



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Oláh György Doktori Iskola

Penicillin származékok szabadgyökös reakciói

Tézisfüzet

Szerző:

Szabó László

Témavezető:

Dr. Tóth Tünde

Konzulens:

Prof. Takács Erzsébet

Szerves Kémia és Technológia Tanszék



Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpont
Energia- és Környezetbiztonsági Intézet
Sugárkémiai Laboratórium

2016

1. Bevezetés

A biológiai rendszerekben is keletkező szabadgyökök közös jellemzőként egy, vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak. Ezek a párosítatlan elektronok, elfoglalva egy atom-/molekulapályát, általában nagy reaktivitást eredményeznek. A szabadgyökök széleskörű jelenléte a szervezetünkben nagyrészt oxigénfüggő életmódunknak köszönhető. Nevezetesen, az aerobikus metabolizmus miatt reaktív oxigén és nitrogén származékok folyamatos áramát termeljük. A szabadgyökök jelentős része, mintegy a kémia véletleneként képződik a mitokondriális elektron transzport lánc folyamán, ahol elektron szivárgás következtében az oxigén befejezetlen redukciójával $O_2^{\cdot-}$ jöhet létre. Ez a gyök forrásként szolgál a reaktív oxigén származékok további képviselőinek képződéséhez, a $\cdot OH$ és H_2O_2 keletkezéséhez. A $\cdot OH$ a biológiai rendszerekben megtalálható legerősebb oxidálószer. A képződési helyéhez közel, szinte szelektivitás nélkül támadja meg a sejtet alkotó molekulákat. Mindeközben a $O_2^{\cdot-}$ és H_2O_2 kevésbé reaktívak, lehetővé téve számukra egyedi funkciók betöltését a sejtben. Jóllehet a mai tudásunk alapján nélkülözhetetlen szerepet játszanak a normál fiziológiás működésben, ezen származékok keletkezése mégis „kétélű fegyver”. Számos betegség patofiziológiája köthető ugyanis ezen, egyébként hasznos származékok túlzott képződéséhez olyan körülmények között, amikor a redox homeosztázist a szervezet már nem képes fenntartani. Az így létrejövő állapotot nevezzük oxidatív stressznek, mely során az antioxidáns védekező rendszer nem tudja ellátni feladatát megfelelően. Mivel ez a jelenség számos betegség kifejlődéséhez köthető, nagy érdeklődés veszi körül az olyan reakciók megértését, melyek a reaktív oxigén származékok és a biomolekulák között játszódnak le a nanoszekundum-mikroszekundum időintervallumban.

A $\cdot OH$ oxidáló képessége sok kutatót megihletett egy, az emberiséget érintő, lesújtó probléma vizsgálatára, a környezetszennyezés minimalizálására. A társadalmi jólét eredményeként vegyi anyagok hatalmas mennyisége termelődik és jut ki a környezetbe. A bioszférát jellemző ciklusoknak köszönhetően ez közvetve mérgezi az életünket. A fenntartható fejlődés elérése érdekében az emberi tevékenység okozta hatásokat minimalizálni szükséges. A vízi környezetre koncentrálna ez részben elérhető a gyógyszermaradványok eltávolításával, mely szennyezők elkerülhetetlenül a környezetbe jutnak az ember anyagcsere-folyamatainak eredményeként. Ezen anyagok közül az antibiotikum maradványok világviszonylatban is jelentős egészségügyi kockázatot jelentenek. Számos tanulmány ismertet olyan módszereket, melyek a $\cdot OH$ reakción alapulva távolítják el a nemkívánatos gyógyszer-szennyezőket.

A sugárkémia egyedi eszközöket nyújt tetszőleges anyagok szabadgyökös reakcióinak tanulmányozásához. Ez az anyag lehet környezeti szennyező, vagy egy biológiailag fontos vegyület. Az antibiotikumok egy sajátos csoportja, nevezetesen a penicillin származékok, jelentős figyelmet kaptak a környezetvédelem és a biokémia területén is. A PhD munka a penicillin származékok egy-elektron oxidációs és redukációs folyamatainak tanulmányozásán alapul.

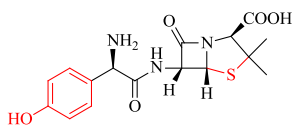
2. Irodalmi áttekintés – célkitűzések

2.1. A $\cdot\text{OH}$ által előidézett oxidáció mechanizmusának tanulmányozása egy modellként szolgáló penicillin származékon

A $\cdot\text{OH}$ képes szinte bármilyen biomolekulát oxidálni diffúzió kontrollált sebességgel, gyakorlatilag véletlenszerűen. Ennek ellenére bizonyos szelektivitás mégis megfigyelhető. A fehérjék és a peptidok, mint az élő szervezetek leggyakoribb összetevői, a reaktív oxigén származékok alapvető célpontjai [1]. Az oxidánsok számos partnere közül a tirozin aromás gyűrűje, a metionin tioéter része és a cisztein tiolcsoportja a leginkább kedvezményezett. Ezek sok káros és védelmező folyamatban szerepet játszanak az oxidatív stressz körülményei között [2].

