

Biomolekulák szelenol-diszelenid egyensúlyainak jellemzése részecskespecifikus paraméterekkel

Doktori értekezés

Dr. Pála Tamás

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla, DSc., egyetemi tanár
Konzulens: Dr. Mirzahosseini Arash, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Hivatalos bírálók: Dr. Ambrus Attila, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Ósz Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár
Tagok: Dr. Béni Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szakács Zoltán, Ph.D., senior kutató-fejlesztő

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	6
1.1. Redoxi homeosztázis és az oxidatív stressz	6
1.2. Tiol-diszulfid és szelenol-diszelenid rendszerek.....	7
1.2.1. Tiol-diszulfid rendszerek jellemzése	7
1.2.2. Szelenol és diszelenid vegyületek biológiai jelentősége	8
1.3. Sav-bázis egyensúlyok makro- és mikroszkopikus jellemzése	10
1.3.1. Protonálódási folyamatok makroszkopikus szintű leírása és vizsgálata	10
1.3.2. Protonálódási folyamatok mikroszkopikus szintű leírása és vizsgálata	11
1.4. Részecskespecifikus redoxi egyensúlyok.....	16
1.5. ⁷⁷ Se NMR spektroszkópia	20
1.5.1. Kémiai eltolódás referenciák	21
1.5.2. ⁷⁷ Se NMR spektroszkópiában alkalmazott szeléntartalmú referenciaanyagok.....	22
2. Célkitűzések.....	24
3. Módszerek.....	25
3.1. A kísérletes munka során felhasznált anyagok.....	25
3.1.1. Szelenol és diszelenid vegyületek.....	25
3.1.2. ¹ H NMR-pH indikátormolekulák.....	25
3.1.3. Előállított modellvegyületek.....	25
3.1.4. Vizsgált ⁷⁷ Se NMR kémiai eltolódás referenciamolekulák	26
3.2. NMR spektroszkópiás mérések	26
3.2.1. NMR-pH titrálások	26
3.2.2. Kvantitatív ¹ H NMR spektrumok felvétele	27

3.2.3.	Referenciamolekulák vizsgálata során alkalmazott mérési paraméterek..	27
3.3.	Kiértékelés	28
3.3.1.	NMR-pH titrálások kiértékelése	28
3.3.2.	Kvantitatív ^1H NMR spektrumok kiértékelése	29
4.	Eredmények	30
4.1.	A szelenocisztein és a szelenocisztin protonálódási állandói.....	30
4.1.1.	Makroszkopikus protonálódási állandók meghatározása.....	30
4.1.2.	A szelenocisztein mikroszkopikus protonálódási állandóinak meghatározása	32
4.1.3.	A szelenocisztin protonálódási mikroállandóinak meghatározása	34
4.2.	A szelenociszteamin és a szelenocisztamin protonálódási állandói	36
4.2.1.	Makroszkopikus protonálódási állandók meghatározása.....	36
4.2.2.	Mikroszkopikus protonálódási állandók meghatározása	37
4.3.	Szelenol-diszelenid egyensúlyi rendszerek részecskespecifikus ^1H , ^{13}C és ^{77}Se NMR kémiai eltolódása	38
4.4.	Szelenol-diszelenid egyensúlyi rendszerek redoxi paramétereinek meghatározása	44
4.4.1.	Részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandók meghatározása.....	44
4.4.2.	Részecskespecifikus standard redoxipotenciál meghatározása	46
4.5.	A szelenát-ionok ^{77}Se NMR kémiai eltolódásának vizsgálata	48
4.5.1.	Előzetes ^{77}Se NMR-pH titrálások	48
4.5.2.	A szelénsav ^{77}Se NMR-pH titrálása.....	49
4.5.3.	Az oldószer, a koncentráció és az ionerősség hatása.....	50
4.5.4.	Hőmérséklet-függés és eltarthatóság	52
4.5.5.	Reaktivitás	53

4.5.6. A szelenát mint vizes közegben alkalmazható belső kémiai eltolódás referencia	54
5. Megbeszélés.....	57
5.1. Szelenol-diszelenid egyensúlyok sav-bázis tulajdonságai	57
5.2. Szelenol-diszelenid egyensúlyok redoxi tulajdonságai	59
5.3. Vizes közegű ⁷⁷ Se NMR vizsgálatokban alkalmazható belső kémiai eltolódás referencia.....	62
6. Következtetések	63
7. Összefoglalás	64
8. Summary	65
9. Irodalomjegyzék	66
10. Saját publikációk jegyzéke	75
10.1. Az értekezés alapját képező közlemények	75
10.2. Más témákhoz kapcsolódó közlemények	75
11. Köszönetnyilvánítás	76

Rövidítések jegyzéke

CysASeH	szelenociszteamin
CysASeSeCysA	szelenocisztamin
CysSeH	szelenocisztein
CysSeSeCys	szelenocisztin
DSS	nátrium-3-(trimetilszilil)-1-propánszulfonát
DTT	ditiotreitól
DTT _{ox.}	oxidált ditiotreitól
GSH	glutation
GSSG	glutation-diszulfid
IUPAC	Nemzetközi Tiszta és Alkalmazott Kémiai Szövetség
NMR	mágneses magrezonancia
ROS	reaktív oxigén származékok
RSeH	szelenol
RSeSeR	diszelenid
RSH	tiol
RSSR	diszulfid
TMS	tetrametilszilil
ΔE	kölcsönhatási tényező

1. Bevezetés

1.1. Redoxi homeosztázis és az oxidatív stressz

A reaktív oxigén származékok (ROS: pl. szuperoxid anion, hidroxilgyök, nitrogén-monoxid, hidrogén-peroxid) az élő szervezetek természetes biokémiai folyamataiban termelődnek, az egészséges emberben is előfordulnak. Számos funkciójuk közül kiemelendő a jelátviteli útvonalakban, az immunválaszban, a sejtosztódásban és a programozott sejthalálban betöltött szerepük [1-3]. Az élő szervezetek által fenntartott dinamikus egyensúly az oxidatív szabadgyökök és az antioxidáns anyagok mennyiségére is kiterjed, ezt redoxi homeosztázisnak nevezzük. Ha az egyensúly a ROS javára billen el, oxidatív stressz jön létre. A szervezet erre reagálva antioxidánsok segítségével igyekszik csökkenteni a ROS mennyiségét a homeosztázis helyreállításának érdekében. Minél tovább áll fenn az oxidatív stressz állapota, annál súlyosabb következményekkel kell számolnunk, úgymint DNS károsodás, lipid-oxidáció, fehérje károsodás, melyek később jól ismert kórképek kialakulásához vezetnek. Az oxidatív stressz patogén szerepét számos betegség – daganatos megbetegedések, neurodegeneratív kórképek (szklerózis multiplex, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, amiotrófiás laterálszklerózis), kardiovaszkuláris betegségek (ateroszklerózis, kardiális iszkémia, reperfüziós ártalom), pulmonáris kórképek (cisztás fibrózis) stb. – kialakulásában bizonyították [1, 2, 4-6]. A redoxi homeosztázis fenntartásáért a szervezetben számos enzimátikus (kataláz, glutation-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz, glutaredoxin, tioredoxin) és nem enzimátikus (C-vitamin, E-vitamin, glutation) antioxidáns útvonal felelős. A szelén a szervezet antioxidáns folyamataiban szeléntartalmú fehérjékbe, ún. szelenoproteinekbe épülve vesz részt. Ilyen szelenoenzim például a glutation-peroxidáz vagy a tioredoxinnal szoros kapcsolatban álló tioredoxin-reduktáz.

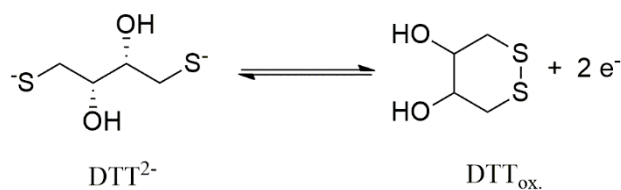
Az oxidatív stressz megelőzése és terápiás elhárítása egyaránt elképzelhetetlen ismert redukáló képességű, szelektív gyógyszeranyagok nélkül. Az antioxidánsként alkalmazott hatóanyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak pontos ismerete pedig különösen fontos a gyógyszerhatás és az esetleges mellékhatások szempontjából. Megfelelő mértékű redukálóképesség nélkül a gyógyszer alkalmazása nem éri el a kívánt hatást, túl erős redukálószer használata viszont a ROS élettani folyamatokban betöltött szerepe miatt épp olyan káros lehet, mint az oxidatív stressz maga [7].

1.2. Tiol-diszulfid és szelenol-diszelenid rendszerek

1.2.1. Tiol-diszulfid rendszerek jellemzése

A tiolcsoportot tartalmazó biomolekuláknak nagy szerepe van a redoxi homeosztázis fenntartásában és a szignáltranszdukcióban, így fontos támadáspontok lehetnek a kapcsolódó betegségek kezelésében [8, 9]. A glutation (GSH) a szervezetben általánosan jelen lévő antioxidáns, az emberi testben mérhető intracelluláris koncentrációja 0,5-10 mmol/dm³ [10]. Főként a sejten belüli redoxi homeosztázis fenntartásában játszik szerepet, ezáltal megakadályozva egyes neurodegeneratív, kardiovaszkuláris és tumoros elváltozások kialakulását [5, 6]. A GSH a ROS-at eliminálva glutation-diszulfiddá (GSSG) oxidálódik, majd a glutation-reduktáz enzim segítségével több lépésen keresztül alakul vissza eredeti formájába. A GSH-GSSG átalakulás megfelelő oxidáló hatású vegyületek (pl. ROS) jelenlétében a szervezetben spontán, enzimkatalízis nélkül is végbemegy. Kiemelkedő szerepe és relatív egyszerű működése az orvostudományt a GSH-hoz hasonló, antioxidáns hatású gyógyszerek fejlesztésére ösztönözte az oxidatív stressz elleni harcban. Mindehhez azonban szükség van a tiol-diszulfid rendszerek minél mélyebb, pontosabb megismerésére. Napjainkra a GSH az egyik legaktívabban kutatott antioxidánssá vált [11], sav-bázis [12-18] és redoxi [19, 20] tulajdonságait már részecskespecifikus szinten is leírták. A szervezet biokémiai folyamataiban betöltött jelentősége és tulajdonságainak korai megismerése miatt a tiol vegyületek redoxi jellemzését gyakran a GSH-hoz viszonyítva adják meg [21].

A fentiek alapján kézenfekvő lenne a szelenol-diszelenid rendszereket GSH-nal képzett redoxi egyensúlyokon keresztül megfigyelni, a GSH azonban nem elég erős redukálószer a diszelenid-hidak felbontásához [22, 23]. Egy jóval nagyobb redukáló hatással rendelkező molekula, a ditiotreitól (DTT) szelenoproteinek szerkezetének vizsgálata során képes volt felszakítani a diszelenid-hidakat [21, 24]. A DTT oxidációja során két elektron leadásával hattagú gyűrűvé záródik. Bár a reakció két lépésből áll, az egy oxidálható tiolátcsoportot tartalmazó részecske jelenléte gyakorlatilag elhanyagolható [25], így az oxidáció egy lépéssé egyszerűsödik (1. ábra). A tiol-diszulfid redoxi egyensúlyok megértéséhez fontos továbbá, hogy oxidálódni maguk a tiolcsoportok nem képesek, az oxidációban deprotonált formájuk, a tiolátcsoport vesz részt [26-29].



1. ábra: A DTT egy lépessé egyszerűsített oxidációja.

1.2.2. Szelenol és diszelenid vegyületek biológiai jelentősége

A szelén mint nyomelem az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen, túlnyomó részt szelenociszteinként (CysSeH, 2. ábra) van jelen. A CysSeH a 21. aminosavként is ismert, biológiai jelentősége kiemelkedő, a szeléntartalmú fehérjék, ún. szelenoproteinek egyetlen olyan építőköve, amely szelént tartalmaz. Az említett fehérjék nagy része antioxidáns folyamatokhoz kapcsolódik, és minden szelenoproteinről elmondható, hogy a szervezetben valamilyen redoxireakcióban vesz részt.

Az elsőként azonosított szeléntartalmú fehérje a glutation-peroxidáz [30], melynek négy különböző izoformájában írtak le CysSeH-t tartalmazó régiót [31-34]. A glutation-peroxidáz felelős a szervezetben képződő hidrogén-peroxid eliminációjáért. Működéséhez a CysSeH-t tartalmazó rész elengedhetetlen, ez lép közvetlenül redoxireakcióba a hidrogén-peroxiddal, majd a GSH-GSSG tiol-diszulfid rendszert oxidálva alakul vissza eredeti állapotába.

A jódtironin 5'-dejodináz enzim a pajzsmirigyhormonokat aktiválja, illetve inaktíválja. I. és II. izoformája a tironin-tiroxin átalakulásban vesz részt, míg III. izoformája a tiroxin inaktivációját katalizálja [35-38].

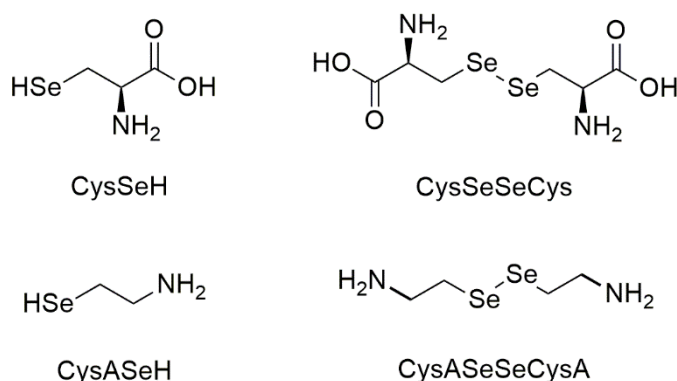
A tioredoxin-reduktáz a tioredoxinon keresztül megvalósuló antioxidáns útvonal eleme, az egyetlen enzim, mely a tioredoxin redukcióját katalizálni képes. A CysSeH aminosav a fehérje C-terminális szakaszán kialakuló redoxi centrumban található [39].

A szelenoproteinekről összefoglalóan megállapítható, hogy a szervezet különböző redoxi folyamatait katalizálják, ezekben a reakciókban CysSeH-t tartalmazó régiójuk aktívan részt vesz, nélkülözhetetlen a fehérje működéséhez. Utóbbi állítást támasztják alá azon tudományos eredmények is, melyek szerint az említett szelenoproteinek génsebészeti technikákkal előállított, CysSeH helyett ciszteint tartalmazó analógjainak katalitikus aktivitása nagyságrendekkel kisebb, mint az eredeti, szelént tartalmazó enzimeké [35, 40].

A CysSeH a redoxireakciók során szelenocisztinné (CysSeSeCys, 2. ábra) oxidálódik. Az említett szelenol-diszelenid rendszer két tagja közül a CysSeSeCys biológiai jelentősége kevésbé ismert, annak ellenére, hogy minden diszelenid-híddal stabilizálódó szelenoproteinben megtalálható. Önálló molekulaként a CysSeSeCys több ponton kapcsolódik a szervezet redoxi homeosztázisához: a glutation-peroxidáz enzimhez hasonló működést fedeztek fel 10^{-5} mol/dm³ koncentrációjú oldatában [41], jelenléte igazoltan növeli a tioredoxin-reduktáz enzim működését [42, 43], valamint indukálja a tumorsejtek ROS-mediált apoptózisát [44-46].

A szelenociszteamin (CysASeH, 2. ábra) kisebb biológiai jelentőséggel bír, ugyanakkor kis mérete és egyszerű szerkezete miatt gyakran választják modellvegyületnek szeléntartalmú aminosavak vizsgálatokor.

A szelenocisztaminra (CysASeSeCysA, 2. ábra) először antivirális tulajdonsága miatt figyeltek fel [47]. Később antioxidáns útvonalakon kifejtett hatását is leírták, a CysSeSeCys-hez hasonlóan glutation-peroxidázszerű aktivitást mutat [41], illetve katalizálja a GSH oxidációját [48]. Glutacion-peroxidáz aktivitását kihasználva a CysASeSeCysA-nal olyan speciális bevonatot is fejlesztettek, mely kardiovaszkuláris sztentek felületén *in situ* NO előállítására képes, csökkentve ezzel újabb infarktus kialakulásának lehetőségét [49-51].



2. ábra: A vizsgált szelenol- és diszelenid vegyületek szerkezete.

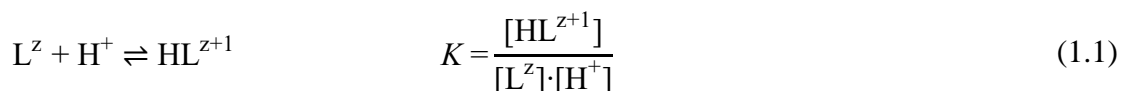
A kén és a szelén a periódusos rendszer VI. A főcsoportjának elemei, vegyületeik főbb tulajdonságaikban sok hasonlóságot mutatnak. A tiol-diszulfid redoxirendszerekben a tiolátcsoportra jellemző pH-független, részecskespecifikus protonálódási állandók, illetve standard redoxipotenciál értékek között talált összefüggés [16, 19-21, 52],

valamint szelénvegyületekkel való hasonlóságuk arra enged következtetni, hogy a szelenol-diszelenid párokat leíró paraméterek ugyancsak korrelálnak. A szeléntartalmú molekulák vizsgálatát tovább segíti, hogy míg a kén nem rendelkezik mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiában aktív izotóppal, a szelén 77-es tömegszámú izotópja NMR spektroszkópiás analízisre alkalmas. Mivel mind a sav-bázis, mind a redoxi tulajdonságok, valamint az NMR spektroszkópia során eredményül kapott kémiai eltolódás (δ) is erősen függ az adott atommag körüli elektronsűrűségtől, ezért jelen munka egyik alapvetéseként feltételeztük, hogy mindhárom fizikai-kémiai jellemző között összefüggés található.

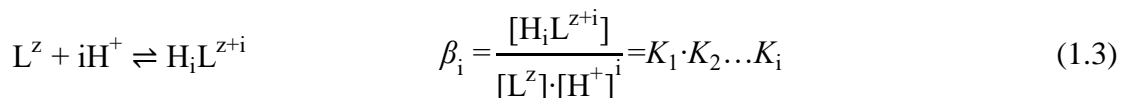
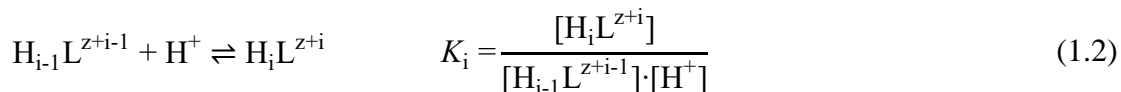
1.3. Sav-bázis egyensúlyok makro- és mikroszkopikus jellemzése

1.3.1. Protonálódási folyamatok makroszkopikus szintű leírása és vizsgálata

A sav-bázis egyensúlyokat a továbbiakban egységesen a protonálódás szempontjából, azaz a konjugált bázis protonfelvételével jellemezzük. Ha egy vizsgált z töltéssel rendelkező L molekula egy sav-bázis funkcióval rendelkező csoportot tartalmaz, a protonálódás folyamata a K protonálódási állandóval írható le:



Többcsoportos molekulák sav-bázis egyensúlyait jellemezhetjük lépcsőzetes (K_i) és kumulatív (β_i) protonálódási állandókkal is:



A fenti egyenletben L^z a molekula z töltésű legbázikusabb formája, amely i számú protont képes felvenni. A makroszkopikus leírás a folyamatban résztvevő részecskéket sztöchiometriai összetételük szintjén definiálja, a protonálódás pontos helyét nem adja meg.

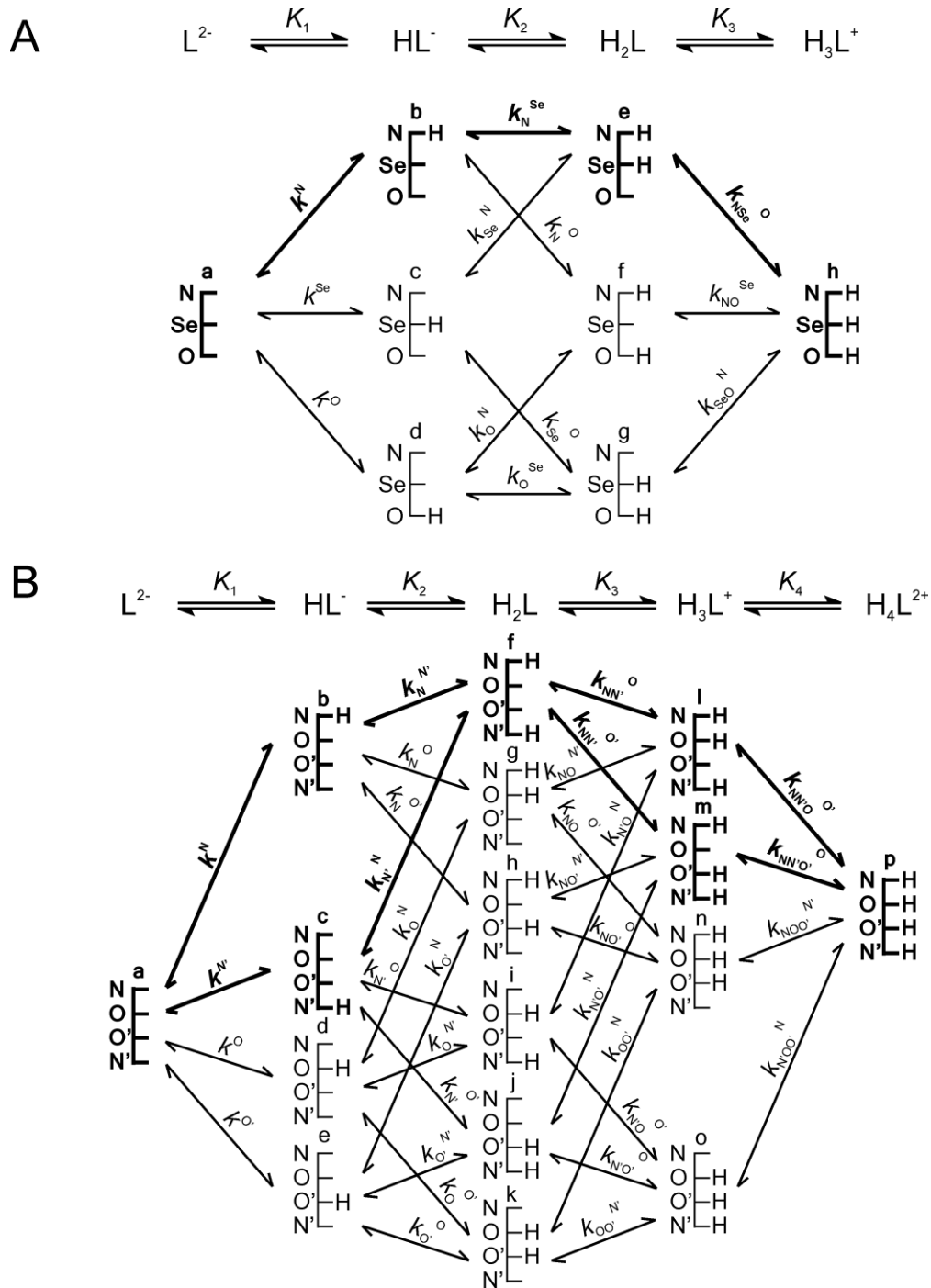
A vizsgált négy vegyületre jellemző makroszkopikus protonálódási állandók értékének meghatározásával már korábban is foglalkoztak, a kapott adatok azonban hiányosak és nem következetesek, eltérő analitikai módszerek alkalmazásával (pH-potenciometriás titrálás [53-57], UV-pH titrálás [56], NMR-pH titrálás [54], 1. táblázat), különböző körülmények (ionerősség, hőmérséklet) mellett végzett mérések során adódtak. Mivel a makroszkopikus protonálódási állandók további számításaink alapját is képezik, szükség volt a molekulák teljes, kellően megbízható és pontos jellemzésére.

