

Új, diamágneses és paramágneses fluoreszcens molekulák szintézise és alkalmazása

**OTKA T042951
2003-2006
Záró beszámoló**

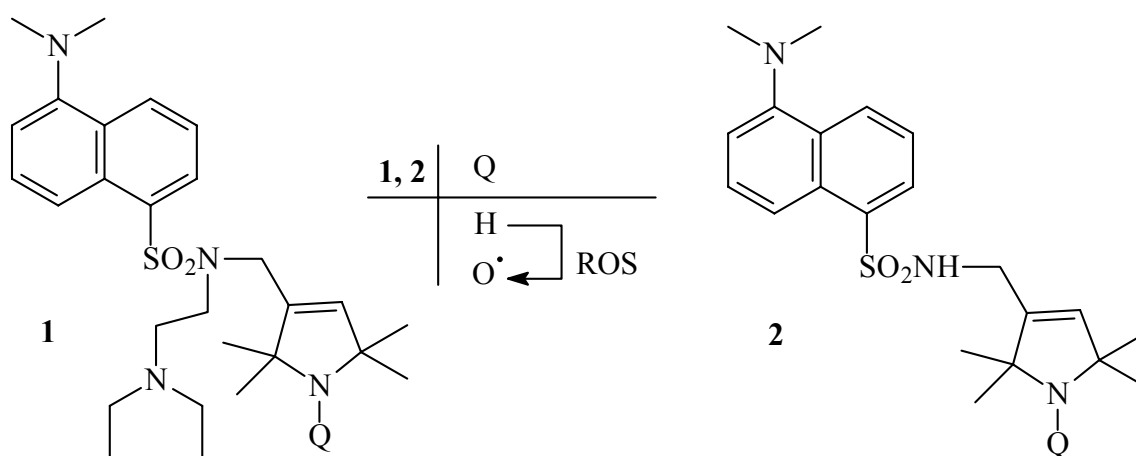
Témavezető: dr. Kálai Tamás
egyetemi docens

PTE, ÁOK Szerves és Gyógyszerkémiai Int.
7624 Pécs, Szigeti út 12.
E-mail: tamas.kalai@aok.pte.hu

1.)

- A pályázat intézetünk korábbi, nitroxidokkal és heterociklusokkal végzett eredményein és azon a megfigyelésen alapult, hogy a fluorofórokhoz kapcsolt nitroxidok kioltják a fluoreszcenciát. Ez felhasználható a nitroxid csoport oxidációs/redukciós állapotának a követésére mind ESR mind fluoreszcencia spektroszkópai módszerekkel.

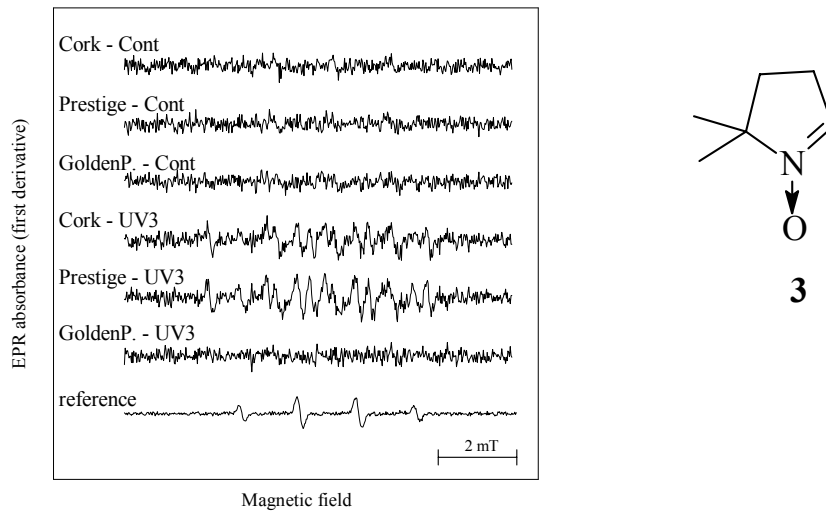
- Az MTA-SzBK kutatóival az intézetünkben előállított (HO-2150NH) **1** DanePy ill. (HO-1889/NH) **2** vegyületekkel, mint kettős jelölő reagensekkel vizsgáltuk UV-A és UV-B fény hatására bekövetkező reaktív oxigén szabadgyök (ROS) termelődést spenót levelekben. A szenzorok működésének elve, hogy a szterikusan gátolt aminok feloxidálódnak nitroxiddá, ezáltal csökkentik a hozzájuk kötött fluorofórok kvantum hatásfokát ill. teljesen kioltják a fluoreszcenciát. A két vegyület csupán egy dietil-aminoetil oldalláncban különbözik. Míg a DanePy (**1**) szelektivitást mutat a szingulett oxigénnel ($^1\text{O}_2$) szemben, addig a **2** vegyület fluoreszcenciája mind szingulett oxigénnel, mind szuperoxid anionnal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) kioltható.



A fenti két ROS szenzor alkalmazásának kombinációjából arra lehetett következtetni, hogy a spenót levelekben a rövidebb hullámhosszú UV-B sugárzás hatására inkább a szuperoxid gyök termelődés a domináns és a fotoszintetikus elektrontranszport jelentékenyen sérül, míg UV-A fény esetében inkább szingulett oxigén termelődik.¹ Ez a kísérlet sorozat közvetlenül bizonyította, hogy UV-A hatására szingulett oxigén keletkezik és a gazdasági haszonnövények stressztűrési mechanizmusának megértéséhez is reményeink szerint hozzájárul.

