *O*-metilcsoport bevitelét Fenton-reakcióval valósítottuk meg, míg az *O*-demetilézést Cope-eliminációval sikerült végrehajtani.¹⁵ A heterociklusokkal és szén ciklusokkal kondenzált pirrolin, tetrahidropiridin és imidazolin nitroxidok szintéziséről egy összefoglaló közleményt állítottunk össze.¹⁶



7. ábra. Imidazollal és 1,4-diazinokkal kondenzált pirrolin nitroxidok szintézisének sematikus ábrája.

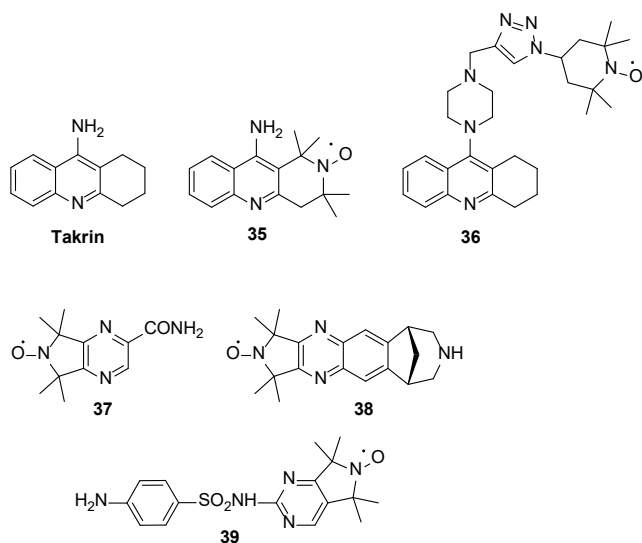
2.1.3. Nitroxidokkal módosított biomolekulák és gyógyszerek szintézise

A paramágnesesen módosított biomolekulák szintézisének két célja van, egyrészt vizsgálni a makromolekula-receptor kölcsönhatást EPR spektroszkópia segítségével, másrészt vizsgálni az így módosított biomolekula hatásspektrumának módosulását. Intézetünk régóta foglalkozik paramágnesesen módosított biomolekulák és gyógyszerek szintézisével. Az utóbbi néhány évben a paramágnesesen módosított retinal **30**,¹⁷ uracil **31**,⁴ kávésav-fenetilészter **32**,¹⁸ kurkumin **33**,¹⁹ és bergamottin **34**²⁰ szintézisét közzétük (8. ábra). Az utóbbi három esetben szerkezet-hatás összefüggéseket is sikerült feltárnunk. Általánosságban megállapíthattuk, hogy a nitroxidok sok esetben csökkentették a toxicitást illetve kedvezően befolyásolták az alapvegyület antiproliferatív hatását.



8. ábra. Paramágnesesen módosított biomolekulák

Hasonlóképpen, a paramágnesesen módosított gyógyszer-molekulák között az eredetinel kedvezőbb hatású vegyületet találtunk, bár meg kell jegyeznünk, hogy a tetrametil-tetrahidropiridin gyűrű nem bizonyult a telített gyűrű jó bioizosztérének a takrinban (palliatív anti-Alzheimer gyógyszer), tekintve, hogy a **35** vegyület elvesztette acetilkolinészteráz inhibíciós hatását. Ugyanakkor a **36** vegyület jó acetilkolinészteráz inhibitor volt és védett az amiloid-beta okozta toxicitással szemben is.²¹ A pirrolin nitroxiddal kondenzált diazinok közül kiemeljük a spinjelölt pirazinamidot **37**,¹⁴ a spinjelölt chantixot **38**,²² és a spinjelölt szulfadiazint **39**²³ (9. ábra). Ez utóbbi jó példa arra, hogy a spinjelölt gyógyszerek a környezeti kémiai analitikában is alkalmazhatók. Tekintve, hogy a környezeti minták általában nem transzparensnek, ezért optikai spektroszkópiával nehezen, viszont EPR spektroszkópiával jól vizsgálhatók. Így a **39** vegyülettel végzett modell kísérlet segítségével sikerült bizonyítani az Osnabrück-i Egyetem kutatóival együttműködésben, hogy az állatgyógyászatban még széleskörűen alkalmazott szulfonamid típusú gyógyszerek a talaj huminsavaihoz az NH_2 csoporton keresztül irreverzibilisen kötődnek.²⁴

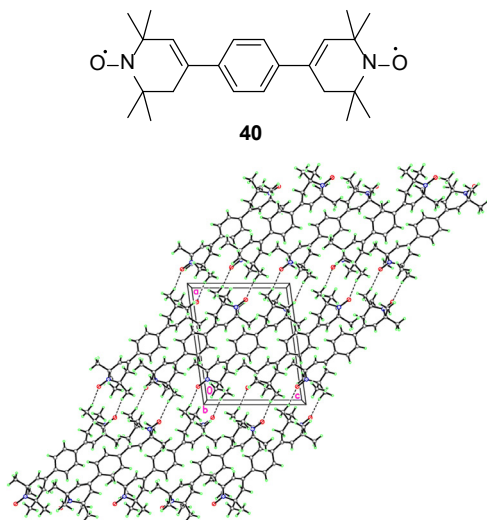


9. ábra. A takrin és a klinikumban alkalmazott gyógyszerek paramágneses analogonjai.

2.2. Anyagtudományi kutatások

2.2.1. Kettős gyökök szintézise és tanulmányozása

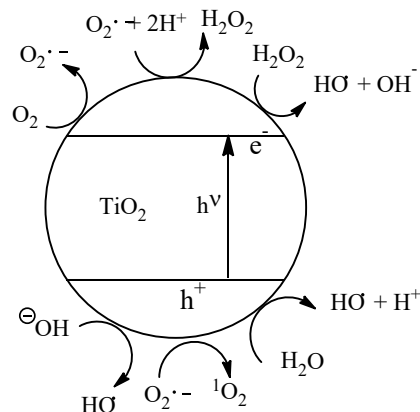
Sonogashira- és Suzuki-kapcsolással a nitroxid funkciót különböző távolságban tartalmazó kettős gyökös vegyületeket állítottunk elő, beleértve néhány ^{13}C és ^{15}N izotópot tartalmazó származékot is. Orosz kutatókkal e vegyületek spin-spin kölcsönhatását és kicserélődési integráljait vizsgáltuk. Az EPR spektroszkópiai mérésekkel kapott értékek jó egyezést adtak a DFT számítások becsléseivel.²⁵⁻²⁸ Az 1,4-arilidén hidat tartalmazó **40** származék²⁹ esetében sikerült a kristályokról röntgendiffrakciós felvételt is készíteni, amely segített meghatározni a pontos nitroxid-nitroxid távolságot (10. ábra). Merev molekulákról lévén szó, ez jól korrelál az oldatfázisban lévő molekulában található nitroxid-nitroxid távolsággal.



10. ábra. A **40** vegyület és kristályszerkezete röntgenkristallográfias mérések alapján. A szaggatott vonalak a H-kötéseket jelölik. (Springer kiadó engedélyével).