1. táblázat: A vizsgált szelenol és diszelenid vegyületek szakirodalomban megtalálható makroszkopikus protonálódási állandói.

	szelenocisztein [56, 57]	szelenocisztin [54]	szelenociszteamin [53-55, 57]	szelenocisztamin [54]
$\log K_1$	9,96; 10,68	9,50	10,99; 11,45; 10,8	10,77
$\log K_2$	5,24; 5,43	8,32	5,31; 5,01; 5,50; 5,0	9,65
$\log K_3$	2,01; 2,21	<i>nincs adat</i>	-	-
$\log K_4$	-	<i>nincs adat</i>	-	-

1.3.2. Protonálódási folyamatok mikroszkopikus szintű leírása és vizsgálata

Míg a makroállandó csak a felvett protonok számát adja meg, addig a mikroszkopikus protonálódási állandó esetében úgy a protonálódás helye, mint a molekula összes sav-bázis funkcióval rendelkező csoportjának protonáltsági állapota is definiált. Részecske-specifikus (vagy csoport-specifikus) protonálódási állandók meghatározásáról már 1895-ből találunk szakirodalmat [58]. Az alapvető összefüggéseket a háromcsoportos CysSeH példáján mutatjuk be, makro- és mikro-speciációs sémája a 3. ábrán látható.



3. ábra: A selenocisztein (A) és a selenocisztin (B) protonálódásának makroszkopikus (felül) és mikroszkopikus (alul) sémája. Félkövérrel kiemelve a domináns protonálódási útvonal látható. A selenolát-, karboxilát- és aminocsoportokat rendre Se, O és N betűk jelölik.

A CysSeH makro- és mikrorészecskéinek koncentrációja között a következő összefüggések állnak fenn:

$$[L^{2-}] = [a] \quad (1.4)$$

$$[HL^-] = [b] + [c] + [d] \quad (1.5)$$

$$[H_2L] = [e] + [f] + [g] \quad (1.6)$$

$$[H_3L^+] = [h] \quad (1.7)$$

Az egyes k mikroállandók az adott funkciós csoport bázicitását jellemzik a többi csoport adott protonáltsági állapota esetén. A k mikroállandóhoz felső indexben kapcsolódó jelölés a protonálódó csoportot, míg az alsó indexben látható betűjel a protonált csoportot jelenti. Példaként a CysSeH szelenolátcsoportjának (Se) protonálódását leíró mikroállandó abban az esetben, ha a molekula karboxilátcsoportja (O) protonált állapotban van:

$$k_O^{Se} = \frac{[g]}{[d] \cdot [H^+]} \quad (1.8)$$

Az amino- és a karboxilátcsoportok protonáltságától függően további három, a szelenolátcsoport bázicitását jellemző mikroállandó definiálható:

$$k^{Se} = \frac{[c]}{[a] \cdot [H^+]} \quad k_N^{Se} = \frac{[e]}{[b] \cdot [H^+]} \quad k_{NO}^{Se} = \frac{[h]}{[f] \cdot [H^+]} \quad (1.9)$$

A makro- és mikroállandók közt fennálló összefüggések:

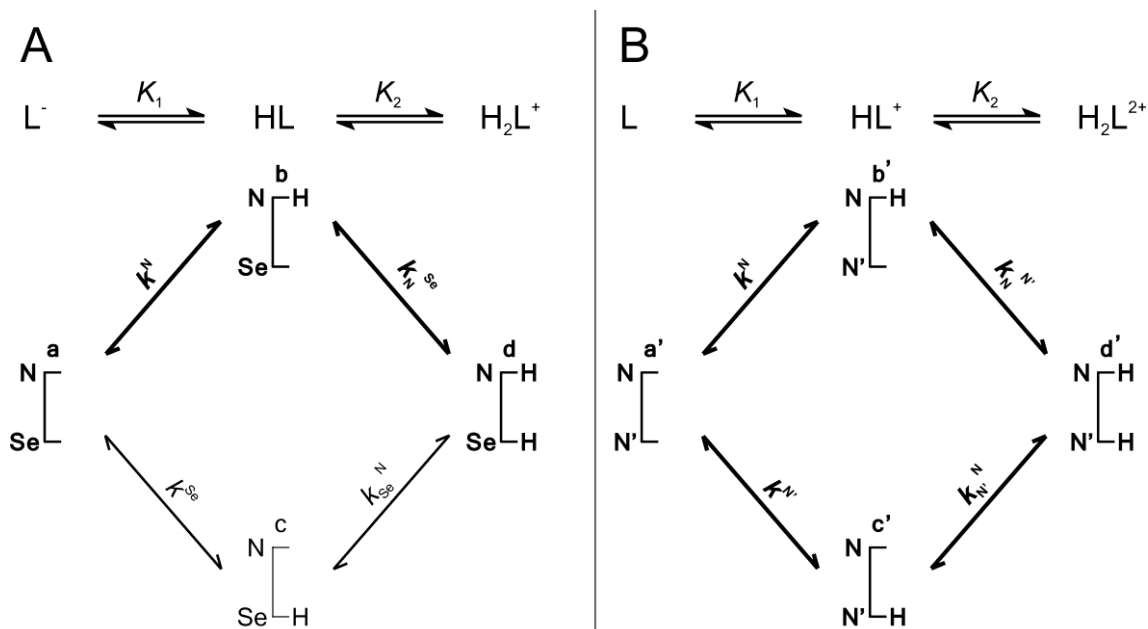
$$\beta_1 = K_1 = k^O + k^{Se} + k^N \quad (1.10)$$

$$\beta_2 = K_1 \cdot K_2 = k^O \cdot k_O^{Se} + k^N \cdot k_N^O + k^N \cdot k_N^{Se} = k^N \cdot k_N^{Se} + k^{Se} \cdot k_{Se}^O + k^O \cdot k_O^N = \dots \quad (1.11)$$

$$\beta_3 = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 = k^O \cdot k_O^{Se} \cdot k_{SeO}^N = k^N \cdot k_N^O \cdot k_{NO}^{Se} = \dots \quad (1.12)$$

A fenti egyenletek hasonló megfontolásokkal levezethetők két és négy sav-bázis funkciós csoportot tartalmazó molekulákra is [59]. A CysASeH és a CysASeSeCysA protonálódását a 4. ábra illusztrálja.

Az említett szelenol és diszelenid vegyületek közül a szakirodalomban eddig mikroállandókat kizárólag a CysASeH molekulára határoztak meg ($\log k^{\text{Se}}=6,47$; $\log k^{\text{N}}=10,99$; $\log k_{\text{N}}^{\text{Se}}=5,01$; $\log k_{\text{Se}}^{\text{N}}=9,53$) [53].



4. ábra: A szelenociszteamin (A) és a szelenocisztamin (B) protonálódásának makroszkopikus (felül) és mikroszkopikus (alul) sémája.

A mikroszkopikus protonálódási állandók meghatározása közvetlenül a makroállandók értéke alapján csak kivételes szerkezettel rendelkező, teljesen szimmetrikus molekulák esetében lehetséges [60]. Példaként a CysASeSeCysA-ra, egy kétcsoportos, szimmetrikus molekulára teljesülő összefüggések az 1.10 és az 1.12 egyenletről levezetve a következők:

$$\log k^{\text{N}} = \log k^{\text{N}'} = \log K_1 - \log 2 \quad (1.13)$$

$$\log k_{\text{N}}^{\text{N}'} = \log k_{\text{N}'}^{\text{N}} = \log K_2 + \log 2 \quad (1.14)$$

Amennyiben ez a feltétel nem teljesül a vizsgált molekulára, a teljes részecskespecifikus jellemzéshez további információra van szükség. Ilyenkor használható rokon szerkezetű vegyület bázicitás adata (deduktív módszer), illetve különböző spektroszkópiás módszerek (UV-pH titrálás, NMR-pH titrálás stb.), amelyek

a molekula olyan tulajdonságát vizsgálják, amelynek változását kizárólag egy csoport protonálódása befolyásolja. A továbbiakban csak a doktori munka során alkalmazott deduktív módszert tárgyaljuk részletesen.

A deduktív módszer alapját azok a tudományos munkák adják, amelyek rokon szerkezetű molekulák egyes csoportjainak hatását figyelték meg más sav-bázis funkciós csoportok bázicitására. Már az első részecskespecifikus protonálódási állandókkal foglalkozó közleményben rámutatnak, hogy a karboxil- és a karboximetil-csoportok közel azonos mértékben csökkentik egy másik csoport bázicitását, amely érték viszont jelentősen eltér a karboxilátcsoport hatásától [58]. A metilcsoport jelenléte mintegy modellezi a protonált állapotot, azaz a karboximetil-csoporttal rendelkező származék makroállandója megfeleltethető a vizsgált molekula k_O^x mikroállandójának, ahol x a másik protonálható csoportot jelzi. Legtöbbször a karboxilátcsoport protonált állapotát modellezzik metilészterként [61, 62], etilészterként [63] vagy savamidként [64], míg a protonált aminocsoportokról kvaternerezett származékokat vizsgálva kaphatunk többletinformációt [65].

Többcsoportos molekulák közel eső csoportjai esetén az egyik protonálódása általában csökkenti a másik bázicitását, ezt számszerűsíti a kölcsönhatási tényező (ΔE). A CysSeH példáján bemutatva a karboxilát- és aminocsoportok egymásra kifejtett hatását a következő összefüggésekkel jellemezhetjük:

$$\begin{aligned} \log \Delta E_{N/O} &= \log k^O - \log k_N^O = \log k_{Se}^O - \log k_{NSe}^O = \log k^N - \log k_O^N = \\ &= \log k_{Se}^N - \log k_{SeO}^N \end{aligned} \quad (1.15)$$

Szintén a deduktív módszerhez soroljuk azt az eljárást, amikor a modellvegyületként választott molekula bázicitás adatai helyett kölcsönhatási tényezőit használjuk fel a mikroállandók meghatározására [66-68]. A módszer megbízhatóságát bizonyítják azok az eredmények, melyek szerint hasonló szerkezetű molekulák esetén a kölcsönhatási tényezők értéke kevésbé változik, mint a mikroállandók [66-70].

Mivel a deduktív módszer közelítésekkel él, akkor célszerű alkalmazni, ha nem lehetséges a protonálódás csoportszelektív megfigyelése, illetve, ha a mikrorészecskék közül valamelyik kiugróan alacsony koncentrációjú. Utóbbi esetben az analitikai

módszerrel szerzett információt nagyobb hiba terheli, mint amekkora a deduktív módszerből fakad [71].

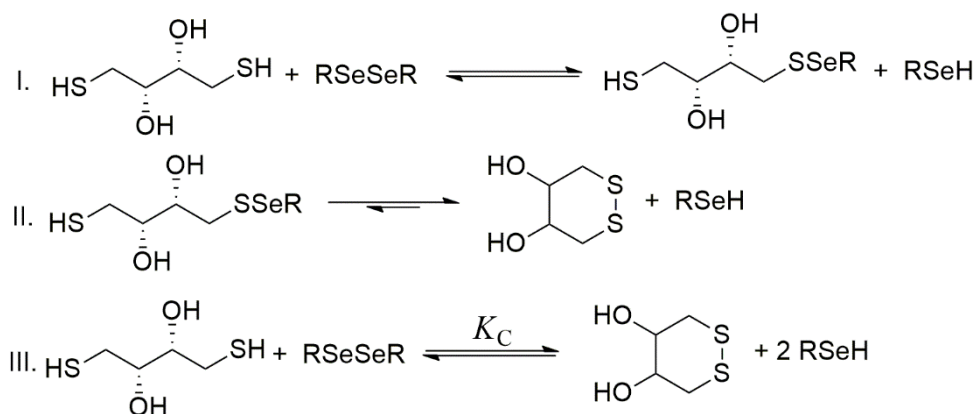
A tiol-diszulfid rendszerek sav-bázis tulajdonságait leíró paramétereket a doktori munka során nem vizsgáljuk, értéküket korábbi eredmények [15, 16, 24] alapján használjuk fel további számításokhoz. Az adatokat a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: *Néhány tiol-diszulfid rendszer vegyületeinek korábban meghatározott, további számításokhoz felhasznált egyes makro- és mikroállandóinak értéke.*

glutation ^[16]		glutation-diszulfid ^[15]		ditiotreitol ^[24]	
log K_1	9,65	log K_1	9,53	log K_1	10,1
log K_2	8,78	log K_2	8,83	log K_2	9,2
log K_3	3,52	log K_3	3,85		
log K_4	2,22	log K_4	3,15		
log k^N	9,49	log K_5	2,32		
		log K_6	1,60		
		log k^N	9,41		
		log k_N^N	9,25		

1.4. Részecske-specifikus redoxi egyensúlyok

A szelenol-diszelenid rendszerek standard redoxipotenciáljának meghatározása a kézenfekvőnek látszó és redoxipotenciálok meghatározására leggyakrabban alkalmazott nemesfém-elektrodos elektrokémiai módszerrel – a tiol-diszulfid párokhoz hasonlóan – fém-komplexek képződése miatt a gyakorlatban nem kivitelezhető. E redoxipotenciálok jellemzéséhez így ismert tulajdonságú vegyületekkel alkotott kémiai egyensúlyokat kell tanulmányoznunk. A DTT alkalmazhatóságát szelenol-diszelenid rendszerek vizsgálatában a korábbiakban már részleteztük. A fennálló redoxi egyensúlyt az 5. ábra mutatja be.



5. ábra: Egy diszelenid vegyület és a DTT egyensúlyi reakciója.

Mivel a DTT igen nagy hajlammal rendelkezik a gyűrű záródásával járó második oxidációs lépésre [25], valamint a diszelenidek jóval stabilabbak, mint a szeleno-szulfid (R-Se-S-R) vegyületek [72], az 5. ábrán az I. és II. számú reakciók jó közelítéssel a III. számmal jelzett lépéssé egyszerűsíthetők. A diszelenid-szelenol átalakulás kémiai egyensúlyát leíró látszólagos (*conditional*) K_C egyensúlyi állandó, valamint a szelenol-diszelenid redoxirendszerre jellemző elektródpotenciál a következő összefüggésekkel adható meg:

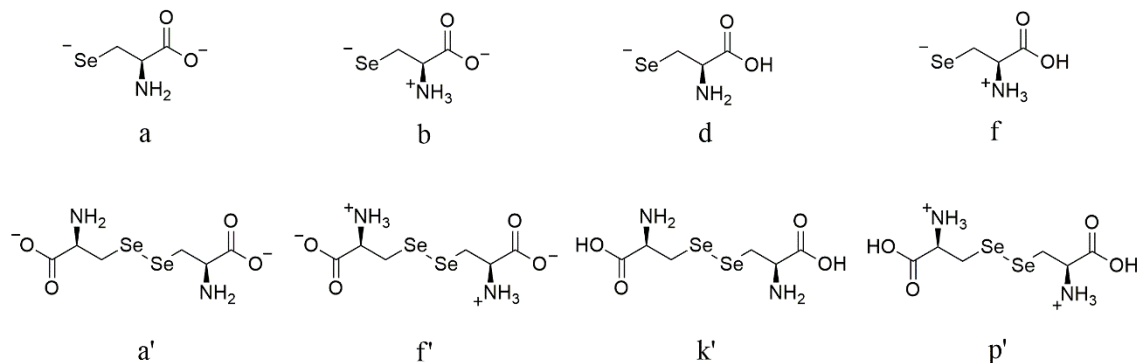
$$K_C = \frac{[\text{RSeH}]^2 \cdot [\text{DTT}_{\text{ox.}}]}{[\text{DTT}] \cdot [\text{RSeSeR}]} \quad (1.16)$$

$$E = E^\circ + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{RSeSeR}]}{[\text{RSe}^-]^2} \quad (1.17)$$

ahol E° a standard redoxipotenciál, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, z az elektronszám-változás, F a Faraday-állandó.

Szelenol-diszelenid rendszerek vizsgálatokor sav-bázis és redoxi folyamatok is zajlanak, így több egymásra ható kémiai reakció egyensúlya áll fenn. Ennek következtében a közvetlenül mért koncentrációk alapján csak látszólagos, pH-függő egyensúlyi állandót és redoxipotenciált tudunk meghatározni. A szervezetben lejátszódó biokémiai reakciók mélyebb megismerése érdekében szükség van a folyamatok részecskeszintű jellemzésére. A makro- és mikrorészecskék koncentrációja közötti összefüggés alapján (1.4-1.7 egyenletek) a látszólagos paraméterek pH-független, részecskespecifikus állandókra bonthatók. A CysSeH példájánál maradva, a

redoxireakciókban részt vevő, azaz szelenolátcsoportot tartalmazó mikrorészecskéket (a, b, d, f) és szimmetrikus oxidációs termékeiket (a', f', k', p') a 6. ábra mutatja be.



6. ábra: A szelenocisztein szelenolátcsoporttal rendelkező mikrorészecskéi, alattuk rendre a velük egyensúlyban álló szelenocisztein mikrorészecskék.

A szelenol és diszelenid formák amino- és karboxilátcsoportjára jellemző csoportspecifikus protonálódási állandók hasonlósága miatt diszelenid vegyületek és DTT reakciójában a csoportok ionizáltsági állapota nem változik (a 6. ábrán látható módon például az f' CysSeSeCys mikrorészecske redukciója során szükségszerűen a b CysSeH részecske keletkezik). Az egyes mikrorészecskék szelenolátcsoportját a másik két funkciós csoport protonáltsági állapotától függően eltérő elektrosztatikus hatások érik, így különböző sav-bázis és redoxi tulajdonságokkal rendelkeznek. A részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandók és standard redoxipotenciál értékek (rendre k^x és E°_x , ahol x a megfelelő szelenol-diszelenid redoxirendszer szelenolátcsoportot tartalmazó mikrorészecskéjének betűjele) kiszámítása a tiol-diszulfid rendszerek vizsgálatára korábban kidolgozott módszer alapján lehetséges [19, 20, 52]. A meghatározáshoz szükség van a látszólagos egyensúlyi állandókra és a vizsgált molekulák protonálódási makro- és mikroállandóira. A CysSeH b mikrorészecskéjének szelenolátcsoportjára jellemző k^b pH-független, részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandó a következő:

$$k^b = \frac{[b]^2 \cdot [DTT_{ox.}]}{[DTT^{2-}] \cdot [f]} \quad (1.18)$$

A DTT teljesen deprotonált, illetve oxidált formájának koncentrációja a makroállandók ismeretében meghatározható. A mikrorészecskék koncentrációját az adott

vegyület összkoncentrációjának és a mikrorészecskére adott pH-n jellemző móltörtnek (χ) a szorzata adja meg.

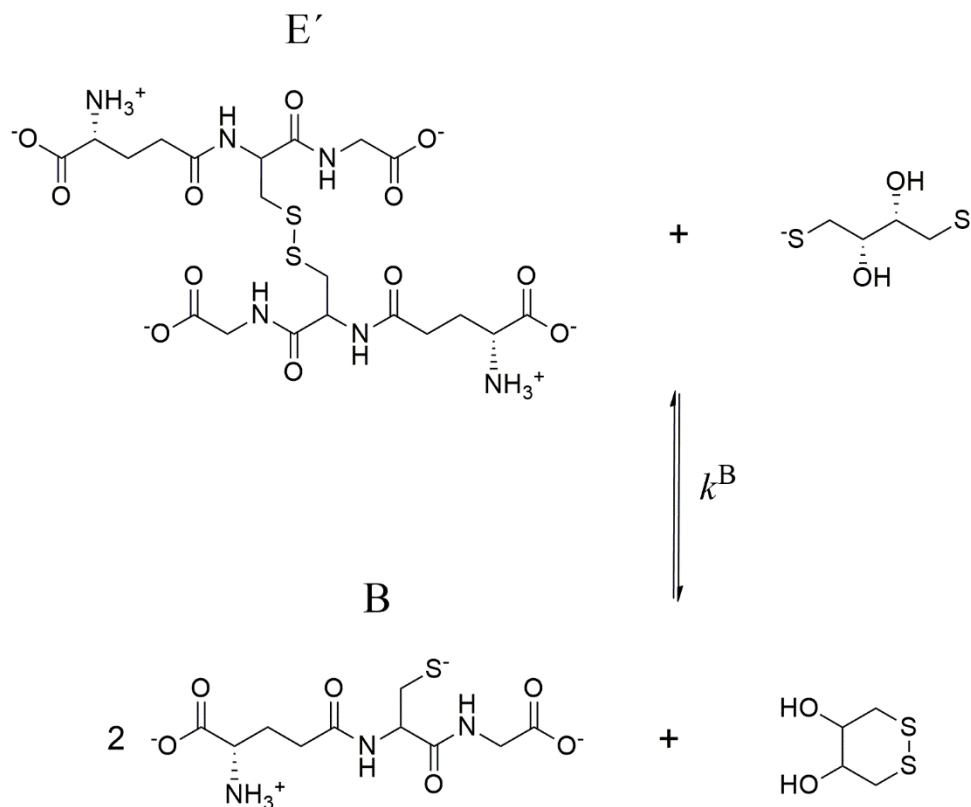
$$[b]=[CysSeH]\cdot\chi_b=[CysSeH]\cdot\frac{k^N\cdot[H^+]}{1+K_1\cdot[H^+]+K_1\cdot K_2\cdot[H^+]^2+K_1\cdot K_2\cdot K_3\cdot[H^+]^3} \quad (1.19)$$

Az 1.19 egyenlet az összes mikrorészecskére analóg módon felírható, ezeket beillesztve az 1.18 egyenletbe a következő összefüggést kapjuk, amely az 1.16 egyenlet alapján tovább egyszerűsíthető:

$$k^b=\frac{[b]^2\cdot[DTT_{ox.}]}{[DTT^{2-}]\cdot[f]}=\frac{[CysSeH]^2\cdot\chi_b^2\cdot[DTT_{ox.}]}{[DTT]\cdot\chi_{DTT^{2-}}\cdot[CysSeSeCys]\cdot\chi_f}=K_C\cdot\frac{\chi_b^2}{\chi_{DTT^{2-}}\cdot\chi_f} \quad (1.20)$$

Mindezek alapján, ha ismert a K_C látszólagos redoxi egyensúlyi állandó, valamint a három mikrorészecskére jellemző móltört adott pH-értéken, az ismeretlen részecskeszpecifikus redoxi egyensúlyi állandók az 1.20 egyenlettel analóg összefüggések alapján meghatározhatók.

Annak érdekében, hogy a szelenol-diszelenid rendszerekről kapott eredmények egységesek és összevethetők legyenek a szakirodalomban szereplő, GSH-nal szemben meghatározott értékekkel, a DTT-GSSG kémiai egyensúlyt is jellemeznünk kell. A lejátszódó kémiai reakció szintén egy lépésként értelmezhető, a vizsgálat során alkalmazott, a DTT redukív aktivitását lehetővé tevő pH-értékeken a GSH B, a GSSG E' mikrorészecskéje a domináns (7. ábra, a mikrorészecskék felhasznált irodalomban [15, 16] található jelölését megőriztük). Az említett részecskékre jellemző standard redoxipotenciál értékét ($E^\circ_B = -0,374$ mV) további számításokhoz korábbi eredmények alapján [19] használtuk fel.



7. ábra: A vizsgált pH-értékeken domináns E' GSSG mikrorészecske és a DTT között létrejövő kémiai egyensúly.

1.5. ^{77}Se NMR spektroszkópia

A szelén ^{77}Se -es tömegszámú izotópjának atommagjában 34 proton és 43 neutron található, eredő magspinje $\frac{1}{2}$, így NMR spektroszkópiával vizsgálható. Először az 1950-es évek elején bizonyították a ^{77}Se NMR gyakorlati kivitelezhetőségét [73, 74], nem sokkal ezután az analitikai módszert szeléntartalmú szerves molekulákra is kiterjesztették [75]. A ^{77}Se izotóp természetes előfordulása 7,63%, mágneses momentuma 0,926, giromágneses állandója 5,125, ^1H maghoz viszonyított relatív érzékenysége $5,37 \cdot 10^{-4}$, ^{13}C maghoz viszonyított relatív érzékenysége 3,15 [76]. A ^{77}Se kémiai eltolódása rendkívül érzékeny a molekuláris környezetre, az eddig mért ^{77}Se kémiai eltolódások kb. 2800 ppm széles skálát fednek le [77, 78]. A ^{77}Se NMR első fénykorát az 1970-1980-as években élte, ennek során főként szerves molekulákban található szelén atommagok kémiai eltolódásait írták le. A szelén a szervezet antioxidáns folyamataiban betöltött jelentősége miatt újra a figyelem középpontjába került, így a szelenoproteinek

analízisében kiemelkedő jelentőségű ^{77}Se NMR spektroszkópia újra tért nyerhet. Ennek egyik feltétele, hogy megfelelő referenciavegyület álljon rendelkezésre.