Az említett megfontolások alapján egyértelmű, hogy a $\cdot\text{OH}$ és fehérjék között lezajló reakciók mechanizmusának feltárása és a keletkező gyökök sorsának követése elengedhetetlen számos betegség patofiziológiájának megértéséhez. Ez különösen fontos a gyógyszerkutatás jövőjét tekintve. Folyamatban lévő kutatások modell peptideken vizsgálják az egy-elektron oxidáció kezdeti eseményeit [3]. A tanulmányok során azonban az is nyilvánvalóvá vált, hogy fehérjékben a helyzet sokkal bonyolultabb, azok komplex és kifinomult szerkezetéből adódóan.

Peptidekben (pl. enkefalinok) és fehérjékben metionin és tirozin/fenilalanin egységek egyidejűleg lehetnek jelen. Ez tovább bonyolítja a helyzetet, hiszen mindegyik rész érzékeny a $\cdot\text{OH}$ támadásával szemben. Az aromás és tioéter rész egyidejű jelenléte egy molekulán belül szintén fennáll bizonyos mikroorganizmusok által termelt másodlagos anyagcseretermékekben, a penicillin származékokban. Az amoxicillin (mely egy széleskörűen alkalmazott félszintetikus penicillin származék) sajátos szerkezete lehetővé teszi a $\cdot\text{OH}$ kompetíciós reakciójának tanulmányozását az egyes molekuláreszekkel (**1. ábra**). Továbbá, gyógyszerként a penicillin származékok is jelen lehetnek *in vivo* az oxidatív stressz során.



Amoxicillin

1. ábra Amoxicillin molekula: tioéter és fenolos részegységekkel

Ezekből a célokból adódóan az amoxicillin szabadgyökök által előidézett oxidációjának mechanizmusát tanulmányoztuk a sugárkémia eszközeinek segítségével. Az oxidáció kezdeti lépéseit impulzusradiolízis kísérletekkel tártuk fel. Végtermék-vizsgálatokat végeztünk különböző körülmények között, hogy szélesítsük az ismereteinket a komplex reakciók megértéséhez, illetve a különböző reaktív köztitermékek hozzájárulásának megismeréséhez.

[1] Du, J.; Gebicki, J. M. *Int. J. Biochem. Cell B* **2004**, *36*, 2334-2343.

[2] Davies, M. J. In *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*; Chatgililoglu, C., Studer, A., Eds; Wiley: New York, 2012; 1425-1458.

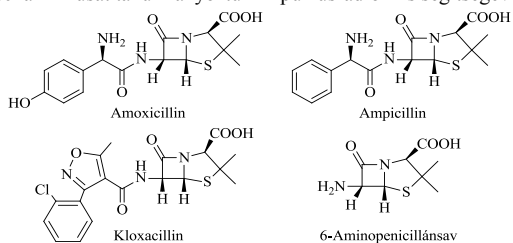
[3] Houée-Levin, C.; Bobrowski, K. *J. Proteomics* **2013**, *92*, 51-62.

2.2. Penicillin származékok egy-elektron redukciója az oxidatív stressz jelenséggel kapcsolatban

A baktericid antibiotikumok esetén baktériumokban és eukarióta sejtekben megfigyelt oxidatív stressz jelenségével számos tanulmány foglalkozik [4,5]. Jól ismert, hogy különféle antibiotikumok (így a penicillin származékok is) céloznak mitokondriális komponenseket, ennek eredményeként reaktív oxigén származékokhoz vezető reakcióutak valósulhatnak meg. A konkrét mechanizmus nem ismert, holott meghatározása elengedhetetlen számos vita tisztázásához ezen a területen [6].

Ebből a szempontból különösképpen érdekes volt számunkra a penicillin származékok egy-elektron redukciójának mechanizmusa. A mitokondriális elektron transzport lánc közelében elektron szivárgás következtében ugyanis egy-elektron redukció történhet, amely olyan reaktív köztitermékekhez vezethet, melyek képesek biomolekulák támadására, vagy elektron átadásra egy megfelelő partnernek, például az O_2 -nek. Ez a folyamat további információval szolgálhat a penicillin származékok esetén is megfigyelt oxidatív stressz jelenség megértéséhez.

Ezzel a szándékkal, választott penicillin származékok - amoxicillin, ampicillin, kloxacillin, és a közös 6-aminopenicillánsav részegység (**2. ábra**) - egy-elektron redukciós mechanizmusát tanulmányoztuk impulzusradiolízis segítségével.



2. ábra Választott penicillin származékok az egy-elektron redukció tanulmányozásához

[4] Dwyer, D. J.; Collins, J. J.; Walker, G. C. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, *55*, 313-332.

[5] Kalghatgi, S.; Spina, C. S.; Costello, J. C.; Liesa, M.; Morones-Ramirez, J. R.; Slomovic, S.; Molina, A.; Shirihai, O. S.; Collins, J. J. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 1-11.

