

TIOL-DISZULFID SAV-BÁZIS ÉS REDOXI EGYENSÚLYOK JELLEMZÉSE RÉSZECSKE-SPECIFIKUS PARAMÉTEREKKEL

PhD értekezés

Mirzahosseini Arash

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Noszál Béla, DSc

Hivatalos bírálók:

Ősz Katalin, PhD

Balog Erika, PhD

A Bírálóbizottság elnöke:

Gyires Klára, DSc

A Bírálóbizottság tagjai:

Németh György, PhD

Budai Lívია, PhD

Budapest, 2017

BEVEZETÉS

Az élőlények a természetes anyagcseréjük során reaktív oxigénszármazékokat termelnek. A sejten belüli redoxi egyensúlyt az antioxidáns rendszerek oxidoreduktáz enzimeik és koenzimeik tartják fenn. A biokémiai folyamatokban szereplő redoxi folyamatok, bár szerteágazó és bonyolult rendszereket alkotnak, alapvetően egy vagy két elektronátmenettel járó elemi reakciókból épülnek fel, melyek nagyrészt tiol-diszulfid cserereakciók.

A mindenütt jelenlévő sejten belüli antioxidáns, a glutation (γ -L-glutamil-L-ciszteinilglicin, GSH), védi a sejtstruktúrákat a reaktív oxigénszármazékok káros hatásaitól, melyek neurodegenerációhoz, szív- és érrendszeri betegségekhez és daganatos betegségekhez vezethetnek. Az oxidatív stressz mélyebb megértéséhez és befolyásolásához mindenképp szükség van a tiol-diszulfid egyensúlyok részletes elemzésére és felderítésére.

A tiol-diszulfid folyamatok meghatározó jellemzője, hogy csak a deprotonált tiolát részecske vesz részt a redoxi folyamatban, vagyis a tiolát anion oxidálódik diszulfiddá. Mivel a tiol disszociációja révén a tiolát-hányad pH-függő, így a tiol-diszulfid rendszerek látszólagos redoxi potenciálja is pH-függő lesz. Az összefüggő sav-bázis és redoxi folyamatok tovább bonyolódnak azáltal, hogy biomolekulákban általában több báziscentrum párhuzamosan protonálódik. Tehát makroszkopikus fizikai-kémiai paraméterek nem tudják egzaktul jellemezni a tiolát csoportot. A rendszerek tiolát-specifikus jellemzése részecske-specifikus vagy ún. mikroszkopikus paraméterekkel lehetséges.

A GSH redoxi potenciáljának meghatározására, még csak látszólagos szinten is, csak közvetve lehetséges egy ismert redoxi rendszer segítségével. Mivel a redoxi és sav-bázis folyamatok egymástól elválaszthatatlanok, a közvetett módon mért látszólagos

redoxi potenciál pH-függő. A redoxi potenciál és a sav-bázis folyamatok szétválasztása egy továbbfejlesztett módszerrel lehetséges, amely a részecske-specifikus redoxi egyensúlyi állandó fogalmát vezeti be.

CÉLKITŰZÉSEK

A doktori értekezés célkitűzései a következők:

- biológiailag fontos tiolok (ciszteamin, cisztein, homocisztein, penicillamin, glutation, ovotiol, dihidroliponsav) valamint diszulfidjaik részecske-specifikus protonálódási állandóinak meghatározása;
- glutationnal szemben mért tiol-diszulfid cserereakciók részecske-specifikus redoxi egyensúlyi állandóinak meghatározása;
- a glutationra vonatkozó redoxi potenciál meghatározása egy összehasonlító redoxi rendszer (1-metilnikotinamid) segítségével;
- a biológiailag fontos tiolokra vonatkozó részecske-specifikus (standard) redoxi potenciál értékek meghatározása.

MÓDSZEREK

A mérések során használt vegyszerek nagy része forgalomban elérhető, azonban néhány vegyületet újonnan kidolgozott vagy létező előírások alapján szintetizáltam meg. A mérésekhez az alábbi módszerek és műszerek lettek felhasználva:

Az NMR spektrumokat Varian 600 MHz spektrométerrel rögzítettem.