1.5.1. Kémiai eltolódás referenciák

A kémiai eltolódás (δ , Hz vagy ppm) az NMR spektrum x-tengelyéről leolvasható egyik alapvető információ, különböző kémiai környezetű atommagok eltérő kémiai eltolódással jelentkeznek. Az NMR mérés során kapott eredményeket a megfelelő pontosság és összehasonlíthatóság érdekében egy adott frekvenciához viszonyítják. A referenciasfrekvencia általában egy vegyület meghatározott atommagjára jellemző. A referenciaanyagtól elvárt tulajdonságok, hogy egyszerű és nagy intenzitású jelet adjon, így jelenléte alacsony koncentrációban alkalmazva csekély hatással van a mérendő anyag kémiai eltolódására. További elvárás, hogy kémiai eltolódása minél inkább változatlan legyen a különböző mérési körülmények között is. A továbbiakban a kémiai eltolódás skála referenciálásának három leggyakrabban használt technikáját részletezzük [79, 80].

Belső referencia alkalmazása esetén a referenciaként szolgáló vegyületet közvetlenül a mérendő oldathoz adjuk, ^1H és ^{13}C NMR spektroszkópiában ez a leggyakrabban alkalmazott módszer. A referenciamolekula kiválasztása esetén a kémiai eltolódás standard anyagokra vonatkozó általános követelményeken felül figyelembe kell venni oldhatóságát az adott oldószerben, illetve (minél kisebb) reaktivitását a mintában található egyéb anyagokkal szemben.

Külső standardként a referenciaoldatot egy kisebb átmérőjű, koaxiális, ún. *insert* csőbe töltik, majd ezt behelyezik a mintát tartalmazó NMR csőbe. A két oldat így fizikailag nem érintkezik, különböző oldószerek használhatók, és az esetleges kémiai reakcióktól sem kell tartani. Az NMR spektroszkópiás mérést elvégezve a két oldat egy spektrumban jelenik meg. A módszer hátránya, hogy az *insert* cső térkitöltése miatt az alkalmazható minta térfogata, így a mérés érzékenysége is csökken.

A szubsztitúciós módszer során a mintát és a referenciát külön NMR csőben, két külön NMR mérés során vizsgáljuk, majd a mintáról kapott NMR spektrum kémiai eltolódás skáláját a referenciára jellemző ismert frekvenciaértékhez viszonyítjuk. A mérések megbízható kivitelezéséhez szükséges az oldószerek deutérium atommagjaihoz történő frekvenciarögzítés, a megfelelő *lock* szint beállítása.

Az előbb ismertetett módszerek feltételezik, hogy minden NMR-aktív mag esetén rendelkezünk jól ismert és részletesen jellemzett, megfelelő tulajdonságokkal bíró kémiai eltolódás referenciaanyaggal. Heteroatomok (bármely NMR-aktív mag a ^1H és ^{13}C atommagok kivételével: ^{19}F , ^{31}P , ^{77}Se stb.) mérése során gyakran hiányos az alkalmazható referenciák listája. Ezen felül a Nemzetközi Tiszta és Alkalmazott Kémiai Szövetség (IUPAC) hivatalos ajánlása az, hogy minden kémiai eltolódás a „végtelen hígításban” alkalmazott tetrametilszilil (TMS) deutero-kloroformos (CDCl_3) oldatában mért legintenzívebb ^1H jel frekvenciájához viszonyítva kerüljön bemutatásra, így egységes, összehasonlítható adatokat kapunk. Vizes oldatok esetén egy további vegyület, a nátrium-3-(trimetilszilil)-1-propánszulfonát (DSS) alkalmazása is lehetséges. Az ajánlás heteroatomok mérése esetében főként a szubsztitúciós módszerrel kivitelezhető, azaz két külön mérést végzünk el két különböző NMR-aktív magra jellemző frekvenciatartományban. Az irodalomban szereplő, heteroatomokra vonatkozó kémiai eltolódás adatokat azonban a kialakult konvenciót követve gyakran adott heteroatomot tartalmazó referenciavegyület frekvenciájára vonatkoztatva adják meg.

1.5.2. ^{77}Se NMR spektroszkópiában alkalmazott szeléntartalmú referenciaanyagok

A ^{77}Se NMR spektroszkópia bevezetésekor a kémiai eltolódásokat bemutató munkák egyértelmű ajánlás hiányában különböző szelénvegyületeket használtak referenciaként: szelén-oxikloridot [81], dimetil-szelenidet [82, 83], szelenofént [84-87], 1,2-di-(p-tolildiszelen)-t [88], szelén-dioxidot [89], nátrium-szelenitet [90] és szelénessavat [54, 81, 91-93]. Mi több, nemcsak a felhasznált anyagok voltak eltérőek, de az alkalmazott mérési körülmények mint a hőmérséklet, koncentráció, ionerősség sem voltak egységesek. Ezt követően két tudományos munka is foglalkozott szeléntartalmú, kémiai eltolódás referenciaként használható anyag vizsgálatával [82, 94]. A dimetil-szelenid mint lehetséges kémiai eltolódás referencia már korábban megjelent az irodalomban [83], ekkor azonban alkalmazhatóságát még nem támasztották alá mérési eredményekkel. Luthra és mtsai. [82] különböző körülmények mellett vizsgálták a dimetil-szelenid ^{77}Se kémiai eltolódását, meghatározták az oldószer, a hőmérséklet, valamint a koncentráció hatását a referenciafrekvenciára. Eredményeiket értékelve kémiai eltolódás referenciaként 60 V/V% dimetil-szelenidet tartalmazó deutero-kloroformos (CDCl_3) oldatot javasoltak. Habár belső referenciaként való használata is említésre került,

reaktivitását más szeléntartalmú anyagokkal nem vizsgálták, az irodalom pedig arról tanúskodik, hogy a dimetil-szelenidet szinte kizárólag külső referenciaként használják. Mivel a referenciaoldat deutero-kloroformot tartalmaz, vizes oldatokra külső referenciaként alkalmazva a megfelelő *lock* szint elérése problémába ütközhet az alacsony deutérium koncentráció miatt. Mindemmellett fontos megjegyezni, hogy a dimetil-szelenid illékony és mérgező anyag, így gyakorlati munka szempontjából nagy odafigyelést és megfelelő védőfelszerelést igényel. Hátrányai ellenére a dimetil-szelenid a leginkább elfogadott ^{77}Se NMR kémiai eltolódás referencia, a legtöbb tudományos munka, amely más szelénvegyületet használ standardként, végső eredményét az összehasonlíthatóság érdekében dimetil-szelenidre vonatkoztatva közli [54, 93].

A szelénessav előnye a dimetil-szelenidhez képest, hogy vízzel oldható, így a referenciaoldat készítésekor oldószerként deutérium-oxid használható. Az így készült mintában magasabb a deutériumatomok száma, mint kloroformos oldatok esetén, nagyban megkönnyítve a megfelelő *lock* szint elérését. Az *insert* csöves külső referencia alkalmazásakor az összehasonlító oldat térfogata a minta térfogatának hozzávetőlegesen tizedrésze, így a megfelelő deutérium koncentráció elérése még lényegesebb szempont. Milne [94] mélyrehatóan tanulmányozta a szelénessav ^{77}Se NMR kémiai eltolódásának változását különböző hőmérséklet- és koncentrációértékek mellett, ezen felül kitért az oldószer nehézvíztartalmának hatására is, valamint a protonálódás/deprotonálódás okozta eltéréseket is ismertette. Eredményei alapján a szelénessav telített vizes oldatát kizárólag külső referenciaként használják.

Habár két szeléntartalmú anyag is rendelkezésre áll kémiai eltolódás referenciaként ^{77}Se NMR spektroszkópiában, továbbra sincs lehetőség belső referencia alkalmazására, főként vizes oldatok esetén. Szelenoproteinek biomimetikus közegben való vizsgálatokor azonban, ha a különböző kémiai környezetű szelénatomok kémiai eltolódását minél pontosabban meg szeretnénk határozni, elengedhetetlen egy vizes közegben megfelelően használható belső referencia.

2. Célkitűzések

Doktori munkám célja a biológiai jelentőségű szelenol-diszelenid egyensúlyi rendszerek részecskespecifikus sav-bázis és redoxi tulajdonságainak jellemzése, valamint korreláció meghatározása az eredményül kapott egyes mikrorészecskékre jellemző paraméterek és ^1H , ^{13}C és ^{77}Se kémiai eltolódások között.

Ennek fontos része a vizsgált molekulák sav-bázis tulajdonságainak jellemzése makro- és mikroszkopikus szinten, melyhez származék vegyületek előállítására szükséges. A kapott eredményeket az irodalomban fellelhető értékekkel összevetve elemezzük.

További célunk az említett szelenol-diszelenid rendszerek DTT-re vonatkoztatott, pH-független, részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandóinak, valamint részecskespecifikus standard redoxipotenciál értékeinek meghatározása. Ehhez előzetesen szükség volt a $\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}$ tiol-diszulfid rendszer standard redoxipotenciál értékére is, melyet a GSH/GSSG redoxirendszerrel alkotott kémiai egyensúly alapján kaptunk meg.

Annak érdekében, hogy kellőképpen pontos kémiai eltolódás értékeket kapjunk, célul tűztük ki egy ^{77}Se NMR spektroszkópia során vizes közegben belső standardként használható kémiai eltolódás referencia anyag részletes mérési adatokkal alátámasztott bevezetését.

3. Módszerek

3.1. A kísérletes munka során felhasznált anyagok

A mérésekhez használt valamennyi analitikai tisztaságú vegyszert (mérőoldatok komponenseit, inert sókat az ionerősség beállításához, a mérésekhez felhasznált pufferekkel) a Sigma-Aldrich, a Merck és a Reanal gyártóktól szereztük be. Az ^1H és ^{13}C NMR spektroszkópiához kémiai eltolódás referenciaként nátrium-3-(trimetilszilil)-1-propánszulfonátot (Tokio Chemical Industry), koncentráció standardként *tert*-butilamint (Sigma-Aldrich) használtunk. Oldószerként kétszer desztillált vizet, deutérium-oxidot (D_2O , VWR Chemicals) vagy deuterált kloroformot (CDCl_3 , VWR Chemicals) alkalmaztunk.

3.1.1. Szelenol és diszelenid vegyületek

A szelenol-diszelenid rendszereket leíró eredmények reprodukálhatóságát vizsgálva az anyagokat két különböző gyártótól szereztük be. A szeleno-*L*-cisztin (CysSeSeCys) a Sigma-Aldrich és az Acros Organics, a szelenocisztamin-dihidroklorid (CysASeSeCysA · 2 HCl) a Sigma-Aldrich és az AKos GmbH terméke volt. Kereskedelmi forgalomban a könnyen oxidálódó szelenol vegyületek nem voltak elérhetők, így azokat *in situ* redukcióval állítottuk elő diszelenidjeikből. Redukálószerként ditiotreitolt (Tokio Chemical Industry) és nátrium-bórhidridet (NaBH_4 , Sigma-Aldrich) használtunk.

3.1.2. ^1H NMR-pH indikátormolekulák

A diklórecetsavat (pH: < 2,3), aceton-oximot (pH: < 2,8 és 11,6-13,1), szarkozint (pH: 1,0-3,5 és 8,7-11,6) és a *tert*-butilamint (pH: 9,7-12,2) a Sigma-Aldrich, a nátrium-acetátot (pH: 3,6-5,6) és az imidazolt (pH: 5,5-8,9) a Reanal gyártóktól szereztük be.

3.1.3. Előállított modellvegyületek

A CysSeSeCys dimetil-észter származékát állítottuk elő: metanolban feloldva, majd tionil-kloriddal kevertetve az elegyet 24 óráig refluxáltuk. Szűrés után vákuumdesztillációval távolítottuk el az oldószert. A terméket további tisztítás nélkül használtuk fel, azonosítása NMR spektroszkópiával történt.

3.1.4. Vizsgált ^{77}Se NMR kémiai eltolódás referenciamolekulák

A dimetil-szelenoxidot (AKos GmbH), 1,1-dimetil-2-szelenokarbamidot, nátrium-szelenitet, szelénsav oldatot és a vízmentes nátrium-szelenátot a Sigma-Aldrichtól vásároltuk.

3.2. NMR spektroszkópiás mérések

Az NMR spektrumok felvételéhez 600 MHz-es Varian Unity Inova spektrométert használtunk. A méréseket $25,0 \pm 0,1$ °C-on végeztük, az oldószer $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 95:5 V/V%-os elegye volt $0,15 \text{ mol/dm}^3$ ionerősség mellett (ettől eltérő mérési körülmények alkalmazását a továbbiakban külön részletezzük). A minták térfogata 600 μl , *insert* cső alkalmazása esetén 550 μl . A pH-t indikátormolekulák segítségével *in situ* határoztuk meg [95, 96], az egyes vegyületek által megbízhatóan jelzett pH-tartományokat a 3.1.2. fejezetben ismertettük. ^1H NMR mérések során, amennyiben szükséges volt, a vízjelet előtelítő (*presaturation*) pulzussal nyomtuk el, az alkalmazott mérési paraméterek különböző magok esetén:

^1H : akkumulált spektrumok száma (nt) = 16, mérési pontok száma (np) = 32768, mérési ablak = 9615,4 Hz, mérési idő = 1,703 s, késleltetési idő = 1,5 s

^{13}C : nt = 65536, np = 65536, mérési ablak = 37878,8 Hz, mérési idő = 0,865 s, késleltetési idő = 1 s.

^{77}Se : nt = a minta koncentrációjától függően 128-65536, np = 262144, mérési ablak = 131578,9 Hz, mérési idő = 0,943 s, késleltetési idő = 1 s. A kapott spektrumot a TMS 0,03 V/V%-os, CDCl_3 -mal készült oldatának ^1H frekvenciájára vonatkoztattuk.

3.2.1. NMR-pH titrálások

NMR-pH titrálásokat két NMR-aktív magra, ^1H -re és ^{77}Se -re végeztünk el 0,60-13,40 közti pH-tartományban $0,15 \text{ mol/dm}^3$ vagy 1 mol/dm^3 ionerősség mellett. ^1H NMR-pH titrálások során a minta koncentrációja tipikusan 10 mmol/dm^3 volt. A nátrium-hidroxiddal készült törzsoldatokhoz sósavat adva állítottuk be a kívánt pH-értéket. A mintakészítéshez használt 5 V/V% D_2O a protonok és a deutériumok aktivitásának

összefüggése alapján a pH-skálát a meghatározás hibáján belül, maximálisan 0,02 egységgel torzítja [97, 98].

3.2.2. *Kvantitatív ^1H NMR spektrumok felvétele*

A reaktánsokat (CysSeSeCys, CysASeSeCysA, GSSG, DTT) tartalmazó törzsoldatok készítéséhez bórax-bórsav puffert használtunk oldószerként. A DTT-t tartalmazó törzsoldathoz *tert*-butilamint adtunk, mely pH-indikátorként és belső koncentráció standardként kettős feladatot látott el. A DTT-t és az egyik reaktánst tartalmazó törzsoldatokat összeöntve a kívánt pH értéket sósav vagy nátrium-hidroxid előírt mennyiségét hozzáadva állítottuk be [99], majd késedelem nélkül felvettük a kvantitatív ^1H NMR spektrumokat (előtelítő pulzus, $n_t = 16$, $n_p = 64000$, mérési idő = 1,703 s, késleltetési idő = 15 s). Annak bizonyítására, hogy a mintakészítés és a vizsgálat elvégzése közti idő elegendő az egyensúly létrejöttéhez, a mérést a minta készítése után azonnal, 15 perccel, egy órával és 24 órával is elvégeztük. Mivel a kapott spektrumok között eltérést nem tapasztaltunk, arra a következtetésre jutottunk, hogy az egyensúly beállta diszelenid vegyületek és DTT között pillanatszerű, amely összhangban van a tioldiszulfid rendszereket leíró eredményekkel [100]. Diszelenid és diszulfid vegyületet nem tartalmazó üres kísérletet is végeztünk, hogy figyelembe tudjuk venni a DTT esetleges oxidációját a levegő oxigénjének jelenlétében.

3.2.3. *Referenciamolekulák vizsgálata során alkalmazott mérési paraméterek*

A referenciavegyület bevezetéséhez szükséges volt alaposan megvizsgálni a választott vegyületek kémiai eltolódását a mérési körülmények változtatása során. Tanulmányoztuk a hőmérséklet, az ionerősség, a koncentráció, az oldószer D_2O -tartalmának és a molekula protonálódásának/deprotonálódásának hatását a ^{77}Se kémiai eltolódásra, illetve a referenciaoldat eltarthatóságát. Az eljárás során alkalmazott mérési körülményeket a 3. táblázat foglalja össze. A kapott adatsorok statisztikai elemzését a MedCalc v12.5.0.0. (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium) szoftverrel végeztük.

3. táblázat: A ^{77}Se kémiai eltolódás referenciamolekulák vizsgálata során alkalmazott mérési körülmények. A táblázatban található pH~7 jelzés esetén a mintakészítéshez kizárólag nem hidrolizáló sók vizes oldatát használtuk.

vizsgált paraméterek		mérési körülmények				
paraméter	intervallum	pH	T (K)	c (mol/dm ³)	I (mol/dm ³)	V/V% D ₂ O
pH	1,36-11,68; 0,66-13,09	-	298	0,05; 0,333	0,15; 1,00	5
T (K)	293-328	8,78	-	0,333	1,00	5
c (mol/dm ³)	0,0025-0,5	~7	298	-	1,5	5
I (mol/dm ³)	0,15-1	~7	298	0,05	-	5
V/V% D ₂ O	5-100	~7	298	0,333	1,00	-
t (nap)	0-127; 0-133	11,50; 8,78	298	0,05; 0,333	0,15; 1,00	5

3.3. Kiértékelés

3.3.1. NMR-pH titrálások kiértékelése

A ^1H NMR-pH titrálási görbék kiértékeléséhez az OriginPro 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) szoftvert használtuk. A többváltozós, nemlineáris paraméterillesztés a δ - pH adatsorokra a következő összefüggés alapján történt [60]:

$$\delta_{\text{mért}}(\text{pH}) = \frac{\delta_L + \sum_{i=1}^n \delta_{\text{H}_i\text{L}} \cdot 10^{\log\beta_i - i \cdot \text{pH}}}{1 + \sum_{i=1}^n 10^{\log\beta_i - i \cdot \text{pH}}} \quad (3.1)$$

ahol δ_L a teljesen deprotonált részecske kémiai eltolódása, $\delta_{\text{H}_i\text{L}}$ az i számú protont felvett ligandumok kémiai eltolódása, n a molekula protonálható csoportjainak száma, β_i pedig az adott lépést leíró kumulatív protonálódási állandó.

^{77}Se NMR-pH titrálások esetén az inflexiós pontok túl alacsony pH értéknél adódtak, így paraméterillesztés nem volt lehetséges.

3.3.2. *Kvantitatív ¹H NMR spektrumok kiértékelése*

Az NMR spektrumok kvantitatív kiértékelését az ACD/NMR Processor Academic Edition v12.01 (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada) szoftverrel végeztük. A program segítségével a mérések során kapott ¹H NMR spektrumokra Lorentz-görbét illesztettünk automatikus alapvonal és fáziskorrektúra mellett. Egy adott jel integráljának értéke a jelet képző ekvivalens ¹H atomok számával és a vegyület koncentrációjával egyenesen arányos, így az ismert koncentrációban alkalmazott belső standard jel alatti területét felhasználva kiszámíthattuk az egyes anyagok oldatbeli koncentrációját. Amennyiben az esetleges jelátfedések miatt bizonyos jelek integrálása nem volt lehetséges, anyagmérleggel számolva, ismert bemérések alapján határoztuk meg a koncentrációt.

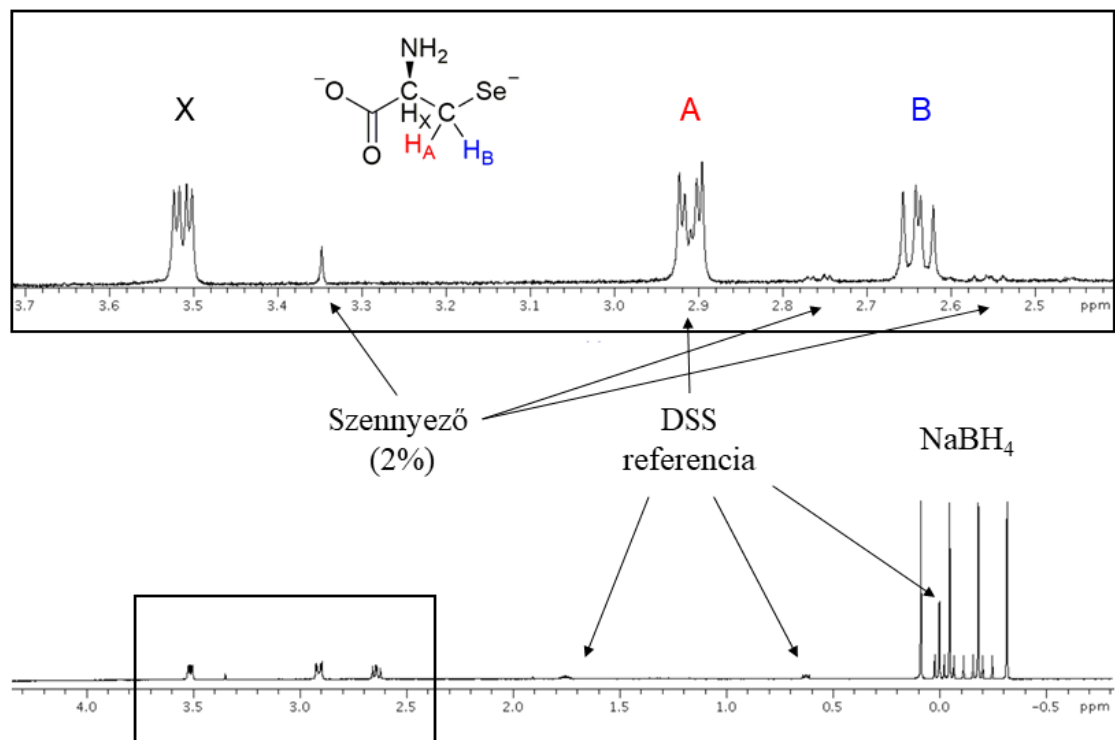
A végeredményként kapott paraméterek közötti korrelációs analízishez az OriginPro 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) szoftvert használtuk.