[6] Imlay, J. A. *Curr. Opin. Microbiol.* **2015**, *24*, 124-131.

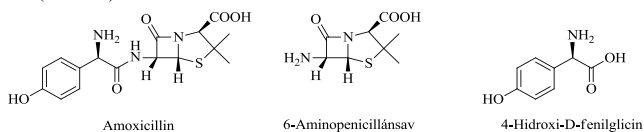
2.3. Antibiotikumok eltávolítása szennyvizekből – a fenntartható jövő felé

Az antibiotikumok, ezen belül is a penicillin származékok ártalmas vízszennyezők [7]. Jelenlétük a szennyvízben elősegíti az antibiotikum rezisztencia terjedését számos baktériumtörzs között, aminek komoly hatása van az emberi egészség jövőjére. Az antibakteriális aktivitás eltávolításához nagyhatékonyságú oxidációs eljárások alkalmazása ígéretes lehet [8]. Ezek a módszerek hidroxilgyököt alkalmaznak oxidálószerként.

2.3.1. A β -laktám gyűrű lebontása az antibakteriális aktivitás eltávolítása céljából

A β -laktám gyűrű elengedhetetlen a penicillin származékok számára az antibakteriális aktivitás kifejtéséhez (ez a rész az úgynevezett farmakofőr). Kompetíció játszódik le a távoli aromás és tioéter egységek között a $\cdot\text{OH}$ támadásáért. Ez a kompetíció egyértelműen meghatározza az antibakteriális aktivitás megszüntetésének hatékonyságát. A tioéter rész ugyanis közel helyezkedik el a farmakofőrhez és az egy-elektron oxidációból származó köztitermékek végülis előidézhetik a gyűrű lebontását. Korábban kinetikai méréseket alapul véve megállapították, hogy a $\cdot\text{OH}$ támadása főként a penicillinek aromás oldalláncán történik és ezért úgy gondolták, hogy a $\cdot\text{OH}$ eredménytelen lesz az antibakteriális aktivitás eltávolításában [9,10]. Ezzel szemben, az amoxicillin $\cdot\text{OH}$ által előidézett oxidációjának vizsgálata során (lásd 2.1-es fejezet) eltérő kép rajzolódott ki számunkra.

Ez az ellentmondás sarkallt bennünket a lényeges farmakofőr eltávolítás hatékonyságának vizsgálatára különböző körülmények között és az ehhez vezető reakció utak felderítésére, melyek a β -laktám gyűrű felnyílásához vezethetnek. Ebből a szemszögből a $\cdot\text{OH}$ és a e_{aq}^- előidézte inaktiválás mechanizmusát tanulmányoztuk kinetikai megközelítésben is az amoxicillin molekulán és annak részkomponensein keresztül (**3. ábra**).



3. ábra Amoxicillin és annak részkomponensei, mint a vizsgálat tárgyai

[7] Andersson, D. I.; Hughes, D. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 465-478.

[8] Michael, I.; Rizzo, L.; McArdell, C. S.; Manaia, C. M.; Merlin, C.; Schwartz, T.; Dagot, C.; Fatta-Kassinos, D. *Water Res.* **2013**, *47*, 957-995.

[9] Song, W.; Chen, W.; Cooper, W. J.; Greaves, J.; Miller, G. E. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 7411-7417.

[10] Dail, M. K.; Mezyk, S. P. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 8391-8395.

2.3.2. Az oxidáció során képződő termékek hatása baktérium törzsekre

A szennyvízben található antibiotikum nyomok eltávolítására a nagyhatékonyságú oxidációs eljárások ígéretes technikáknak bizonyultak azok nagy hatásfokából adódóan. Ugyanakkor a közelmúltban megjelent néhány tanulmányban a kezelést követően megmaradó antibakteriális aktivitásról számolnak be, melyet a $\cdot\text{OH}$ által képzett termékeknek tulajdonítottak [11-14].

Célunk β -laktám antibiotikumokból (amoxicillin, ampicillin, kloxacillin) a kezelés során képződő termékek baktériumokra gyakorolt hatásainak vizsgálata szerkezet-alapú és mikrobiológiai megközelítésekkel Gram-pozitív és Gram-negatív törzseket alkalmazva (4. ábra).



4. ábra A tanulmány kísérleti megközelítése

2.3.3. Penicillin származékok egy-elektron oxidációs mechanizmusa a nagyhatékonyságú oxidációs eljárások tekintetében

A nagyhatékonyságú oxidációs eljárás során képződő reaktív köztitermékek meghatározása és jellemzése ($\cdot\text{OH}$ előidézte oxidáció) nélkülözhetetlen az antibakteriális aktivitás eltávolításának hatékonyságát befolyásoló folyamat paramétereinek megértéséhez. Ezért a nagyhatékonyságú oxidáció mechanizmusát tanulmányoztuk impulzusradiolízis technikát felhasználva $\cdot\text{OH}$ és $\text{Cl}_2^{\cdot-}/\text{Br}_2^{\cdot-}$ alkalmazásával. A gyökianionok a $\cdot\text{OH}$ és a Cl^-/Br^- közötti reakcióban képződnek, mely anionok a szennyvízmintákban leggyakrabban előforduló halogenid-ionok. A $\text{Cl}_2^{\cdot-}/\text{Br}_2^{\cdot-}$ reakcióinak sós vizek esetén van hatása a lebontás mechanizmusára [15].

