

Pajzsmirigyhormonok és
előanyagaik jellemzése részecske-
specifikus paraméterekkel

Doktori tézisek

Tóth Gergő

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

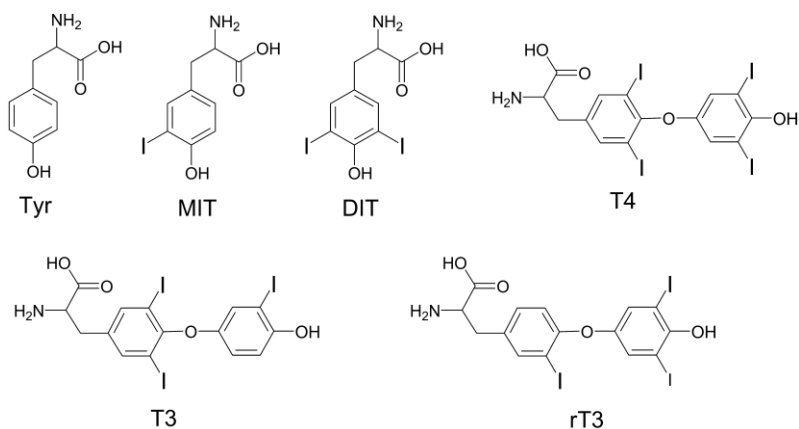


1. Bevezetés

A bio- és gyógyszermolekulák specifikus reakciókban vesznek részt a szervezetben. Az ilyen reakciók egy része csak akkor megy végbe, ha a részecskék megfelelő mikroszkopikus protonáltsági, konformációs állapotban vannak. Ezen részecskék koncentrációja és a kapcsolódó egyensúlyi állandók a mikrospeciáció segítségével határozhatóak meg. Az egyes mikrorészecskék nehezen megfogható kémiai entitások. Állandó egymásba való átalakulásuk miatt átlagos egyedi élettartalmuk ezredmásodperces nagyságrendbe esik, emiatt semmilyen ma ismert elválasztási technikával nem különíthetők el egymástól. Ennek ellenére egyedi fizikai-kémiai paraméterekkel jellemezhetőek, a biológiai folyamatokban saját, önálló formában vesznek részt. A protonáltsági izomerek (pl.: az aminosavak ikerionos és töltésmentes formája) csak abban különböznek egymástól, hogy a kötött protont eltérő báziscentrumon hordozzák, biológiai szerepük mégis eltérő. Általánosságban a membránon keresztüli transzportfolyamatokban a töltésmentes, míg a receptor kötődésben az ikerionos forma vesz részt. A

mikroszkopikus egyensúlyi és kinetikai paraméterek ismerete alapvető a biokémiai és analitikai folyamatok molekuláris szintű molekuláris megértéséhez és természetesen a biológiai kóros folyamatok terápiás befolyásolásához.

A legfontosabb pajzsmirigyhormonok a tiroxin (T4), liotironin (T3) és a reverz liotironin (rT3). A vegyületek a pajzsmirigyben a tirozin (Tyr) jódozása után monojódtirozin (MIT) és dijódtirozin (DIT) molekulák összekapcsolódásával keletkeznek. A vegyületek szerkezete az első ábrán látható.



1. ábra Vizsgált vegyületeink szerkezete

A pajzsmirigyhormonok élettani hatása régóta ismert. Teljes hiányuk az étellel összeegyeztethetetlen. Fontos szerepet játszanak a szervezet energiaszabályozásában, valamint a megfelelő idegrendszeri funkciók kialakításában.

A pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus fizikai-kémiai tulajdonságai alulreprezentáltak az irodalomban, annak ellenére, hogy ez elengedhetetlen a terápia hatás molekuláris szintű megismeréséhez, az egyes gyógyszeranyagok farmakokinetikai és farmakodinámiai jellemzéséhez.