4. Eredmények

4.1. A szelenocisztein és a szelenocisztin protonálódási állandói

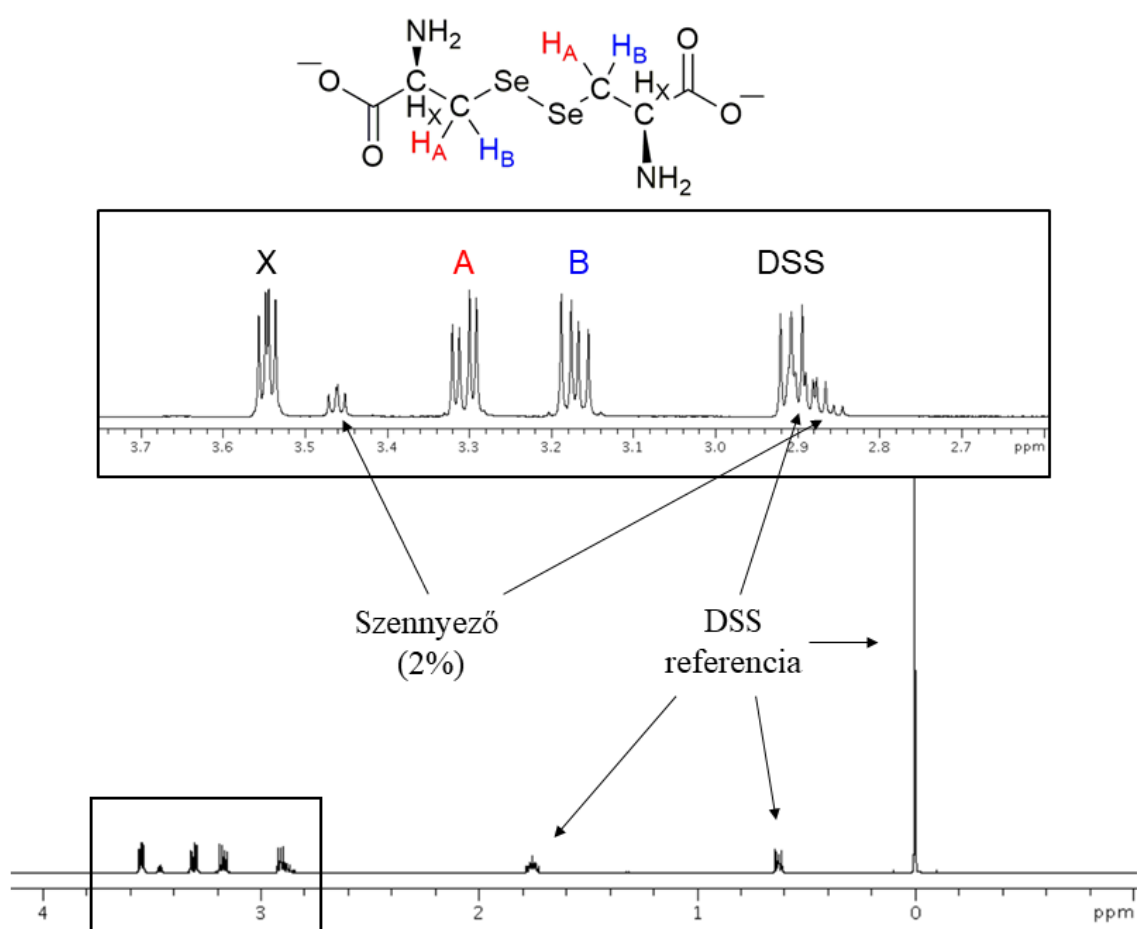
4.1.1. Makroszkopikus protonálódási állandók meghatározása

A CysSeH és a CysSeSeCys ^1H NMR spektrumát és jelhozzárendelését a 8-9. ábra mutatja be.



8. ábra: A szelenocisztein ^1H NMR spektruma lúgos közegben (pH=13), illetve a spektrumban található jelek asszignációja.

A CysSeH ^1H NMR-pH titrálása során NaBH₄-et és DTT-t is adtunk redukálószerként az oldathoz. Bár előbbi kedvező tulajdonsága, hogy a spektrum alifás régiójában (0-4 ppm) nem ad jelet, savas közegben könnyen bomlik és elveszti hatását. Ennek kiküszöbölésére pH = 7 alatt DTT-t is alkalmaztunk. Mivel így a DTT és a vizsgált anyag jelei átfednek, a spektrumok kiértékelése során csak a -CH csoportok kémiai eltolódásának követése volt lehetséges. A CysSeSeCys, illetve dimetil-észter származékának vizsgálatokor szintén a -CH csoportok jelét követtük (10. ábra).

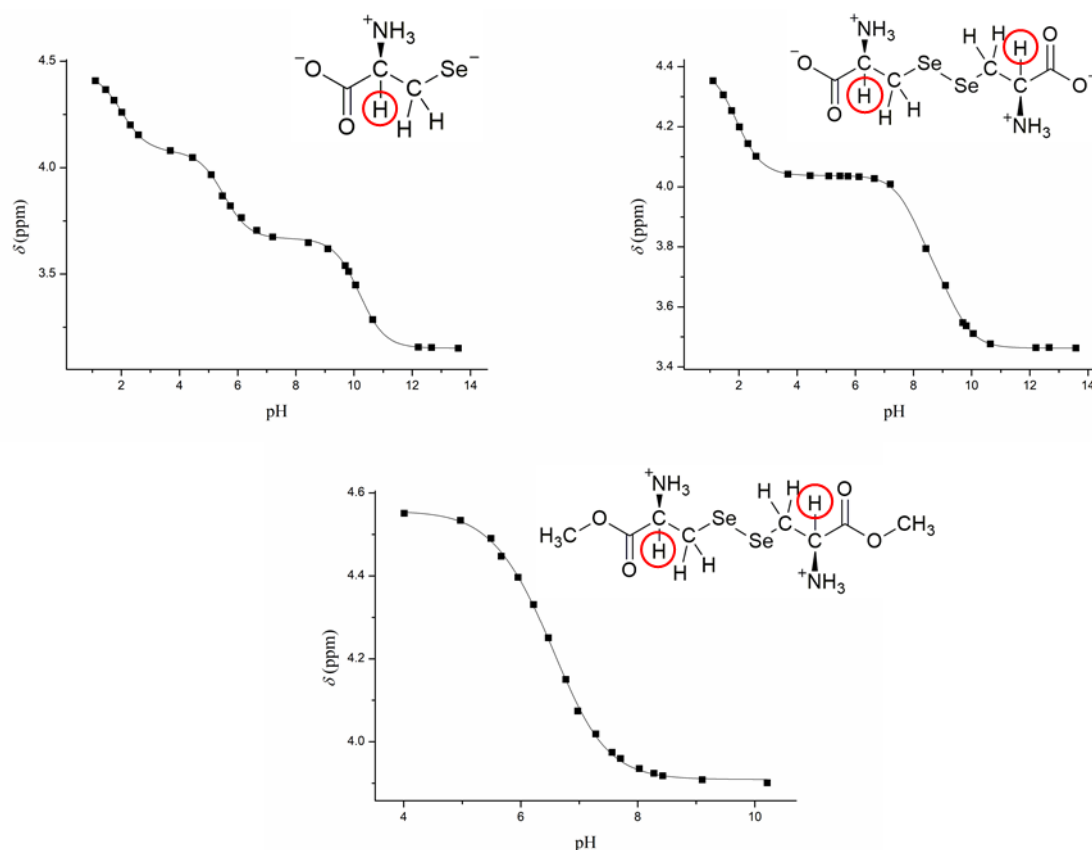


9. ábra: A selenocisztin ^1H NMR spektruma lúgos közegben ($\text{pH}=13$), illetve a spektrumban látható jelek hozzárendelése.

A nemlineáris paraméterillesztéssel kapott makroszkopikus protonálódási állandókat és a regresszió szórását a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: A selenociszteint és selenocisztint, valamint utóbbi dimetil-észterét jellemző protonálódási makroállandók.

paraméter	CysSeH	CysSeSeCys	CysSeSeCys dimetil-észter
$\log K_1$	$10,18 \pm 0,02$	$9,19 \pm 0,02$	$6,74 \pm 0,12$
$\log K_2$	$5,52 \pm 0,03$	$8,22 \pm 0,02$	$5,82 \pm 0,32$
$\log K_3$	$2,01 \pm 0,04$	$2,25 \pm 0,05$	-
$\log K_4$	-	$1,58 \pm 0,07$	-



10. ábra: A selenocisztein (bal felül), a selenocisztin (jobb felül) és a selenocisztin dimetil-észterének (alul) titrálása során felvett pontok és az illesztéssel kapott titrálási görbék. A vizsgálat során a pirossal kiemelt hidrogénatomok jelét követtük.

4.1.2. A selenocisztein mikroszkopikus protonálódási állandóinak meghatározása

A CysSeH makroállandói annyira távol esnek egymástól, hogy a domináns protonálódási útvonalhoz képest a minor útvonalak hatása a titrálási görbékre igen csekély. Kémiai evidenciák alapján belátható, hogy magas pH-ról kiinduló savas titráláskor dominánsan elsőként az amino-, majd a selenolát-, végül a karboxilátcsoport protonálódik, így a meghatározott makroszkopikus protonálódási állandók és a domináns útvonalhoz tartozó mikroállandók értékét egyenlőnek tekinthetjük:

$$\log k^N = \log K_1 \quad (4.1)$$

$$\log k_N^{\text{Se}} = \log K_2 \quad (4.2)$$

$$\log k_{\text{NSe}}^{\text{O}} = \log K_3 \quad (4.3)$$

A szimmetrikus CysSeSeCys gyakorlatilag két CysSeH egységnek tekinthető, ahol a szelénatomokhoz nem hidrogén, hanem kovalens kötéssel keresztül egy másik szelénatom kapcsolódik. A keletkező diszelenid-híd többi sav-bázis csoportra kifejtett hatása jól modellezi a szelenolátcsoport protonált állapotának, a szelenolcsoportnak a hatását. A teljesen deprotonált CysSeSeCys aminos csoportjának protonálódását leíró paraméter ezért megegyeztethető a CysSeH aminos csoportjára vonatkozó mikroállandóval abban az esetben, ha szelenolátcsoportja már protonált állapotban van (a CysSeSeCys $\log k^N$ értékének meghatározása lehetséges csupán a makroállandók ismeretében, ezt később, a 4.1.3 fejezetben tárgyaljuk):

$$\log k_{\text{CysSeH}}^N = \log k_{\text{CysSeSeCys}}^N \quad (4.4)$$

$$\log \Delta E_{\text{N/Se}} = \log k^N - \log k_{\text{Se}}^N \quad (4.5)$$

A CysSeH a cisztein aminosav szelén analógja, rokon szerkezetű molekulák lévén várhatóan sav-bázis funkciók csoportjaik közti kölcsönhatási tényezők értéke megegyezik. Ezt alátámasztja, hogy a CysSeH négy eddig meghatározott mikroállandójából a 4.5 egyenlet alapján kiszámítható $\log \Delta E_{\text{N/Se}}$ értéke $1,29 \pm 0,03$, ami összhangban van a ciszteinre korábban meghatározott $\log \Delta E_{\text{N/S}}$ értékével ($1,31 \pm 0,01$) [101]. Így a cisztein amino- és karboxilátcsoportja, illetve tiolát- és karboxilátcsoportja közötti kölcsönhatási tényezők értékét ($\log \Delta E_{\text{N/O}} = 1,89 \pm 0,01$, $\log \Delta E_{\text{S/O}} = 1,12 \pm 0,03$) felhasználhattuk a hiányzó mikroállandók meghatározásához. Ahogy a kölcsönhatási tényezők (1.15 egyenlet), úgy egyes mikroállandók is redundáns módon, több egyenlet alapján kiszámíthatók, a továbbiakban a legkisebb szórással járó összefüggéseket mutatjuk be.

$$\log k^{\text{Se}} = \log k_{\text{N}}^{\text{Se}} + \log \Delta E_{\text{N/Se}} \quad (4.6)$$

$$\log k^{\text{O}} = \log k_{\text{NSe}}^{\text{O}} + \log \Delta E_{\text{N/O}} + \log \Delta E_{\text{Se/O}} \quad (4.7)$$

$$\log k_{\text{N}}^{\text{O}} = \log k_{\text{NSe}}^{\text{O}} + \log \Delta E_{\text{Se/O}} \quad (4.8)$$

$$\log k_{\text{Se}}^{\text{O}} = \log k_{\text{NSe}}^{\text{O}} + \log \Delta E_{\text{N/O}} \quad (4.9)$$

$$\log k_{\text{O}}^{\text{N}} = \log k^{\text{N}} - \log \Delta E_{\text{N/O}} \quad (4.10)$$

$$\log k_{\text{O}}^{\text{Se}} = \log k_{\text{N}}^{\text{Se}} + \log \Delta E_{\text{N/Se}} - \log \Delta E_{\text{Se/O}} \quad (4.11)$$

$$\log k_{\text{NO}}^{\text{Se}} = \log k_{\text{N}}^{\text{Se}} - \log \Delta E_{\text{Se/O}} \quad (4.12)$$

$$\log k_{\text{SeO}}^{\text{N}} = \log k_{\text{N}}^{\text{N}} - \log \Delta E_{\text{N/O}} - \log \Delta E_{\text{N/Se}} \quad (4.13)$$

Az így kapott protonálódási mikroállandók, illetve a kölcsönhatási tényezők értéke és Gauss-féle hibaterjedést figyelembe véve számított standard hibájuk az 5. táblázatban található.

5. táblázat: A szelenocisztein mikroszkopikus protonálódási állandói és kölcsönhatási tényezői. A domináns protonálódási útvonalat leíró mikroállandók félkövérrel szedve láthatók.

Szelenocisztein					
$\log k_{\text{N}}^{\text{N}}$	$10,18 \pm 0,02$	$\log k_{\text{N}}^{\text{O}}$	$3,13 \pm 0,05$	$\log k_{\text{O}}^{\text{Se}}$	$5,69 \pm 0,05$
$\log k^{\text{Se}}$	$6,81 \pm 0,04$	$\log k_{\text{Se}}^{\text{N}}$	$8,89 \pm 0,02$	$\log k_{\text{NSe}}^{\text{O}}$	$2,01 \pm 0,04$
$\log k^{\text{O}}$	$5,02 \pm 0,05$	$\log k_{\text{Se}}^{\text{O}}$	$3,90 \pm 0,04$	$\log k_{\text{NO}}^{\text{Se}}$	$4,40 \pm 0,06$
$\log k_{\text{N}}^{\text{Se}}$	$5,52 \pm 0,03$	$\log k_{\text{O}}^{\text{N}}$	$8,29 \pm 0,02$	$\log k_{\text{SeO}}^{\text{N}}$	$7,00 \pm 0,04$
$\log \Delta E_{\text{N/Se}}$	$1,29 \pm 0,03$	$\log \Delta E_{\text{N/O}}$	$1,89 \pm 0,01$	$\log \Delta E_{\text{Se/O}}$	$1,12 \pm 0,03$

4.1.3. A szelenocisztein protonálódási mikroállandóinak meghatározása

A CysSeSeCys amino- és karboxilátcsoportjaira jellemző két-két makroállandó (rendre K_1 , K_2 és K_3 , K_4) értéke közti több nagyságrend eltérés, illetve a molekula szimmetrikus szerkezete miatt a domináns protonálódási útvonalat két kétsoportos, szimmetrikus molekula elkülönülő protonálódási folyamatként értelmezhetjük. Az első esetben a teljesen deprotonált molekula két protonálható aminocsoporttal rendelkezik, a protonálódást a $\log K_1$ és $\log K_2$ makroállandók írják le. A $\log K_3$ és $\log K_4$ által jellemzett lépésekben a szimmetrikus molekula két aminocsoportja protonált, további két proton felvétele a karboxilátcsoportokon lehetséges. A szimmetria esetén megállapított 1.13 és 1.14 összefüggések érvényesek, a karboxilátcsoportok protonálódása a következőképpen írható le:

$$\log k_{NN'}^O = \log k_{NN'}^{O'} = \log K_3 - \log 2 \quad (4.14)$$

$$\log k_{NN'O}^{O'} = \log k_{NN'O}^O = \log K_4 + \log 2 \quad (4.15)$$

Az előállított dimetil-észter származék szintén szimmetrikus, azt a minor útvonalat modellezi, ahol a karboxilátcsoportok protonált, az aminocsoportok deprotonált állapotban vannak. Az 1.13 és 1.14 egyenletek alapján:

$$\log k_{OO'}^N = \log k_{OO'}^{N'} = \log K_{1_{\text{észter}}} - \log 2 \quad (4.16)$$

$$\log k_{NOO'}^{N'} = \log k_{NOO'}^N = \log K_{2_{\text{észter}}} + \log 2 \quad (4.17)$$

A CysSeH mikroállandóinak számítása során tett megfontolás itt is alkalmazható, miszerint az amino- és karboxilátcsoportok közti kölcsönhatási tényező értéke közel változatlan rokon vegyületek esetén. Számításaink során a $\log \Delta E_{N/O} = 1,89 \pm 0,01$ [101] értéket használtuk fel, így az összes mikroállandó és kölcsönhatási tényező értéke meghatározható az alábbiak szerint:

$$\log \Delta E_{N/N'} = \log k^N - \log k_{N'}^N \quad (4.18)$$

$$\log \Delta E_{O/O'} = \log k_{NN'}^O - \log k_{NN'O}^O \quad (4.19)$$

$$\log k_{N'O}^N = \log k_{NO'}^{N'} = \log k_{N'}^N - \log \Delta E_{N/O} \quad (4.20)$$

$$\log \Delta E_{N/O'} = \log \Delta E_{N'/O} = \log k_{N'O}^N - \log k_{N'OO'}^N \quad (4.21)$$

$$\log k^O = \log k^{O'} = \log k_{NN'}^O + \log \Delta E_{N/O} + \log \Delta E_{N/O'} \quad (4.22)$$

$$\log k_{N'}^{O'} = \log k_{N'}^{O'} = \log k_{NN'}^O + \log \Delta E_{N/O} \quad (4.23)$$

$$\log k_N^O = \log k_{N'}^{O'} = \log k_{NN'}^O + \log \Delta E_{N/O'} \quad (4.24)$$

$$\log k_{O'}^N = \log k_O^{N'} = \log k^N - \log \Delta E_{N/O'} \quad (4.25)$$

$$\log k_O^N = \log k_{O'}^{N'} = \log k^N - \log \Delta E_{N/O} \quad (4.26)$$

$$\log k_{O'}^{O'} = \log k_O^{O'} = \log k_{NN'O}^O + \log \Delta E_{N/O} + \log \Delta E_{N/O'} \quad (4.27)$$

$$\log k_{NO'}^{O'} = \log k_{N'O}^{O'} = \log k_{NN'O}^O + \log \Delta E_{N/O'} \quad (4.28)$$

$$\log k_{N'O}^N = \log k_{NO}^{N'} = \log k_{NOO'}^{N'} + \log \Delta E_{N/O} \quad (4.29)$$

$$\log k_{N'O}^{O'} = \log k_{NO}^{O'} = \log k_{NN'O}^O + \log \Delta E_{N/O} \quad (4.30)$$

A 4.14-4.30 egyenletek alapján kapott mikroállandókat és standard hibájukat a 6. táblázatba gyűjtöttük össze.

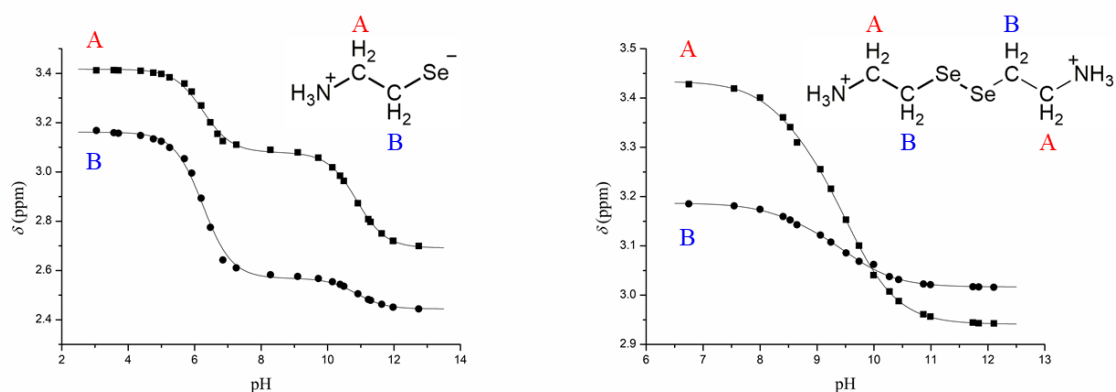
6. táblázat: A szelenocisztin mikroszkopikus protonálódási állandóinak és kölcsönhatási tényezőinek értéke. A domináns protonálódási útvonalat leíró mikroállandók félkövérrel szedve láthatók.

Szelenocisztin			
$\log k^N = \log k^{N'}$	$8,89 \pm 0,02$	$\log k_{NN'}^O = \log k_{NN'}^{O'}$	$1,95 \pm 0,05$
$\log k^O = \log k^{O'}$	$4,40 \pm 0,13$	$\log k_{N'O}^N = \log k_{N'O}^{N'}$	$6,63 \pm 0,04$
$\log k_N^{N'} = \log k_N^N$	$8,52 \pm 0,04$	$\log k_{NO'}^O = \log k_{NO'}^{O'}$	$2,44 \pm 0,14$
$\log k_{N'}^O = \log k_N^{O'}$	$3,84 \pm 0,05$	$\log k_{N'O'}^N = \log k_{NO}^{N'}$	$7,96 \pm 0,12$
$\log k_N^O = \log k_{N'}^{O'}$	$2,51 \pm 0,13$	$\log k_{N'O'}^O = \log k_{NO}^{O'}$	$3,77 \pm 0,07$
$\log k_O^N = \log k_O^{N'}$	$8,33 \pm 0,12$	$\log k_{OO'}^N = \log k_{OO'}^{N'}$	$6,44 \pm 0,12$
$\log k_O^N = \log k_O^{N'}$	$7,00 \pm 0,02$	$\log k_{NN'O}^{O'} = \log k_{NN'O}^O$	$1,88 \pm 0,07$
$\log k_{O'}^O = \log k_O^{O'}$	$4,33 \pm 0,14$	$\log k_{NOO'}^{N'} = \log k_{N'O}^N$	$6,07 \pm 0,12$
$\log \Delta E_{N/N'}$	$0,37 \pm 0,03$	$\log \Delta E_{O/O'}$	$0,07 \pm 0,09$
$\log \Delta E_{N/O'}$ $= \log \Delta E_{N'/O}$	$0,56 \pm 0,12$	$\log \Delta E_{N/O}$ $= \log \Delta E_{N'/O'}$	$1,89 \pm 0,01$

4.2. A szelenociszteamin és a szelenocisztamin protonálódási állandói

4.2.1. Makroszkopikus protonálódási állandók meghatározása

A CysASeH és a CysASeSeCysA titrálása során az A és B jelű metilén csoportok kémiai eltolódását követtük, a kapott adatsorokra szimultán nemlineáris paraméterillesztést végeztük. A titrálási görbéket a 11. ábra mutatja be. A titrálási görbe az egyértelmű jelhozzárendelést is lehetővé tette, ugyanis ^1H NMR spektroszkópia esetén egy adott sav-bázis csoport protonáltsági állapotának megváltozása annál nagyobb eltérést eredményez a mért kémiai eltolódás értékében, minél közelebb helyezkedik el a jelcsoportot képző ekvivalens ^1H magokhoz képest (11. ábra).



11. ábra: A selenociszteamin (balra) és a selenocisztamin (jobbra) titrálása során felvett pontok és az illesztett titrálási görbe.

A meghatározott protonálódási makroállandók értékei a 7. táblázatban láthatók.

7. táblázat: A selenociszteamin és a selenocisztamin makroszkopikus protonálódási állandóinak értéke és a regresszió szórása.

Selenociszteamin		Selenocisztamin	
$\log K_1$	$10,87 \pm 0,03$	$\log K_1$	$9,62 \pm 0,04$
$\log K_2$	$6,26 \pm 0,02$	$\log K_2$	$8,48 \pm 0,12$

4.2.2. Mikroszkopikus protonálódási állandók meghatározása

A mikroállandók kiszámításához szükséges összefüggések hasonlóak a CysSeH, illetve CysSeSeCys molekulák vizsgálatánál ismertetett egyenletekhez. A CysASeH titrálása során kapott makroállandók távol esnek egymástól, így a domináns protonálódási útvonalat képviselő mikroállandók ezekkel gyakorlatilag megegyezők.

$$\log k^N = \log K_1 \quad (4.31)$$

$$\log k_N^{\text{Se}} = \log K_2 \quad (4.32)$$

A vizsgálandó molekulák szerkezete hasonló a CysSeH, illetve a CysSeSeCys szerkezetéhez, a szelenolát- és aminocsoportok mindegyik vegyületben három kötés távolságra vannak egymástól. A korábban meghatározott $\log \Delta E_{N/\text{Se}}$ kölcsönhatási

tényező értéke így a CysASeH/CysASeSeCysA rendszer protonálódási mikroállandóinak kiszámításához felhasználható. Ezen felül a CysASeSeCysA szimmetrikus szerkezete alapján felírható 1.13 és 1.14 egyenleteket korábban már bemutattuk. Ezeket a megfontolásokat téve minden szükséges információ rendelkezésünkre áll a mikroállandók kiszámításához. A CysASeH további protonálódási mikroállandóit a következő egyenletekből kaptuk meg:

$$\log k^{\text{Se}} = \log k_{\text{N}}^{\text{Se}} + \log \Delta E_{\text{N/Se}} \quad (4.33)$$

$$\log k_{\text{Se}}^{\text{N}} = \log k^{\text{N}} - \log \Delta E_{\text{N/Se}} \quad (4.34)$$

Az eredményeket a 8. táblázatban foglaltuk össze.