- Az MTA-SzBK-s közreműködő partnereink ELTE-s kutatókkal együtt vizsgálták sötétben csíráztatott borsó (*Pisum sativum*) fény okozta károsodását. Ennek során bebizonyították, hogy a szár kezdeményekben már kis intenzitású sugárzás is okozhat károsodást a klorofill bioszintéziséhez fel nem használt porfirin közvetítette fotodinamias reakció útján. Ennek során a membránokat károsító szingulett oxigén is keletkezik, ez az **1** vegyületet nitroxiddá oxidálja, lecsökkentve annak fluoreszcenciáját.²

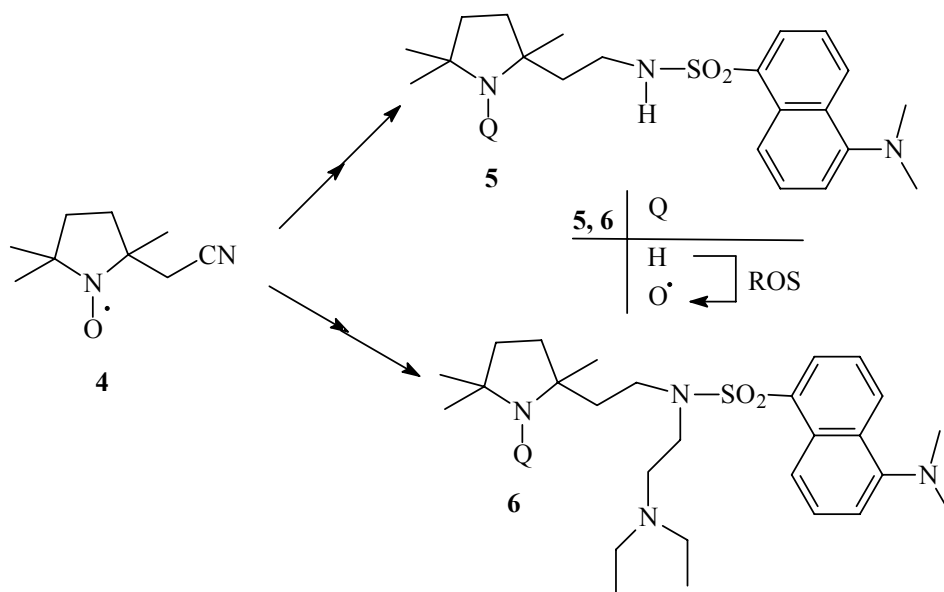
- Közreműködő partnereink az **1** kettősen jelölő reagenssel 3 árpafajta („Cork”, „Prestige” és „Golden Promise”) UV-B sugárzás tűrő képességét vizsgálták. A sugárzás hatására az árpafajták leveleiben bekövetkező ROS képződést DMPO (**3**) csapdázással mutatták ki (1. ábra).



1. ábra Az árpafajták leveleiből készített extraktum + **3** ESR spektruma kezeletlen (standard nevelési fényviszonyok, felülről 1-3 görbék), UV-B kezelt (standard fény + $17.6 \text{ kJ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ kiegészítő UV-B). A 7., legalsó görbe referencia spektrum, növényi extraktum nélküli **3** + Fenton-reakció ESR spektruma.

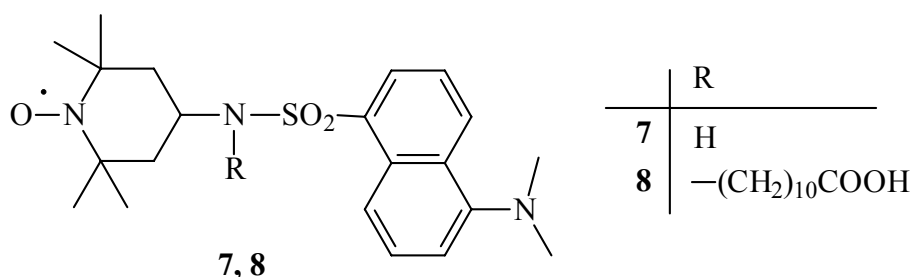
A spincsapdázás, növényi pigment, gázcsere, antioxidáns mérések és a fehérje degradációs mérések alapján a „Golden Promise” fajtának legnagyobb az UV-B sugárzás tűrő képessége.³

- Ennek a munkának a további kiterjesztése volt az **5** és **6** danzilszármazékok szintézise a **4** nitrilszármazékból kiindulva. Az **5** és **6** vegyületek valójában **1** és **2** danzilvegyületek 2-szubsztituált pirrolidin analógjai.