A pH-potenciometriás titrálásokat Metrohm 6.0204.100 kombinált pH üvegelektóddal felszerelt 716 DMS Titrino automatikus titrátor segítségével végeztem el.

Az UV spektroszkópiás méréseket Jasco V-550 UV/VIS spektrofotométer segítségével végeztem el.

Az elektrokémiai méréseket egy Radeklis OP-6123 redoxi elektród segítségével végeztem el.

A szintetizált vegyületek pontos tömegének meghatározásához a TOF MS mérések egy pozitív ion módban levő JetStream electrospray ionforrással felszerelt Agilent 6230 time-of-flight tömegspektrométer segítségével lettek elvégezve.

EREDMÉNYEK

A részecske-specifikus protonálódási állandók meghatározása minden vegyület esetén egy vegyületre szabott deduktív módszer segítségével történt. A deduktív módszer megtervezése a legegyszerűbb biogén tiol segítségével kerül bemutatásra. A ciszteamin makroszkopikus protonálódási állandóinak (1. Táblázat) meghatározásához fiziológiás-közeli körülmények között titráltam a ciszteamint, a ^1H NMR jelek kémiai eltolódásainak pH-profiljának rögzítésével. A makroszkopikus és mikroszkopikus protonálódási állandók közt fennálló összefüggések a következők:

$$(1) K_1 = k^{\text{N}} + k^{\text{S}}$$

$$(2) \beta_2 = K_1 K_2 = k^{\text{N}} k_{\text{N}}^{\text{S}} = k^{\text{S}} k_{\text{S}}^{\text{N}}$$

A ciszteamin tiolát és amino báziscentrumokkal rendelkezik, így a protonálódását két első lépcsős mikroállandó (k^{N} , k^{S} – amikor az amino vagy tiolát protonálódik és a szomszédos csoport még protonátlan) és két második lépcsős mikroállandó (k_{S}^{N} , k_{N}^{S} – amikor az amino vagy tiolát protonálódik és a szomszédos csoport már protonált) jellemzi. Tehát a makroszkopikus protonálódási állandókon kívül a ciszteamin összes mikroszkopikus protonálódási állandóknak meghatározásához egy további független adatra szükség van. A deduktív módszer szerint az egyik minor protonálódási mikrorészecske modellezhető egy megfelelő származékvegyület által, mely ez esetben az *S*-metilciszteamin, amely a ciszteamin tioláton protonált formáját modellezi. Az *S*-metilciszteamin protonálódási állandója megegyezőnek tekinthető a ciszteamin k_{S}^{N}

mikroállandójával (1. Táblázat). A fennmaradó mikroállandók az (1) és (2) egyenletek segítségével kerültek meghatározásra (1. Táblázat). A mikroszkopikus protonálódási állandók megadják továbbá a báziscentrumok közti kölcsönhatási tényezőt:

$$(3) \log \Delta E_{N/S} = \log k^N - \log k_S^N = \log k^S - \log k_N^S$$

A kölcsönhatási tényező megmutatja egy báziscentrum protonálódásának egy szomszédos báziscentrumra gyakorolt bázicitáscsökkentő hatását. A kölcsönhatási tényezőt tekintik a legmegbízhatóbb és legállandóbb tényezőnek azonos kovalens távolságban levő báziscentrumok között, egyéb csoportok protonáltsági állapotától függetlenül, akár különböző vegyületekben.