[11] Dodd, M. C.; Kohler, H. P. E.; von Gunten, U. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 2498-2504.

[12] Dodd, M. C.; Rentsch, D.; Singer, H. P.; Kohler, H. P. E.; von Gunten, U. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 5940-5948.

[13] Dimitrakopoulou, D.; Rethemiotaki, I.; Frontistis, Z.; Xekoukoulotakis, N. P.; Venieri, D.; Matzavinos, D. *J. Environ. Manage.* **2012**, *98*, 168-174.

[14] Jung, Y. J.; Kim, W. G.; Yoon, Y.; Kang, J. W.; Hong, Y. M.; Kim, H. W. *Sci. Total Environ.* **2012**, *420*, 160-167.

[15] Yang, Y.; Pignatello, J. J.; Ma, J.; Mitch, W. A. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 2344-2351.

3. Módszerek

3.1. Besugárzás

A γ -radiolízis kísérletek elvégzése során a mintákat $2,3 \times 10^{15}$ Bq (~ 62000 Ci) aktivitású ^{60}Co γ -forrással (Izotóp Intézet Kft., Budapest) sugároztuk be.

Az **impulzusradiolízis** kísérletekhez Tesla Linac LPR-4 típusú elektron gyorsítót alkalmaztunk (TESLA V. T. MIKROEL, Prága, Cseh Köztársaság) kinetikus spektrofotometriás detektálással.

3.2. Analitikai módszerek

Az **UV-Vis abszorpciós spektrumokat** Jasco 550 spektrofotométerrel rögzítettük.

Az **FTIR spektrumokat** Unicam Mattheson Research Series 1 készülékkel vettük fel.

A ^{13}C **NMR spektrumokat** (500 MHz) Bruker DRX-500 Avance spektrométer alkalmazásával rögzítették.

A termékek azonosításához **nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával csatolt tömegspektrometriás technikát** alkalmaztunk (LC/MS). A termékek elválasztása Agilent 1200 liquid chromatograph (LC) segítségével $2,1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ Phenomenex Kinetex XB-C18 oszlopon történt. Ez a rendszer egy Agilent 6410 triple quadrupole MS/MS készülékhez csatlakozott, mely elektro spray ionizációs illesztőegységgel rendelkezett. A tömegspektrometriás adatokat Agilent MassHunter Qualitative Analysis szoftverrel értékeltük ki (1.3.157.0-ás verzió).

A felszabaduló CO_2 mennyiségét közvetett módon határoztuk meg a minta **teljes szerves széntartalmának** (Total Organic Carbon (TOC) content) mérésén keresztül Shimadzu TOC-L készülék felhasználásával.

3.3. Biológiai elemzés

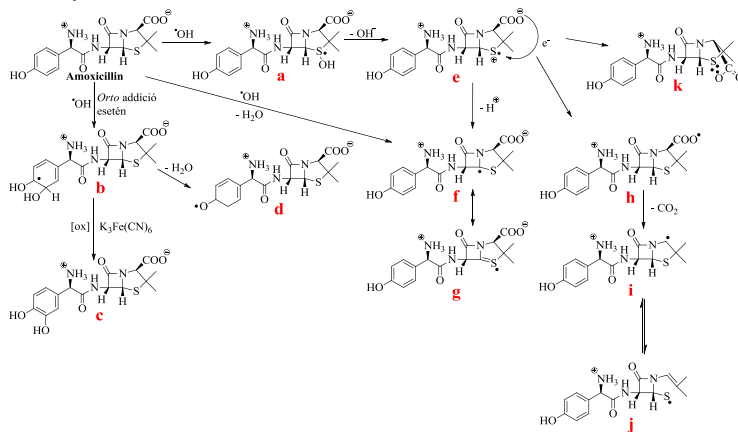
A **toxicitás tesztek**et *Vibrio fischeri* baktérium törzs alkalmazásával (Agricultural Research Service Culture Collection, NRRL-B-11177, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Németország) a DIN EN ISO 11348-2 szabvány alapján hajtottuk végre, annak néhány módosításával. A lumineszcens (akut és krónikus toxicitás) intenzitás és optikai denzitás (OD, 435 nm-en) méréséhez LUMISTox 300 készüléket alkalmaztunk (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Németország).

Az antibiotikum **érzékenységi tesztek**et *Bacillus subtilis* (American Type Culture Collection (ATCC), ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) és *Escherichia coli* (ATCC 25922) törzseken végeztük. Az agar diffúziós tesztek során tripton-glükóz agar (TGA) lemezeket használtunk. A táptalaj hígítási tesztekhez RABIT impedimetriás készüléket alkalmaztunk (Don Whitley Scientific, Egyesült Királyság).