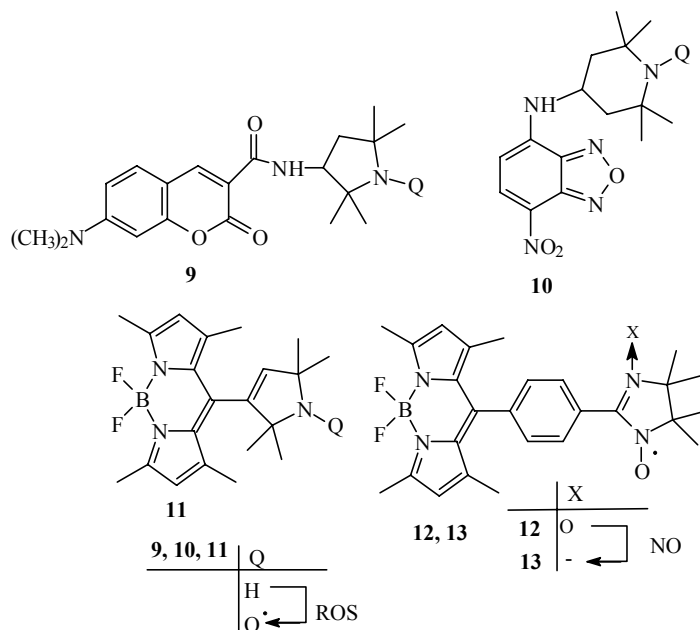


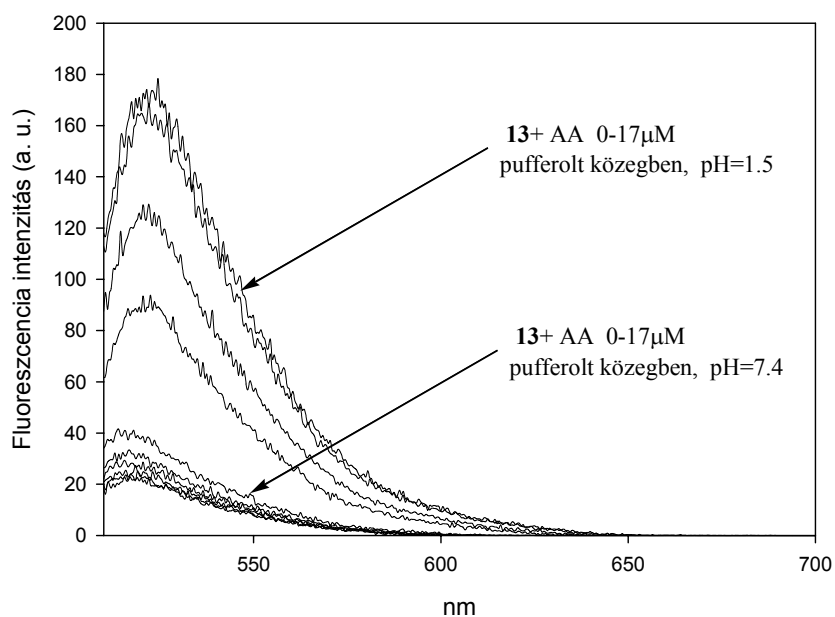
Az MTA-SzBK és japán kutatók vizsgálták a négy kettősen jelölő vegyületet (**1,2,5,6**) és megállapították, hogy az *in vitro* végzett növényfiziológiai kísérletekben a ROS-kal szembeni érzékenység **1** és **2** vegyület esetében jobb volt, míg **5** és **6** vegyületek *in vivo* rendszerekben lehetnek előnyösebbek.⁴ A fentiekben ismertetett vizsgálatoknak fontos szerepe van a szárazságtűrő fajták kiválasztásában, így közvetlen gyakorlati/gazdasági jelentőséggel bírnak.

2.) Olasz és izraeli kutatókkal együttműködésben a szarvasmarha β -laktoglobulinjának hidrofób kötőhelyeit vizsgáltuk ESR és fluoreszcencia spektroszkópai módszerekkel **7** (HO-30) és **8** kettősen jelölő vegyületek segítségével. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy csak a **8**, hidrofób oldallánccal rendelkező, kettősen jelölő vegyület kötődött a fehérjéhez, valamint a kötődés helyét és mértékét a natív protein hőmérsékletének változtatásával is lehet befolyásolni.⁵



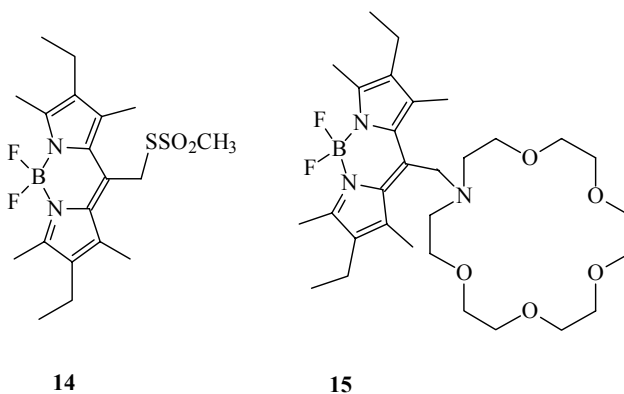
3.) További kettősen jelölő vegyületeket állítottunk elő, ezekben kumarin (**9**), nitrobenzofurazan (**10**) és BODIPY (**11**) festékekhez kapcsoltuk a nitroxid gyököket ill azok amino prekursorait.^{6,7} Az új, kettősen jelölő vegyületek a danzil-nitroxid/donor-akceptor vegyületekhez hasonlóan működnek, viszont a különböző gerjesztési (330-515 nm) és emissziós (380 - 540 nm) hullámhosszak tovább bővítik az alkalmazási lehetőségeket. A BODIPY fluorofort nitronil-nitroxid molekulához kapcsolva nitrogén-monoxid kimutatására alkalmas kettősen jelölő vegyülethez (**12**) jutottunk.⁸ Az NO hatására képződő **13** imino nitroxid optikai logikai kapuként alkalmazható, mert intenzív fluoreszcenciát csak redukálószer pl. aszkorbinsav és az imino nitrogén protonálódása esetén (savas közeg) mutat (2. ábra).