1. Táblázat A ciszteamin és cisztamin protonálódási állandói és kölcsönhatási tényezői logaritmus egységben \pm szórás (298 K, 0,15 mol/L ionerősség).

| Ciszteamin | | Cisztamin | |
|---------------------------------------|------------------|------------------------|-----------------|
| Makroszkopikus protonálódási állandók | | | |
| Ciszteamin | | Cisztamin | |
| $\log K_1$ | 10,88 \pm 0,01 | $\log K_1$ | 9,61 \pm 0,02 |
| $\log K_2$ | 8,34 \pm 0,01 | $\log K_2$ | 8,76 \pm 0,02 |
| <i>S</i> -Metilciszteamin | | | |
| $\log K$ | 9,55 \pm 0,01 | | |
| Mikroszkopikus protonálódási állandók | | | |
| $\log k^N$ | 10,85 \pm 0,01 | $\log k^N$ | 9,31 \pm 0,02 |
| $\log k^S$ | 9,67 \pm 0,01 | $\log k_N^{N'}$ | 9,06 \pm 0,02 |
| $\log k_N^S$ | 8,37 \pm 0,01 | | |
| $\log k_S^N$ | 9,55 \pm 0,01 | | |
| Kölcsönhatási tényezők | | | |
| $\log \Delta E_{N/S}$ | 1,30 \pm 0,01 | $\log \Delta E_{N/N'}$ | 0,25 \pm 0,03 |

A ciszteamin homodiszulfidja, a cisztamin egy szimmetrikus vegyület két aminos csoporttal, N és N' jelölésekkel. A szimmetria és a megegyező inherens bázicitások miatt az alábbi összefüggéseket írhatjuk fel:

$$(4) \quad k^N = k^{N'}$$

$$(5) \quad k_{N'}^N = k_N^{N'}$$

Fenti összefüggések leegyszerűsítik a makroszkopikus és mikroszkopikus protonálódási állandók közt fennálló összefüggéseket:

$$(6) \log k^N = \log K_1 - \log 2$$

$$(7) \log k_N' = \log K_2 + \log 2$$

A cisztamin ^1H NMR-pH titrálásokból származó makroszkopikus protonálódási állandók és ezekből meghatározott mikroszkopikus protonálódási állandók valamint kölcsönhatási tényező az 1. Táblázatban található. A fent bemutatott deduktív módszer némi átalakításokkal alkalmas volt további biogén tiolok (cisztein, homocisztein, penicillamin, glutation, ovotiol, dihidroliponsav) és homodiszulfidjaik teljes mikrospeciációjának meghatározására.

A részecske-specifikus protonálódási állandók meghatározása után a redoxi potenciál értékeket az alábbi módszer segítségével határoztam meg. A tiol-diszulfid egyensúlyoknak csak a látszólagos egyensúlyi állandója (K_{3C}) figyelhető meg a különböző reagensek és termékek (egy tetszőleges tiol glutationnal szemben mért tiol-diszulfid reakciója esetén: RSH, GSSG, RSSR, GSH) egyensúlyi koncentrációinak meghatározásával. A glutationnal szemben mért tiol-diszulfid folyamatok látszólagos redoxi egyensúlyi állandó értékei a 2. Táblázatban található.

2. Táblázat A ciszteamin-, cisztein-, homocisztein-, penicillamin-, valamint ovotiol-glutacion rendszerek redoxi egyensúlyi állandó értékei. Az pH és egyensúlyi állandó értékek hibája 0,01-0,02 valamint 0,002-0,004 között van.