Doktori munkám során a pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus sav-bázis tulajdonságait, lipofilitását és receptorkötődését vizsgáltuk. Ezen tulajdonságok molekuláris szinten teszik lehetővé a vegyületek élettani és biokémiai tulajdonságának jobb megértését, illetve lehetőség nyílik a szerkezet-hatás összefüggések pontosabb felderítésével új gyógyszermolekulák tervezésére is.

2. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a pajzsmirigyhormonok és előanyagaiknak protonáltsági állapotainak, valamint a bioszintézis, receptorkötődés és membrántranszport közötti esetleges összefüggések vizsgálatát. Ehhez szükséges a molekulák összes protonálódási makro- és mikroállandójának, az egyes mikrorészecskék egyedi lipofilitásának illetve a pajzsmirigyhormonok mikrorészecskéinek receptorhoz való kötődését jellemző Gibbs-féle szabadenergia értékek ismerete.

A protonálódási makroállandókat ^1H NMR-pH titrálással akartuk meghatározni. A pH torzítatlan meghatározására pH 3 alatt *in situ* pH indikátorok használatát terveztük. A mikroállandókat csökkentett protonálható csoporttal rendelkező származékvegyületek felhasználásával, kombinált spektroszkópai-deduktív módszerrel kívántuk meghatározni. A pajzsmirigyhormonok csoportspecifikus sav-bázis tulajdonságainak ismeretében vizsgáltuk, hogy az egyes funkciós csoportok bázicitása hogyan befolyásolhatja a pajzsmirigyhormonok bioszintézisét, felszívódását és fehérjékhez való kötődését.

A receptorkötődés vizsgálatára *in silico* modellezést terveztünk, ahol a pajzsmirigyhormonok összes protonáltsági mikrorészecskéjét pajzsmirigyhormon receptorokhoz dokkoltuk a Schrödinger program Glide moduljának segítségével. Evvel a módszerrel terveink szerint vizsgálni lehet, hogy az egyes csoportok ionizáltsági állapota hogyan befolyásolja a vegyületek receptoraffinitását.

A jódozott aminosavak egyes mikrorészecskéinek lipofilitását az intézetünkben a közelmúltban kidolgozott módszer alapján karboximetil- és O-metil-származékvegyületek felhasználásával, különböző pH-kon mért megoszlási hányadosok meghatározásával terveztük jellemezni. A kémiai módosítás hatása korrekciós faktor bevezetésével minimalizálható. A kísérletesen meghatározott részecske-specifikus megoszlási hányadosok ismertében terveink szerint a vegyületek membrántranszportja molekuláris szinten lesz magyarázható.

3. Módszerek

Minden mérést állandó hőmérsékleten ($t=25^{\circ}\text{C}$) végeztünk, az oldatok ionerősségét KCl hozzáadásával állítottuk be konstans értékre ($I=0,15\text{M}$).

^1H NMR-pH titrálás Az NMR méréseket 600 MHz-es Varian Unity spektrométeren végeztük. A titrálásokhoz egyes oldatok pH-ját savas és lúgos törzsoldatok megfelelő arányú elegyítésével állítottuk be. Az oldatok pH-ját Metrohm kombinált üvegelektóddal mértük, pH 3 alatt a pontos pH-t *in situ* indikátormolekulák – diklórecetsav és monoklórecetsav - kémiai eltolódásából számítottuk. Az oldatok 5% D_2O -t tartalmaztak, referencianyagnak DSS-t használtunk. A vízjelet kettős spin echo pulzussal nyomtuk el. A protonálódási egyensúlyok makroszkopikus kiértékeléséhez az OPIUM és a Microcal OriginPro 8.0 programokat használtuk.

UV-pH titrálás A Tyr, MIT és T3 fenolát mikroállandójának (k°) meghatározásra UV-pH titrálást alkalmaztunk. A titrálás során a színeképeket szobahőmérsékleten 0,5-1 nm lépésközzel vettük fel 200-

400 nm-es tartományban 1 cm úthosszú Aldrich kvarcküvetét használva egy Jasco V-550 típusú diódasoros spektrofotométeren. A kiértékelést azon a hullámhosszon végeztük, ahol az eltérő pH-jú oldatok spektrumán a legnagyobb abszorbancia változás volt megfigyelhető (~298 nm). Az UV-pH titrálási adatok kiértékeléséhez Statistica 6.0 programot használtunk.