2.2.2. Nagy reaktivitású titán-dioxid fotokatalizátorok EPR-spektroszkópiás vizsgálata

A különböző fém-oxid fotokatalizátorok napjainkban egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert az ipari és mezőgazdasági szennyvizek tisztításában, fontos szerepük lehet a szerves szennyeződések átalakításában és a mikroorganizmusok inaktiválásában. Az egyik legígéretesebb és legjobban tanulmányozott félvezető fém-oxid a TiO_2 , melynek gerjesztését követően a vegyértéksávban visszamarad egy elektronhiányos lyuk (h^+), míg a vezetési sávba egy elektron (e^-) lép (11. ábra). A rendszerben jelen lévő szerves szubsztátok egyrészt a katalizátor felületén, az elektronlyukkal történő reakcióban, másrészt a víz és oxigén jelenlétében a TiO_2 felszínén képződő reaktív oxigén származékokkal (ROS) — mint a hidroxil gyök, a szuperoxid gyökion, a hidrogén-peroxid vagy a szingulett oxigén — reakcióba lépve oxidálódnak.³⁰ A titán-dioxidnak több kristálmódosulata létezik, közülük a legismertebbek közé tartozik a nagy fotoaktivitású anatáz és a termodinamikailag stabilabb rutil. Természetben megtalálható polimorfjai a brookit és $\text{TiO}_2(\text{B})$ is.³¹

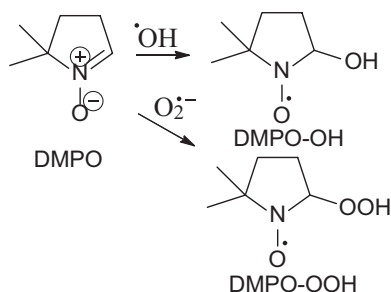


11. ábra. Reaktív oxigén származékok képződése fényrel gerjesztett TiO_2 felületén.

A TiO_2 optikai tulajdonságait, fotokatalitikus aktivitását javíthatjuk fémes vagy nem-fémes elemek adalékolásával. Munkánk során új foszfor-fluor-adalékolt anatáz valamint rutil TiO_2 fotokatalizátorokat vizsgáltunk EPR spektroszkópiával. A fotokatalizátorokat Dr. Körösi László állította elő titán(IV)-kloridból kiindulva hidrotermális reakcióban.^{32,33,34} Gyakorlati alkalmazhatóság szempontjából a rutil TiO_2 nanorészecskék előnye az anatázzal szemben, hogy a tiltott sáv szélessége kisebb (~ 3.0 eV), ezáltal a látható fény hullámhossz tartományában is mutat fotokatalitikus aktivitást.

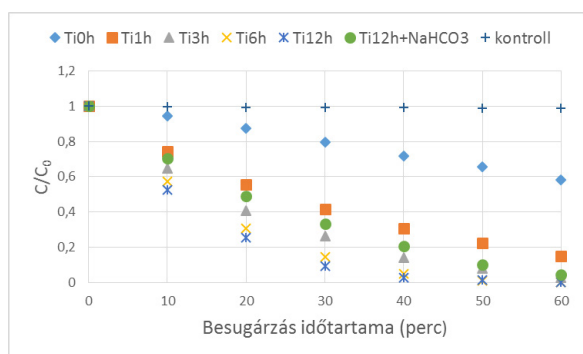
Az 5,5-dimetil-1-pirrolin-*N*-oxid (DMPO) relatíve stabilis paramágneses adduktot képez mind a hidroxil gyökkel mind a szuperoxid gyökionnal (12. ábra), jellegzetes csatolási mintázatot adva az EPR spektrumban. A TiO_2 minták besugárzását követően vizes közegben a DMPO-OH 1:2:2:1-es intenzitás arányú kvartett jelét figyeltük meg,

$a_N = a_H = 1,49$ mT hiperfinom csatolási állandókkal. Az oldószert dimetil-szulfoxidra (DMSO) cserélve a DMPO-OOH EPR jele volt megfigyelhető ($a_N = 1,37$ mT, $a_H = 1,0$ mT).³⁵ A DMSO szerepe kettős, jelentősen megnöveli a $O_2^{\cdot-}$ stabilitását, illetve eliminálja a rendszerben keletkező hidroxil gyököket.³⁶

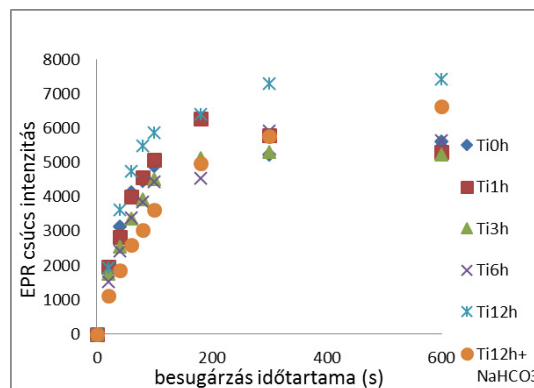


12. ábra. $O_2^{\cdot-}$ és $\cdot OH$ csapdázása DMPO nitronnal

Az új fotokatalizátorok reaktivitását kétféle módszerrel vizsgáltuk, egyrészt metilnarancs bontásán keresztül fotometrián, másrészt a DMPO adduktok keletkezésén keresztül EPR spektroszkópiával. Referencia katalizátorként a magas aktivitásáról közismert kereskedelmi forgalomban kapható P25 TiO_2 -ot (Evonik) alkalmaztuk. A kinetikai mérések jó egyezést mutattak a két módszer esetében, annak ellenére, hogy az ESR mérésekkel csak közelítő eredményeket kaphatunk a képződő $O_2^{\cdot-}$ és $\cdot OH$ koncentrációról. Ennek oka, hogy a csapdázási hatékonyság a hidroxil gyök esetében mindössze 33%, a szuperoxid gyökön esetében pedig még ennél is alacsonyabb.³⁷ A foszfor-fluor adalékolt TiO_2 fotokatalizátorok esetében a 12 órán át 250 °C-on hidrotermálisan kezelt minta – amely teljes mértékben anatóz kristályokat tartalmazott – bizonyult a legaktívabbnak metilnarancs degradációjában (13. ábra). A DMPO-OH adduktok képződésének kinetikai mérése alapján ennek a fotokatalizátornak az UV-A besugárzása eredményezte a legnagyobb hidroxil gyök koncentrációt (14. ábra). Ezzel magyarázható, hogy a foszfor-fluor adalékolt TiO_2 minták erős baktericid hatást is mutattak különböző carbapenem-rezisztens *Klebsiella pneumoniae* baktérium törzsekkel szemben.

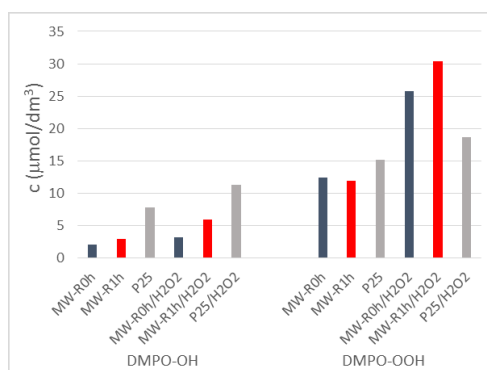


13. ábra. A hidrotermális kezelés időtartamának hatása a PF-adalékolt titán-dioxid fotokatalizátorok reaktivitására. Az ábra a metilnarancs relatív koncentrációját mutatja az UV-A besugárzás idejének függvényében.



