Pajzsmirigyhormonok és előanyagainak jellemzése részecske-specifikus paraméterekkel

Doktori értekezés

Tóth Gergő

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Noszál Béla, D.Sc.

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Lemberkovics Éva, C.Sc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál, C.Sc

Dr. Kalász Huba, D.Sc.

Budapest

2013

Tartalom

1. **Rövidítések jegyzéke** 4

2. **Bevezetés (irodalmi háttér)** 5

2.1 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik 7

2.1.1 Pajzsmirigyhormonok története, áttekintés 7

2.1.2 Pajzsmirigyhormonok bioszintézise 9

2.1.2.1. A pajzsmirigy jodidfelvétele 10

2.1.2.2 A jódozási reakció, a tirozinváz kialakulása és a folyamat pH függése 11

2.1.2.3 Perifériás szövetek dejodinálási reakció 13

2.1.3 Pajzsmirigyhormonok szállítása a vérben 14

2.1.3.1 Tiroxinkötő fehérje 16

2.1.3.2 Transztiretin 16

2.1.3.3 Humán szérum albumin 17

2.1.3.4 A szállítófehérjékhez való kötődés pH függése 17

2.1.4 A pajzsmirigyhormonok membrántranszportja 19

2.1.4.1 Szerves anion transzport-rendszerek 20

2.1.4.2 Aminosav transzport-rendszerek 21

2.1.4.3 A protonáltsági állapot szerepe a vegyületek membrántranszportjában 22

2.1.5 Pajzsmirigyhormonok receptorkötődése 23

2.1.5.1 Szerkezet-hatás összefüggések 25

2.1.5.2 Pajzsmirigyhormon-béta szelektív vegyületek 25

2.1.5.3 pH-függő kötődés a receptorhoz 26

2.1.6 Pajzsmirigyhormonok fő élettani funkciói 27

2.1.6.1 Pajzsmirigy betegségek 28

2.2 Sav-bázis egyensúlyok 29

2.2.1 Makroszkopikus protonálódási egyensúlyok leírása 30

2.2.1.1 Makroállandók meghatározására 31

2.2.1.1.1 NMR-pH titrálás 32

2.2.2 Protonálódási mikroegyensúlyok vizsgálata és leírása 35

2.2.2.1 Mikroszkopikus protonálódási állandók meghatározásának lehetőségei 38

2.2.2.2 Modellvegyületek bázicitás adatainak felhasználása (Deduktív módszer) 38
2.2.2.3 Mikroállandók meghatározása UV-pH titrálással 39
2.2.2.4 Mikroállandók meghatározása NMR-pH titrálással 40
2.3 Lipofilitás 41
2.3.1 log*P* érték meghatározására alkalmas módszerek 43
2.3.1.1 Hagyományos rázótölcséres és keverőedényes módszerek 44
2.4 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik fizikai – kémiai állandói – irodalmi előzmények 44
3. Célkitűzések 46
4. Módszerek 47
4.1 Anyagok 47
4.2 Modellvegyületek előállítása 47
4.3 Üvegelektród kalibrálása 49
4.4 ^{1}H NMR – pH titrálás 50
4.5 UV – pH titrálás 51
4.6 Megoszlási hányados meghatározása keverőedényes módszerrel 52
4.7 HRMS módszer 52
4.8 *In silico* receptorkötődés vizsgálat 53
4.8.1 Validálás 55
5. Eredmények 58
5.1 Pajzsmirigyhormonok és előanyagainak részecske-specifikus bázicitásának meghatározása 58
5.1.1 Protonálódási makroállandók meghatározása ^{1}H NMR – pH titrálással 58
5.1.2 Protonálódási mikroállandók meghatározása UV – pH titrálással 61
5.1.3 Vizsgált vegyületeink teljes mikrospeciációja 63
5.2 Pajzsmirigyhormonok mikrorészecskéinek in silico receptorkötődés vizsgálata 66
5.3 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik részecske-specifikus lipofilitása 67
6. Megbeszélés 72
6.1 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik részecske-specifikus bázicitása 72

6.1.1 A vegyületek részecske-specifikus bázicitás adataiból levonható következtetések 74
6.2 Pajzsmirigyhormonok mikrorészecskéinek *in silico* receptordokkolása 75
6.3 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik részecske-specifikus lipofilitása 79
6. Következtetések 83
7. Összefoglalás 86
8. Summary 87
9. Irodalomjegyzék 87
10. Saját publikációk jegyzéke 99
10.1 Az értekezés alapját képező közlemények 99
10.2 Az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemény 99
10.3 Más témákhoz kapcsolódó saját közlemények 99
11. Köszönetnyilvánítás 101