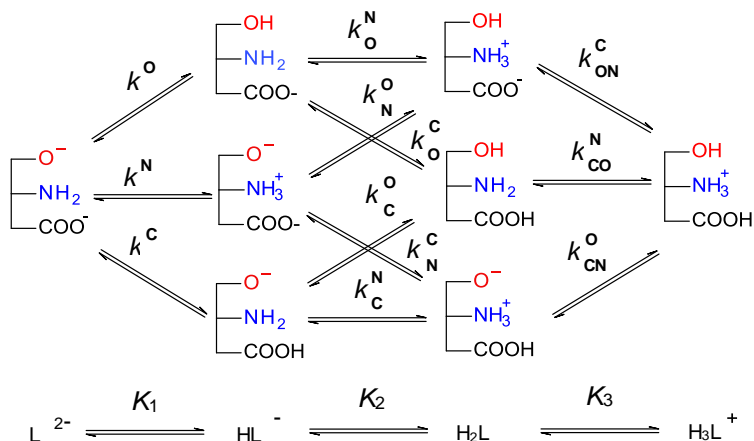
Megoszlási hányados meghatározása keverőedényes módszerrel A vizsgált anyavegyületek és egyes származékainak oktanol/víz látszólagos megoszlási hányadosát keverőedényes módszerrel határoztuk meg a megoszlás előtti és utáni mért abszorbanciák felhasználásával különböző fázisarányoknál. A megoszlási kísérlet előtt az oktanolos illetve a megfelelő pH-jú vizes fázisokat egymással telítettük legalább 3 órán át tartó intenzív kevertetéssel 25 °C-on, majd legalább 24 órás szételegyedési idő eltelte után használtuk az egymással telített fázisokat. A megfelelő fázisok koncentrációcsökkenését UV spektrofotometriás módszerrel követtük, 250 és 400 nm között a teljes UV spektrumot regisztráltuk.

In silico receptorkötődés vizsgálat A számítógépes modellezés során a pajzsmirigyhormonok összes mikrorészecskéjét flexibilisen dokkoltuk a pajzsmirigyhormon receptor (TR) mindkét izoformájához (TR α és TR β) a Schrödinger program Glide modulja segítségével XP (extra precíz) módban. A pajzsmirigyhormon receptor – ligand együtt kristályosított komplex szerkezeteket a Protein Data Bank adatbázisból (www.pdb.org) töltöttük le. A fehérjemolekulák geometriai optimalizálása esetén OPLS2005, míg a ligandumok esetén MMFF94s erőteret alkalmaztunk. A dokkolások kimeneteleként a legjobb három eredményt írtuk ki a Glide pontozási funkciójának megfelelően. Módszerünket ismert kötési affinitással rendelkező tireomimetikumokkal validáltuk.

4. Következtetések, új tudományos eredmények

1. A pajzsmirigyhormonok és előanyagaik mindegyike három báziscentrummal rendelkezik, ezek a fenolát-, az amino- és a karboxilátcsoport. A vegyületeink egyenként

3 makroállandóval és 12 mikroállandóval jellemezhetőek (2. ábra). Kombinált spektroszkópiai és deduktív módszerrel meghatároztuk a pajzsmirigyhormonok és előanyagaik összes protonálódási makro- és mikroállandóját.



2. ábra Vizsgált vegyületeink protonálódási makro-és mikroegyensúlyai. A fenolátcsoportot O⁻, az aminocsoportot NH₂, a karboxilátcsoportot COO⁻ jelöli.

2. A meghatározott mikroállandók ismeretében vizsgáltuk az eltérő jódozottsági mintázat hatását az egyes csoportok bázicitására. A jódozás az összes csoport

bázicitását csökkenti, legjobban a fenolátét. Azoknál a molekuláknál, ahol a fenolos hidroxilcsoporttól orto-helyzetben két jódatomtalálható a fenolát csoport bázicitása annyira lecsökken, hogy e molekulák (DIT, T4, rT3) a vér pH-ján anionos (O^- , NH_3^+ , COO^-) formában fordulnak elő, míg a MIT és T3 esetén ugyanezen a pH-n egy a fenoláton protonált forma (OH , NH_3^+ , COO^-) fog dominálni.