14. ábra. DMPO-OH adduktok relatív koncentrációja az UV-A besugárzás idejének függvényében.

A hidrotermálisan kezelt (MW-R1h) és kezeletlen (MW-R0h) rutil fotokatalizátorok esetében az UV-A besugárzás során keletkező $O_2^{\cdot-}$ és $\cdot OH$ gyökök koncentrációját H_2O_2 jelenlétében is vizsgáltuk. A DMPO-adduktok koncentrációjának meghatározásához a 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-oxil 10 μM -os oldatát használtuk standardként. Az új fotokatalizátorok aktivitását összehasonlítottuk a P25 fotoaktivitásával.³⁸ Korábbi tanulmányok eredményeivel összhangban azt tapasztaltuk, hogy míg a nagy anatóz tartalmú P25 besugárzása során nagy mennyiségben keletkezett a hidroxil gyök, addig a rutil nanorészecskék felületén a fotokatalízis során nagy mennyiségben keletkezik szuperoxid gyökön, amelyet a katalizátoron adszorbeált oxigén és a vezetési sávba került elektron reakciója eredményez. Hidrogén-peroxid jelenlétében a P25-höz viszonyítva az új rutil TiO_2 nanorészecskék nagyobb aktivitás növekedést mutattak. A P25 esetében 20-30%-kal emelkedett meg a DMPO-adduktok koncentrációja H_2O_2 jelenlétében, az MW-R1h fotokatalizátor esetében ez a változás nagyságrendileg 2,5-szeres volt mind a DMPO-OH, mind a DMPO-OOH esetében (15. ábra). Ezt annak tulajdonítottuk, hogy a rutil nanorészecskék felületén a H_2O_2 hatékonyabban képes megkötődni, mint az anatózon, és reagálva a vezetési sáv elektronjával vagy az elektronhiányos lyukkal nagyobb mennyiségben szolgáltatja a reaktív intermediereket ($O_2^{\cdot-}$ és $\cdot OH$).

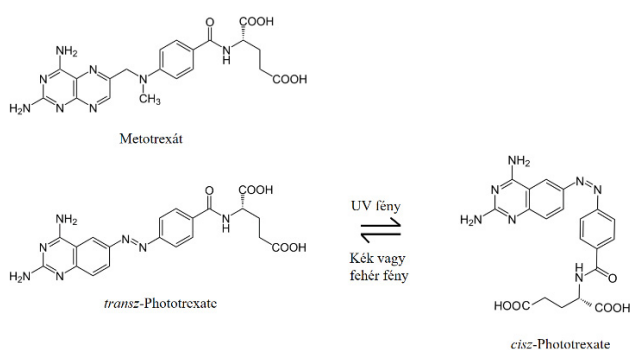


15. ábra. A hidrotermálisan kezelt (MW-R1h) és kezeletlen (MW-R0h) rutil valamint a P25 TiO_2 fotokatalitikus aktivitása. DMPO-adduktok koncentrációja 300 másodperces UV-A besugárzást követően H_2O_2 nélkül illetve 1,75 mM H_2O_2 jelenlétében.

2.2.3. A metotrexát és kromofór származékának összehasonlítása, antioxidáns hatásuk vizsgálata

A metotrexát (MTX) egy viszonylag jól ismert, elsővonalbeli daganatellenes és reumaellenes gyógyszerhatóanyag. Reumaellenes (gyulladáscsökkentő) hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, habár valószínűleg szerepet játszik benne a DNS szintézis gátlása a dihidrofolát-reduktáz (DHFR) enzim gátlása által, az adenosin-felszabadulás serkentése és a transzmetilációs reakciók gátlása.⁴⁰⁻⁴² A MTX viszonylag kedvezőtlen mellékhatás-profillal rendelkezik, melynek legfőbb oka célfehérjéjének, a DHFR-nak az ubikviter jellege.⁴³

Matera és mtsai⁴³, illetve Mashita és mtsai⁴⁴ egy azobenzén csoportot tartalmazó MTX-származékot szintetizáltak, mely a „Phototrexate” (PHX) nevet kapta. Ez a molekula kromofór tulajdonságokkal rendelkezik, UV-fény hatására a termodinamikailag stabilabb *transz*-PHX reverzibilisen izomerizálódik, majd látható fényben vagy sötétben a *cisz*-PHX *transz*-PHX-tá alakul vissza (16. ábra). Citotoxicitás szempontjából a *transz*-PHX szinte teljesen hatástalan, a *cisz*-PHX viszont a MTX-hoz hasonló hatású.



16. ábra. A metotrexát (MTX) és kromofór származéka, a Phototrexate (PHX), illetve a PHX reverzibilis izomerizációja.⁴³

A MTX rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben csökkentette a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázatát. Ezen betegségek patogenezisében fontos szerepet töltenek be a szabad gyökök.⁴⁵⁻⁴⁷ Zimmerman és mtsai kimutatták a MTX szuperoxid gyökfogyó hatását, így feltételezhetően ez áll a megfigyelt kardioprotektív aktivitás háttérében.⁴⁸ A MTX gyökfogyó hatását vizsgáltuk, illetve összehasonlítottuk a PHX izomereinek gyökfogyó hatásával. A *transz*-PHX-ot a szakirodalmi adatok alapján intézetünkben állítottuk elő, a teljes izomerizáció eléréséhez pedig a mintákat UV-lámpával világítottuk be ($\lambda=366$ nm).⁴³

A gyökfogyó hatást EPR spektroszkópiás módszerrel vizsgáltuk. A spincsapda az 1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-ol (*N*-hidroxi-TEMPOL) volt, a szuperoxid gyököt pedig a hipoxantin/xantin-oxidáz (HX/XO) rendszer termelte. A különböző mintákban a MTX koncentrációját 0-5 mM között, a PHX koncentrációját pedig 0-2 mM kö-

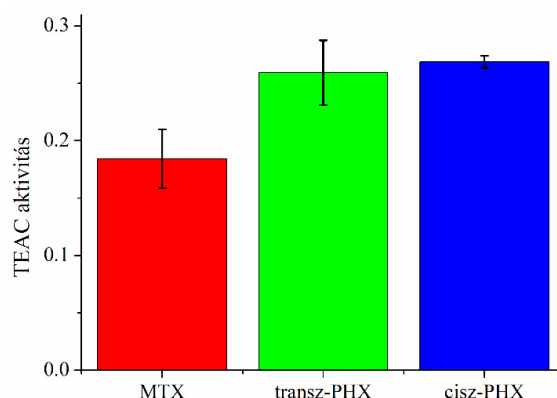
zött változtattuk. A számolt sebességi állandó ($\ln k$) értékeket az 1. Táblázatban tüntettük fel.