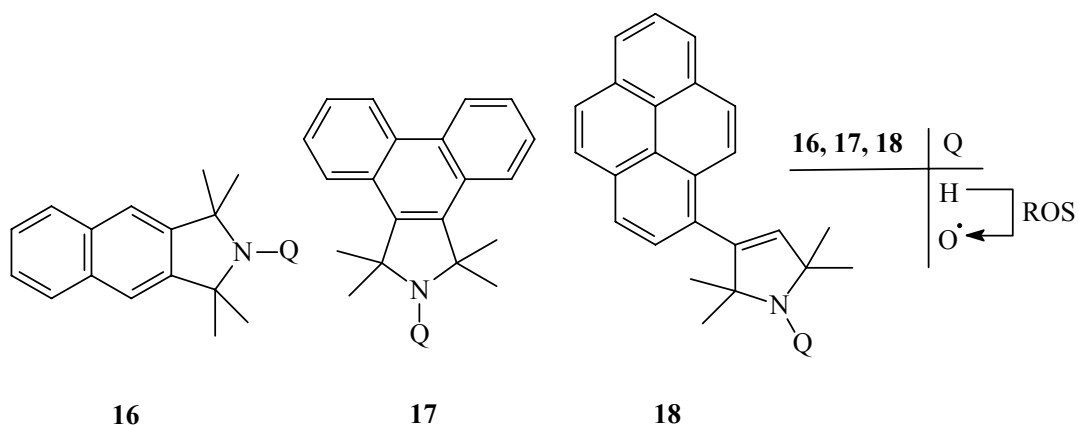


2. ábra: A **13** vegyület (15 μM) fluoreszcencia intenzitásának változása aszkorbinsavval (AA) történő redukció hatására pufferolt ill. savas közegben.

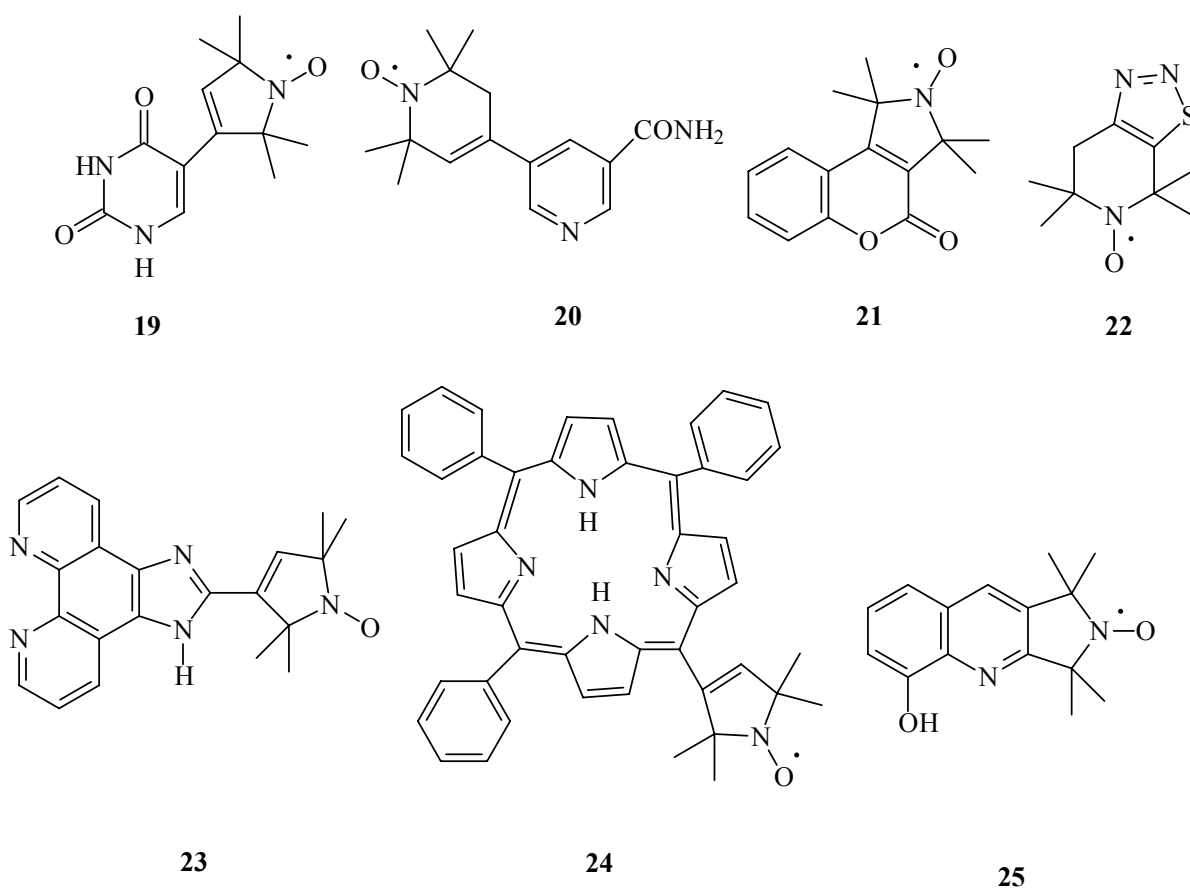
A kettősen jelölő ill. kettős szenzor vegyületek mellett diamágneses BODIPY- származékokat szintetizáltunk, mint pl. a **14** tiolspecifikus vegyület és a káliumion detektálására alkalmas **15** fluoroionofor.⁸