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Amoxicillin szabadgyökök által előidézett átalakulásai

A $\cdot\text{OH}$ és az amoxicillin tioéter részegysége közti reakció első lépéseként OH-addukt képződik a kénatomon **(a)** (5. ábra). A $\cdot\text{OH}$ a fenolos oldalláncon reagálva dihidroxiciklohexadienil gyököt képez **(b)**. A keletkezett gyök $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ alkalmazásával, gyors reakcióban oxidálható **(c)** mielőtt még a dehidratációs lépés a fenoxil gyökhöz **(d)** vezetve végbemenne, eltávolítva a köztiterméket **(b)** a rendszerből. A kénatomon létrejövő $\cdot\text{OH}$ addukt átalakulhat $\cdot\text{OH}$ kilépésével, kén központú gyökkationt eredményezve **(e)**. A kénatommal szomszédos α -szénatom deprotonálódásán keresztül a továbbiakban α -(alkiltio)alkil gyök **(f)** képződik, mely leginkább rezonancia határszerkezettel írható le **(f** és **g)**. A kén központú gyökkation **(e)** képes belső elektron átadásra a karboxilát egység közreműködésével. A távoli kén atomot célzó elektron átadást **(h-hoz)** vezetve CO_2 felszabadulás követi, ezzel példázva a pseudo-Kolbe reakció egyik változatát. A folyamat végül α -aminoalkil típusú gyök képződéséhez vezet **(i)**. Az α -aminoalkil típusú gyök β -fragmentáción mehet keresztül thylil gyököt **(j)** szolgáltatva egyensúlyi reakcióban. A tioéter származékokból eredő gyökkation **(e)** hajlamos más heteroatommal, vagy kénatommal komplexálás révén stabilizálódni. A létrejövő három-elektronos kötés ($2\sigma/1\sigma^*$) a gyökkation párosítatlan p elektronja és a donor atom (N, O, S) magános p elektron párjának kölcsönhatása révén keletkezik. S...O három-elektronos gyök komplexek képződhetnek intramolekuláris kölcsönhatás révén is a szterikusan elérhető karboxil funkció részvételével, **k** köztiterméket szolgáltatva. A köztitermékek számított sugárkémiái hozamai alapján az amoxicillin molekulában a kénatom sokkal érzékenyebb a $\cdot\text{OH}$ támadásra, mint az aromás rész.



5. ábra Az amoxicillin $\cdot\text{OH}$ által előidézett átalakulásai

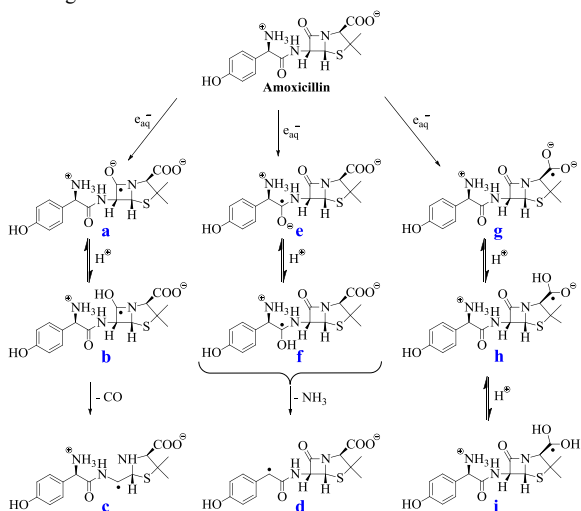
A reakció mechanizmusból következik egy rövid életű és egy stabilizált hosszú életű $\cdot\text{OH}$ kén addukt jelenléte. Ez a stabilizáció hidrogén kötés létrejöttén keresztül valósulhat meg a szterikusan hozzáférhető karboxilcsoport közreműködésével.

Végtermék-vizsgálatok alapján a kén oxidációja főként a megfelelő szulfoxid képződéséhez vezet. A szulfoxid keletkezésében az oldott oxigén jelentős szerepet játszik, ugyanakkor anaerob körülmények esetén a H_2O_2 és az α -(alkiltio)alkil gyök köztitermékek irányítják a reakció mechanizmust.

4.2. Penicillin származékok egy-elektron redukciós reakciói

A hidratált elektron a penicillin váz karbonilcsoportjaira támad, ezt az amoxicillin példáján mutatjuk be (**6. ábra**). A β -laktám karbonilcsoportjához kapcsolódva a megfelelő ketil gyökönion képződik (**a**), amely azonnal továbbalakul α -hidroxialkyl gyököt eredményezve (**b**). A szomszédos szénatomot érintő elektron vándorlásokon keresztül, melyet feltehetően CO felszabadulása követ, szén központú gyök keletkezik (**c**). Ammónia felszabadulása vezethet a megfelelő benzil gyökhöz (**d**). Ez a folyamat azon ketil gyökönionon keresztül játszódik le (peptidekhez hasonlóan), mely a hidratált elektron és az amidfunkció karbonilcsoportja közti reakcióban keletkezik (**e**). Ezek a köztitermékek szintén gyors protonálódáson mennek keresztül α -hidroxialkyl gyökhöz vezetve (**f**). A karboxilát egységen bekövetkező e_{aq}^- támadás eredményeként gyök dianion keletkezik (**g**). Ez a gyök lépésről lépésre protonálódik **h** köztiterméken keresztül **i** származékot eredményezve.