8. táblázat: A szelenociszteamin és a szelenocisztamin mikroszkopikus protonálódási állandóinak értéke és standard hibája. A domináns protonálódási útvonalat leíró mikroállandók félkövérrel szedve láthatók.

Szelenociszteamin		Szelenocisztamin	
$\log k^{\text{N}}$	$10,87 \pm 0,03$	$\log k^{\text{N}} = \log k^{\text{N}'}$	$9,32 \pm 0,04$
$\log k^{\text{Se}}$	$7,55 \pm 0,03$	$\log k_{\text{N}}^{\text{N}'} = \log k_{\text{N}'}^{\text{N}}$	$8,78 \pm 0,12$
$\log k_{\text{N}}^{\text{Se}}$	$6,26 \pm 0,02$		
$\log k_{\text{Se}}^{\text{N}}$	$9,58 \pm 0,04$		
$\log \Delta E_{\text{N/Se}}$	$1,29 \pm 0,03$	$\log \Delta E_{\text{N/N}'}$	$0,54 \pm 0,13$

4.3. Szelenol-diszelenid egyensúlyi rendszerek részecskespecifikus ^1H , ^{13}C és ^{77}Se NMR kémiai eltolódása

Az egyes mikrorészecskéket jellemző kémiai eltolódások meghatározásához felvettük a molekulák ^1H , ^{13}C és ^{77}Se NMR spektrumait a titrálási görbe platószakaszain. Ezekben a pH-tartományokban (a makroállandók közti több nagyságrendű eltérés értelmében) csaknem kizárólagosan egy adott mikrorészecske fordul elő, így a mért kémiai eltolódás megfeleltethető a domináns részecskére jellemző értékkel. A CysSeH molekula Z NMR-aktív magjára tehát (a mikrorészecskék jelölése a 3. és 4. ábrán látható):

$$\delta_Z^a = \delta_Z^{\text{pH}=13,15} \quad (4.35)$$

$$\delta_Z^b = \delta_Z^{\text{pH}=7,90} \quad (4.36)$$

$$\delta_Z^c = \delta_Z^{\text{pH}=3,80} \quad (4.37)$$

$$\delta_Z^h = \delta_Z^{\text{pH}=0,0} \quad (4.38)$$

Az így kapott részecskespecifikus kémiai eltolódások értékeiből ki tudtuk számítani az adott magra és funkciós csoportra jellemző protonálódás hatására bekövetkező kémiai eltolódás változást ($\Delta\delta_Z^x$), amely megmutatja, hogy egy Z NMR-aktív mag kémiai eltolódását hogyan változtatja meg x sav-bázis funkciós csoport protonálódása. A CysSeH esetén teljesülő összefüggések:

$$\Delta\delta_Z^N = \delta_Z^b - \Delta\delta_Z^a \quad (4.39)$$

$$\Delta\delta_Z^{\text{Se}} = \delta_Z^c - \Delta\delta_Z^b \quad (4.40)$$

$$\Delta\delta_Z^O = \delta_Z^h - \Delta\delta_Z^c \quad (4.41)$$

A domináns részecskét leíró kémiai eltolódásokat, illetve az összes sav-bázis funkciós csoport mindhárom vizsgált NMR-aktív magra gyakorolt $\Delta\delta$ értékét felhasználva a minor részecskékre jellemző kémiai eltolódások kiszámíthatók:

$$\delta_Z^c = \delta_Z^a + \Delta\delta_Z^{\text{Se}} \quad (4.42)$$

$$\delta_Z^d = \delta_Z^a + \Delta\delta_Z^O \quad (4.43)$$

$$\delta_Z^f = \delta_Z^h - \Delta\delta_Z^{\text{Se}} \quad (4.44)$$

$$\delta_Z^g = \delta_Z^h - \Delta\delta_Z^N \quad (4.45)$$

A meghatározott részecskespecifikus kémiai eltolódások értékét a fejezet végén a 9. táblázat foglalja össze. A CysSeSeCys vizsgálatok a két karboxilát- és két aminocsoport protonálódása nem különül el, a molekula bár négy makroállanóval jellemezhető, titrálási görbéjén csupán három platószakasz található. Az így meghatározható három domináns mikrorészecske részecskespecifikus eltolódása:

$$\delta_Z^{a'} = \delta_Z^{\text{pH}=13,15} \quad (4.46)$$

$$\delta_Z^{f'} = \delta_Z^{\text{pH}=5,20} \quad (4.47)$$

$$\delta_Z^{p'} = \delta_Z^{\text{pH}=0,0} \quad (4.48)$$

A megegyező sav-bázis funkciós csoportok együttes protonálódásának hatását tudjuk számszerűen kifejezni, $\Delta\delta_Z^N$ és $\Delta\delta_Z^O$ értékét pedig jó közelítéssel egyenlőnek vehetjük a CysSeH-nél meghatározottal:

$$\Delta\delta_Z^{NN'} = \Delta\delta_Z^{f'} - \Delta\delta_Z^{a'} \quad (4.49)$$

$$\Delta\delta_Z^{OO'} = \Delta\delta_Z^{p'} - \Delta\delta_Z^{f'} \quad (4.50)$$

Az így kapott és importált $\Delta\delta$ értékek különbsége megadja az adott jelcsoporttól távolabb eső funkciós csoportok protonálódásának hatását a kémiai eltolódásra:

$$\Delta\delta_Z^{N'} = \Delta\delta_Z^{NN'} - \Delta\delta_Z^N \quad (4.51)$$

$$\Delta\delta_Z^{O'} = \Delta\delta_Z^{OO'} - \Delta\delta_Z^O \quad (4.52)$$

Bár a CysSeSeCys szimmetrikus, egyes mikrorészecskéi a csoportok protonáltsági állapotától függően aszimmetrikusak. Tekintsük például a teljesen deprotonált, szimmetrikus a' mikrorészecskét. Egyik aminocsoportjának protonálódásával a b' vagy a c' aszimmetrikus, de azonos mikrorészecskéket kapjuk, képződésüket a k^N és $k^{N'}$ megegyező mikroállandók jellemzik. Ezekben a részecskékben ugyanakkor nem ekvivalens a két szelén atom, mivel egyikük egy kötéssel közelebb van a protonált aminocsoporthoz. Így a két mikrorészecske ugyanazzal a két részecskespecifikus ^{77}Se kémiai eltolódással jellemezhető (természetesen ez az állítás a ^1H és a ^{13}C részecskespecifikus kémiai eltolódásokra is igaz):

$$\delta_{Z_1}^{b'} = \delta_{Z_1}^{c'} = \delta_Z^{a'} + \Delta\delta_Z^N \quad (4.53)$$

$$\delta_{Z_2}^{b'} = \delta_{Z_2}^{c'} = \delta_Z^{a'} + \Delta\delta_Z^{N'} \quad (4.54)$$

A továbbiakban a szimmetrikus mikrorészecske-párok közül csak a protonálódó csoporthoz közeli NMR-aktív magok kémiai eltolódásának számítását adjuk meg, ugyanakkor a 4.54 egyenlettel analóg összefüggések minden esetben felírhatók:

$$\delta_Z^{b'} = \delta_Z^{c'} = \delta_Z^{a'} + \Delta\delta_Z^N \quad (4.55)$$

$$\delta_Z^{d'} = \delta_Z^{e'} = \delta_Z^{a'} + \Delta\delta_Z^O \quad (4.56)$$

$$\delta_Z^{g'} = \delta_Z^{j'} = \delta_Z^{b'} + \Delta\delta_Z^O \quad (4.57)$$

$$\delta_Z^{h'} = \delta_Z^{i'} = \delta_Z^{b'} + \Delta\delta_Z^{O'} \quad (4.58)$$

$$\delta_Z^{k'} = \delta_Z^{d'} + \Delta\delta_Z^{O'} \quad (4.59)$$

$$\delta_Z^{l'} = \delta_Z^{m'} = \delta_Z^{f'} + \Delta\delta_Z^O \quad (4.60)$$

$$\delta_Z^{n'} = \delta_Z^{o'} = \delta_Z^{h'} + \Delta\delta_Z^O \quad (4.61)$$

A CysASeH és CysASeSeCysA részecskespecifikus kémiai eltolódásainak meghatározása során a fenti egyenletekkel analóg megfontolásokat alkalmaztunk, a szelenol vegyület esetében meghatározott $\Delta\delta_Z^N$ értéket itt is egyenlőnek tekintettük a diszelenid forma $\Delta\delta_Z^N$ értékével. A két szelenol-diszelenid rendszer mikrorészecskéit leíró részecskespecifikus kémiai eltolódásokat a 9-12. táblázatok foglalják össze. A karboxilát-, illetve karboxilcsoportokban található szénatomokat ^{13}C NMR spektroszkópiában mutatott alacsony érzékenységük miatt nem tudtuk jellemezni.

9. táblázat: A szelenociszteinre meghatározott részecskespecifikus ^{77}Se , ^1H és ^{13}C kémiai eltolódások.

	Szelenocisztein					
	^{77}Se	^1H ($^\alpha\text{CH}$)	^1H ($^\beta\text{CH}_{2a}$)	^1H ($^\beta\text{CH}_{2b}$)	^{13}C ($^\alpha\text{CH}$)	^{13}C ($^\beta\text{CH}_2$)
<i>Mért kémiai eltolódások</i>						
pH=13,15	-233,09	3,152	2,828	2,434	62,55	22,18
pH=7,90	-229,54	3,667	2,935	2,719	60,46	15,85
pH=3,80	-84,06	4,076	3,242	3,190	58,37	20,12
pH=0,0	-72,73	4,449	3,604	3,462	55,98	18,61

Protonálódás hatására bekövetkező kémiai eltolódás változás

$\Delta\delta^{\text{N}}$	3,55	0,515	0,108	0,285	-2,09	-6,33
$\Delta\delta^{\text{Se}}$	145,48	0,409	0,307	0,470	-2,09	4,27
$\Delta\delta^{\text{O}}$	11,33	0,373	0,362	0,272	-2,39	-1,51

Részecskeszpecifikus kémiai eltolódások

δ^{a}	-233,09	3,152	2,828	2,434	62,55	22,18
δ^{b}	-229,54	3,667	2,935	2,719	60,46	15,85
δ^{c}	-87,61	3,561	3,135	2,904	60,46	26,45
δ^{d}	-221,76	3,525	3,189	2,706	60,16	20,67
δ^{e}	-84,06	4,076	3,242	3,190	58,37	20,12
δ^{f}	-218,21	4,040	3,297	2,991	58,07	14,34
δ^{g}	-76,28	3,934	3,497	3,176	58,07	24,94
δ^{h}	-72,73	4,449	3,604	3,462	55,98	18,61

10. táblázat: A szelenocisztinre meghatározott részecskeszpecifikus ^{77}Se , ^1H és ^{13}C kémiai eltolódások.

	Szelenocisztin					
	^{77}Se	^1H ($^{\alpha}\text{CH}$)	^1H ($^{\beta}\text{CH}_{2\text{a}}$)	^1H ($^{\beta}\text{CH}_{2\text{b}}$)	^{13}C ($^{\alpha}\text{CH}$)	^{13}C ($^{\beta}\text{CH}_2$)
<i>Mért kémiai eltolódások</i>						
pH=13,15	281,40	3,463	2,904	2,851	58,40	32,80
pH=5,20	286,60	4,038	3,176	3,142	57,46	31,42
pH=0,0	291,92	4,440	3,289	3,217	55,00	29,41
<i>Protonálódás hatására bekövetkező kémiai eltolódás változás</i>						
$\Delta\delta^{\text{NN'}}$	5,20	0,575	0,273	0,292	-0,94	-1,38
$\Delta\delta^{\text{OO'}}$	5,32	0,402	0,113	0,074	-2,46	-2,01
$\Delta\delta^{\text{N}}$	3,55	0,515	0,108	0,285	-2,09	-6,33
$\Delta\delta^{\text{N'}}$	1,65	0,060	0,165	0,007	1,15	4,95
$\Delta\delta^{\text{O}}$	11,33	0,373	0,362	0,272	-2,39	-1,51
$\Delta\delta^{\text{O'}}$	-6,01	0,029	-0,249	-0,198	-0,07	-0,50
<i>Részecskeszpecifikus kémiai eltolódások</i>						
$\delta^{\text{a'}}$	281,40	3,46	2,904	2,851	58,40	32,80
$\delta^{\text{b'}}$, $\delta^{\text{c'}}$	284,95	3,98	3,011	3,136	56,31	26,47
	283,05	3,52	3,069	2,857	59,55	37,75

δ^d, δ^e	292,73	3,84	3,265	3,123	56,01	31,29
	275,39	3,49	2,654	2,653	58,33	32,30
δ^f	286,60	4,04	3,176	3,142	57,46	31,42
δ^g, δ^j	296,28	4,35	3,373	3,408	53,92	24,96
	277,04	3,55	2,820	2,659	59,48	37,25
δ^h, δ^i	278,94	4,01	2,762	2,938	56,24	25,97
	294,38	3,90	3,431	3,129	57,16	36,24
δ^k	286,72	3,87	3,016	2,925	55,94	30,79
δ^l, δ^m	297,93	4,41	3,538	3,414	55,07	29,91
	280,59	4,07	2,927	2,945	57,39	30,92
δ^n, δ^o	290,27	4,38	3,124	3,210	53,85	24,46
	288,37	3,93	3,181	2,931	57,09	35,74
δ^p	291,92	4,44	3,289	3,217	55,00	29,41

11. táblázat: A szelenociszteaminra meghatározott részecskespecifikus ^{77}Se , ^1H és ^{13}C kémiai eltolódások.

	Szelenociszteamin				
	^{77}Se	^1H ($^\alpha\text{CH}_2$)	^1H ($^\beta\text{CH}_2$)	^{13}C ($^\alpha\text{CH}_2$)	^{13}C ($^\beta\text{CH}_2$)
<i>Mért kémiai eltolódások</i>					
pH=13,15	-233,09	2,691	2,444	48,61	18,31
pH=8,6	-214,16	3,079	2,583	46,67	10,91
pH=1,60	-48,07	3,417	3,168	45,05	15,99
<i>Protonálódás hatására bekövetkező kémiai eltolódás változás</i>					
$\Delta\delta^{\text{N}}$	18,93	0,388	0,139	-1,94	-7,40
$\Delta\delta^{\text{Se}}$	166,09	0,338	0,585	-1,62	5,08
<i>Részecskespecifikus kémiai eltolódások</i>					
δ^a	-233,09	2,691	2,444	48,61	18,31
δ^b	-214,16	3,079	2,583	46,67	10,91
δ^c	-67,00	3,029	3,029	46,99	23,39
δ^d	-48,07	3,417	3,168	45,05	15,99

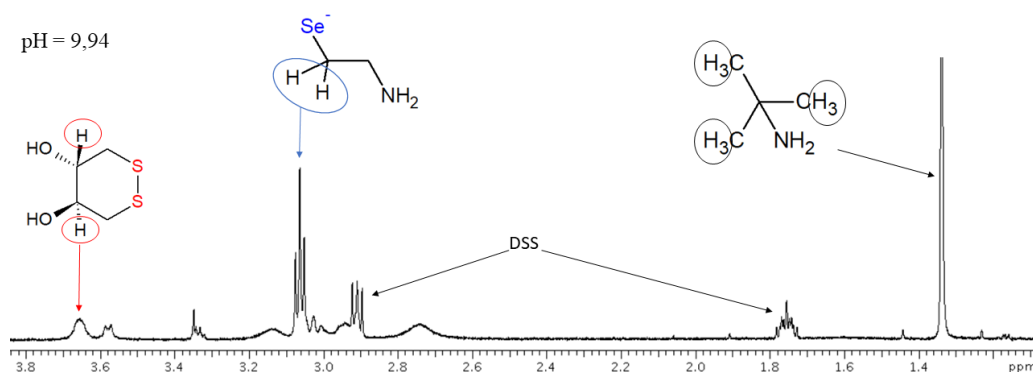
12. táblázat: A szelenocisztaminra meghatározott részecskespecifikus ^{77}Se , ^1H és ^{13}C kémiai eltolódások.

	Szelenocisztamin				
	^{77}Se	^1H ($^{\alpha}\text{CH}_2$)	^1H ($^{\beta}\text{CH}_2$)	^{13}C ($^{\alpha}\text{CH}_2$)	^{13}C ($^{\beta}\text{CH}_2$)
<i>Mért kémiai eltolódások</i>					
pH=13,15	261,82	2,941	3,016	43,69	35,06
pH=0,85	278,22	3,434	3,187	42,83	26,75
<i>Protonálódás hatására bekövetkező kémiai eltolódás változás</i>					
$\Delta\delta^{\text{NN}'}$	16,40	0,493	0,171	-0,86	-8,31
$\Delta\delta^{\text{N}}$	18,93	0,388	0,139	-1,94	-7,4
$\Delta\delta^{\text{N}'}$	-2,53	0,105	0,032	1,08	-0,91
<i>Részecskespecifikus kémiai eltolódások</i>					
$\delta^{\text{a}'}$	261,82	2,941	3,016	43,69	35,06
$\delta^{\text{b}'}, \delta^{\text{c}'}$	280,75	3,329	3,155	41,75	27,66
	259,29	3,046	3,048	44,77	34,15
$\delta^{\text{d}'}$	278,22	3,434	3,187	42,83	26,75

4.4. Szelenol-diszelenid egyensúlyi rendszerek redoxi paramétereinek meghatározása

4.4.1. Részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandók meghatározása

A Módszerek fejezetben ismertetett eljárással felvettük a DTT és a három vizsgálandó redoxirendszer oxidált formája (CysSeSeCys, CysASeSeACys, GSSG) által képzett egyensúlyok kvantitatív ^1H NMR spektrumát, melynek egy példája a 12. ábrán látható.



12. ábra: A szelenociszteamin és a DTT között fennálló egyensúlyról készült kvantitatív ¹H NMR spektrum.

A vizsgálatot csak a pH: 9-11 tartományban tudtuk elvégezni, mivel magasabb (pH > 11) és kissé alacsonyabb (pH: 5-9) értékeken a szelenol és diszelenid formák jelei átfednek, így a kapott spektrumok kvantitatív kiértékelése nagy hibával járt volna, jóval savasabb kémhatású oldatokban (pH: 1-5) pedig a DTT redukáló képessége annyira lecsökken, hogy nem megy végbe a redoxireakció. A kiértékelés során kapott koncentrációkból az 1.16 egyenletbe az aktuális szelenol-diszelenid rendszer megfelelő formáit behelyettesítve kiszámítottuk a látszólagos redoxi egyensúlyi állandókat (K_C). Az 1.16 egyenlet a DTT/GSSG tiol-diszulfid rendszerek közti egyensúlyra is teljesül. A kapott értékeket a 13. táblázat foglalja össze.

13. táblázat: A vizsgált redoxirendszerek ditiotreitollal szemben meghatározott látszólagos redoxi egyensúlyi állandói.

Szelenocisztin/ Szelenocisztein		Szelenocisztamin/ Szelenociszteamin		Glutation-diszulfid/ Glutation	
pH	log K_C	pH	log K_C	pH	log K_C
9,79	-2,88	9,66	-2,31	8,30	-0,41
9,81	-2,20	9,67	-2,43	8,35	-0,03
9,86	-2,87	9,67	-2,23	9,00	0,00
9,90	-2,07	9,68	-2,48	9,07	0,20
9,96	-1,98	9,69	-2,40	9,63	0,41
9,98	-2,04	9,80	-2,37	10,23	0,05
10,02	-2,05	9,89	-2,09	11,01	0,83

9,94	-2,25
9,98	-2,21
10,01	-2,16

Az 1.20 egyenlettel analóg összefüggés mindhárom molekula összes szelenolát- (illetve tiolát-) csoportot tartalmazó mikrorészecskéjére és az abból oxidáció során képződő diszelenid (és diszulfid) részecskére (6. ábra) felírható. A DTT részecskespecifikus redoxi tulajdonságainak meghatározását a szelenol-diszelenid rendszerek vizsgálatára alkalmas pH-tartományban végeztük el, hogy a lehető legpontosabb adatokból tudjunk további következtetéseket levonni. Ahogy korábban részleteztük, ebben a közegben a GSH B részecskéje a domináns, így a DTT/GSSG rendszerre csak k^B értékét állapítottuk meg. A korábban meghatározott protonálódási mikroállandók ismeretében, illetve a K_C látszólagos egyensúlyi állandók értékét felhasználva a részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandók az 1.20 egyenlet alapján kiszámíthatók. Az eredményeket és szórásukat a 14. táblázat tartalmazza.

14. táblázat: A vizsgált redoxirendszerek pH-független, részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandók értéke.

Szelenocisztin/ Szelenocisztein		Szelenocisztamin/ Szelenociszteamin		Glutation-diszulfid/ Glutation	
$\log k^a$	$-2,68 \pm 0,42$	$\log k^a$	$-3,72 \pm 0,19$	$\log k^B$	$0,99 \pm 0,24$
$\log k^b$	$0,27 \pm 0,42$	$\log k^b$	$-0,08 \pm 0,19$		
$\log k^d$	$-1,37 \pm 0,42$				
$\log k^f$	$2,70 \pm 0,42$				

4.4.2. Részecskespecifikus standard redoxipotenciál meghatározása

A DTT és a GSSG között létrejövő kémiai egyensúlyt egymással összefüggő sav-bázis és redoxireakciók alkotják. Az oldatban spontán reakciók nem lépnek fel, az összes redoxirendszer elektródpotenciálja mikroszkopikus szinten is egyenlő.

$$E_{\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}^{2-}} = E_{\text{A}'/\text{A}} = E_{\text{E}'/\text{B}} = \dots \quad (4.64)$$

ahol A'/A és E'/B tetszőlegesen kiválasztott GSSG/GSH párok. Mivel a DTT-re eddig csak látszólagos standard redoxipotenciál ismert, míg a GSH tulajdonságait már részecskespecifikus szinten jellemezték [15, 16, 19, 20], a két molekula kémiai egyensúlyát vizsgálva és kiértékelve megkaphatjuk a DTT²⁻ részecskére jellemző, pH-független standard redoxipotenciál értékét. A 4.64 egyenletet a DTT_{ox.}/DTT²⁻, illetve az E'/B (GSSG/GSH) redoxirendszerekre alkalmazva, az elektródpotenciál értékek a Nernst-egyenlet (1.17) alapján felírhatók a következőképpen:}

$$E^{\circ}_{\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}^{2-}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{DTT}_{\text{ox.}}]}{[\text{DTT}^{2-}]} = E^{\circ}_{\text{E}'/\text{B}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{E}']}{[\text{B}]^2} \quad (4.65)$$

Az egyenletet átrendezve, majd az 1.18 összefüggés alapján k^{B} részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandót behelyettesítve:

$$E^{\circ}_{\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}^{2-}} = E^{\circ}_{\text{E}'/\text{B}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{E}'] \cdot [\text{DTT}^{2-}]}{[\text{B}]^2 \cdot [\text{DTT}_{\text{ox.}}]} = E^{\circ}_{\text{E}'/\text{B}} - \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln k^{\text{B}} \quad (4.66)$$

ahol a 7. ábra jelzéseit használva E' GSSG mikrorészecske, melyet redukálva B GSH részecske képződik. Az összefüggések alapján a DTT_{ox.}/DTT²⁻ redoxirendszer pH-független standard redoxipotenciálja $-0,403 \pm 0,007$ V-nak adódott.}

A CysSeH és a DTT kémiai egyensúlyára teljesülő 4.64 és 4.65 egyenletek a CysSeH b mikrorészecskéjére felírva:

$$E^{\circ}_{\text{b}} = E^{\circ}_{\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}^{2-}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[\text{b}]^2 \cdot [\text{DTT}_{\text{ox.}}]}{[\text{f}] \cdot [\text{DTT}^{2-}]} = E^{\circ}_{\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}^{2-}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln k^{\text{b}} \quad (4.67)$$

A 4.67 egyenlettel analóg összefüggések a többi mikrorészecskére is igazak. A számított részecskespecifikus standard redoxipotenciál értékek és azok szórása a 15. táblázatban láthatók.