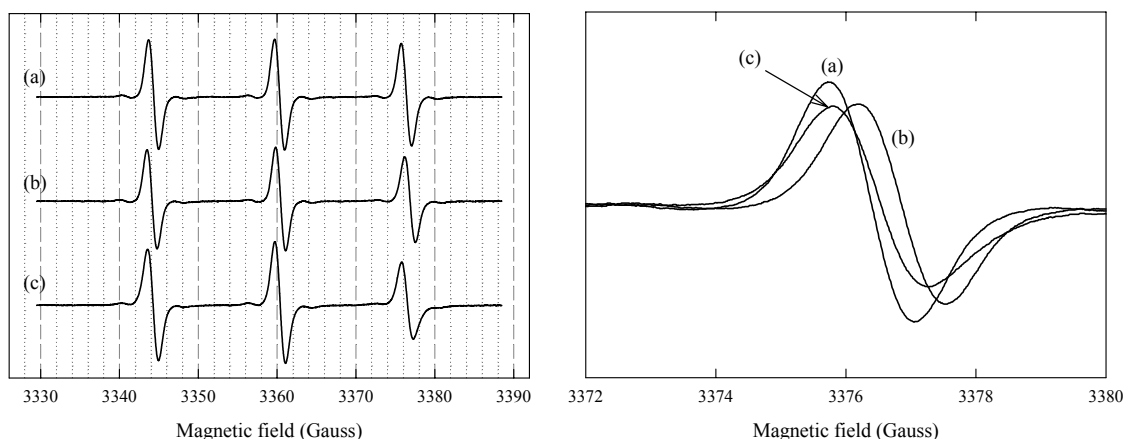
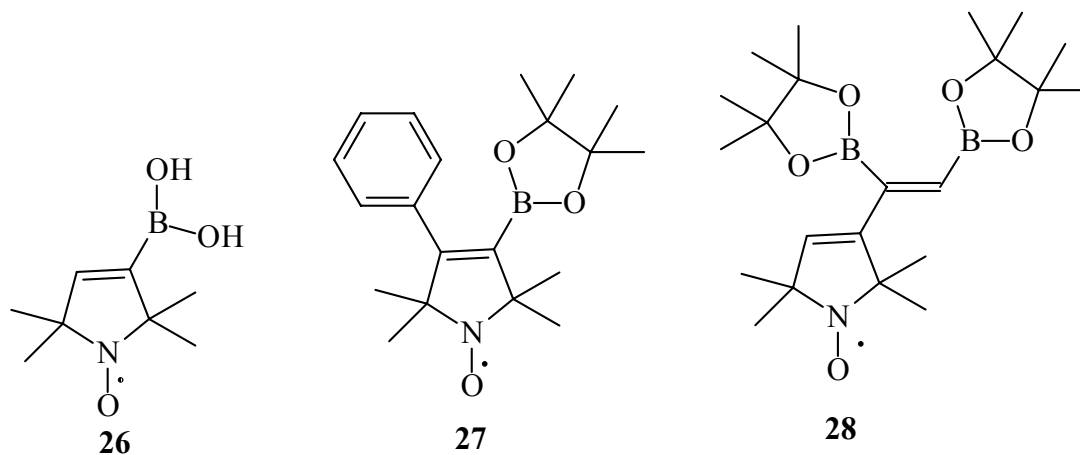
A kettősen jelölő vegyületek egy további csoportja a poliaromás szénhidrogénekhez (mint fluorofórokhoz) kapcsolt ill. kondenzált nitroxidgyűrűt vagy annak redukált származékát tartalmazó vegyületek (**16**, **17**, **18**).^{7,9,10,11} A kettősen jelölő sajátosságuk mellett ezek a vegyületek környezeti kémiai szempontból is fontosak lehetnek, mert a motorizáció toxikus melléktermékeként keletkező poliaromás szénhidrogének ESR spektroszkópiával történő biofizikai vizsgálatára (pl. diffúzió membránokban) nyílik lehetőség (Q = O[•]).



4.) A nitroxidgyűrűvel kondenzált karbociklusok szintézise mellett kidolgoztuk a heterociklusokkal kondenzált ill. heterociklusokhoz kapcsolt nitroxidvegyületek szintézisét is „klasszikus” ill. Pd-katalizált keresztkapcsolási reakciókkal. Így paramágneses pirán-⁹, furán-⁹, tiofén-⁹, izotiazol-⁹, uracil-¹⁰ (**19**), nikotinsavamid- (**20**),¹¹ kinolin-¹¹, kumarin-¹¹ (**21**) benzazol-¹², indol-¹², oxazol-¹², benzofurán-¹² és tiadiazol-¹² (**22**) analógokat készítettünk. A vegyületek közül kiemelném a heterociklusos, paramágnesesn módosított ligandumokat, így a **23** paramágneses fenantrolint,⁹ **24** porfirin és **25** 8-hidroxi-kinolin vegyületeket.¹²