1. Rövidítések jegyzéke

d – dublett

D1 - I. típusú jódtironin-dejodináz enzim

DIT- dijódtirozin

DSS - 3-trimetil-1-propánszulfonsav

HRMS – nagy felbontású tömegspektrométer

HSA – humán szérum albumin

LAT – L-típusú aminosav transzporter

m - multiplett

MCT - monokarboxilát transzporter

MIT- monojódtirozin

MMFF – Merck Molecular Force Field

NMR – Mágneses magrezonancia spektroszkópia

NTCP - Na^+-taurokolát kotranszporter polipeptid

OATP - Na^+ független organikus anion polipeptid

OPLS - Optimized Potentials for Liquid Simulation

PDB – Protein Data Bank

s – szingulett

rT3 – reverz liotironin

T4 – tiroxin

T3 – liotironin

Tyr – tirozin

TBG - tiroxinkötő fehérje

TTR – transztiretin

TSH – tireoid-stimuláló hormon

TRH - thyreotropin-felszabadító hormon

TR – pajzsmirigyhormon receptor

TOF- time-of-flight (repülési idő analizátor)

2. Bevezetés (irodalmi háttér)

A bio- és gyógyszermolekulák specifikus reakciókban vesznek részt a szervezetben. Az ilyen reakciók egy része csak akkor megy végbe, ha a részecskék megfelelő mikroszkopikus protonáltsági, konformációs állapotban vannak. Ezen részecskék koncentrációja és a kapcsolódó egyensúlyi állandók a mikrospeciáció segítségével határozhatóak meg. Az egyes mikrorészecskék nehezen megfogható kémiai entitások. Állandó egymásba való átalakulásuk miatt átlagos egyedi élettartalmuk ezredmásodperces nagyságrendbe esik, emiatt semmilyen ma ismert elválasztás-technikai módszerrel nem különíthetőek el egymástól. Ennek ellenére egyedi fizikai-kémiai paraméterekkel jellemezhetőek, a biológiai folyamatokban saját, önálló formában vesznek részt. A protonáltsági izomerek (pl.: az aminosavak ikerionos és töltésmentes formái) csak abban különböznek egymástól, hogy a kötött protont eltérő báziscentrumon hordozzák, biológiai szerepük mégis eltérő. Általánosságban a membránon keresztüli transzportfolyamatokban a töltésmentes, míg a receptorkötődésben az ikerionos forma vesz részt. A mikroszkopikus egyensúlyi és kinetikai paraméterek ismerete alapvető a biokémiai és analitikai folyamatok molekuláris szintű megértéséhez és természetesen a biológiai kóros folyamatok terápiás befolyásolásához [1-3].

A legfontosabb pajzsmirigyhormonok a tiroxin (T4), liotironin (T3) és a reverz liotironin (rT3). A vegyületek a pajzsmirigyben a tirozin (Tyr) jódozása után monojódtirozin (MIT) és dijódtirozin (DIT) molekulák összekapcsolódásával keletkeznek. A pajzsmirigyhormonok élettani hatása régóta ismert. Teljes hiányuk az élettel összeegyeztethetetlen. Fontos szerepet játszanak a szervezet energiaszabályozásában, valamint a megfelelő idegrendszeri funkciók kialakításában [4]. Részben a molekulák rossz vízoldhatósága miatt azonban a vegyületek fizikai – kémiai jellemzése alulreprezentált az irodalomban, annak ellenére, hogy ez elengedhetetlen a terápiás hatás molekuláris szintű megismeréséhez, az egyes gyógyszervegyületek farmakokinetikai és farmakodinámiás jellemzéséhez. A gyógyszermolekulák szervezetbeni sorsát befolyásolják külső tényezők, mint a közeg pH-ja vagy hőmérséklete, illetve belső paraméterek, mint a molekulaszerkezet, lipofilitás és ionizáció. Az utóbbit különböző sav-bázis paraméterekkel jellemezhetjük.

A protonálódási makroállandók a molekula egészét jellemzik, az egyedi funkciós csoportok sav-bázis karakteréről a protonálódási mikroállandók adnak információt. A protonálódási állandók segítségével kiszámítható, hogy egy adott biológiai közegre jellemző pH-n milyen mértékben fordul elő egy vegyület különböző mértékben protonált formája. Ezáltal előre jelezhető, hogy a molekula a szervezet mely kompartmentjéből fog legnagyobb valószínűséggel felszívódni. A receptorhoz való kötődést az biztosítja, ha a ligandum farmakofór csoportjai és ezek ionizációs állapotai komplementer módon megfelelnek a receptor kötőhely aminosav oldalláncainak és ezek ionizációs állapotának. Egy receptor – ligand kötődés is csoportspecifikus bázicitás adatok ismeretében eredményesebben tanulmányozható [1].

