

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

PhD értekezés

Mirzahosseini Arash

Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Noszál Béla, DSc

Hivatalos bírálók:

Ősz Katalin, PhD

Balog Erika, PhD

A Bírálóbizottság elnöke:

Gyires Klára, DSc

A Bírálóbizottság tagjai:

Németh György, PhD

Budai Lívია, PhD

Budapest, 2017

BEVEZETÉS

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

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

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

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

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

CÉLKITŰZÉSEK

A doktori értekezés célkitűzései a következők:

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

MÓDSZEREK

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

Az NMR spektrumokat Varian 600 MHz spektrométerrel rögzítettem.

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

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

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

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

EREDMÉNYEK

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

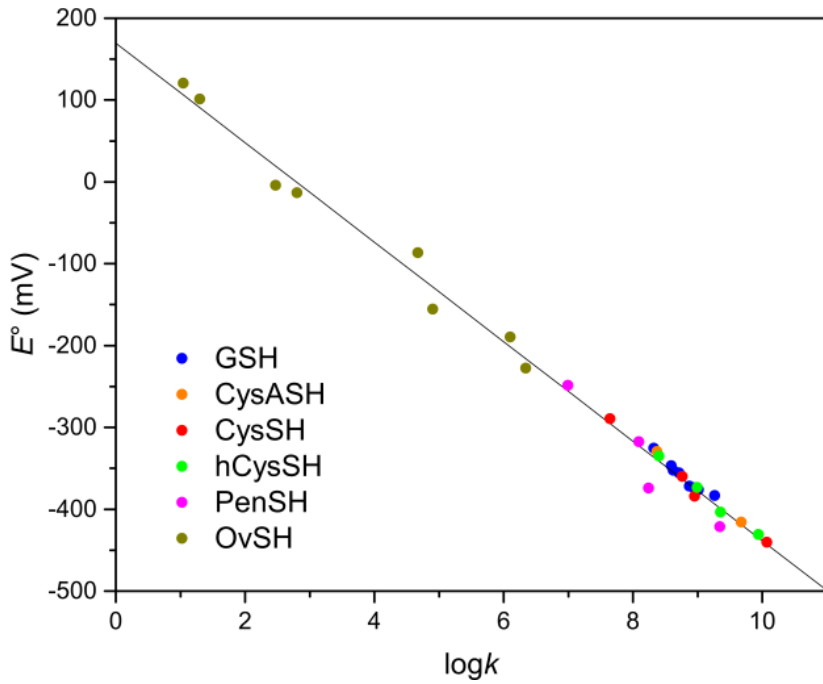
Ciszteamin		Cisztein		Homocisztein		Penicillamin		Ovotiol	
pH	$\log K_{3C}$	pH	$\log K_{3C}$	pH	$\log K_{3C}$	pH	$\log K_{3C}$	pH	$\log K_{3C}$
0,99	-0,154	0,86	0,028	0,91	0,099	0,84	-0,155	0,85	-0,850
1,31	-0,097	1,25	0,078	1,22	0,137	1,26	-0,119	1,24	-1,402
1,59	-0,071	1,54	0,113	1,54	0,203	1,52	-0,056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

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

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

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

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



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

KÖVETKEZTETÉSEK

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

PUBLIKÁCIÓK

A doktori értekezés témájában megjelent közlemények

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

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

Egyéb témákban megjelent közlemények

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

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