A hidratált elektron jelentős reaktivitást mutat a penicillin származékokkal szemben, a reakciósebességi állandó $\sim 5 \times 10^9 \text{ dm}^3/\text{mol s}$.



6. ábra Amoxicillin egy-elektron redukciós reakciói

4.3. Antibiotikumok eltávolítása szennyvízmintákból

4.3.1. Az amoxicillin β -laktám gyűrűjének lebontása az antibakteriális hatás eltávolítása céljából

Korábbi kinetikai tanulmányokkal ellentétben azt találtuk, hogy a $\cdot\text{OH}$ és a e_{aq}^- megfelelő jelöltek egy penicillin származék hatástalanítására. IR méréseket alapul véve a $\cdot\text{OH}$ és a e_{aq}^- ugyanis 55 % és 84 % hatékonysággal bontja le a β -laktám rendszert. Levegő jelenlétében végzett kísérleteknél az oldatban a farmakofór eltávolításának hatékonysága kissé leromlott, mivel a gyűrű felnyíláshoz vezető reakció utat gátolta az O_2 -nek és a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -nak a kén oxidációs termékeivel szemben mutatott reaktivitása. A négytagú gyűrű lebontása hidratált elektronnal feltehetően a β -laktám karbonil és a karboxilát szénatomokon lezajló reakció következménye.

Méréseink alapján a $\cdot\text{OH}$ reakciója a 6-aminopenicillánsavval és 4-hidroxi-D-fenilglicin oldallánccal diffúzió kontrollált sebességgel zajlik. A gyakorlati sugárkémiai tekintve egy szerves szulfid és a $\cdot\text{OH}$ közötti reakció sebességi állandójának meghatározásakor KSCN kompetitor használata elkerülendő a $(\text{SCN})_2^{\cdot-}$ kénnel szemben mutatott reaktivitása miatt, valamint a kén három-elektronos kötés létesítésére mutatott hajlamából következően, a képződő köztitermékek ugyanis ugyanabban a hullámhossz tartományban nyelnek el, mint a $(\text{SCN})_2^{\cdot-}$.

4.3.2. A penicillin származékok oxidációs termékeinek hatása baktérium törzsekre

A kémiai elemzés alapján a β -laktám gyűrű (farmakofór) lebontása figyelhető meg, mely folyamat az aromás rendszeren lezajló reakcióval verseng. A reaktív köztitermékek támadása a penicillin váz több pontján is OH-szubsztituált származékokat eredményezhet. A megnövekedett hidrofilitás nagyobb diffúzió sebességet biztosít a Gram-negatív baktériumok porin csatornáin és a Gram-pozitív baktériumok hidofil sejtfalán keresztül. Ennek megfelelően megnövekedett akut toxicitás tapasztalható a penicillin származékokat tartalmazó mintákban a nagyhatékonyságú oxidációs kezelés kezdetén. Hasonló tendencia figyelhető meg a hatásmechanizmusból eredő antibakteriális aktivitást célzó vizsgálatok során, melyeket antibiotikum érzékenységi tesztekkel végeztünk (agar diffúzió, bakteriális növekedés). Hosszabb idejű kezelés olyan termékeket eredményez (pl. polihidroxifenol származékokat), melyek szintén károsak a baktériumokra. Ebből következően a nagyhatékonyságú oxidációs eljárás körültekintő optimalizálása szükséges.

4.3.3. Penicillin származékok egy-elektron oxidációs mechanizmusa a nagyhatékonyságú oxidációs eljárások tekintetében

A $\cdot\text{OH}$ által előidézett oxidáció mechanizmusa más penicillin származékok esetén is hasonló ahhoz, melyet az amoxicillin esetén tárgyaltunk (5. ábra). A $\cdot\text{OH}$ támadása főként a kénatomot érinti. Miközben a 6-aminopenicillánsav esetén $>\text{S}\cdot\text{S}<$ három-elektronos intermolekuláris kölcsönhatás révén kialakult komplexek is

5. Tézisek

I. Igazoltuk, hogy a hidratált elektron a penicillin váz β -laktám gyűrűjén, az amidfunkció karbonilcsoportján, valamint a karboxilcsoport szénatomján támad. Az egy-elektron redukció köztitermékei ketil gyökök. (1. közlemény)