1. Táblázat. A vizsgált minták (MTX, PHX izomerek) számolt $\ln k$ értékei.

Koncentráció (μM)	MTX $\ln k$	<i>transz</i> -PHX $\ln k$	<i>cisz</i> -PHX $\ln k$
0	-8.70 ± 0.16	-8.69 ± 0.18	-8.68 ± 0.15
100	-8.79 ± 0.23	-9.56 ± 0.15	-9.16 ± 0.25
500	-9.46 ± 0.21	-10.46 ± 0.28	-9.19 ± 0.26
2000	-10.25 ± 0.25	-11.96 ± 0.23	-9.51 ± 0.29
5000	-11.01 ± 0.20	-	-

A szabad gyökök termelődésének sebessége fontos adat, hiszen ha élő szervezetben a szabad gyökök gyorsabban termelődnek, mint ahogy a sejtek gyökfogyó mechanizmusai (szuperoxid dizmutáz, kataláz, glutation peroxidáz) eliminálni tudnák őket, a sejtek oxidatív stressznek vannak kitéve. Számításaink alapján a *transz*-PHX a MTX-nál nagyobb mértékben gátolta a szabad gyök termelést a teljes vizsgált koncentrációtartományban. A *cisz*-PHX 100 μM -os koncentrációban szintén hatékonyabb volt, mint a MTX, magasabb koncentrációkon viszont már az MTX bizonyult hatékonyabbnak. A *transz*-PHX minden esetben nagyobb mértékben gátolta a szabad gyök termelést, mint a *cisz*-PHX.

Meghatároztuk a MTX, a *transz*-PHX és a *cisz*-PHX Troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitását is (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC). 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav (ABTS) oldatához kálium-preszulfátot adva $\text{ABTS}^{\bullet+}$ gyökkation keletkezik, mely antioxidánsokkal spektrofotometriásan (734 nm-es hullámhosszon) nyomon követhető reakcióba lép. A vizsgált vegyületeket a Trolox (az E-vitamin vízoldható származéka) antioxidáns tulajdonságaival hasonlítottuk össze (17. ábra).



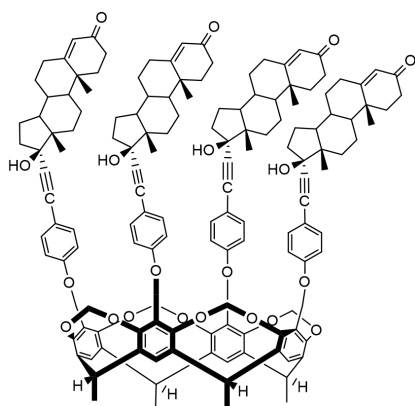
17. ábra. A MTX, *transz*-PHX és *cisz*-PHX Troloxra vonatkoztatott antioxidáns kapacitása (TEAC).

A PHX izomerei között nem volt szignifikáns különbség, de mindkét izomer nagyobb antioxidáns aktivitást mutatott, mint a MTX.

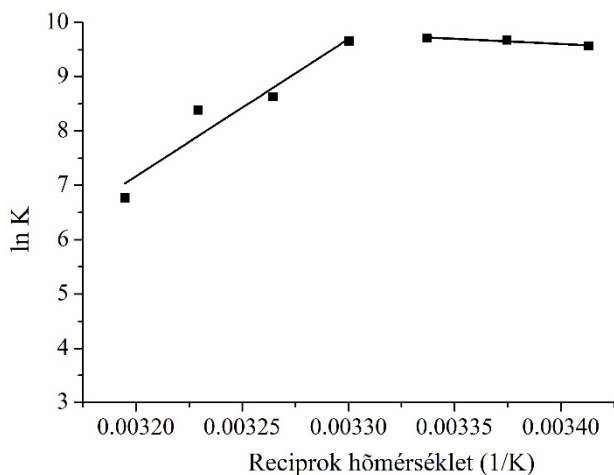
Elsőként vizsgáltuk a PHX izomereit EPR spektroszkópiás módszerrel, és eredményeink arra utalnak, hogy a citotoxikus hatás hiánya ellenére a *transz*-PHX hangsúlyosabb antioxidáns hatással rendelkezik, mint a MTX, ezáltal feltételezhetően hatékonyabb gyulladáscsökkentő is lehet.⁴⁹

2.2.4. A MTX másodlagos kölcsönhatásainak termodinamikai vizsgálata

Szelektív szenzorok készítése, továbbá a gyógyszerhatóanyag oldhatóságának szabályozhatósága céljából - a fentiekhez kapcsolódva - megvizsgáltuk a MTX-nak egy befogadó molekulával alkotott komplexének képződési és szerkezeti sajátosságait. Az alkalmazott komplexképző molekula a tetrakis(andoszt-4-én-3-on-17 α -etinil)kavitand (TAC) volt (18. ábra).



18. ábra. A tetrakis(andoszt-4-én-3-on-17 α -etinil)kavitand (TAC) szerkezeti képlete.



19. ábra. A MTX-TAC kölcsönhatás van 't Hoff függvénye.

Azért esett a választásunk erre a vegyületre, mert a TAC szerkezetéből adódóan kétféle kötőhellyel rendelkezik (a kavitand kehely és a felső peremhez kapcsolt szubsztituensek által alkotott üreg), melyek termodinamikai szempontból várhatóan eltérő hőmérsékletfüggést mutatnak.

A fluoriméteres méréseket 390 nm-es gerjesztési hullámhossz alkalmazásával végeztük, és az 540 nm-en kapott

emissziós intenzitásokat használtuk a számításokhoz (24. ábra). A méréseket 293.15 K, 296.48 K, 299.82 K, 303.15 K, 306.48 K, 309.82 K és 313.15 K hőmérsékleteken végeztük. A vizsgált mintákban a MTX 10 μ M koncentrációban volt jelen, a TAC koncentrációja pedig 0-80 μ M között változott.

A MTX-TAC komplexek kötési állandóit a Benesi-Hildebrand egyenlettel határoztuk meg:

$$1/(I-I_0)=1/A+1/(A*K*c)*\ln k \quad (1)$$

ahol I a MTX-ot és TAC-ot, I_0 pedig a csak MTX-ot tartalmazó minták fluoreszcenciás intenzitása, c a moláris koncentráció, A egy állandó, $\ln k$ pedig a kötési állandó természetes alapú logaritmus.

A termodinamikai paramétereket a van 't Hoff egyenlet segítségével határoztuk meg:

$$\ln k=\Delta G/RT=\Delta H/RT+\Delta S/R \quad (2)$$

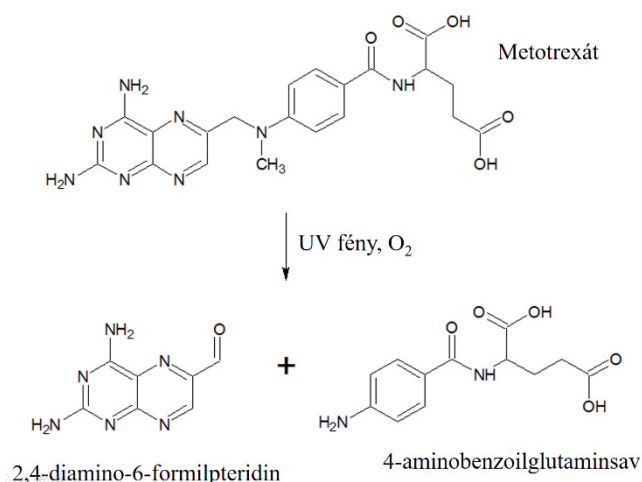
ahol ΔG a szabadentalpia változása, R az univerzális gázállandó, T a hőmérséklet, ΔH az entalpiaváltozás, ΔS pedig az entrópiaváltozás. A kötési állandókat a 2. Táblázatban tüntettük fel. A számításaink alapján kapott van 't Hoff függvény a 19. ábrán látható.