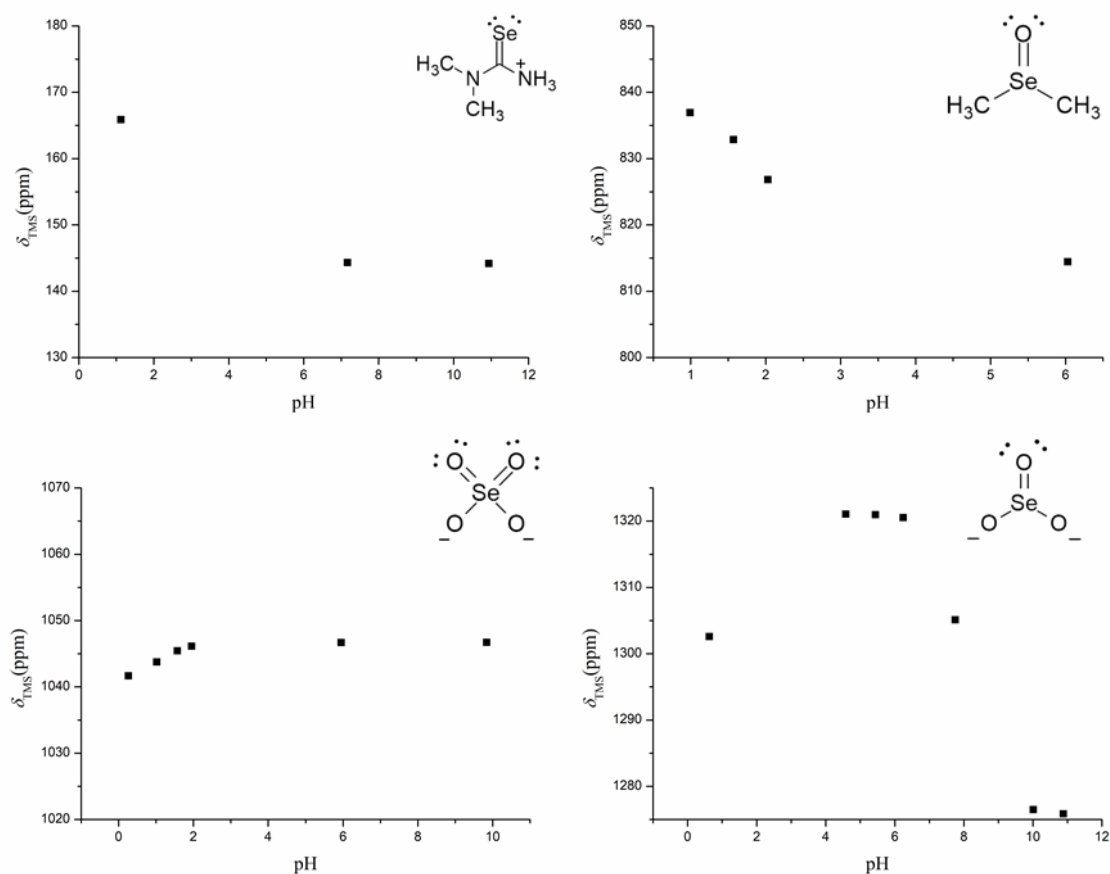
15. táblázat: A vizsgált szelenol-diszelenid redoxirendszerek részecskespecifikus standard redoxipotenciálja.

Szelenocisztin/ Szelenocisztein		Szelenocisztamin/ Szelenociszteamin	
részecske	E° (V)	részecske	E° (V)
a	$-0,482 \pm 0,01$	a	$-0,513 \pm 0,006$
b	$-0,395 \pm 0,01$	b	$-0,405 \pm 0,006$
d	$-0,444 \pm 0,01$		
f	$-0,323 \pm 0,01$		

4.5. A szelenát-ionok ^{77}Se NMR kémiai eltolódásának vizsgálata

4.5.1. Előzetes ^{77}Se NMR-pH titrálások

Vizes oldatok NMR vizsgálata esetén a sav-bázis funkciós csoportokat tartalmazó molekulák protonálódása/deprotonálódása nagymértékben befolyásolja a mért kémiai eltolódást. Mivel a minták pontos pH-ja nem mindig ismert, valamint kiszámítása több segédanyag alkalmazása esetén nehézségekbe ütközik, a referencia vegyületek kiválasztásának elsődleges szempontja volt, hogy az oldat kémhatásának változása minél kisebb eltérést okozzon a mért ^{77}Se kémiai eltolódásokban. Az előzetesen kiválasztott négy molekula, az 1,1-dimetil-szelenokarbamid, a dimetil-szelenoxid, a szelénsav (szelenát-ion) és a szelénessav (szelenit-ion) ^{77}Se NMR pH-titrálásának eredményét a 13. ábra mutatja be.



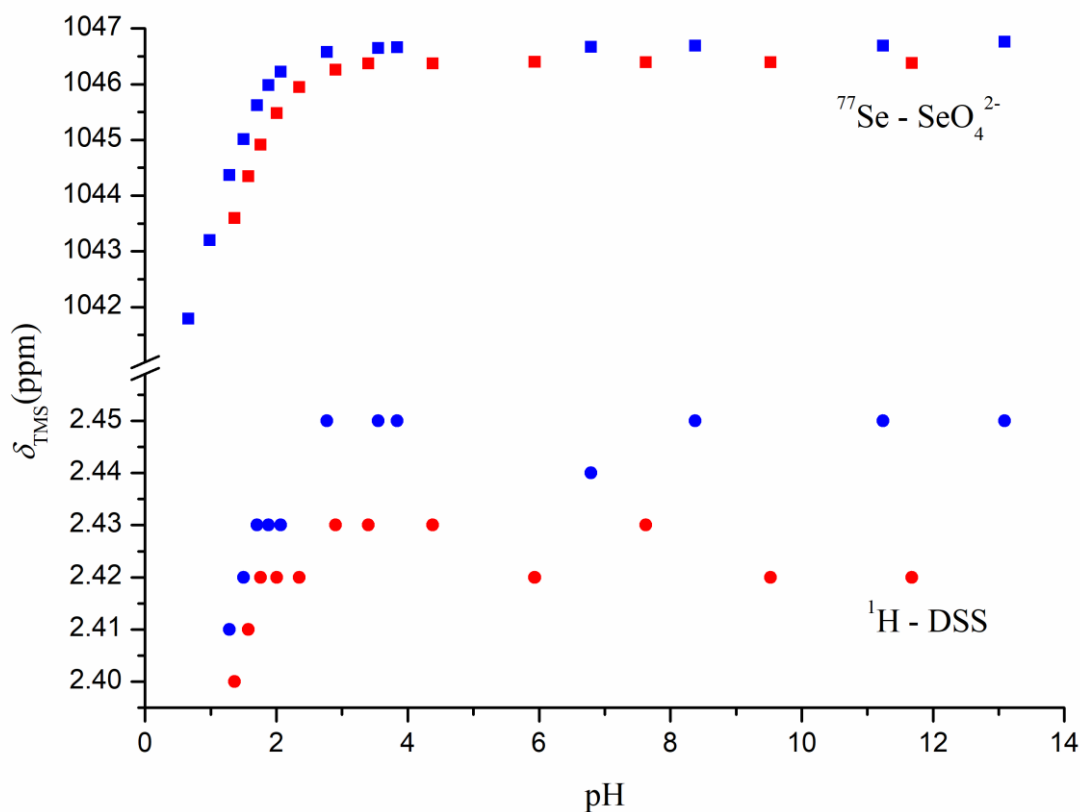
13. ábra: Az 1,1-dimetil-szelenokarbamid (bal felül), a dimetil-szelenoxid (jobb felül), a szelenát-ion (bal alul) és a szelenit-ion (jobb alul) ^{77}Se NMR-pH titrálása. Az összehasonlíthatóság érdekében az y-tengely (δ , ppm) ábrázolt szakasza minden molekula esetén 50 ppm.

Referenciavegyületet keresve a pH változására legkevésbé érzékeny szelénsavval folytattuk méréseinket, a kapott eredményeket a fejezet végén a 16. táblázatban összesítettük. A vizes oldatokhoz DSS-t adtunk belső ^1H referenciaként, kémiai eltolódását a vizsgált mérési körülmények mellett rögzítettük, hogy az eredmények kiértékelésekor a két referencia tulajdonságait össze tudjuk hasonlítani.

4.5.2. A szelénsav ^{77}Se NMR-pH titrálása

Az előzetes titrálás alapján a szelénsav csak erősen savas közben protonálódik, a vizsgált pH-tartomány nagy részében szelenát-ionok formájában található meg. ^{77}Se kémiai eltolódásának változását 0,15 mol/dm³ és 1,0 mol/dm³ ionerősség mellett követtük, utóbbi esetben alacsonyabb pH-értéket tudtunk elérni a titrálás utolsó

pontjaként. A két titrálás során mért szelénsav ^{77}Se , illetve DSS ^1H titrálási görbéje a 14. ábrán látható. A kémiai eltolódásokat minden esetben 0,03 V/V% TMS-t tartalmazó CDCl_3 -mal készült oldathoz viszonyítva adtuk meg.

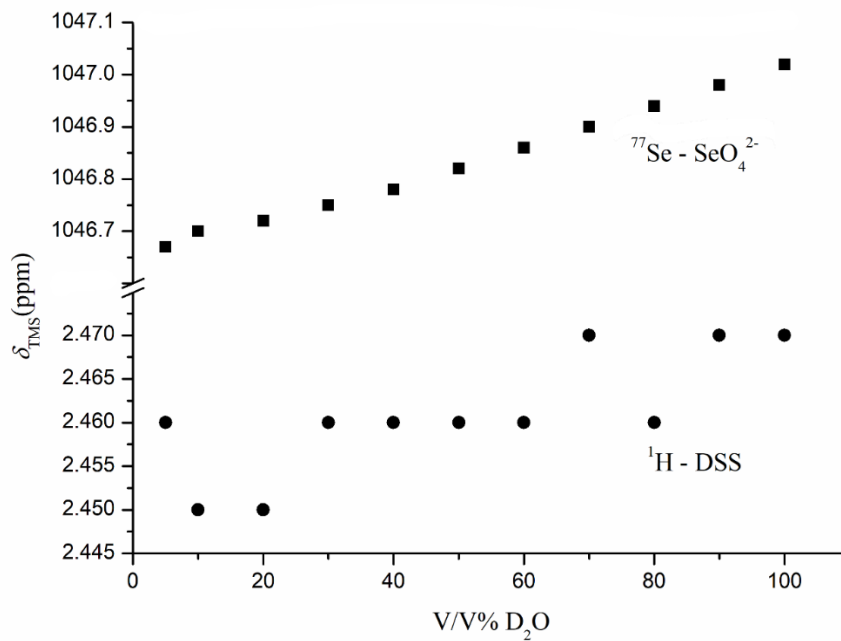


14. ábra: A szelénsav ^{77}Se NMR-pH titrálása $0,15 \text{ mol/dm}^3$ (piros) és $1,0 \text{ mol/dm}^3$ (kék) ionerősség mellett.

A titrálási görbe alapján kijelenthető, hogy $\text{pH} = 3,5$ felett, ahol a referenciavegyület szelenát-ionok formájában van jelen, a kémiai eltolódás csaknem változatlan.

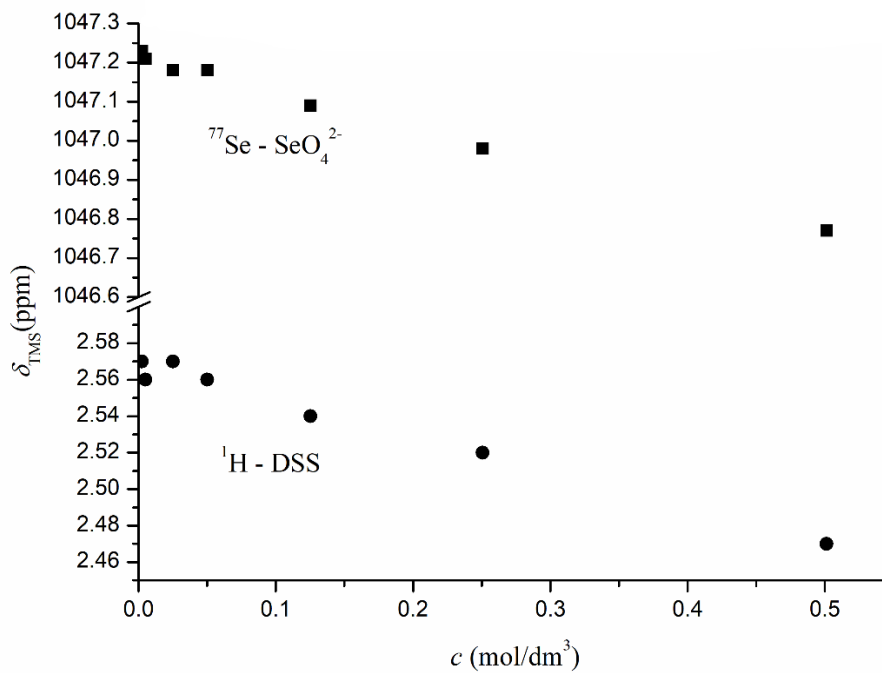
4.5.3. Az oldószer, a koncentráció és az ionerősség hatása

A víz és a nehézvíz (D_2O) relatív permittivitása eltérő, ami hatással lehet a kémiai eltolódásra. Az NMR spektroszkópiában alkalmazott vizes közegű minták D_2O -tartalma gyakran változó (5-100%), fontos tisztázni tehát, hogy különböző arányú $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ elegyekben tapasztalunk-e eltérést a szelenát-ionok ^{77}Se NMR spektrumában (15. ábra). A mintakészítéshez azonos koncentrációjú vizes és nehézvizes nátrium-szelenát oldatokat alkalmaztunk meghatározott arányban.

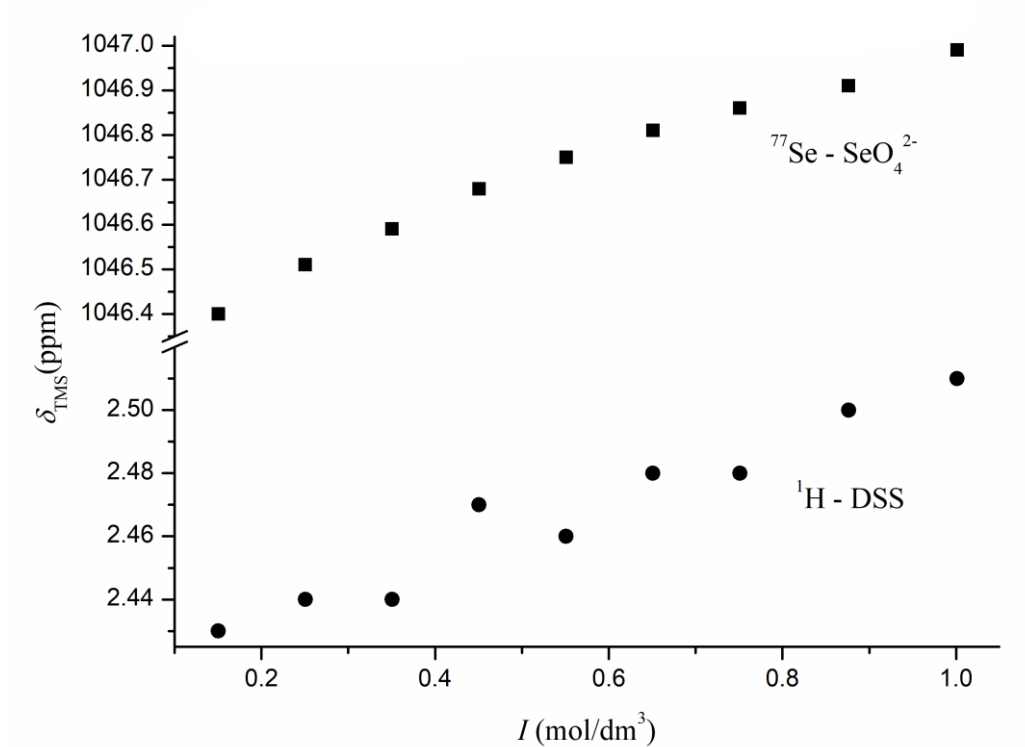


15. ábra: A szelenát-ionok ^{77}Se kémiai eltolódása különböző arányú $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ elegyekben.

Vizsgáltuk továbbá a ^{77}Se jelek változását állandó ionerősségű, de különböző koncentrációjú (16. ábra), valamint állandó koncentrációjú, de eltérő ionerősségű minták (17. ábra) esetében. Az ionerősség beállítására NaCl-ot használtunk.



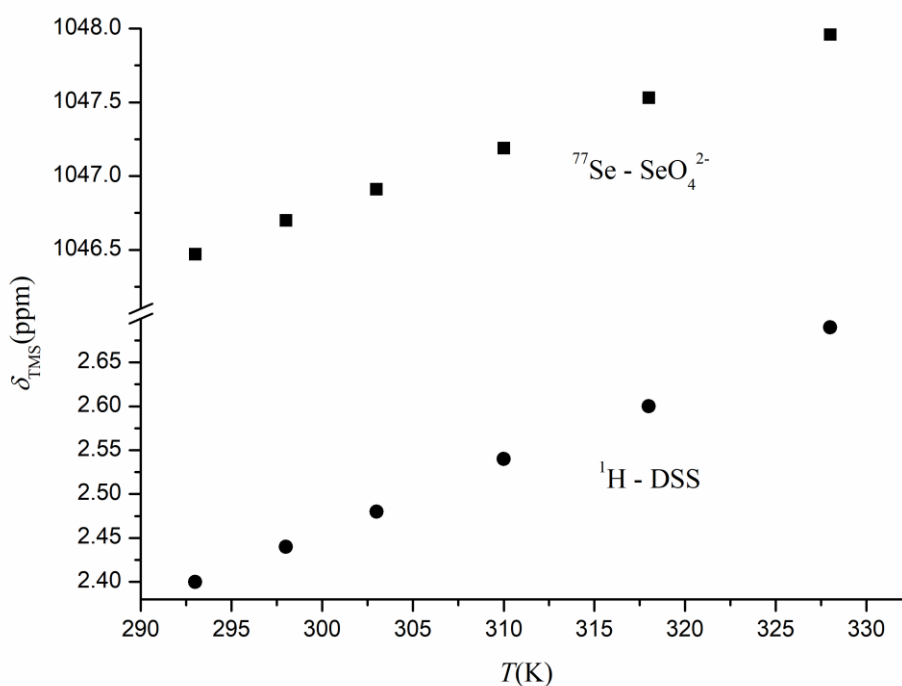
16. ábra: A szelenát-ionok ^{77}Se kémiai eltolódásának koncentráció-függése (állandó ionerősség mellett).



17. ábra: A szelenát-ionok ⁷⁷Se kémiai eltolódásának ionerősség-függése (állandó koncentráció mellett).

4.5.4. Hőmérséklet-függés és eltarthatóság

A kémiai eltolódás hőmérséklet-függésének tanulmányozása különös jelentőségű a szeléntartalmú biomolekulák analizisét tekintve, az általánosnak tekinthető 25°C-tól eltérően a biológiai környezet minél pontosabb modellezéséhez sokszor 37°C hőmérsékletet alkalmaznak. A mérés során felvett pontokra (18. ábra) lineáris egyenletet illesztve a hőmérsékleti koefficiens 0,0422 ppm/K.



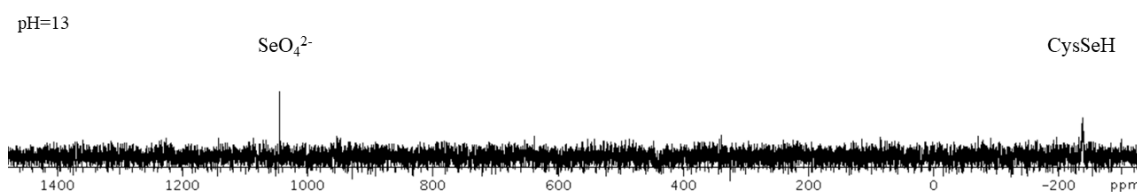
18. ábra: A szelenát-ionok ^{77}Se kémiai eltolódásának hőmérséklet-függése.

A referenciaoldatot szobahőmérsékleten tárolva megvizsgáltuk a minta eltarthatóságát, bizonyos időközönként rögzítve ^{77}Se NMR spektrumát. A $0,15 \text{ mol/dm}^3$ és $1,0 \text{ mol/dm}^3$ ionerősségű oldatokat rendre 127 és 133 napon keresztül figyeltük meg. A kapott eltérés minden más mérési körülmény hatásához képest egy nagyságrenddel kisebbnek bizonyult.

4.5.5. Reaktivitás

Belső standard alkalmazásakor figyelembe kell vennünk a referenciaanyag és a mintában található egyéb vegyületek közti esetleges reakciókat. A szelenát-ionban a szelén legmagasabb, +6 oxidációs állapotában található meg. A szelenol vegyületek jó redukálószerrek, a levegő oxigénjének hatására diszelenid vegyületekké oxidálódnak. Vizsgálatukhoz a diszelenid-hidak felbontása szükséges, az alkalmazott redukálószerrek pedig redukálhatják a szelenát-ionokat is. Mivel pontos redoxipotenciál értékek nem állnak rendelkezésre, empirikus úton győződünk meg arról, hogy a DTT, illetve a NaBH_4 reakcióba lép-e szelenát-ionokkal. Az oldatról készült ^{77}Se NMR spektrum egyértelműen bizonyítja, hogy a szelenát-sók (pl. nátrium-szelenát) szelenol vegyületek vizsgálata során belső kémiai eltolódás referenciaként alkalmazhatók (19. ábra). A nemkívánatos

mellékreakció során képződő szelénessav a ^{77}Se NMR spektrumban 1270 ppm-nél jelent volna meg.



19. ábra: A szelenocisztein és a belső referenciaként alkalmazott szelenát ^{77}Se NMR spektruma.

4.5.6. A szelenát mint vizes közegben alkalmazható belső kémiai eltolódás referencia

Az előbbi fejezetekben a szelenát-ionok ^{77}Se kémiai eltolódását vizsgáltuk hat különböző, a gyakorlatban sokszor változó mérési körülmény függvényében. A kapott eredményeket a már régóta ^1H kémiai eltolódás referenciaként használt DSS jeleinek változásához viszonyítottuk. A 16. táblázatban az egyes mérési paraméterek okozta lehetséges hibát az adott NMR-aktív magra jellemző teljes mérési ablak (^1H : ~46 ppm, ^{77}Se : ~2800 ppm) arányában adtuk meg.

16. táblázat: A szelenát-ionok ^{77}Se és a DSS ^1H kémiai eltolódásának változása különböző mérési körülmények mellett. Az összehasonlíthatóság érdekében a kapott eltéréseket az adott mag mérési ablakának százalékos értékében is megadtuk. A pH hatását, illetve az eltarthatóságot $0,15 \text{ mol/dm}^3$ (felül) és 1 mol/dm^3 (alul) ionerősség mellett vizsgáltuk.