II. Impulzusradiolízis módszer alkalmazásával megállapítottuk, hogy az amoxicillin molekulában a tioéter egység érzékenyebb a $\cdot\text{OH}$ támadására, mint az antibiotikum aromás gyűrűje. Az amoxicillin $\cdot\text{OH}$ által előidézett oxidációja tehát követi a szerves szulfidokra jellemző reakcióutat. (2. közlemény)

III. A $\cdot\text{OH}$ által előidézett reakció mechanizmusának feltárásán keresztül impulzusradiolízis technikát alkalmazva bebizonyítottuk, hogy egy rövid életű és egy stabilizált hosszú életű $\cdot\text{OH}$ -kén addukt képződik az amoxicillin esetében. (2. közlemény)

IV. A hidratált elektron és a $\cdot\text{OH}$ nagy hatékonysággal képes lebontani az amoxicillin β -laktám gyűrűjét. Ezt IR spektroszkópiai vizsgálatokkal és kinetikai mérésekkel támasztottuk alá. (3. közlemény)

V. Végtermék-vizsgálatokkal egybekötött mikrobiológiai mérések segítségével bizonyítottuk, hogy a penicillinek kezelése nagyhatékonyságú oxidációs eljárással előállított kis és nagy gyökkoncentráció alkalmazásával veszélyezteti a baktériumokra ható szelektív nyomás megszüntetését. (4. közlemény)

VI. Impulzusradiolízis vizsgálatokkal alátámasztottuk, hogy a penicillinek egy-elektron oxidációja főként a kénatomon játszódik le mind $\text{Cl}_2^{\cdot-}/\text{Br}_2^{\cdot-}$, mind $\cdot\text{OH}$ alkalmazása esetén. Megállapítottuk továbbá, hogy a penicillinek jelentős reaktivitással rendelkeznek a $\text{Cl}_2^{\cdot-}/\text{Br}_2^{\cdot-}$ -nal. Nagyobb kén gyökkation koncentráció tapasztalható $\text{Cl}_2^{\cdot-}/\text{Br}_2^{\cdot-}$ alkalmazása esetén, mint a csak $\cdot\text{OH}$ -kel végzett kísérletekkel, mivel a $\cdot\text{OH}$ előidézte oxidáció során stabilizált köztitermék keletkezik. (2. és 5. közlemény)

6. Alkalmazási lehetőségek

A penicillinek különleges szerkezete kiváltképpen érdekessé tette a molekulák szabadgyökös reakcióit. Ezen antibiotikumok egy-elektron oxidációja és redukciója sok sajátos reakciót adott kiegészítve egy újabb fejezettel a szabadgyökös reakciók kémiáját. A tárgyalt folyamatok segítségre lehetnek ennél sokkal összetettebb rendszerek megértéséhez (például tioéter részt tartalmazó (metionin tartalmú) fehérjék és peptidok).

A nagyhatékonyságú oxidációs eljárások, mint csúcstechnológiák kerülhetnek bevezetésre a jövőben olyan szennyvizek kezelésére, melyek különféle gyógyszerekkel, például antibiotikumokkal szennyezettek. A fő cél minden esetben a szennyvíz meglévő antibakteriális aktivitásának a megszüntetése, mivel ez ártalmas az

emberi egészségre a környezetben található mikroorganizmusokra kifejtett hatásokon keresztül. A nagyhatékonyságú oxidációs eljárások szabadgyökös reakciókon alapulnak és ezért a kezelés során lezajló folyamatok megértéséhez szükséges az oxidáció kezdeti eseményeinek tisztázása. A végtermékek mikroorganizmusokra gyakorolt hatása a kezelés különböző fázisaiban szintén fontos mérnöki kérdés. Mindezen szempontokat tárgyalja az értekezés.

7. Közlemények

Az értekezés alapját képező közlemények:

1. Szabó, L.; Tóth, T.; Takács, E.; Wojnárovits, L. One-electron reduction of penicillins in relation to the oxidative stress phenomenon. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 29673-29681. [IF: 2,862 (2014)].
2. Szabó, L.; Tóth, T.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Drugs with susceptible sites for free radical induced oxidative transformations: the case of a penicillin. *Free Radical Research* **2016**, *50*, 26-38. [IF: 2,976 (2014)].
3. Szabó, L.; Tóth, T.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. $\bullet\text{OH}$ and e_{aq}^- are yet good candidates for demolishing the β -lactam system of a penicillin eliminating the antibacterial activity. *Radiation Physics and Chemistry* **2016**, *124*, 84-90. [IF: 1,38 (2014)].
4. Szabó, L.; Tóth, T.; Engelhardt, T.; Mohácsi-Farkas, Cs.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Change in hydrophilicity of penicillins during advanced oxidation by radiolytically generated $\bullet\text{OH}$ compromises the elimination of selective pressure on bacterial strains. *Science of the Total Environment* **2016**, *551-552*, 393-403. [IF: 4,099 (2014)]. Független idéző: 1.
5. Szabó, L.; Tóth, T.; Takács, E.; Wojnárovits, L. One-electron oxidation of molecules with aromatic and thioether functions: $\text{Cl}_2^{\bullet-}/\text{Br}_2^{\bullet-}$ and $\bullet\text{OH}$ induced oxidation of penicillins studied by pulse radiolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2016**, *326*, 50-59. [IF: 2,495 (2014)].