3. Tanulmányoztuk a pajzsmirigyhormonok előanyagainak protonáltsági állapotainak hatását a hormonok bioszintézisére. Megállapítottuk, hogy a pajzsmirigyhormonok bioszintézisének szabályozásában a fenolos hidroxilcsoport ionizáltsági állapota meghatározó. Az általunk meghatározott mikroállandók alapján a DIT-ban a fenolos hidroxilcsoport 93%-ban anionos formában fordul elő a vér pH-ján míg ez az érték a MIT esetén csak 14%. Amennyiben a fenolos hidroxilcsoport ionizációs állapota befolyásolja az előanyagok kondenzációját pajzsmirigyhormonná, a pajzsmirigyben a szintetizálódó hormonnak közel 90%-ban a két DIT összekapcsolódásával képződő T4-nek kell

lennie. Ez az eredmény jó összhangban áll élettani adatokkal, vagyis a bioszintetikus adatok értelmezhetővé váltak a részecske-specifikus bázicitásadatok ismeretében.

4. A pajzsmirigyhormonok receptorkötődésének az egyes csoportok ionizáltsági állapottól való függését *in silico* kötődésvizsgálattal végeztük, ahol a pajzsmirigyhormonok mikrorészecskéit receptoraihoz dokkoltuk. A receptoraffinitás értékek összhangban élettani adatokkal azt mutatták, hogy a T3 rendelkezik legmagasabb receptoraffinitással, mivel a receptorkötődéshez a T3-ban a legkedvezőbb a jódozottsági mintázat. Az aromás gyűrűrendszer 3, 5-ös helyzetű diszubsztitúciója szükséges a megfelelő illeszkedéshez a receptorzsebben, ellenben a 3', 5' diszubsztitúció meggátolja a hidrogénhíd kialakulását a ligandum fenolátcsoportja és a receptor hisztidinje között.

Dokkolási módszerünkkel vizsgálható, hogy az egyes csoportok ionizáltsági állapota hogyan befolyásolja a receptorkötődést. Megállapítottuk, hogy a pajzsmirigyhormonok alifás oldalláncának protonáltsági

állapota meghatározó a receptorkötődésben, a fenolos hidroxilcsoport ionizáltsági állapota kevésbé befolyásolja azt. Az alifás oldalláncon mind az amino-, mind a karboxilátcsoport protonálódása rontja a receptorkötődést, amelynek oka, hogy a receptorkötőzsebben az alifás oldallánc három arginin molekulával alakíthat ki kapcsolatot, amelynek guanidinium csoportja fiziológiás pH tartományban protonált állapotban van.

A mikrospeciációs és dokkolási eredményeink összevetéséből kiderül, hogy nem a vér pH-ján legnagyobb mértékben előforduló mikrorészecske kötődik legjobban a receptorhoz. Míg a pajzsmirigyhormonok bioszintézisében az előanyagok major protonáltsági állapotai a meghatározóak, addig a szerkezeti kontroll alatt álló receptorkötődésben egy minor mikrorészecske szerepe a meghatározó.

5. Meghatároztuk a jódozott aminosavak részecske-specifikus lipofilitását rokon szerkezetű molekulák megoszlási hányadosának felhasználásával. Az oktanol-víz megoszlási hányados jó prediktora a gyógyszerek membránon való áthaladásának. Eredményeink azt