Paraméter	Tartomány	$\Delta\delta_{\text{SeO}_4^{2-}}^{77\text{Se}}$	relatív hiba	$\Delta\delta_{\text{DSS}}^{1\text{H}}$	relatív hiba
T (K)	293-328	1,49	0,053%	0,29	0,63%
c (mol/dm^3)	0,0025-0,5	0,46	0,016%	0,10	0,22%
I (mol/dm^3)	0,15-1	0,59	0,021%	0,08	0,17%
pH	1,36-11,68	2,78	0,099%	0,03	0,07%
	0,66-13,09	4,97	0,178%	0,14	0,30%
V/V% D_2O	5-100%	0,35	0,013%	0,02	0,04%
t (nap)	127	0,05	0,002%	0,02	0,04%
	133	0,08	0,003%	0,01	0,02%

Megbízható pH-tartományok					
pH	3,40-11,68	0,03	0,001%	0,04	0,09%
	3,55-13,09	0,11	0,004%	0,11	0,24%

17. táblázat: A szelenát-ionok ^{77}Se NMR kémiai eltolódását befolyásoló paraméterek hatásának statisztikai vizsgálata. A táblázatban a lineáris regressziós modell független változóinak együtthatói szerepelnek.

konstans	1034,795		
paraméter	együttható	együttható szórása	p
T (K)	0,03895	0,002807	<0,0001
c (mol/dm ³)	-0,08035	0,08755	0,3626
I (mol/dm ³)	0,4339	0,03254	<0,0001
pH	-0,00566	0,00743	0,4493
V/V% D ₂ O	0,001929	0,0006299	0,0033
t (nap)	-0,0003594	0,0004917	0,4678

A megbízható pH-tartományba eső adatokat többváltozós lineáris regressziós analízisnek vetettük alá. A kapott statisztikai eredményeket a 17. táblázat mutatja be. Az eredmények alapján pH = 3,5 felett a pH, a koncentráció és a mintakészítéstől eltelt idő hatása a kémiai eltolódásra a többi független változóhoz képest nem szignifikáns, hiszen ezen faktorok esetében a p-érték az általánosan elfogadott 5%-os szignifikanciaszintnél nagyobb. Az illesztés jóságát mutatja a determinációs együttható értéke ($R^2 = 0,8935$). A hibák véletlenszerűségét ellenőrizve azok normál eloszlást mutattak. A modell alapján számított várható és a mért értékek között maximálisan 0,22 ppm eltérés volt, mely a mérési ablak 0,008%-a. A nem szignifikáns paraméterek elhagyása után felírható redukált modell a következő:

$$\delta_{\text{TMS}}(\text{ppm}) = 1034,795 + 0,03895 \cdot T(\text{K}) + 0,4339 \cdot I(\text{mol/dm}^3) + 0,001929 \cdot \text{V/V\% D}_2\text{O} \quad (4.66)$$

Ahhoz, hogy a különböző ^{77}Se kémiai eltolódásokat bemutató tudományos munkák eredményei összehasonlíthatóak legyenek, a szelenát-ionok kémiai eltolódását nemcsak a DSS és a TMS megfelelő oldatban felvett ^1H eltolódáshoz viszonyítva, hanem az irodalom ajánlása alapján CDCl_3 -mal készült 60 V/V%-os dimetil-szelenid oldat ^{77}Se kémiai eltolódásával szemben is meghatároztuk. A szelenát-ionok kémiai eltolódását a gyakran használt kémiai eltolódás referenciákhoz viszonyítva a 18. táblázat mutatja be.

18. táblázat: A szelenát-ionok mért kémiai eltolódása gyakran használt referenciaanyagokhoz viszonyítva (5% D_2O , $T = 25^\circ\text{C}$, $I = 0,15 \text{ mol/dm}^3$).

Szelenát-ionok ^{77}Se kémiai eltolódása		
0,03 V/V% TMS CDCl_3 -ban	1 mmol/dm ³ DSS	60 V/V% dimetil-szelenid CDCl_3 -ban
1046,40 ppm	1043,96 ppm	1048,65 ppm

5. Megbeszélés

5.1. Szelenol-diszelenid egyensúlyok sav-bázis tulajdonságai

A meghatározott makroállandókat az irodalomban közölt értékekkel (1., 4. és 7. táblázatok) összevetve megállapítható, hogy a CysSeH/CysSeSeCys rendszert leíró makroszkopikus protonálódási állandók egybevágóak, ami az eddig ismeretlen két paraméter megbízhatóságát alátámasztja. A CysASeH molekulára jellemző, általunk mért K_1 protonálódási állandó értéke összhangban van az irodalmi adatokkal, míg K_2 hozzávetőlegesen egy nagyságrenddel nagyobb, mint a korábban meghatározott értékek. A CysASeSeCysA makroállandói szintén egy nagyságrenddel térnek el az irodalmi adatoktól. Az állandók közti eltérést ugyanakkor könnyen okozhatják a már említett, nem egységesen alkalmazott mérési körülmények, amit az is alátámaszt, hogy a ^1H NMR-pH titrálást többször ($n=5$) megismételve, különböző gyártóktól beszerzett anyagokat vizsgálva a mérés hibaértékén belüli eredményeket kaptunk. Ezen felül, a szelenol és diszelenid forma közti összefüggésből számított kölcsönhatási tényező (lsd. később) jó egyezést mutat a korábban meghatározott értékkel, így meggyőződésünk, hogy az általunk leírt makroállandók értéke helyes és reprodukálható. A mikroállandókra kapott eredményeket csak a CysASeH esetén tudjuk összehasonlítani irodalmi adatokkal, a makroállandók közti különbség miatt azonban csak a kölcsönhatási tényező értékét érdemes összevetni, mely eredményeinket alátámasztja (1,29 és 1,46).

A szelenol-diszelenid és tiol-diszulfid rendszerekre meghatározott [101] mikroállandókat összehasonlítva megfigyelhető, hogy az amino- és karboxilátcsoportokat leíró protonálódási állandók értéke csaknem megegyezik. Továbbá, a CysSeH-re meghatározott amino-szelenolát és a cisztein amino-tiolát csoportjaira jellemző kölcsönhatási tényezők a mérési hibánál kisebb mértékben térnek el egymástól (1,29 és 1,31), így megállapítható, hogy akár tiolát-, akár szelenolátcsoportot tartalmaz a molekula, a többi sav-bázis csoport bázicitására hasonló hatást fejtenek ki. Továbbá, a diszelenidek k^{N} és k^{O} , valamint a szelenolok k_{Se}^{N} és k_{Se}^{O} mikroállandói (5., 6. és 8. táblázatok) nagy hasonlóságot mutatnak, bizonyítva, hogy a diszelenid-híd jól modellezi a szelenolcsoport semleges, -SH állapotát, hasonlóan a diszulfid-híd és a tiolcsoport közötti összefüggéshez.

A szelén- és kénatomok különböző tulajdonságai (atomméret, elektronegativitás, polarizálhatóság) jól magyarázzák, hogy a tiolátcsoportokhoz képest a szelenolátcsoportokat jellemző mikroállandók 2-3 nagyságrenddel kisebbek, tehát a szelenolátcsoportok jóval erősebb savi karaktert mutatnak. A redukcióhoz elengedhetetlen anionos forma így egy szélesebb, az emberi vér pH-értékét is magába foglaló pH-tartományban a dominánsan előforduló protonáltsági állapot.

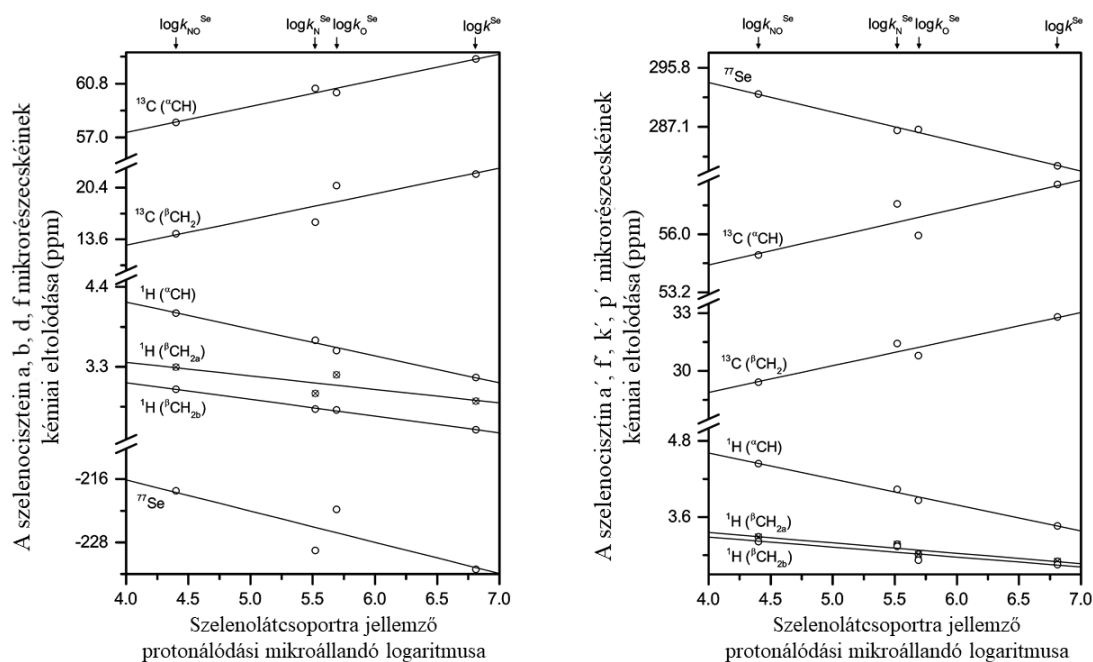
A meghatározott ^1H és ^{13}C kémiai eltolódások egybevágóak a várható értékekkel, ha figyelembe vesszük a mikrorészecskék csoportjainak különböző protonáltsági állapotát. A ^{77}Se kémiai eltolódásait az irodalmi értékekkel összehasonlítva megfigyelhető, hogy az általunk mért adatok hozzávetőlegesen 30 ppm egységgel nagyobbak, az egyes csoportok protonálódásának hatására bekövetkező változás viszont megegyezik. Ebből arra következtethetünk, hogy az eltérést a ^{77}Se kémiai eltolódások referenciapontjának nem egységes alkalmazása okozza. A kapott eredményeket összevetve az is kiderül, hogy a CysSeH és a CysASeH amino- és szelenolátcsoportjainak protonálódása hasonló mértékben változtatja meg a ^{77}Se kémiai eltolódás értékeit.

Az egyes szelenol vegyületek szelenolátcsoportjára jellemző protonálódási mikroállandók és a meghatározott részecskéspecifikus kémiai eltolódások közti korrelációt a 20. ábra mutatja be. Mivel a diszelenid vegyületek redoxi egyensúlyban állnak a szelenolokkal, és ezt az egyensúlyt nagyban befolyásolja a szelenolátcsoportok protonáltsági állapota, feltételeztük, hogy diszelenid vegyületek szelenolokkal egyensúlyban álló mikrorészecskéit leíró kémiai eltolódások szintén összefüggenek az adott szelenolát bázicitással. Az ábrázolt adatpontok és az illesztett egyenesek a 20. ábrán láthatók. Az illesztés egyéb adatait a 19. táblázat foglalja össze.

19. táblázat: A mikroszkopikus protonálódási állandó logaritmusai és a részecskéspecifikus kémiai eltolódás adatokra illesztett egyenesek paraméterei.

	Szenocisztein					
	^{77}Se	^1H ($^{\alpha}\text{CH}$)	^1H ($^{\beta}\text{CH}_{2a}$)	^1H ($^{\beta}\text{CH}_{2b}$)	^{13}C ($^{\alpha}\text{CH}$)	^{13}C ($^{\beta}\text{CH}_2$)
<i>meredekség</i>	-5,92	-0,37	-0,19	-0,23	1,84	3,38
<i>tengelymetszet</i>	-192,5	5,7	4,1	4,0	50,0	-0,7
R^2	0,7249	0,9922	0,7117	0,9978	0,9813	0,7861

Szelenocisztin						
<i>meredekség</i>	-4,34	-0,41	-0,16	-0,16	1,36	1,38
<i>tengelymetszet</i>	311,0	6,2	4,0	3,9	49,1	23,4
R^2	0,9934	0,9890	0,8989	0,7991	0,7777	0,9368



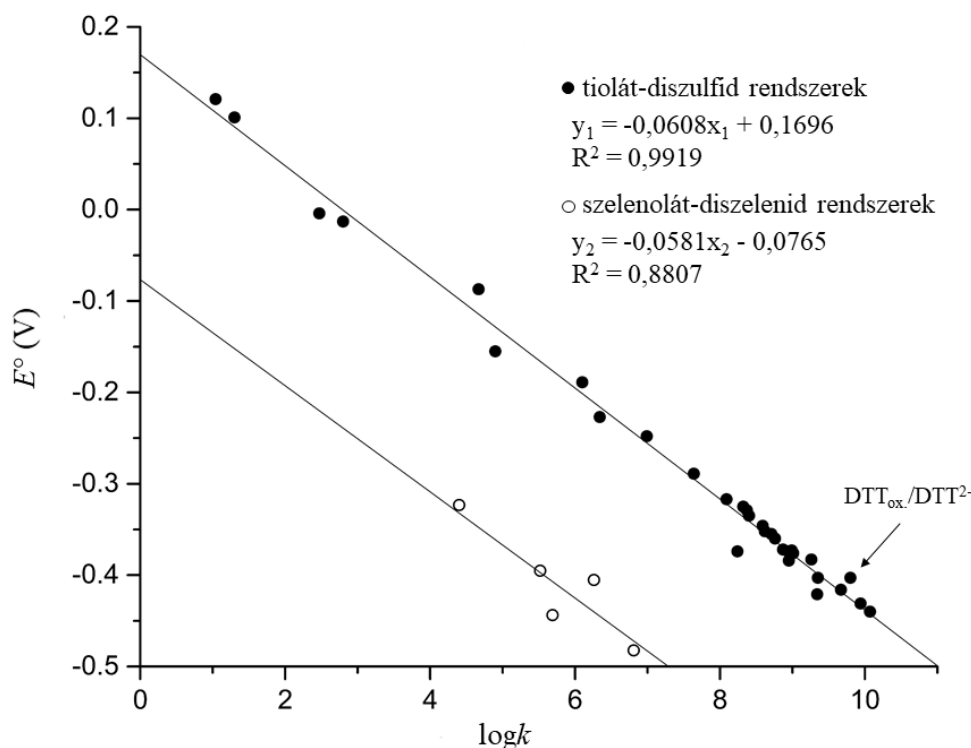
20. ábra: A szelenolátcsoportot leíró mikroszkopikus protonálódási állandó logaritmus és a részecskespecifikus kémiai eltolódás összefüggése.

A 20. ábrán látható, hogy a korreláció az adatok kis száma miatt nem minden esetben tökéletes, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a mérési eredményeken alapuló előrejelzés szempontjából az illesztett egyenes meredeksége különösen fontos, a ^{77}Se magok pedig nagy érzékenységet mutatnak a kémiai környezet megváltozására. A CysSeSeCys esetén kapott pontok sokkal inkább egy egyenesre illeszkednek, és mivel a diszelenid a stabilabb forma, ezek szelénatomjait megvizsgálva képet kaphatunk a belőle képződő, sokszor nehezen előállítható szelenolát bázicitásáról és redoxi tulajdonságáról is.

5.2. Szelenol-diszelenid egyensúlyok redoxi tulajdonságai

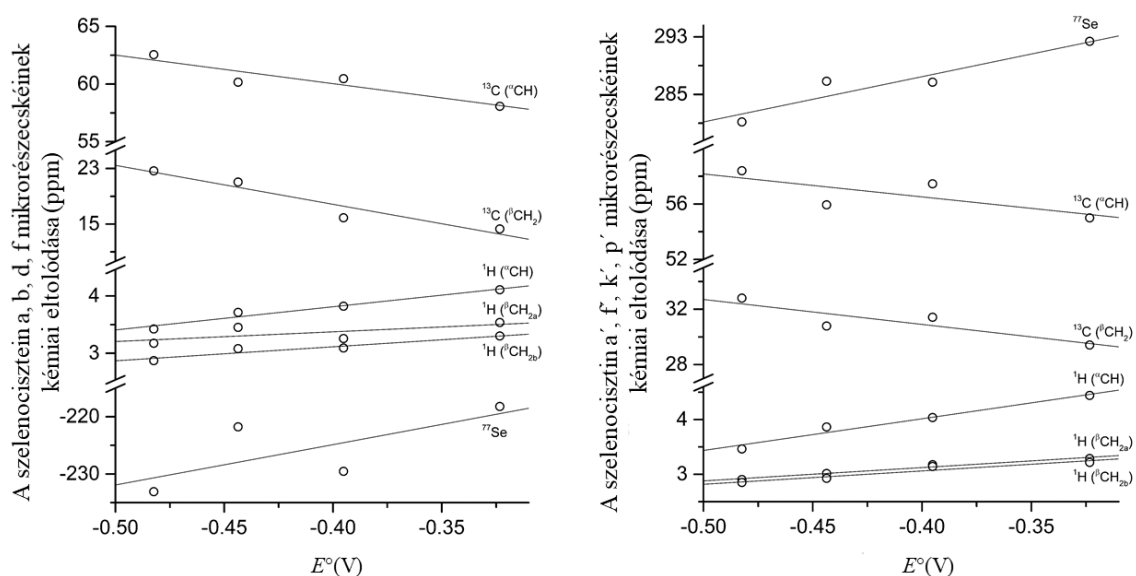
A meghatározott részecskespecifikus standard redoxiponteciálokat tekintve megfigyelhető, hogy a szelenolátcsoportot anionos formában tartalmazó mikrorészecskék eltérő redukálóképességgel rendelkeznek. Példaként vegyük a CysSeH a és f

mikrorészecskéjét, melyek között tekintélyes, 160 mV eltérés tapasztalható. Ebből világossá válik, hogy a pH megváltozása nemcsak a redukcióhoz feltétlenül szükséges szelenolátcsoport előfordulását befolyásolva hat a redukálóképességre, hanem – másodlagos hatásként – a további sav-bázis funkciós csoportok protonálódása is befolyásolja a redoxi tulajdonságokat. Az analóg tiol-diszulfid és szelenol-diszelenid rendszerek adott szelenolát- és tiolátcsoportokra jellemző részecskespecifikus standard redoxipotenciálját bázicitásuk függvényében ábrázolva a két illesztett egyenes szinte teljesen párhuzamos lefutású (21. ábra). Ez arról tanúskodik, hogy a protonálódási állandók megváltozása mindkét rendszer esetén ugyanakkora eltérést okoz a redoxi tulajdonságokban. A két párhuzamos egyenes közti kb. 246 mV különbség pedig úgy értelmezhető, hogy a szelenolátcsoport nemcsak sav-bázis tulajdonsága miatt erősebb redukálószer, azonos bázicitású szelenolát- és tiolátcsoportok esetén a szelén atomok jelenléte erősebb redukálóképességet eredményez.



21. ábra: A tiolát- és szelenolátcsoportok protonálódási mikroállandóinak és standard redoxipotenciáljának összefüggése. A tiolátcsoportok adatait a DTT_{ox}/DDT²⁻ rendszeren kívül korábbi munkák alapján [19] tüntettük fel.

A protonálódási mikroállandókhoz hasonlóan a részecskespecifikus standard redoxipotenciál értékek is korrelációt mutatnak a ^1H , ^{13}C és ^{77}Se kémiai eltolódásokkal (22. ábra, 20. táblázat). Az összefüggéseket felhasználva elmondható, hogy a különböző szeléntartalmú molekulák sav-bázis és redoxi tulajdonságai NMR spektroszkópiás mérésekkel előrejelezhetőek, ami különös jelentőséggel bírhat antioxidáns hatóanyagok tervezésekor és vizsgálatakor, valamint szelenoproteinek csoportspecifikus redoxi és sav-bázis tulajdonságainak – korábban nem meghatározható – előrejelzésében.



22. ábra: A részecskespecifikus standard redoxipotenciál és kémiai eltolódás összefüggése.

20. táblázat: A részecskespecifikus standard redoxipotenciál és kémiai eltolódás adatokra illesztett egyenesek paraméterei.

	Szenocisztein					
	^{77}Se	^1H (αCH)	^1H (βCH_{2a})	^1H (βCH_{2b})	^{13}C (αCH)	^{13}C (βCH_2)
<i>meredekség</i>	70,524	5,251	2,208	3,163	-24,743	-52,487
<i>tengely-metszet</i>	-196,660	5,755	3,970	4,013	50,137	-3,319
<i>R²</i>	0,4979	0,9622	0,4838	0,9095	0,8571	0,9180

Szelenocisztin						
<i>mere- dekség</i>	59,106	5,806	2,446	2,437	-16,557	-18,030
<i>tengely- metszet</i>	310,960	6,338	4,102	4,036	49,893	23,692
R^2	0,8908	0,9660	0,9720	0,9259	0,5578	0,7718

5.3. Vizes közegű ^{77}Se NMR vizsgálatokban alkalmazható belső kémiai eltolódás referencia

A szelenát-ionok ^{77}Se kémiai eltolódását hat mérési paraméter változtatása mellett követtük, a ^{77}Se magok frekvenciája legnagyobb mértékben az oldatban uralkodó pH-ra érzékeny, pH = 3,5 felett azonban ez a hatás nem szignifikáns. Savasabb pH értékeken a várható kémiai eltolódás a titrálási görbék alapján számítható. Hőmérsékleti koeficiense a többi mérési paramétert nem változtatva 0,042 ppm/K, míg a körülmények változtatása mellett, többváltozós statisztikai analízis alapján 0,039 ppm/K. Hőmérséklet-függése a két eddig bevezetett [82, 94] ^{77}Se kémiai eltolódás referenciaanyaghoz hasonlítva a dimetil-szelenid (0,025 ppm/K) és a szelénessav (0,094 ppm/K) tulajdonságai közé esik. A koncentráció, az ionerősség és az oldószer D_2O -tartalma az általunk vizsgált tartományban az előbb említett két mérési körülményhez képest egy nagyságrenddel kisebb eltérést okoz. Statisztikai analízis alapján a koncentráció nem szignifikáns, míg az ionerősség és az oldószer összetétele szignifikáns hatással van a kémiai eltolódásra. Szelenát-ionokat tartalmazó mintát 133 napig szobahőmérsékleten tároltunk, ^{77}Se NMR spektrumát vizsgálva kémiai eltolódása jelentős változást nem mutatott. A jelenleg ismert vízdoldható referenciához, a szelénessavhoz viszonyítva tulajdonságai kedvezőbbek, valamint kísérlettel bizonyítottuk, hogy a szelenát-sók a szelenol vegyületek vizsgálatához szükséges redukív közegben is használhatók, ugyanis sem a segédanyagokkal, sem a mérendő szeléntartalmú anyaggal nem lépnek reakcióba.

Eredményeinket összefoglalva, a szelenátok nagy biztonsággal alkalmazható belső kémiai eltolódás referenciák, kémiai eltolódásuk 5 V/V% D_2O -t tartalmazó oldatban, 25°C -on, $0,15 \text{ mol/dm}^3$ ionerősség mellett 60 V/V% CDCl_3 -os dimetil-szelenidhez képest 1048,65 ppm, míg 0,03 V/V% CDCl_3 -os TMS ^1H jeléhez viszonyítva 1046,40 ppm. Így a ^{77}Se NMR mérésekhez vízdoldható, szeléntartalmú belső kémiai eltolódás referenciavegyületet vezetünk be, elsőként a szakirodalomban.

6. Következtetések

A doktori munka során az irodalomban először határoztunk meg részecskespecifikus paramétereket a CysSeH-CysSeSeCys és a CysASeH-CysASeSeCysA redoxirendszerek összesen 32 mikrorészecskéjére. A kapott mikroszkopikus protonálódási állandók, a részecskespecifikus standard redoxipotenciál értékek és a részecskespecifikus ^1H , ^{13}C és ^{77}Se kémiai eltolódások között korrelációt fedeztünk fel. Mivel a három említett paraméter összefüggése bizonyított, bármely fizikai-kémiai jellemző meghatározása esetén jól prediktálható a másik két tulajdonság. A kémiai eltolódás az egyik legalapvetőbb spektrális paraméter, így a szeléntartalmú biomolekulák sav-bázis és redoxi tulajdonságai, ezáltal szervezetben betöltött szerepük egy egyszerűen és gyorsan kivitelezhető NMR spektrum felvételével és kiértékelésével megjósolható.

A munkacsoport által korábban meghatározott tiol-diszulfid és a szelenol-diszelenid rendszerek redoxi tulajdonságait összehasonlítva elmondható, hogy a szelenolátcsoportok fokozott redukáló képessége nem kizárólag gyengébb bázikus jellegükkel magyarázható, ugyanis standard redoxipotenciáljuk jóval alacsonyabb, mint a tiolátcsoportoké, beleértve az azonos bázicitással rendelkező tiolátcsoportokat is.

A ^{77}Se magok a legérzékenyebbek a kémiai környezet megváltozására, így előrejelző értékük kiemelkedő. Az illesztett egyenes meredekségén alapuló számításokhoz a ^{77}Se NMR igen széles mérési ablaka ellenére szükségünk van a kémiai eltolódások lehető legpontosabb meghatározására, ehhez pedig szükség van egy vizes oldatokban is alkalmazható belső kémiai eltolódás referenciára. A szelénsavat és a nátrium-szelenátot hat különböző mérési körülmény változtatása mellett vizsgáltuk, a ^{77}Se mag spektrális ablakához képest a körülmények okozta maximális eltérés 0,18 %, mely nem haladja meg a DSS ^1H jelének hibahatárát. Ezek alapján a szelenát széles pH-tartományban alkalmazható mint az első szeléntartalmú, vízben oldódó belső kémiai eltolódás referencia. Kémiai eltolódása az eddig gyakorlatban használt dimetil-szelenidhez képest 1048,65 ppm, míg a TMS ^1H jeléhez viszonyítva 1046,40 ppm.