2. Táblázat. A számolt kötési állandók 10-es alapú logaritmusai.

Hőmérséklet (K)	log K
293.15	4.16
296.48	4.20
299.82	4.22
303.15	4.19
306.48	3.75
309.82	3.64
313.15	2.94

Eredményeink azt mutatják, hogy különböző hőmérséklet-tartományokban eltérő mechanizmussal jönnek létre a MTX-TAC komplexek. Alacsonyabb hőmérsékleteken az entrópiánövekedés entalpiánövekedéssel társul, míg magasabb hőmérsékleteken entrópia- és entalpiacsökkenés történik. Feltételezhetően magasabb hőmérsékleteken a MTX a TAC molekula etiszteron csoportjaival lép kölcsönhatásba. E csoportok mozgását a vendégmolekulával létrejövő kölcsönhatás jelentősen csökkenti, ezáltal az entrópia a bruttó folyamatban is csökken. Alacsonyabb hőmérsékleten a MTX a kavitand merev kehelyével lép kölcsönhatásba. Az ekkor tapasztalt entrópiánövekedés az oldószermolekulák eltávolításából adódik, azonban ez a folyamat energiabeiktetést igényel. Ezért a bruttó folyamatban az entalpiaváltozás pozitív.⁵⁰

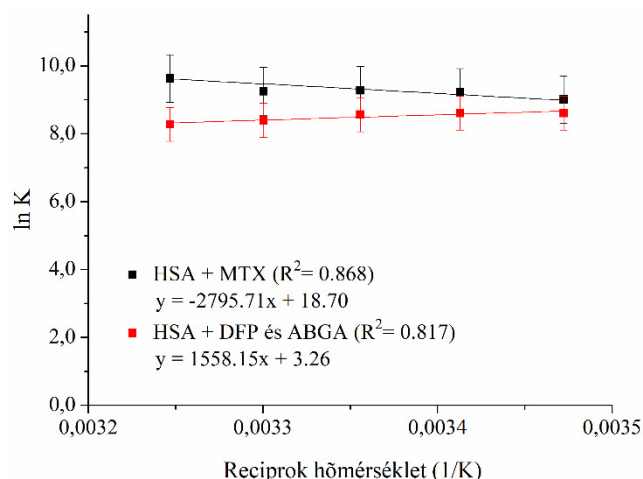
A MTX fényérzékeny molekula, UV-fény hatására bomlik, bomlástermékei a 2,4-diamino-6-formilpteridin (DFP) és a 4-aminobenzoilglutaminsav (ABGA) (20. ábra).⁵¹



20. ábra. A MTX UV-fény hatására történő bomlása.⁴⁹

A MTX transzferében – más gyógyszerhatóanyagokhoz hasonlóan – a szérum albuminok fontos szerepet játszanak. Emiatt megvizsgáltuk a MTX és bomlástermékeinek a humán szérum albumin (HSA) hődenaturációjára gyakorolt hatását. A méréseket μ SC differenciális pásztázó kaloriméterrel végeztük, 293.15 K - 373.15 K hőmérséklet-tartományban. A MTX HSA-n történő adszorpciója gyenge kölcsönhatáson alapul, ezért első lépésként az MTX-HSA kölcsönhatás hőmérsékletfüggését kellett megállapítanunk. E célból fluorimetriás módszerrel, a Benesi-Hildebrand és a

van 't Hoff egyenletek segítségével ebben az esetben is meghatároztuk a kölcsönhatások termodinamikai paramétereit. A vizsgált kölcsönhatások van 't Hoff függvénye alapján a kölcsönhatások erőssége nem változik jelentősen a vizsgált hőmérséklettartományban (21. ábra).



21. ábra. A HSA-MTX és a HSA-DFP+ABGA kölcsönhatás van 't Hoff függvényei.

A HSA hődenaturációjának aktiválási energiáját a Kissinger-módszerrel⁵² határoztuk meg:

$$\ln(H_f/R^*T_{\max}^2) = -(E_a/R^*T_{\max}) + \ln(R^*A/E_a) \quad (3)$$

ahol H_f a felfűtési sebesség, E_a az aktiválási energia, A az Arrheniusi preexponenciális tényező. Ha az egyenlet bal oldalát ábrázoljuk $1/T$ függvényében, akkor megkapjuk a Kissinger függvényt (22. ábra). A kapott egyenesből egyszerűen kiszámítható az E_a :

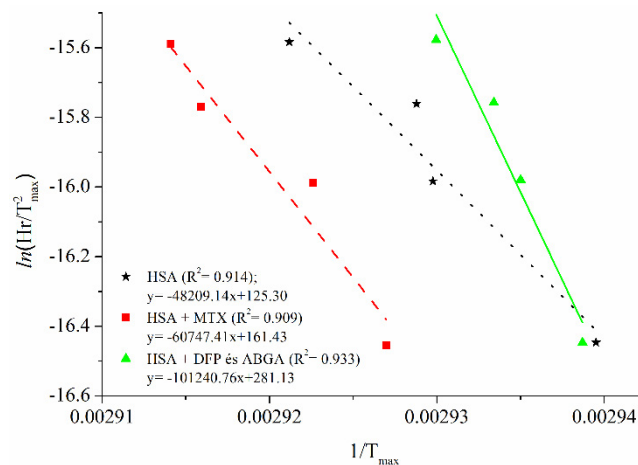
$$E_a = -R^* \text{meredekség} \quad (4)$$

Az így számolt E_a értékeket a 3. Táblázatban tüntettük fel.

3. Táblázat. A HSA hődenaturációjának aktiválási energiája a vizsgált mintákban.

	Aktiválási energia (kJ/mol)
HSA	400.81
HSA+MTX	505.05
HSA+DFP+ABGA	841.71

A kapott aktiválási energia értékekből arra következtetünk, hogy a MTX is növeli a HSA hődenaturációjának aktiválási energiáját, de a MTX bomlástermékei esetében ez a hatás még kifejezettebb.⁵³ A fehérjestabilizáló hatású hatóanyagokról általánosságban elmondható, hogy gyulladáscsökkentő hatásuk van, hiszen a denaturálódott fehérjék gyulladási mediátorként viselkedhetnek. A fehérje stabilizálás egy lehet a MTX (és bomlástermékei) gyulladáscsökkentő hatásának számos mechanizmusa közül, ennek pedig a jövőben akár terápiás jelentősége is lehet.



22. ábra. A HSA hődenaturációjának Kissinger függvényei más reagenst nem tartalmazó mintákban (pontozott vonal), MTX-ot tartalmazó mintákban (szaggatott vonal), illetve a MTX bomlástermékei (DFP, ABGA) tartalmazó mintákban (folytonos vonal).