mutatják, hogy a pajzsmirigyhormonok esetén a jódozott aromás gyűrűk alapvetően meghatározzák a vegyületek lipofilitását, míg alifás lánc protonálódási állapota kevésbé befolyásolja ezt a paramétert, ellentétben az előanyagokkal, ahol a molekulákban kisebb lipofil rész található. Vizsgált vegyületeink esetén a vegyületek bruttó lipofilitásához a vér pH-ján nem töltésmentes, hanem egy ikerionos mikrorészecske (OH^- , NH_3^+ , COO^-) hozzájárulása a legnagyobb. Ez azt jelenti, hogy a konvencionálisan elfogadott nézettel szemben a pajzsmirigyhormonok esetén vizes fázisból a lipofil fázisba az ikerionos forma juttatja át a molekulát, mivel a töltésmentes mikrorészecske koncentrációja nagyobb mértékben kisebb, mint amennyire az egyedi lipofilitása nagyobb. A pajzsmirigyhormonok ikerionos mikrorészecskéje amfifil tulajdonságú, a lipofil aromás rész és a hidrofil alifás lánc miatt. Ez a tulajdonság jól magyarázza azt a biológiai megfigyelést, hogy a pajzsmirigyhormonok annak ellenére, hogy magas $\log P$ értékekkel rendelkeznek, aktív transzporttal jutnak át membránokon, mivel ugyan könnyen bejutnak a membránokba, de át már nem képesek jutni.

5. Összefoglalás

Doktori munkámban a pajzsmirigyhormonok (tiroxin, liotironin, reverz liotironin) és előanyagaik (tirozin, monojódtirozin, dijódtirozin) részecske-specifikus bázicitásának, lipofilitásának és receptoraффinitásának meghatározását, és az így nyert adatokból levonható biológiai következtetéseket foglaltam össze.

A vegyületek protonálódási makroállandóit ^1H NMR-pH titrálással, míg a mikroállandókat csökkentett protonálható csoporttal rendelkező származékvegyületek felhasználásával, kombinált spektroszkópai-deduktív módszerrel határoztuk meg. A kapott mikroállandók azt mutatták, hogy az eltérő számú és/vagy helyzetű jódatom a molekulákban leginkább a fenolát csoport bázicitását befolyásolja. A fenolát csoport eltérő ionizációs állapotai jelentős szerepet játszanak a pajzsmirigyhormonok bioszintézisében és fehérjékhez való kötődésében. A báziscentrumok protonálódási állapotának szerepét a receptorkötődésben *in silico* dokkolással tisztáztuk. A pajzsmirigyhormonok összes mikrorészecskéjét pajzsmirigyhormon-receptorokhoz dokkoltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a ligand és a receptor

közötti kölcsönhatás kialakításában az aminosav oldallánc protonáltsági állapota meghatározó, továbbá megállapítható, hogy nem a vér pH-ján legnagyobb valószínűséggel előforduló mikrorészecske kötődési affinitása a legjobb.

Az egyes mikrorészecskék lipofilitását karboximetil- és *O*-metil-származékvegyületek felhasználásával, különböző pH-kon mért megoszlási hányadosok meghatározásával végeztük. A kémiai módosítás hatását korrekciós faktor bevezetésével minimalizáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a pajzsmirigyhormonok lipofilitásában a döntő szerkezeti elem a jódozott aromás gyűrűrendszer, az alifás rész protonálódása csekély hatással bír a vegyületek megoszlási hányadosára. A vegyületek részecske-specifikus lipofilitásával a vegyületek membrántranszportja molekuláris szinten vált magyarázhatóvá. Fiziológias pH-n a pajzsmirigyhormonok amfifil tulajdonságúak a lipofil aromás gyűrű és a hidofil aminosav oldallánc miatt, ami azt eredményezi, hogy a molekulák csak szállítófehérje segítségével képesek átjutni a membránokon.

A vegyületek részecske-specifikus fizikai-kémiai állandóinak ismerete szükséges a pajzsmirigyhormonok (pato)fiziológiás viselkedésének molekuláris szinten való megértéséhez és gyógyászati befolyásoláshoz.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező közlemények:

Tóth G, Hosztafi S, Kovács Zs, Noszál B (2012) The site-specific basicity of thyroid hormones and their precursors as regulators of their biological functions. *J Pharm Biomed Anal* 61:156-164.