További közlemények:

6. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Hydroxyl radical induced degradation of salicylates in aerated aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry* **2014**, *97*, 239-245. [IF: 1,380]. Független idéző: 1.
7. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Radiolysis of paracetamol in dilute aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry* **2012**, *81*, 1503-1507. [IF: 1,375]. Független idéző: 4.

8. Sági, Gy.; Csay, T.; Szabó, L.; Pátzay, Gy.; Csonka, E.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Analytical approaches to the OH radical induced degradation of sulfonamide antibiotics in dilute aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, *106*, 52-60. [IF: 2,979 (2014)]. Független idéző: 3.

Könyvfejezet:

1. Wojnárovits, L.; Takács, E.; Szabó, L. Gamma-ray and electron beam-based AOPs. In *Advanced Oxidation Processes for Water Treatment: Fundamentals and Applications*; Stefan, M. I., Ed.; IWA Publishing, 2016. Nyomdában.

Konferencia kiadványok (magyar nyelven):

1. Szabó, L.; Tóth, T.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Amoxicillin átalakulásai *in vitro* oxidatív környezetben. *Őszi Radiokémiai Napok 2014*, 53-57. ISBN 978-963-9970-50-2.
3. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Szalicilsav származékok sugárzásos degradációjának összehasonlítása. *Őszi Radiokémiai Napok 2013*, 105-108. ISBN 978-963-9970-42-7.
4. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Paracetamol bomlása híg vizes oldatokban radioaktív sugárzás hatására. *Őszi Radiokémiai Napok 2012*, 37-42. ISBN 978-963-9970-27-4.
5. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Toxicitás változása gyógyszermaradványok vizes oldataiban sugárzásos lebontás során. *Őszi Radiokémiai Napok 2011*, 63-68. ISBN 978-963-9970-19-9.

Konferencia kiadványok (angol nyelven):

1. Sági, Gy.; Csay, T.; Szabó, L.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Analytical approaches to the OH radical induced degradation of sulfonamide antibiotics in dilute aqueous solutions. *Őszi Radiokémiai Napok 2014*, 49-52. ISBN 978-963-9970-50-2.
2. Takács, E.; Wojnárovits, L.; Homlok, R.; Illés, E.; Csay, T.; Szabó, L.; Rácz, G. Radiation Treatment of Wastewater Containing Pharmaceutical Compounds. *Report of the 2nd Research Coordination Meeting (RCM) on "Radiation Treatment of Wastewater for Reuse with Particular Focus on Wastewaters Containing Organic Pollutants" 29 October - 2 November 2012, Jeonguep, Republic of Korea*, 67-78.
(http://www-naweb.iaea.org/napc/iachem/working_materials/RC-1188-2-report.pdf)

Szöbeli előadások (angol nyelven):

1. Szabó, L.; Tóth, T.; Rácz, G.; Engelhardt, T.; Mohácsi-Farkas, Cs.; Takács, E.; Wojnárovits, L. •OH Induced Oxidation of Penicillins in Relation to Advanced Oxidation Techniques: Elimination of the Antibacterial Activity. *First International Conference on Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, április 10-15, 2016.
2. Szabó, L.; Tóth, T.; Rácz, G.; Sági, Gy.; Csay, T.; Engelhardt, T.; Mohácsi-Farkas, Cs.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Penicillins in the facet of radiation chemistry. *13th Tihany Symposium on Radiation Chemistry*, Balatonalmádi, augusztus 29-szeptember 3, 2015.

Szöbeli előadások (magyar nyelven):

1. Szabó, L.; Tóth, T.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Amoxicillin átalakulásai *in vitro* oxidatív környezetben. *Őszi Radiokémiai Napok 2014*, Balatonszárszó, október 13-15, 2014.
2. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Szalicilsav származékok sugárzásos degradációjának összehasonlítása. *Őszi Radiokémiai Napok 2013*, Eger, október 16-18, 2013.
3. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Paracetamol bomlása híg vizes oldatokban radioaktív sugárzás hatására. *Őszi Radiokémiai Napok 2012*, Siófok, október 8-10, 2012.
4. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Toxicitás változása gyógyszermaradványok vizes oldataiban sugárzásos lebontás során. *Őszi Radiokémiai Napok 2011*, Sopron, október 26-28, 2011.

Poszterek (angol nyelven):

1. Szabó, L.; Tóth, T.; Rácz, G.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Free radical induced oxidation of amoxicillin. *ChemCYS 2016 (Chemistry Conference for Young Scientists)*, Blankenberge, Belgium, március 16-18, 2016.
2. Szabó, L.; Tóth, T.; Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Radiolytic degradation of paracetamol in dilute aqueous solution. *12th Tihany Symposium on Radiation Chemistry*, Zalakaros, augusztus 27-szeptember 1, 2011.