3. Összefoglalás

Az elmúlt nyolc évben intézetünkben tovább folytattuk a stabilis nitroxid szabad gyökökkel kapcsolatos kutatásokat, így új módszereket adoptáltunk paramágneses acetilén és foszfortartalmú vegyületek előállítására. Előállítottunk számos spinjelölt biomolekulát és gyógyszert biológiai vizsgálatok illetve környezetkémiai vizsgálatok céljából. Pirrollal, triazollal, foszfolén-oxiddal, piridinnel, pirazin-

nal, pirimidinnel, tiazinnal és tiazepinnel kondenzált nitroxidokat szintetizáltunk. A biológiai vizsgálatok vezérelte kutatások mellett anyagtudományi kutatásokat is végeztünk. A nitroxidgyűrűket különböző távolságban tartalmazó merev kettős-gyök rendszereket állítottunk elő és vizsgáltuk a gyökök spin-spin kölcsönhatásait és kicserélődési integráljait, alkalmakként kristályszerkezetét. Spincsapda nitron segítségével titán-dioxid alapú fotokatalizátorok reaktív szabad gyök generáló képességeit vizsgáltuk EPR spektroszkópiával. Molekulaszelektív szenzorok készítése, továbbá a gyógyszerek hatóanyagok oldhatóságának szabályozhatósága céljából részletesen tanulmányoztuk a metotrexát valamint analogonjának, a fototrexátnak a sajátosságait. A metotrexát és a fototrexát *E/Z* izomereinek gyökfógo hatásosságát vetettük össze és a *Z* (cisz) izomer nagyobb aktivitását állapítottuk meg. Tanulmányoztuk a metotrexát kölcsönhatásait két kötőhellyel rendelkező kavitand-származékkal. A két kötőhelyen mért komplex stabilitás értékek ellentétes hőmérsékletfüggést mutattak, aminek a háttérben szignifikánsan eltérő termodinamikai változások állnak. A metotrexát és a humán szérumban albumin kölcsönhatásának vizsgálata arra a felismerésre vezetett, hogy a metotrexát és fotokémiai bomlástermékei is növelik a humán szérumban albumin hődenaturációjának aktiválási energiáját, tehát fehérje stabilizáló hatásúak.

A gyenge molekuláris kölcsönhatások témakörén belül a gazda – vendég kölcsönhatásokra végzett, a termodinamikai paraméterek meghatározására irányuló kísérletes, valamint a kapcsolódó elméleti kémiai modellezésünk a már említett szenzorfejlesztésen kívül reményeink szerint hozzájárul a gyógyszerek hatóanyagok dokkolását befolyásoló tényezők molekuláris szintű értelmezéséhez is.

A stabilis nitroxid szabad gyökökkel kapcsolatos szerves kémiai kutatások és a reaktív szabad gyökök generálásával vagy azok csapdázásával kapcsolatos kutatások reményeink szerint számottevő jelentőséggel bírnak mind az élő, mind az élettelen természettudományok területén és számos ipari, mezőgazdasági, anyagtudományi, természetvédelmi és gyógyászati alkalmazásnak lehetnek az iniciatívái.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki munkatársainknak, Balog Máriának, Bósz Dórának, Horváthné Csokona Violának, Kecskés Kristófnak, Kish Krisztinának, Lamperth Évának, Lazsányi Noéminak, Varga Boglárkának és Vörös Patriknak munkánk technikai támogatásáért.

Ezek az eredmények nem jöhettek volna létre a hazai és külföldi kutatók és kutatócsoportok támogatása nélkül. Így köszönjük Dr. Bényei Attila (Debreceni Egyetem, GYTK) Prof. Ifj. Gallyas Ferenc és csoportja (PTE, ÁOK), Dr. Gulyás Fekete Gergely (PTE ÁOK), Dr. Hartvig Nóra (PTE, SZKK), Dr. Hetényi Csaba (PTE, ÁOK), Prof. Hideg Éva és csoportja (PTE, TTK), Prof. Huszthy Péter (BMGE, VK), Dr. Jekő József (Nyíregyházi Egyetem), Prof. Anne-

Marie Kelterer (University of Graz, Graz, Austria), Prof. Alexander Kokorin (Semenov Institute, Moszkva, Oroszország), Prof. Koichi Iwata (Gakushuin University, Tokyo, Japan), Prof. Kollár László és kutatócsoportja (PTE, TTK), Prof. Periannan Kuppasamy és csoportja (Dartmouth College, Lebanon, USA), Prof. Sophie Lecomte (University of Bordeaux, Bordeaux, France), Dr. Heng Li (Xiamen University, Xiamen, China), Prof. Michael Matthies (University of Osnabrück, Németország), Prof. Masaki Nagane és csoportja (Azabu University, Japán), Dr. Schneider Gyula (PTE, ÁOK), Prof. Heiz-Juergen Steinhoff és csoportja (University of Osnabrück, Németország), Dr. Poór Miklós és csoportja (PTE, GYTK), Prof. John Voss és munkatársai (University of California, Davis, USA), Dr. Ruslan Zaripov (Zavoisky Physical-Technical Institute, Kazan, Oroszország) értékes hozzájárulását.

A szerzők köszönik a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K104956, FK124331, K137793), „2020-4.1.1-TKP2020” azonosítószámú, Tématerületi Kiválósági Program 2020, GINOP-2.2.1.-15-2016-00020 és GINOP-2.3.2.-15-2016-00049, továbbá EFOP-3.6.1.-16-2016-00004 és 2019-2.1.11-TÉT-2019-00042 azonosítószámú projektek anyagi támogatását.

Hivatkozások

- Bognár, B.; Sár, P. C.; Hankovszky, H. O.; Kálai, T.; Hideg, K. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2013**, *119*, 80-87.
- Likhtenshtein, G. I. *Nitroxides* Springer: Cham, **2020**.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-34822-9>
- Ouari, O.; Gimes, D. (Eds.) *Nitroxides: Synthesis, Properties and Applications*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2021**.
<https://doi.org/10.1039/9781788019651>
- Úr, Gy.; Kálai, T.; Hideg, K. *Tetrahedron Letters* **2016**, *57*, 778-780.
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.01.012>
- Úr, Gy.; Kálai, T.; Balog, M.; Bognár, B.; Gulyás-Fekete, G.; Hideg, K. *Synthetic Communications* **2015**, *45*, 2122-2129.
<https://doi.org/10.1080/00397911.2015.1066391>
- Isbera, M.; Bognár, B.; Jekő, J.; Sár, C.; Hideg, K.; Kálai, T.; *Molecules* **2020**, *25*, 2430.
<https://doi.org/10.3390/molecules25102430>
- Isbera, M.; Bognár, B.; Sár, C.; Jekő, J.; Kálai, T. *Synthetic Communications* **2021**, *51*, 1353-1362.
<https://doi.org/10.1080/00397911.2021.1880595>
- Rancurel, C.; Heise, H.; Köhler, F.H.; Schatzschneider, U.; Rentschler, E.; Vidal-Gancedo, J.; Veciana, J.; Sutter, J.-P. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 5903-5914.
<https://doi.org/10.1021/jp049730+>
- Stipa, P.; Finet, J.P.; Le Moigne, F.; Tordo, P. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4465-4468.
<https://doi.org/10.1021/jo00068a049>
- Isbera, M.; Bognár, B.; Gallyas, F.; Bényei, A.; Jekő, J.; Kálai, T. *Molecules* **2021**, *26*, 4366.
<https://doi.org/10.3390/molecules26144366>
- Bognár, B.; Kálai, T.; Gulyás-Fekete, G.; Lazsányi, N.; Hideg, K. *Synthesis* **2015**, *47*, 985-991.
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1379958>
- Bognár, B.; Varga, B.; Kálai, T.; Csokona, V.; Gulyás Fekete, G.; Sár, C.; Hideg, K. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2017**, *54*, 2556-2562.
<https://doi.org/10.1002/jhet.2850>