Mazák K, **Tóth G**, Kökösi J, Noszál B (2012) Thyroxine lipophilicity is dominated by its zwitterionic microspecies. *Eur J Pharm Sci* 47:921-925.

Tóth G, Mazák K, Hosztafi S, Kökösi J, Noszál B (2013) Species-specific lipophilicity of thyroid hormones and their precursors in view of their membrane transport properties. *J Pharm Biomed Anal* 76: 112-118.

Tóth G, Baska F, Schretner A, Rácz A, Noszál B (2013) The site-specific basicity of thyroid hormones as

regulators of their receptor binding: in silico investigation. Eur Biophys J 42: 721-730

Tóth G, Noszál B (2013) Thyroid hormones and their precursors I. Biochemical properties. Acta Pharm Hung 83: 35-45

Más témához kapcsolódó közlemények

Rusu A, **Tóth G**, Szócs L, Kökösi J, Kraszni M, Gyéresi Á, Noszál B (2012) Triprotic site-specific acid-base equilibria and related properties of fluoroquinolone antibacterials. J Pharm Biomed Anal 66: 50-57

Neumayer G, Sohajda T, Darcsi A, **Tóth G**, Sente L, Noszál B, Béni Sz (2012) Chiral recognition of dapoxetine enantiomers with methylated-gamma-cyclodextrin: A validated capillary electrophoresis method, J Pharm Biomed Anal 62: 42-47

Béni Sz, **Tóth G**, Noszál B, Hosztafi S (2012) Preparation of benzoate esters of morphine and its derivatives. Monatsh Chem 143: 1431-1440

Tóth G, Mohácsi R, Rác Á, Rusu A, Horváth P, Sente L, Béni Sz, Noszál B (2014) Equilibrium and structural characterization of ofloxacin-cyclodextrin complexation. J Incl Phenom Macro 77: 291-300.

Boldizsár I, Kraszni M., Tóth F, **Tóth G**, Sólyomváry A, Noszál B, Zárar Gy, Molnár-Perl I (2012) The role of harmonized, gas and liquid chromatography mass spectrometry in the discovery of the neolignan balanophonin: present separately in the fruit wall of *Cirsium vulgare*, *J Chrom A* 1264: 143-147

Váradí A, Horváth P, Kurtán T, Mándi A, **Tóth G**, Gergely A, Kökösi J (2012) Synthesis and configurational assignment of 1,2-dihydroimidazo[5,1-b]quinazoline-3,9-diones: novel NMDA receptor antagonists, *Tetrahedron* 68: 10365-10371

Váradí A, Lévai D, **Tóth G**, Horváth P, Noszál B, Hosztafi S (2013) Glucosides of morphine derivatives: synthesis and characterization. *Monatsh Chem* 144: 255-262

Váradí A, Hosztafi S, Rouzic LV, **Tóth G**, Urai Á, Noszál B, Pasternak WG, Grinnell GS, Majumdar S (2013) Novel 6 β -acylamino-morphinans with analgesic activity *Eur J Med Chem* 69C: 786-789

Rusu A, Hancu G, Völgyi G, **Tóth G**, Noszál B, Gyéresi Á (2013) Separation and determination of quinolone

antibacterials by capillary electrophoresis J Chrom Sci in press DOI: 10.1093/chromsci/bmt10

Riethmüller E, Alberti Á, **Tóth G**, Béni Sz, Ortolano F, Kéry Á (2013) Characterisation of diarylheptanoid-and flavonoid-type phenolics in *Corylus avellana* L. leaves and bark by HPLC/DAD–ESI/MS Phytochem Anal 24: 493-503

Neumajer G, **Tóth G**, Béni Sz, Noszál B (2013) Novel ion-binding C3 symmetric tripodal triazoles: synthesis and characterization, Cent Eur J Chem 12: 115-125

Szabó B, Kállai N, **Tóth G**, Hetényi G, Zelkó R (2013) Correlation between the changes of the free volume and the drug release characteristics of cast and freeze dried buccal films, J Pharm Biomed Anal 89C: 83-87