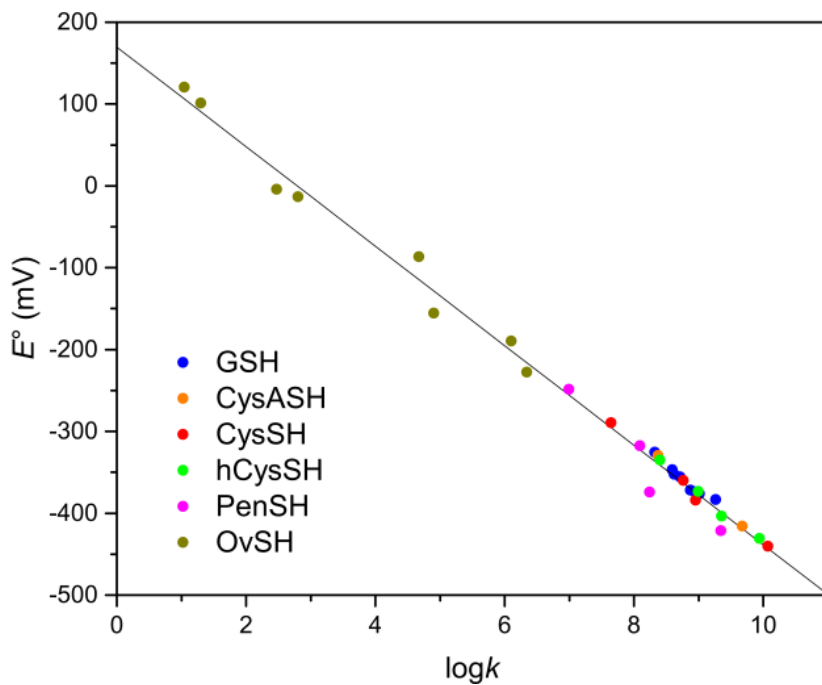
| Ciszteamin | | Cisztein | | Homocisztein | | Penicillamin | | Ovotiol | |
|------------|---------------|----------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------|---------------|
| pH | $\log K_{3C}$ | pH | $\log K_{3C}$ | pH | $\log K_{3C}$ | pH | $\log K_{3C}$ | pH | $\log K_{3C}$ |
| 0,99 | -0,154 | 0,86 | 0,028 | 0,91 | 0,099 | 0,84 | -0,155 | 0,85 | -0,850 |
| 1,31 | -0,097 | 1,25 | 0,078 | 1,22 | 0,137 | 1,26 | -0,119 | 1,24 | -1,402 |
| 1,59 | -0,071 | 1,54 | 0,113 | 1,54 | 0,203 | 1,52 | -0,056 | 1,78 | -2,444 |
| 1,83 | -0,097 | 1,81 | 0,176 | 1,81 | 0,263 | 1,85 | -0,027 | 2,43 | -2,924 |
| 2,62 | -0,222 | 2,61 | 0,197 | 2,61 | 0,335 | 2,31 | -0,009 | 3,02 | -3,889 |
| 2,93 | -0,252 | 2,89 | 0,146 | 2,89 | 0,323 | 2,91 | -0,086 | 4,11 | -5,278 |
| 3,17 | -0,260 | 3,20 | 0,122 | 3,20 | 0,288 | 3,25 | -0,137 | 5,09 | -5,793 |
| 3,95 | -0,328 | 3,40 | 0,116 | 3,40 | 0,174 | 3,41 | -0,237 | 5,61 | -6,124 |
| 5,43 | -0,319 | 5,60 | -0,273 | 5,62 | -0,051 | 5,54 | -0,310 | 6,28 | -5,875 |
| 6,55 | -0,251 | 6,42 | -0,230 | 6,37 | -0,056 | 6,40 | -0,328 | 7,21 | -6,267 |
| 7,87 | -0,495 | 7,67 | -0,204 | 7,60 | -0,092 | 7,67 | -0,456 | 8,08 | -5,851 |
| 7,92 | -0,509 | 8,83 | 0,105 | 8,83 | -0,048 | 8,88 | -1,046 | 9,20 | -5,412 |
| 9,62 | -1,347 | 9,67 | 0,601 | 9,67 | 0,280 | 9,67 | -0,745 | 9,42 | -5,050 |
| 10,20 | -0,523 | 9,98 | 0,779 | 9,98 | 0,693 | 9,90 | -0,699 | 10,28 | -4,611 |
| 10,60 | 0,021 | 10,44 | 1,244 | 10,44 | 1,003 | 10,44 | -1,398 | 11,34 | -3,972 |
| 11,44 | 0,701 | 11,86 | 1,668 | 11,86 | 1,443 | 11,88 | 0,161 | 11,95 | -3,878 |