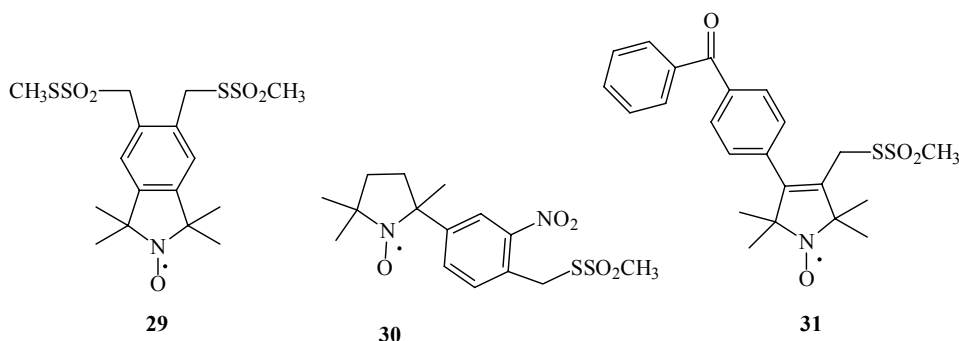


5.) A paramágneses boronsavak és boronsav észterek előállítása szintén nagy előrelépést jelentett a kettősen jelölő vegyületek szintézisében, mert **26**, **27** és **28** vegyületek tetszőlegesen kapcsolhatók halogéntartalmú aromás-, heteroaromás- és vinil-halogenidekkel Suzuki-reakciókban úgy, hogy a C-C kötés kialakításához nem kell megvédeni a nitroxid funkciós csoportot. A **26** boronsav további előnye, hogy szénhidrát-affin spinpróbaként is alkalmazható. A **26** vegyületet inulinhoz adva jelkiszélesedést figyeltünk meg (3. ábra).^{10, 11}

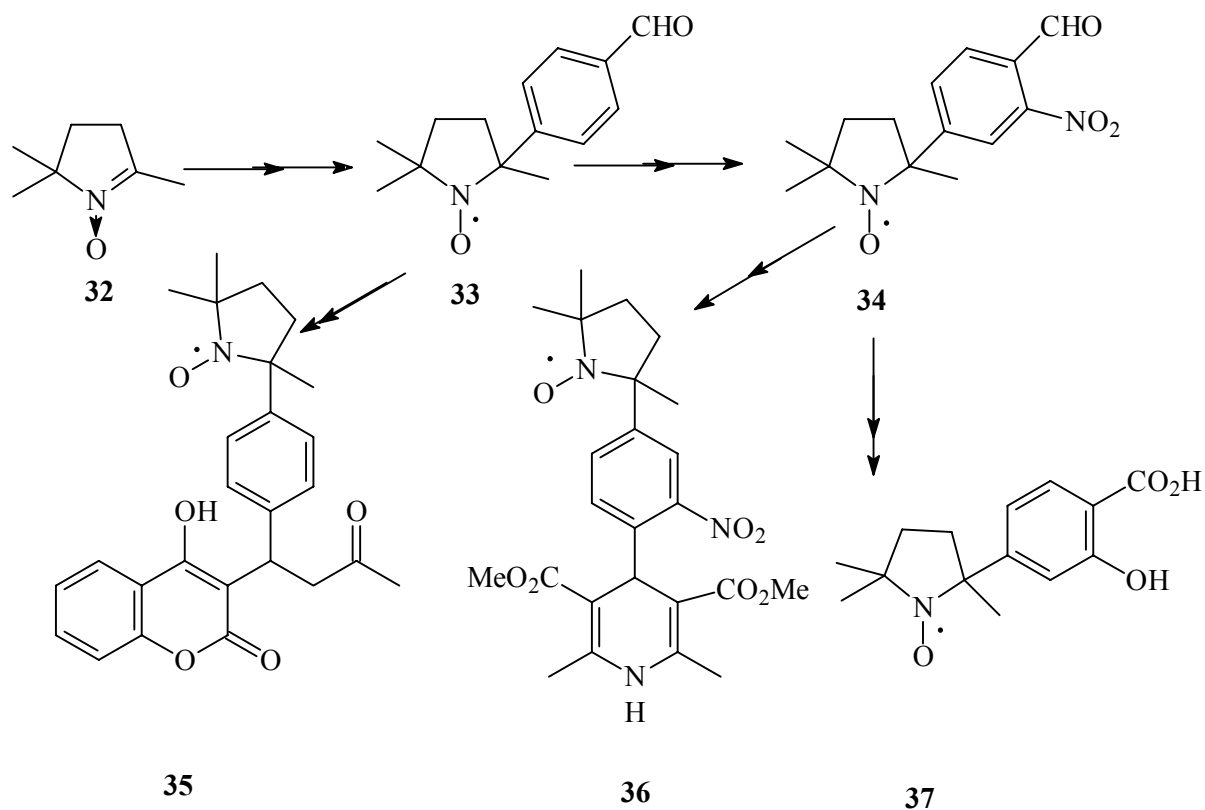


3. ábra: A **26** vegyület (9.3×10^{-5} M) ESR spektruma (a) foszfát pufferban (pH = 6.9); (b) **26** boronsav (9.3×10^{-5} M) + 40 mM fruktóz foszfát pufferban; (c) **26** boronsav (9.3×10^{-5} M) + 10 mM inulin foszfát pufferban és a spektrum 3372-3380 G kinagyított (166 %) tere.