13. Úr, Gy.; Gulyás Fekete, G.; Hideg, K.; Kálai, T. *Molbank* **2018**, 2018, M980. <https://doi.org/10.3390/M980>
14. Isbera, M.; Bognár, B.; Gulyás-Fekete, G.; Kish, K.; Kálai, T. *Synthesis* **2019**, 51, 4463–4472. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690678>
15. Chalmers, B.A.; Morris, J.C.; Fairfull-Smith, K.E.; Grainger, R.S.; Bottle, S.E. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 10382–10384. <https://doi.org/10.1039/C3CC46146G>
16. Bognár, B.; Úr, Gy.; Sár, C.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K.; Kálai, T.; *Current Organic Chemistry* **2019**, 23, 480–501. <https://doi.org/10.2174/1385272823666190318163321>
17. Kálai T.; Lazsányi, N.; Gulyás-Fekete, G.; Hideg, K. *Monatsh. Chem.* **2014**, 145, 651–656. <https://doi.org/10.1007/s00706-013-1144-y>
18. Nagane, M.; Yamashita, T.; Vörös, P.; Kálai, T.; Hideg, K.; Bognár, B. *Monatsh.Chem.* **2019**, 150, 1513–1522. <https://doi.org/10.1007/s00706-019-02458-8>
19. Bognár, B.; Kuppusamy, M. L.; Madan, E.; Kálai, T.; Balog, M.; Jekő, J.; Kuppusamy, P.; Hideg, K. *Medicinal Chemistry* **2017**, 13, 761–772. <https://doi.org/10.2174/1871520617666170522124712>
20. Zsidó, B. Z.; Balog, M.; Erős, N.; Poór, M.; Mohos, V.; Fliszár-Nyúl, E.; Hetényi, Cs.; Masaki, N.; Hideg, K.; Kálai, T.; Bognár, B. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 508. <https://doi.org/10.3390/ijms21020508>
21. Kálai, T.; Altman, R.; Maezawa, I.; Balog, M.; Morisseau, C.; Petrlova, J.; Hammock, D. B.; Jin, L.W.; Trudell, J. R.; Voss, C. J.; Hideg, K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 77, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.026>
22. Bognár, B.; Isbera, M.; Kálai, T. *Organic Preparations and Procedures International* **2021**, 53, 311–315. <https://doi.org/10.1080/00304948.2021.1877997>
23. Úr, Gy.; Gulyás Fekete, G.; Jekő, J.; Hideg, K.; Kálai, T. *Synthesis* **2017**, 49, 3740–3748. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1589034>
24. Ricke, A.; Kálai, T.; Steinhoff, H.J.; Matthies, M. *Science of the Total Environment* **2021**, 796, 149042. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149042>
25. Gromov, O. I.; Golubeva, E. N.; Khrustalev, V. N.; Kálai, T.; Hideg, K.; Kokorin, A. I. *Appl. Magn. Reson.* **2014**, 45, 981–992. <https://doi.org/10.1007/s00723-014-0573-z>
26. Kokorin, A. I.; Zaripov, R. B.; Gromov, O. I.; Sukhanov, A. A.; Kálai, T.; Lamperth, É.; Hideg, K. *Applied Magnetic Resonance* **2016**, 47, 1057–1067. <https://doi.org/10.1007/s00723-016-0813-5>
27. Kokorin, A. I.; Zaripov, R. B.; Gromov, O. I.; Hideg, K.; Kálai, T. *Applied Magnetic Resonance* **2018**, 49, 137–149. <https://doi.org/10.1007/s00723-017-0942-5>
28. Zaripov, R. B.; Khairutdinov, I. T.; Kálai, T.; Kish, K.; Kokorin, A. I.; Salikhov, K. M. *Applied Magnetic Resonance* **2020**, 51, 523–543. <https://doi.org/10.1007/s00723-020-01199-w>
29. Kokorin, A. I.; Gromov, O. I.; Dorovatovskii, P.V.; Lazarenko, V. A.; Khustalev, V. N.; Hideg, K.; Kálai, T. *Applied Magnetic Resonance* **2019**, 50, 425–439. <https://doi.org/10.1007/s00723-018-1089-8>
30. Nosaka, Y.; Nosaka, A. Y. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 11302–11336. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00161>
31. Banerjee, S.; Gopal, J.; Muraleedharan, A.; Tyagi, A.; Rai, B. *Curr. Sci.* **2005**, 90, 1378–1383. <https://www.jstor.org/stable/24091987>
32. Körösi, L.; Prato, M.; Scarpellini, A.; Riedinger, A.; Kovács, J.; Kus, M.; Meynen, V.; Papp, S. *Mater. Sci. Semicond. Process* **2015**, 30, 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2014.10.033>
33. Körösi, L.; Bognár, B.; Horváth, M.; Schneider, G.; Kovács, J.; Scarpellini, A.; Castelli, A.; Colombo, M.; Prato, M. *Appl. Catal. B-Environ.* **2018**, 231, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2018.03.012>
34. Körösi, L.; Bognár, B.; Boudérias, S.; Castelli, A.; Scarpellini, A.; Pasquale, L.; Prato, M. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, 493, 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.06.259>
35. Dvoranová, D.; Barbieriková, Z.; Brezová, V. *Molecules* **2014**, 19, 17279–17304. <https://doi.org/10.3390/molecules191117279>
36. Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 200, 1–16. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(80\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90323-9)
37. Grela, M. A.; Colussi A. J. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 16940–16946. <https://doi.org/10.1021/jp953562r>
38. Körösi, L.; Boudérias, S.; Csepregi, K.; Bognár, B.; Teszlák, P.; Scarpellini, A.; Castelli, A.; Hideg, É.; Jakab, G. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, 190, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.010>
39. Lyle, F. R. U.S. Patent 5 973 257, 1985; *Chem. Abstr.* **1985**, 65, 2870.
40. Cronstein, B.N. *Nat. Clin. Pract. Rheum.* **2007**, 3, 256–257. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0475>
41. Chane, E.S.L.; Cronstein, B.N. *Arthritis Res. Ther.* **2002**, 4, 266–273. <https://doi.org/10.1186/ar419>
42. Cutolo, M.; Sulli, A.; Pizzorni, C.; Seriola, B. *Ann. Rheum. Dis.* **2001**, 60, 729–735. <https://doi.org/10.1136/ard.60.8.729>
43. Matera, C.; Gomila, A.M.J.; Camarero, N.; Libergoli, M.; Soler, C.; Gorostiza, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 15764–15773. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08249>
44. Mashita, T.; Kowada, T.; Takahashi, H.; Matsui, T.; Mizukami, S. *ChemBioChem* **2019**, 20, 1382–1386. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800816>
45. Micha, R.; Imamura, F.; von Ballmoos, M.W.; Solomon, D.H.; Hernán, M.A.; Ridker, P.M.; Mozaffarian, D. *Am. J. Cardiol.* **2011**, 108, 1362–1370. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.06.054>
46. Libby, P.; Ridker, M.; Hansson, G.K. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, 54, 2129–2138. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>
47. Ross, R. *Nature* **1993**, 362, 801–809. <https://doi.org/10.1038/362801a0>
48. Zimmerman, M.C.; Clemens, D.L.; Duryee, M.J.; Sarmiento, C.; Chiou, A.; Hunter, C.D.; Tian, J.; Klassen, L.W.; O'Dell, J.R.; Thiele, G.M.; Mikuls, T.R.; Anderson, D.R. *Redox Biol.* **2017**, 13, 588–593. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.018>
49. Preisz, Zs.; Hartvig, N.; Bognár, B.; Kálai, T.; Kunsági-Máté, S. *Pharmaceuticals* **2021**, 14, 665. <https://doi.org/10.3390/ph14070665>
50. Preisz, Zs.; Nagymihály, Z.; Lemli, B.; Kollár, L.; Kunsági-Máté, S. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 4345. <https://doi.org/10.3390/ijms21124345>
51. Pascu, M.L.; Staicu, A.; Voicu, L.; Brezenau, M.; Carstocea, B.; Pascu, R.; Gazdaru, D. *Anticancer Res.* **2004**, 24, 2925–2930. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.978.1256&rep=rep1&type=pdf>
52. Kissinger, H.E. *Anal. Chem.* **1957**, 29, 1702–1706. <https://doi.org/10.1021/ac60131a045>
53. Preisz, Zs.; Kunsági-Máté, S. *Spectrochim. Acta A.* **2021**, 245, 118905. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118905>