A részecske-specifikus redoxi egyensúlyi állandók a látszólagosakból lettek meghatározva a protonálódási mikrorészecskék előfordulási valószínűségeinek segítségével. A protonálódási mikrorészecskék előfordulási aránya a részecske-specifikus protonálódási állandók függvénye. A GSSG/GSH redoxi rendszer standard redoxi potenciál értéke indirekt módon lett meghatározva egy ismert redoxi rendszerrel való összehasonlítás révén. E célból a legegyszerűbb nikotinamid analógot, 1-metilnikotinamid (MNA^+ , oxidált forma) és 1-metildihidronikotinamid (MNAH, redukált forma), kiválasztottam. A glutation részecske-specifikus, standard,

redoxi potenciál értékét a GSSG és MNAH közti részecske-specifikus redoxi egyensúlyi állandó és Nernst egyenlet segítségével határoztam meg. A többi vizsgált tiol redoxi potenciál értékének meghatározására a GSSG/GSH redoxi rendszerrel összehasonlítva, a korábban meghatározott részecske-specifikus egyensúlyi állandók segítségével volt lehetséges.

3. Táblázat Tiol-diszulfid rendszerek részecske-specifikus redoxi potenciál értékei. A redoxi potenciál értékek hibaértéke 5-10 mV között van.

| Mikrorészecske | log <i>k</i> | <i>E</i> ^o (mV) | Mikrorészecske | log <i>k</i> | <i>E</i> ^o (mV) | | |
|----------------|--------------|----------------------------|----------------|--------------|----------------------------|------|------|
| GSH | A | 9,26 | -383 | a | 9,94 | -431 | |
| | B | 8,94 | -374 | hCysSH b | 8,99 | -373 | |
| | D | 8,87 | -372 | d | 9,35 | -403 | |
| | E | 9,01 | -376 | f | 8,4 | -335 | |
| | G | 8,59 | -346 | PenSH | a | 9,34 | -421 |
| | H | 8,71 | -355 | | b | 8,09 | -317 |
| | K | 8,62 | -352 | | d | 8,24 | -374 |
| | N | 8,32 | -325 | | f | 6,99 | -248 |
| CysASH | a | 9,67 | -416 | A | 6,34 | -227 | |
| | b | 8,37 | -329 | B | 2,8 | -13 | |
| CysSH | a | 10,07 | -440 | C | 4,9 | -155 | |
| | b | 8,76 | -360 | OvSH D | 6,1 | -189 | |
| | d | 8,95 | -384 | F | 1,3 | 101 | |
| | f | 7,64 | -289 | G | 2,47 | -4 | |
| | | | | I | 4,67 | -87 | |
| | | | L | 1,04 | 121 | | |



1. Ábra A részecske-specifikus redoxi potenciál értékek és részecske-specifikus tiolát protonálódási állandók között felállított egyenes arányosság.

KÖVETKEZTETÉSEK

A glutation és biogén tiolok közti pH-függő valamint részecske-specifikus redoxi egyensúlyi állandók kerültek meghatározásra. A részecske-specifikus redoxi egyensúlyi állandókat elsőként írtuk le tiol-diszulfid cserereakciók jellemzéséhez; e fizikai-kémiai paraméterek mikroszkopikus szinten jellemzik a tiol-diszulfid redoxi reakciókat. A részecske-specifikus egyensúlyi állandó értékek megbízható alapul szolgálnak a tiolát részecskék oxidábilitásának előrejelzéséhez, amely az egyik kulcs tényező az oxidatív stressz megismeréséhez és befolyásolásához. A meghatározott standard redoxi potenciál értékek jó korrelációt mutatnak a tiolát bázicitás értékekkel. Egy eredményes antioxidáns terápia kényes feladata az antioxidáns vegyület szelektivitásában rejlik: reaktív oxigén származékok semlegesítését úgy kell véghez vinni, hogy közben biológiailag fontos diszulfidok érintetlenül maradjanak. Az egyik akadályt egy hatásos antioxidáns tervezésében eddig a fehérjék diszulfid hídjai redoxi potenciáljának meghatározása jelentette. A redoxi és sav-bázis tulajdonságok közti összefüggés erős kiindulópontot jelenthet a diszulfid hidak reducibilitásának előrejelzésében és szelektív antioxidáns vegyületek tervezésében.