7. Összefoglalás

A redoxi homeosztázis fenntartásában, az oxidatív stressz elleni védelemben és számos egyéb biológiai funkcióban nagy szerepe van a szeléntartalmú fehérjéknek, a szelenoproteineknek. Az említett fehérjéket felépítő aminosavak közül kizárólag a szelenocisztein, illetve – diszelenid-hidak képződésekor – a szelenocisztin tartalmaz szelénatomokat. A doktori munka során a szelenocisztein-szelenocisztin és a szelenociszteamin-szelenocisztamin rendszerek sav-bázis és redoxi tulajdonságait jellemeztük részecskespecifikus szinten. 4 különböző molekula összesen 32 mikrorészecskéjére határoztunk meg mikroszkopikus protonálódási állandót és kölcsönhatási tényezőket, részecskespecifikus ^1H , ^{13}C és ^{77}Se NMR kémiai eltolódásokat, valamint ditiotreitollal alkotott kémiai egyensúlyukat vizsgálva pH-független, részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandót és standard redoxipotenciált. A kapott eredményeket a nagyon hasonló tiol-diszulfid rendszerekkel összevetve megállapítható, hogy a szeléntartalmú vegyületek jóval erősebb redukálószer, mint kéntartalmú analógiáik. Ennek magyarázata, hogy egyrészt a szelenolátcsoport 2-3 nagyságrenddel gyengébb bázikus karaktert mutat a tiolátcsoportnál, ezáltal a redukcióhoz elengedhetetlen anionos forma szélesebb pH-tartományban megtalálható, másrészt az eredmények arra is rámutatnak, hogy azonos sav-bázis tulajdonságokkal rendelkező funkciós csoportok esetén a szelénatom jelenléte erősebb redukálószer eredményez. A mért részecskespecifikus kémiai eltolódásokat a kapott mikroszkopikus protonálódási állandók, illetve részecskespecifikus standard redoxipotenciál értékek függvényében ábrázolva egyértelmű összefüggést kaptunk nemcsak a szelenol, hanem a diszelenid vegyületeket leíró kémiai eltolódások esetében is. A kapott korrelációt magyarázza, hogy mindhárom említett fizikai-kémiai jellemző erősen függ az atommag körüli elektronsűrűségtől. Ezen összefüggések lehetőséget nyitnak egy NMR spektroszkópián alapuló egyszerű, olcsó és gyors módszer kidolgozására, ami előre jelezheti a szervezetben biológiai jelentőséggel bíró szeléntartalmú vegyületek várható viselkedését. A minél pontosabb előrejelzés érdekében megbízható mérési eredményekre van szükség, viszont jelenleg a ^{77}Se NMR kémiai eltolódások bemutatása a szakirodalomban nem egységes, az elérhető eszközök kissé hiányosak. Ezt kiegészítve bevezettük a szelenátot mint ^{77}Se NMR spektroszkópia során alkalmazható vízben oldódó belső kémiai eltolódás referenciát.

8. Summary

Selenium-containing proteins, also called selenoproteins have an important role in maintaining the redox homeostasis, an inevitable precondition of healthy living that combats the agents of oxidative stress in living systems. The only amino acids that contain selenium are selenocysteine and (in case of forming diselenide bridges) selenocystine. In this work the acid-base and redox properties of selenocysteine-selenocystine and selenocysteamine-selenocystamine, two selenol-diselenide redox systems were studied at the microscopic level. Microscopic protonation constants and interactivity parameters, species-specific ^1H , ^{13}C and ^{77}Se NMR chemical shifts were determined, resulting also in species-specific redox equilibrium constants and standard redox potential values for 34 microspecies of the 4 compounds by investigating the chemical equilibria of the compounds with dithiothreitol. The reduction potential of the selenols proved to be much higher than that of the thiolates, the sulfur-containing analogues. This fact can be explained by two major observations based on our experiments. Firstly, the basic character of the selenolate groups is 2-3 orders of magnitude weaker than that of thiolates, so the anionic selenolate, the redox-reactive form of any selenols is present in a wider pH range, including the pH of the blood. In addition, the results showed that even between selenolate and thiolate groups of identical basicity, the stronger reducing potential belongs to the selenolate. The obtained species-specific chemical shifts were plotted against either the microscopic protonation constants or the species-specific standard redox potentials. A correlation analysis showed unambiguous correlations among these three apparently independent parameters. The correlation among these parameters can be interpreted in terms of the electron density on the given nucleus, a highly influential property that strongly affects basicity, chemical shifts and redox behaviour. Based on these correlations a simple, inexpensive, and quick NMR-based method can be introduced to predict the behavior of selenium-containing compounds in the human body. For the proper utility of this method, precise chemical shift data are needed. In the ^{77}Se NMR literature, however, chemical shifts are given relative to various references with limited accuracy and consistency. Therefore, selenate was introduced as a water soluble internal chemical shift standard for ^{77}Se NMR spectroscopy.

9. Irodalomjegyzék

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 44-84.
2. Halliwell B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 16: 33-50.
3. Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82: 47-95.
4. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160: 1-40.
5. Sugamura K, Keaney Jr JF. (2011) Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 51: 978-992.
6. Head E. (2009) Oxidative damage and cognitive dysfunction: antioxidant treatments to promote healthy brain aging. *Neurochem Res*, 34: 670-678.
7. Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, Gao S, Puigserver P, Brugge JS. (2009) Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 461: 109-113.
8. Zilmer M, Soomets U, Rehema A, Langel U. (2005) The glutathione system as an attractive therapeutic target. *Drug Des Rev*, 2: 121-127.
9. Gilbert HF. (1995) [2] Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability. *Methods Enzymol*, 251: 8-28.
10. Kosower NS, Kosower EM. (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol*, 54: 109-160.
11. Millis KK, Weaver KH, Rabenstein DL. (1993) Oxidation/reduction potential of glutathione. *J Org Chem*, 58: 4144-4146.
12. Rabenstein DL. (1973) Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. I. Microscopic ionization constants of glutathione and methylmercury-complexed glutathione. *J Am Chem Soc*, 95: 2797-2803.

13. Pirie NW, Pinhey KG. (1929) The titration curve of glutathione. *J Biol Chem*, 84: 321-333.
14. Pillai L, Boss RD, Greenberg MS. (1979) On the role of solvent in complexation equilibria. II. The acid-base chemistry of some sulfhydryl and ammonium-containing amino acids in water—acetonitrile mixed solvents. *J Solution Chem*, 8: 635-646.
15. Noszál B, Szakács Z. (2003) Microscopic protonation equilibria of oxidized glutathione. *J Phys Chem B*, 107: 5074-5080.
16. Mirzahosseini A, Somlyay M, Noszál B. (2015) The comprehensive acid–base characterization of glutathione. *Chem Phys Lett*, 622: 50-56.
17. Martin R, Edsall J. (1958) Glutathione: ionization in basic solutions and molecular rearrangement in strongly acid solutions. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, 40: 1763-1771.
18. Li NC, Gawron O, Bascuas G. (1954) Stability of Zinc Complexes with Glutathione and Oxidized Glutathione. *J Am Chem Soc*, 76: 225-229.
19. Mirzahosseini A, Noszál B. (2016) Species-specific standard redox potential of thiol-disulfide systems: a key parameter to develop agents against oxidative stress. *Sci Rep*, 6: 37596.
20. Mirzahosseini A, Somlyay M, Noszál B. (2015) Species-Specific Thiol-Disulfide Equilibrium Constant: A Tool To Characterize Redox Transitions of Biological Importance. *J Phys Chem B*, 119: 10191-10197.
21. Keire DA, Strauss E, Guo W, Noszál B, Rabenstein DL. (1992) Kinetics and equilibria of thiol disulfide interchange reactions of selected biological thiols and related molecules with oxidized glutathione. *J Org Chem*, 57: 123-127.
22. Koide T, Itoh H, Otaka A, Yasui H, Kuroda M, Esaki N, Soda K, Fujii N. (1993) Synthetic Study on Selenocystine-Containing Peptides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 41: 502-506.
23. Singh R, Whitesides GM. (1991) Selenols catalyze the interchange reactions of dithiols and disulfides in water. *J Org Chem*, 56: 6931-6933.
24. Whitesides GM, Lilburn JE, Szajewski RP. (1977) Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *J Org Chem*, 42: 332-338.

25. Cleland WW. (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3: 480-482.
26. Eldjarn L, Pihl A. (1957) The Equilibrium Constants and Oxidation-Reduction Potentials of Some Thiol-Disulfide Systems. *J Am Chem Soc*, 79: 4589-4593.
27. Kolthoff I, Stricks W, Kapoor R. (1955) Equilibrium constants of exchange reactions of cystine with glutathione and with thioglycolic acid both in the oxidized and reduced state. *J Am Chem Soc*, 77: 4733-4739.
28. Szajewski RP, Whitesides GM. (1980) Rate constants and equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions involving oxidized glutathione. *J Am Chem Soc*, 102: 2011-2026.
29. Wilson JM, Bayer RJ, Hupe D. (1977) Structure-reactivity correlations for the thiol-disulfide interchange reaction. *J Am Chem Soc*, 99: 7922-7926.
30. Flohe L, Günzler W, Schock H. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett*, 32: 132-134.
31. Arthur J. (2001) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 57: 1825-1835.
32. Maiorino FM, Brigelius-Flohé R, Aumann K, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. (1995) [5] Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, 252: 38-53.
33. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. (1987) Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 256: 677-686.
34. Chu F-F, Doroshov J, and, Esworthy R. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, 268: 2571-2576.
35. Köhrle J. (2000) The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci*, 57: 1853-1863.
36. Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, Germain DL, Galton VA. (1995) Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem*, 270: 26786-26789.
37. Croteau W, Whittemore SL, Schneider MJ, Germain DL. (1995) Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem*, 270: 16569-16575.

38. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J. (1990) Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 173: 1143-1149.
39. Tamura T, Stadtman TC. (1996) A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 1006-1011.
40. Maiorino M, Aumann K-D, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L. (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler*, 376: 651-660.
41. Yasuda K, Watanabe H, Yamazaki S, Toda S. (1980) Glutathione peroxidase activity of D,L-selenocystine and selenocystamine. *Biochem Biophys Res Commun*, 96: 243-249.
42. Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A. (1995) Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem*, 270: 11761-11764.
43. Arteel GE, Briviba K, Sies H. (1999) Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen. *Chem Res Toxicol*, 12: 264-269.
44. Chen T, Wong Y-S. (2009) Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 63: 105-113.
45. Chen T, Wong Y-S. (2009) Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. *Int J Biochem Cell Biol*, 41: 666-676.
46. Chen T, Wong Y-S. (2008) Selenocystine induces apoptosis of A375 human melanoma cells by activating ROS-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*, 65: 2763.
47. And MH, Ledinko N. (1980) Inhibition of influenza A virus replication by rifampicin and selenocystamine. *J Med Virol*, 6: 169-174.

48. Chaudiere J, Courtin O, Leclaire J. (1992) Glutathione oxidase activity of selenocystamine: a mechanistic study. *Arch Biochem Biophys*, 296: 328-336.
49. Yang Z, Yang Y, Zhang L, Xiong K, Li X, Zhang F, Wang J, Zhao X, Huang N. (2018) Mussel-inspired catalytic selenocystamine-dopamine coatings for long-term generation of therapeutic gas on cardiovascular stents. *Biomaterials*, 178: 1-10.
50. Weng Y, Song Q, Zhou Y, Zhang L, Wang J, Chen J, Leng Y, Li S, Huang N. (2011) Immobilization of selenocystamine on TiO₂ surfaces for in situ catalytic generation of nitric oxide and potential application in intravascular stents. *Biomaterials*, 32: 1253-1263.
51. Chen S, An J, Weng L, Li Y, Xu H, Wang Y, Ding D, Kong D, Wang S. (2014) Construction and biofunctional evaluation of electrospun vascular graft loaded with selenocystamine for in situ catalytic generation of nitric oxide. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 45: 491-496.
52. Mirzahosseini A, Noszál B. (2016) Species-specific thiol-disulfide equilibrium constants of othiol A and penicillamine with glutathione. *RSC Adv*, 6: 26757-26764.
53. Tanaka H, Sakurai H, Yokoyama A. (1970) Acid Dissociation of Selenocysteamine (2-Aminoethaneselenol). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 18: 1015-1020.
54. Tan K-S, Arnold AP, Rabenstein DL. (1988) Selenium-77 nuclear magnetic resonance studies of selenols, diselenides, and selenenyl sulfides. *Can J Chem*, 66: 54-60.
55. Sugiura Y, Tamai Y, Tanaka H. (1978) Selenium protection against mercury toxicity: high binding affinity of methylmercury by selenium-containing ligands in comparison with sulfur-containing ligands. *Bioinorg Chem*, 9: 167-180.
56. Huber R, Criddle R. (1967) Comparison of the chemical properties of selenocysteine and selenocystine with their sulfur analogs. *Arch Biochem Biophys*, 122: 164-173.
57. Arnold AP, Tan K-S, Rabenstein DL. (1986) Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. 23. Complexation of

- methylmercury by selenohydril-containing amino acids and related molecules. *Inorg Chem*, 25: 2433-2437.
58. Wegscheider R. (1895) Über die Affinitätsconstanten der mehrbasischen Säuren und der Estersäuren. *Monatsh Chem Verw Teile Anderer Wiss*, 16: 153-158.
 59. Szakács Z, Kraszni M, Noszál B. (2004) Determination of microscopic acid–base parameters from NMR–pH titrations. *Anal Bioanal Chem*, 378: 1428-1448.
 60. Szakács Z, Noszál B. (1999) Protonation microequilibrium treatment of polybasic compounds with any possible symmetry. *J Math Chem*, 26: 139.
 61. Loewenstein A, Roberts JD. (1960) The Ionization of Citric Acid Studied by the Nuclear Magnetic Resonance Technique. *J Am Chem Soc*, 82: 2705-2710.
 62. Ebert L. (1926) Determination of double ions in solutions of ampholytes. *Z Phys Chem*, 121: 385-400.
 63. Neuberger A. (1936) Dissociation constants and structures of glutamic acid and its esters. *Biochem J*, 30: 2085.
 64. Noszál B, Sándor P. (1989) Rota-microspeciation of aspartic acid and asparagine. *Anal Chem*, 61: 2631-2637.
 65. Kovács Z, Hosztafi S, Noszál B. (2006) Site-specific acid–base properties of pholcodine and related compounds. *Anal Bioanal Chem*, 386: 1709-1716.
 66. Santos MA, Esteves MA, Vaz MC, da Silva JJF, Noszál B, Farkas E. (1997) Microscopic acid–base equilibria of a synthetic hydroxamate siderophore analog, piperazine-1,4-bis(N-methylacetohydroxamic acid). *J Chem Soc Perkin 2*, 10: 1977-1983.
 67. Marosi A, Kovács Z, Béni S, Kökösi J, Noszál B. (2009) Triprotic acid–base microequilibria and pharmacokinetic sequelae of cetirizine. *Eur J Pharm Sci*, 37: 321-328.
 68. Burger K, Sipos P, Veber M, Horváth I, Noszál B, Löw M. (1988) Formation microequilibria of proton, calcium and magnesium complexes of the γ -carboxyglutamate ion and related compounds. *Inorg Chim Acta*, 152: 233-239.
 69. Borkovec M, Spiess B. (2004) Microscopic ionization mechanism of inositol tetrakisphosphates. *Phys Chem Chem Phys*, 6: 1144-1151.
 70. Borkovec M, Brynda M, Koper GJ, Spiess B. (2002) Resolution of microscopic protonation mechanisms in polyprotic molecules. *Chimia (Aarau)*, 56: 695-701.

71. Gajda T, Henry B, Delpuech J-J. (1994) Multinuclear NMR and potentiometric study on tautomerism during protonation and zinc (II) complex formation of some imidazole-containing peptide derivatives. *J Chem Soc Perkin 2*, 1: 157-164.
72. Besse D, Budisa N, Karnbrock W, Minks C, Musiol H-J, Pegoraro S, Siedler F, Weyher E, Moroder L. (1997) Chalcogen-analogs of amino acids. Their use in X-ray crystallographic and folding studies of peptides and proteins. *Biol Chem*, 378: 211-218.
73. Walchli H. (1953) Nuclear Magnetic Resonance Measurements of Selenium. *Phys Rev*, 90: 331.
74. Dharmatti S, Weaver Jr H. (1952) Magnetic Moment of Se 77. *Phys Rev*, 86: 259.
75. Lardon M. (1970) Selenium and proton nuclear magnetic resonance measurements on organic selenium compounds. *J Am Chem Soc*, 92: 5063-5066.
76. Harris R. (1976) NMR and the periodic table. *Chem Soc Rev*, 5: 1-22.
77. Cullen ER, Guzic FS, Murphy CJ, Wong TC, Andersen KK. (1981) Selenium-77 NMR studies of some organoselenium compounds containing-selenium double bonds. *J Am Chem Soc*, 103: 7055-7057.
78. Arnold D, Dryburgh J, Ebsworth E, Rankin D. (1972) Exchange reactions of bromodifluorophosphine with silyl and germyl derivatives of the Group VI elements. *J Chem Soc Dalton Trans*, 22: 2518-2522.
79. Harris RK, Becker ED, Menezes SMCd, Granger P, Hoffman RE, Zilm KW. (2008) Further conventions for NMR shielding and chemical shifts (IUPAC Recommendations 2008). *Pure Appl Chem*, 80: 59-84.
80. Harris RK, Becker ED, Menezes SMCd, Goodfellow R, Granger P. (2001) NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem*, 73: 1795-1818.
81. Birchall T, Gillespie R, Vekris S. (1965) Nuclear magnetic resonance spectroscopy of some selenium compounds. *Can J Chem*, 43: 1672-1679.
82. Luthra N, Dunlap R, Odom J. (1983) The use of dimethyl selenide as a chemical shift reference in ⁷⁷Se NMR spectroscopy. *J Magn Reson*, 52: 318-322.
83. McFarlane W, Wood R. (1972) Nuclear magnetic double-resonance studies of organo-selenium compounds. *J Chem Soc Dalton Trans*, 13: 1397-1402.

84. Gronowitz S, Konar A, Hörnfeldt AB. (1977) ^{77}Se NMR studies of organoselenium compounds: III—substituent effects in 4, 4'-disubstituted diphenyl selenides and 4, 4'-disubstituted diphenylmethanes studied by ^1H , ^{13}C and ^{77}Se spectroscopy. *Org Magn Reson*, 9: 213-217.
85. Gronowitz S, Johnson I, Hornfeldt AB. (1975) Se-77 NMR-Studies of Organoselenium Compounds .1. Se-77 NMR Parameters of Monosubstituted Selenophenes. *Chem Scr*, 8: 8-14.
86. Gronowitz S, Johnson I, Hornfeldt AB. (1975) Nuclear Magnetic-Resonance of Aromatic Heterocycles .9. Correlation of C-13 NMR Shifts of Monosubstituted Thiophenes with Reactivity Parameters. *Chem Scr*, 7: 76-84.
87. Fredga A, Gronowitz S, Hornfeldt AB. (1975) Se-77 NMR-Studies of Organoselenium Compounds .2. Arylmethylseleno Substituted Alkanoic Acids, Arylmethyl Selenides, Diselenides, and Diselenocyanates. *Chem Scr*, 8: 15-19.
88. Kohne B, Lohner W, Praefcke K, Jakobsen HJ, Villadsen B. (1979) Spectroscopic investigations: XVII. ^{77}Se and ^{125}Te NMR resonances of some selenol and tellurol esters. *J Organomet Chem*, 166: 373-377.
89. Pekonen P, Hiltunen Y, Laitinen RS, Pakkanen TA. (1990) Selenium-77 NMR spectroscopic study of fluxional selenium sulfide 1, 2, 3, 4, 5- Se_5S_2 . *Inorg Chem*, 29: 2770-2773.
90. Koch W, Lutz O, Nolle A. (1978) ^{77}Se and ^{125}Te nuclear magnetic resonance investigations in II–VI and IV–VI compounds. *Z Phys*, 289: 17-20.
91. Günther B, Kanert O. (1985) Nuclear-magnetic-resonance study of crystalline tellurium and selenium. *Phys Rev B*, 31: 20.
92. Lamoureux M, Milne J. (1990) Selenium chloride and bromide equilibria in aprotic solvents; a ^{77}Se NMR study. *Polyhedron*, 9: 589-595.
93. Rabenstein DL, Tan KS. (1988) ^{77}Se NMR studies of bis(alkylthio)selenides of biological thiols. *Magn Reson Chem*, 26: 1079-1085.
94. Milne J. (1993) Chemical shift references for ^{77}Se NMR spectroscopy. Selenous acid. *Magn Reson Chem*, 31: 652-655.
95. Szakács Z, Hägele G, Tyka R. (2004) $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ NMR pH indicator series to eliminate the glass electrode in NMR spectroscopic pKa determinations. *Anal Chim Acta*, 522: 247-258.

96. Orgován G, Noszál B. (2011) Electrodeless, accurate pH determination in highly basic media using a new set of ^1H NMR pH indicators. *J Pharm Biomed Anal*, 54: 958-964.
97. Purlee EL. (1959) On the solvent isotope effect of deuterium in aqueous acid solutions. *J Am Chem Soc*, 81: 263-272.
98. Glasoe PK, Long F. (1960) Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J Phys Chem*, 64: 188-190.
99. Bates RG, Bower VE. (1956) Alkaline solutions for pH control. *Anal Chem*, 28: 1322-1324.
100. Mirzahosseini A, Faragó Z, Noszál B. (2018) Determination of pH-independent rate constants of thiolate–disulfide redox transitions. *New J Chem*, 42: 11653-11659.
101. Mirzahosseini A, Noszál B. (2014) The species- and site-specific acid-base properties of biological thiols and their homodisulfides. *J Pharm Biomed Anal*, 95: 184-192.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés alapját képző közlemények

1. **Pálla T**, Mirzahosseini A, Noszál B. (2020) The species-specific acid-base and multinuclear magnetic resonance properties of selenocysteamine, selenocysteine, and their homodiselenides. *Chem Phys Lett*, 741: 137076.
2. **Pálla T**, Mirzahosseini A, Noszál B. (2020) Species-Specific, pH-Independent, Standard Redox Potential of Selenocysteine and Selenocysteamine. *Antioxidants*, 9: 465.

10.2. Más témákhoz kapcsolódó közlemények

1. Mirzahosseini A, **Pálla T**, Orgován G, Tóth G, Noszál B. (2018) Dopamine: Acid-base properties and membrane penetration capacity. *J Pharm Biomed Anal*, 158: 346-350.
2. **Pálla T**, Tóth G, Kraszni M, Mirzahosseini A, Noszál B. (2018) Population, basicity and partition of short-lived conformers. Characterization of baclofen and pregabalin, the biaxial, doubly rotating drug molecules. *Eur J Pharm Sci*, 123: 327-334.
3. Mirzahosseini A, **Pálla T**, Orgován G, Tóth G, Noszál B. (2019) Characterization of the species-specific acid-base equilibria of adrenaline and noradrenaline. *J Pharm Biomed Anal*, 170: 215-219.
4. **Pálla T**, Fogarasi E, Noszál B, Tóth G. (2019) Characterization of the Site-Specific Acid-Base Equilibria of 3-Nitrotyrosine. *Chem Biodivers*, 16: e1900358.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Prof. Dr. Noszál Bélának szakmai tanácsaiért, támogatásáért és tudományos munkám irányításáért.

Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Mirzahosseini Arash egyetemi tanársegédnek, aki konzulensként határtalan türelmével, a mérések megtervezésében, kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségével, valamint szakmai tanácsaival segítette doktori munkámat.

Hálás vagyok a Gyógyszerészi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának támogatásukért és biztatásukért, illetve a baráti légkör megteremtéséért.

Végül, de kiemelt szeretném köszönetemet kifejezni Menyasszonyomnak és Családomnak, hogy nyugodt, szeretetteljes háttérrel biztosítottak számomra.