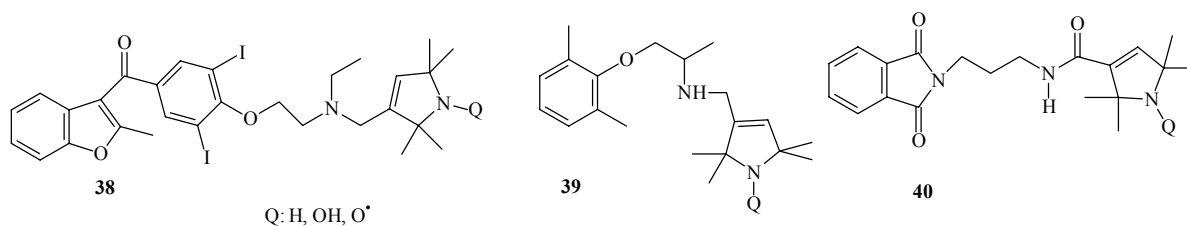
6.) Munkánk során új, homo- és heterobifunkcionális, keresztkötő spinjelző vegyületeket állítottunk elő. Ezek a vegyületek tiolspecifikus (**29**, **30**) és tiolspecifikus/fotoaktiválható funkciós csoportokat tartalmaznak (**31**).^{9,12,13}



7.) A **32** nitronból kiindulva **33** és **34** 2-szubsztituált pirrolidin-aldehydeket állítottunk elő. Ezek bioaktív vegyületek szintéziséhez bizonyultak kulcsintermediereknek mint pl. paramágneses warfarin (**35**), Ca^{2+} -antagonista nifedipin (**36**), szalicilsav (**37**) analógok.¹³



Intézetünkben elsősorban keringésre ható szerek pl. amidaron **38**, mexiletin **39** nitroxidokkal történő módosításával is foglalkoztunk. Azt tapasztaltuk, hogy ezek a vegyületek megtartották eredeti hatásukat és az új analógok antioxidáns hatással bírnak. Az új analógok és a H-2545 (**40**) kísérleti gyógyszer képesek csapdázni a doxorubicin oxidatív metabolizmusa következtében képződő ROS-okat, pl. $\text{O}_2^{\cdot-}$.¹⁴ A kettősen jelölő vegyületeknél a ROS-ok analitikájában használt elv jól alkalmazható a gyógyszerkémiai kutatásokban is.



8.) Intézetünkben a közelmúltban elért eredményeket – beleértve a kettősen jelölő vegyületek szintézisét is - összefoglaló cikkben ismertettük.¹⁵ Kutatócsoportjainkhoz 3 PhD hallgató is csatlakozott (Barta Csengele, Bognár Balázs, Kulcsár Győző) a pályázat néhány eredménye az Ő disszertációikban is szerepel ill. szerepelni fog.¹⁶ Részben a fenti kutatómunka alapján a témavezető (Kálai Tamás) a Debreceni Egyetemen habilitációt¹⁷ szerzett ill. benyújtotta akadémiai doktori értekezését.¹⁸

Összefoglalva: Jelen pályázat keretében növényfiziológiai kutatásokra alkalmas kettősen jelölő (spin és fluoreszcens) vegyületek szintézisét dolgoztuk ki és azok néhány alkalmazását mutattuk be. Szénciklusokhoz és heterociklusokhoz kapcsolt nitroxidokat szintetizáltunk, ezek között pl. komplexképző, spinjelző és bioaktív vegyületeket találunk. A pályázat során előállított mintegy 120 db új vegyület közül a paramágneses boronsavak (amelyeket a legjobb tudomásunk szerint elsőként állítottunk elő) tűnnek a legígéretesebbnek. További kutatásaink során, amennyiben erre lehetőség nyílik, további paramágneses boronsavak szintézisével, hosszabb hullámhosszon fluoreszkáló kettősen jelölő vegyületek, bioaktív molekulák, gyógyszerek, új spinjelző vegyületek szintézisével és ezek vizsgálatával kívánunk foglalkozni.

Hivatkozások:

1. Differences in the ROS-generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. Barta, Cs.; Kálai, T.; Hideg, K.; Vass, I.; Hideg, É. *Functional Plant Biol.* **2004**, *31*, 23-28.
2. Light-induced Wilting and its Molecular Mechanism in Epicotyls of Dark-germinated Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings. Erdei, N.; Barta, C.; Hideg, É.; Böddi, B. *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 185-191.
3. A comparison of UV-B induced stress responses in three barley cultivars. Hideg, É.; Rosenqvist, E.; Váradi, G.; Bornman, J.; Vincze, É. *Funct. Plant. Biol.* **2006**, *33*, 77-90.
4. Singlet Oxygen in Plants – its Significance and Possible Detection with Double (Spin and Fluorescence) Indicator Reagents. Hideg, É.; Kálai, T.; Kos, P.; Asada, K.; Hideg, K. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1211-1218.
5. Structural Features of Transiently Modified Beta-Lactoglobulin Relevant to the Stable Binding of Large Hydrophobic Molecules. Lozinsky, E.; Iametti, S.; Barbiroli, A.; Likhtenshtein, G. I.; Kálai, T.; Hideg, K.; Bonomi, F. *The Protein Journal* **2006**, *25*, 1-15.
6. Synthesis of paramagnetic BODIPY dyes as new double (spin and fluorescence) sensors. Kálai, T.; Hideg, É.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8497-8499.
7. Synthesis of New Double (Spin and Fluorescence) Sensors and Labels. Bognár, B.; Ósz, E.; Hideg, K.; Kálai, T. *J. Heterocyclic Chem.* **2006**, *43*, 81-86.
8. Synthesis of New BODIPY Based Sensors and Labels. Kálai, T.; Hideg, K. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 10352-10360.
9. Synthesis of Paramagnetic Carbo- and Heterocycles. Kulcsár, Gy.; Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis* **2003**, 1361-1366.
10. Synthesis of a paramagnetic boronic acid as a useful synthetic building block and carbohydrate affinity spin probe. Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 8395-8398.
11. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Paramagnetic Vinyl Bromides and Paramagnetic Boronic Acids. Kálai, T.; Jekő, J.; Berente, Z.; Hideg, K. *Synthesis* **2006**, 439-446.
12. Synthesis of new, paramagnetically modified heterocycles. Kálai, T.; Bognár, B.; Jekő, J.; Hideg, K. *Synthesis*, **2006**, 2573-2579.
13. Synthesis and Reactions of Paramagnetic Aromatic Aldehydes as Useful Synthetic Building Blocks. Kálai, T.; Kulcsár, Gy.; Jekő, J.; Ósz, E.; Hideg, K. *Synthesis* **2004**, 2115-2120.

14. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. Hideg, K.; Kálai, T. *Cardiovasc. Toxicity* **2007** (in press)
15. Recent results in chemistry and biology of nitroxides. Hideg, K.; Kálai, T.; Sár, P. C. *J. Het. Chem.* **2005**, *42*, 437-450.
16. Detecting ROS in vivo with fluorescent probes. Barta Cs. *PhD Disszertáció*, SzTE, Szeged, 2004
17. Új, pirrolin és pirrolidin nitroxidok szintézise és alkalmazása. Kálai, T. *Habilitációs tézisek*, DE, TTK, Debrecen, 2004.
18. Paramágneses heterociklusos nitroxidok és diamágneses származékaik szintézise és alkalmazása. Kálai, T. *MTA Doktori Értekezés*, Pécs, 2006. (benyújtva)

A pályázat témájához kapcsolódó előadások, poszterek:

1. Kettős (ESR és fluoreszcens) szenzorvegyületek
Kálai T.
MTA Heterociklusos Munkabizottság, Balatonszemes, 2003. május 29-30.
2. Paramágneses policiklusos vegyületek szintézise
Kálai, T.; Kulcsár, G.; Balog, M.; Jekő, J.; Hideg, K.
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28.
3. Diamágneses és Paramágneses BODIPY származékok szintézise.
Kálai, T.; Hideg, É.; Jekő, J.; Hideg, K.
MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28.
4. Detecting reactive oxygen species in leaves stressed by ultraviolet- or excess photosynthetically active radiation.
Hideg, É.
10th Congress of the European Society for Photobiology, General Hospital Vienna, Austria, September 6-11, 2003
5. The role of superoxide-dismutase in detoxifying reactive oxygen species in tobacco leaves exposed to UV-radiation.
Barta, Cs.; Ogawa, K.; Asada, K.; Hideg, É.
10th Congress of the European Society for Photobiology, General Hospital Vienna, Austria, September 6-11, 2003
6. Synthesis and biological application of double (fluorescent and spin) sensor reagents.
Kálai, T. *Invited seminar lecture*, October 18, 2003, McDonald Research Laboratories, Howard Hughes Medical Institute, University of California Los Angeles, USA.
7. Paramágneses benzaldehidszármazékok szintézise és reakciói
Kálai, T.; Kulcsár, G. Ősz, E. Jekő, J.; Hideg, K.
MTA Heterociklusos munkabizottság, Balatonszemes, 2004. május 20-21.
8. Recent results in chemistry and biology of heterocyclic nitroxides
Hideg, K.
XXI. ECHC, September 12-15, 2004, Sopron, Hungary.
9. Synthesis and study of paramagnetic boronic acids
Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K.
XXI. ECHC, September 12-15, 2004, Sopron, Hungary.

10. Synthesis and reactions of paramagnetic aromatic aldehydes as useful synthetic building blocks.
Kálai, T.; Kulcsár, G.; Jekő, J.; Ósz, E. Hideg, K.
XXI. ECHC, September 12-15, 2004, Sopron, Hungary.
11. Synthesis of new double (fluorescent and spin) sensor Molecules.
Kálai, T.; Hideg, É.; Jekő, J.; Hideg, K.
High-Field EPR in Biology, Chemistry and Physics, Final Report Colloquium of the DFG Priority Programme SPP1051, February 16-18, 2005, Hünfeld, Germany.
12. Nitroxidokkal módosított gyógyszerek, biomolekulák szintézise
Kálai, T.
Bruckner-termi előadás, ELTE, Budapest, 2005. március 18.
13. Paramágneses vinil-halogenidek Suzuki-reakciói.
Kálai, T.; Jekő, J. Hideg, K.
MKE Vegyészkonferencia, 2005. június 28-30, Hajdúszoboszló
14. Recent Results in Chemistry and Biology of Pyrroline, Pyrrolidine and Piperidine Nitroxides
Hideg, K.; Kálai, T.; Sár, P. C.
SPIN-2005, September 20-24, 2005, Novosibirsk, Russia
15. Suzuki Reactions of Paramagnetic Vinyl Halides and Synthesis of Paramagnetic Boronic Acids
Kálai, T.; Jekő, J. Hideg, K.
SPIN-2005, September 20-24, 2005, Novosibirsk, Russia
16. Bioaktív, paramágneses nitroxid vegyületek és diamágneses származékaik szintézise
Kálai, T.
Zemplén-előadás, MTA, Budapest, 2005. december 15.
17. Paramágneses heterociklusos nitroxidok és diamágneses származékaik szintézise és alkalmazása
Kálai, T.
MTA Heterociklusos Kémiai Munkabizottság Ülése, Balatonszemes, 2006. június 7-9.

Ezúton is köszönjük az OTKA Bizottság támogatását és kérem záró beszámolóm elfogadását.

Pécs, 2007. február 15.

Tisztelettel,

Kálai Tamás