PUBLIKÁCIÓK

A doktori értekezés témájában megjelent közlemények

1. **Mirzahosseini A**, Orgován G, Hosztafi S, Noszál B. (2014) The complete microspeciation of ovoidiol A, the smallest octafarious antioxidant biomolecule. *Anal Bioanal Chem*, 406: 2377-2387.
2. **Mirzahosseini A**, Noszál B. (2014) The species- and species-specific acid-base properties of biological thiols and their homodisulfides. *J Pharm Biomed Anal*, 95: 184-192.
3. **Mirzahosseini A**, Szilvay A, Noszál B. (2014) The species- and species-specific acid-base properties of penicillamine and its homodisulfide. *Chem Phys Lett*, 610-611: 62-69.
4. **Mirzahosseini A**, Hosztafi S, Tóth G, Noszál B. (2014) A cost-effective synthesis of enantiopure ovoidiol A from L-histidine, its natural precursor. *Arkivoc*, 6: 1-9.
5. **Mirzahosseini A**, Orgován G, Tóth G, Hosztafi S, Noszál B. (2015) The complete microspeciation of ovoidiol A disulfide: a hexabasic symmetric biomolecule. *J Pharm Biomed Anal*, 107C: 209-216.
6. **Mirzahosseini A**, Somlyay M, Noszál B. (2015) The comprehensive acid-base characterization of glutathione. *Chem Phys Lett*, 622: 50-56.
7. **Mirzahosseini A**, Somlyay M, Noszál B. (2015) Species-specific thiol-disulfide equilibrium constants: a tool to characterize redox transitions of biological importance. *J Phys Chem B*, 119: 10191-10197.

8. **Mirzahosseini A**, Noszál B. (2016) Species-specific thiol-disulfide equilibrium constants of othiol A and penicillamine with glutathione. RSC Advances, 6: 26757-26764.
9. **Mirzahosseini A**, Szilvay A, Noszál B. (2016) Physico-chemical profiling of α -lipoic acid and related compounds. Chem Biodivers, 13: 861-869.
10. **Mirzahosseini A**, Noszál B. (2016) Species-specific standard redox potential of thiol-disulfide systems: a key parameter to develop agents against oxidative stress. Scientific Reports, 6: 37596.

Egyéb témákban megjelent közlemények

1. **Mirzahosseini A**, Dalmadi B, Csutora P. (2013) Histamine receptor H4 regulates mast cell degranulation and IgE induced Fc ϵ RI upregulation in murine bone marrow-derived mast cells. Cell Immunol, 283: 38-44.
2. **Mirzahosseini A**, Kovács M, Kánai K, Csutora P, Dalmadi B. (2014) BODIPY® FL histamine as a new modality for quantitative detection of histamine receptor upregulation upon IgE sensitization in murine bone marrow-derived mast cells. Cytometry Part A, 87: 23-31.
3. Fiedler GB, Meyerspeer M, Schmid AI, Goluch S, Schewzow K, Laister E, **Mirzahosseini A**, Niess F, Unger E, Woltz M, Moser E. (2015) Localized semi-LASER dynamic 31P magnetic resonance spectroscopy of the soleus during and following exercise at 7 T. Magn Reson Mater Phy, 28: 493-501.
4. Budai KA, **Mirzahosseini A**, Noszál B, Tóth G. (2015) Az elhízás gyógyszeres kezelése – The pharmacotherapy of obesity. Acta Pharm Hung, 85: 3-17.
5. Fiedler GB, Schmid AI, Goluch S, Schewzow K, Laister E, Niess F, Unger E, Woltz M, **Mirzahosseini A**, Kemp GJ, Moser E, Meyerspeer M. (2016)

Skeletal muscle ATP synthesis and cellular H⁺ handling measured by localized ³¹P-MRS during exercise and recovery. Scientific Reports, 6:32037.