Some results from Institute of Organic and Medicinal Chemistry at University of Pécs between 2013-2021.

During the last eight years in the face of constant challenges our institute widened its profile by integrating material science research beyond synthetic chemistry. But continuing our interest in synthesis and applications of stable nitroxide free radicals we have worked out a new approach for accessing 3,4-disubstituted pyrroline nitroxides (**2a-e**) by deprotonating α,β -unsaturated ester (**1**) at β -carbon followed by treatment with various electrophiles. We have adopted methods to synthesize paramagnetic acetylenes (**4a-c**) from paramagnetic aldehydes (**3a-c**) by Bestman-Ohira reagent without demolishing the free radical center by the generated carbene. Arbusov and Pudovic reactions were used to generate allylic phosphonate esters (**6a,b**), α -ketophosphonate esters (**8a,b**) and α -hydroxyphosphonate esters (**10a,b**), respectively. The acetylene compounds (**4, 11**) were deprotonated and after treatment with diethylchlorophosphonate yielded compounds **12a,b** and hydration of acetylene phosphonate esters with catalytic amount of PdCl_2 offered β -ketophosphonate esters (**13a,b**). The protected symmetric paramagnetic diene was converted to phospholene oxide (**14**) by McCormac reaction and we published a procedure for diphenyl-pyrroline phosphine (**15**) as well. The latter structure was confirmed by X-ray diffraction. Starting from six-membered α,β -unsaturated aldehyde and α,β -unsaturated nitro compound with Hemetsberger-Knittel reaction and Barton-Zard reaction we achieved **17** and **19** pyrrole esters, respectively. Compounds **21** and **24** were treated with binucleophiles and depending on the reaction conditions pyrroline nitroxide condensed 1,4-thiazepine (**23**) and 1,3-thiazine (**25**) were achieved in the presence of DBU, while 2-substituted benzothiazole (**22**) was obtained under neutral conditions. An *O*-methyl protected compound (**27**) was used to synthesize a series of nitroxide condensed 1,4-diazines (**28**) and an imidazole (**29**). A series of paramagnetically modified biomolecules such as retinal (**30**), uracyl (**31**), CAPE-ester (**32**), curcumin (**33**) and bergamottin (**34**) were synthesized in multistep reactions. The paramagnetic analogue of tacrine (**35**) was synthesized and tested on oxidative stress protecting and acetylcholinesterase inhibitory activity. The modification of tetrahydroacridine scaffold with a tetrahydropyridine *N*-oxyl ring resulted in the loss of acetylcholinesterase inhibitory activity. Among the other derivatives synthesized, compound **36** proved to be the most effective with a double effect, both acetylcholinesterase inhibitory and oxidative stress suppressing activity. Starting from diamagnetic derivative **27**, spin-labeled pyrazinamide (**37**) and spin labeled chantix (**38**) were achieved. Among the published paramagnetic drugs (**35-39**) the sulfonamide derivative (**49**) was used to model the behavior of secreted sulfonamide adsorbed by humic acid from wastewater. Application of Pd-catalyzed cross coupling and Wittig reactions rigid biradicals were achieved with ^{13}C and ^{15}N incorporation in certain cases. These biradicals contained the biradical centre with various distances and their hyperfine splitting constants and electron spin exchange integral were studied by both EPR spectroscopy and density functional theory (DFT) calculations with good agreement.

In case of biradical (**40**) hyperfine splitting (hfs) constants on the ^{14}N atoms, electron spin exchange integral $|J|$, and the distance between the two N–O fragments $r_{\text{NO-NO}}$ were experimentally measured based on X-ray crystallographic measurements. It was confirmed that the intramolecular electron spin exchange in a biradical analogous to compound **40** is realized by the indirect mechanism rather than direct collision of the N–O \cdot groups.

Hydrothermally treated TiO_2 particles (anatase and rutile) were assayed on superoxide radical anion and hydroxyl radical generating capability by means of trapping of the reactive species with a nitron (DMPO). We concluded that in the presence of H_2O_2 rutile may be an efficient photocatalyst, upon irradiation high amount of superoxide radical formed on its surface. We also found that hydrothermal treatment and PF-co-doping increased the photocatalytic and antibacterial activity of TiO_2 nanoparticles by promoting the formation of hydroxyl radical, leading to rapid inactivation of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. The utilization of TiO_2 as a photocatalyst might offer a greener alternative for agrochemicals and germicides.

The principle of photopharmacology is the introduction of a photoswitchable unit into the molecular structure of a bioactive compound itself. One major advantage of photopharmacological agents is that their activation is reversible, which may lead to a significant reduction in adverse drug reactions. Methotrexate (4-amino-10-methylfolic acid, MTX) is a dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitor. It is widely used as chemotherapeutic drug in rheumatoid arthritis (RA), psoriasis and some sorts of leukaemia. It decreases the concentration of tetrahydrofolate (THF) in the cells by the inhibition of DHFR, therefore it reduces the purine nucleotide and DNA synthesis. Accordingly, the methotrexate (MTX) and its photoswitchable azobenzene analogue phototrexate (PHX) were assayed on antioxidant activity, concluding that its *Z* isomer was more active. With the aim to regulate the pharmacokinetics of the above drug molecules weak interactions of MTX and a cavitand derivative with two different binding sites were studied. The cavitand can include the methotrexate in two forms: either by its opened structure with free androsta-4-en-3-one-17 α -ethinyl arms or by the closed form when all the androsta-4-en-3-one-17 α -ethinyl arms play role in the complex formation. Significantly different thermodynamic background with opposite enthalpy and entropy changes was identified as fact of the quite different temperature dependence of complex stabilities. MTX is a photosensitive drug, UV-light exposure causes photodissociation of the molecule. The binding of methotrexate or its photodegradation products (DFP+ABGA) on the human serum albumin (HSA) results in kinetical stabilization of HSA.

In the future more purposefully synthesized nitroxides will be required, so the exploration of the new synthetic procedures to access various scaffolds will be essential. We believe that these old and new research directions outlined above and especially their combinations can result in fruitful applications in material science, drug research, agriculture, and industry.