A gyógyszermolekulák membránon való átjutási képességének becslésében a lipofilitás játszik döntő szerepet, amelyet a gyógyszerészetben leggyakrabban az oktanol/víz megoszlási hányadossal számszerűsítenek. Ez a paraméter a szerkezet-hatás összefüggések tanulmányozásában is központi helyen áll [5]. Nyilvánvaló, hogy a membránokon történő penetráció a semleges, töltés nélküli részecskének a legkedvezőbb. Azonban, ha a semleges részecske részaránya a szervezet egy adott kompartmentjében, egy adott pH-n, elhanyagolható más mikrorészecskéhez viszonyítva, könnyen előfordulhat, hogy a molekula bruttó lipofilitásához nem a töltés-mentes részecske hozzájárulása lesz a legnagyobb. Emiatt szükséges az egyes egyedi mikrorészecskék lipofilitásának ismerete is, ami által a molekulák membránon keresztüli transzportja szubmolekuláris szinten is tanulmányozhatóvá válik.

A pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus sav-bázis paramétereinek és lipofilitásuknak jellemzése hozzájárulhat a vegyületek élettani és biokémiai tulajdonságának jobb megértéséhez, illetve lehetőség nyílik a szerkezet-hatás összefüggések pontosabb felderítésével új gyógyszermolekulák tervezésére is.

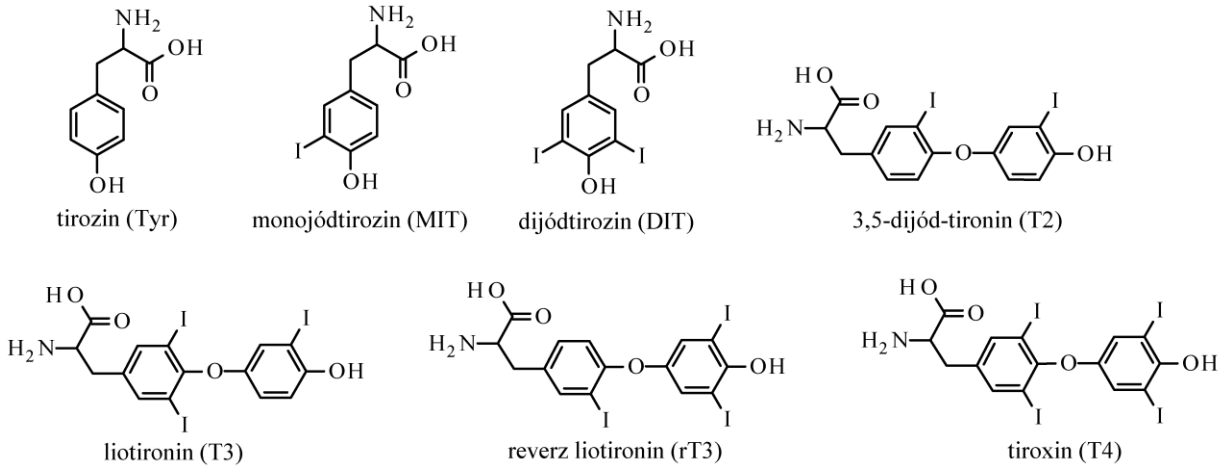
Az irodalmi összefoglalás első részében a dolgozat alapjául szolgáló pajzsmirigyhormonok biokémiai és élettani tulajdonságát foglaljuk össze. Részletesebben foglalkozunk a vegyületek bioszintézisével, transzportfolyamataival és receptorkötődésével, illetve e folyamatok protonáltsági állapottól való függésével. Összefoglalást adunk a vegyületek gyógyszerészi kémiájáról, részletezve a szerkezet-hatás összefüggéseket. Majd két önálló fejezetben foglaljuk össze a makroszkopikus és csoportspecifikus (mikroszkopikus) protonálódási egyensúlyok vizsgálatát, illetve a lipofilitással kapcsolatos eddigi fontosabb irodalmi előzményeket.

2.1 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik

2.1.1 Pajzsmirigyhormonok története, áttekintés

Már az ókorban ismert volt, hogy a tengeri hínár megfelelő gyógyszer lehet a jódhiány miatt kialakuló pajzsmirigy alulműködés, golyva kezelésére (annak magas jodidtartalma miatt). Az 1800-as években ismerté vált, hogy a pajzsmirigynek a kreténizmus kialakulásához köze lehet. Ebben az időszakban kezdték el kezelni a pajzsmirigy hiányos működése következtében létrejövő tüneteket vágóhidakról származó szárított pajzsmirigyporral [6].

A pajzsmirigyből az első hormont, a T4-t 1914-ben Kendall izolálta. Ő még a vegyület összegképletét hibásan határozta meg [7,8]. A pontos összegképlet 1927-ben lett ismert Harrington munkája nyomán, aki megoldotta a vegyület első szintézisét is [9,10]. Később további pajzsmirigyhormonok felfedezése is megtörtént [11], és nyilvánvalóvá vált, hogy a biológiai hatást a T3 fejti ki [12]. A pajzsmirigyhormonok és biológiai előanyagainak szerkezetét az 1. ábra foglalja össze.



1. ábra A pajzsmirigyhormonok és előanyagainak konstitúciós szerkezete, neve és rövidítése

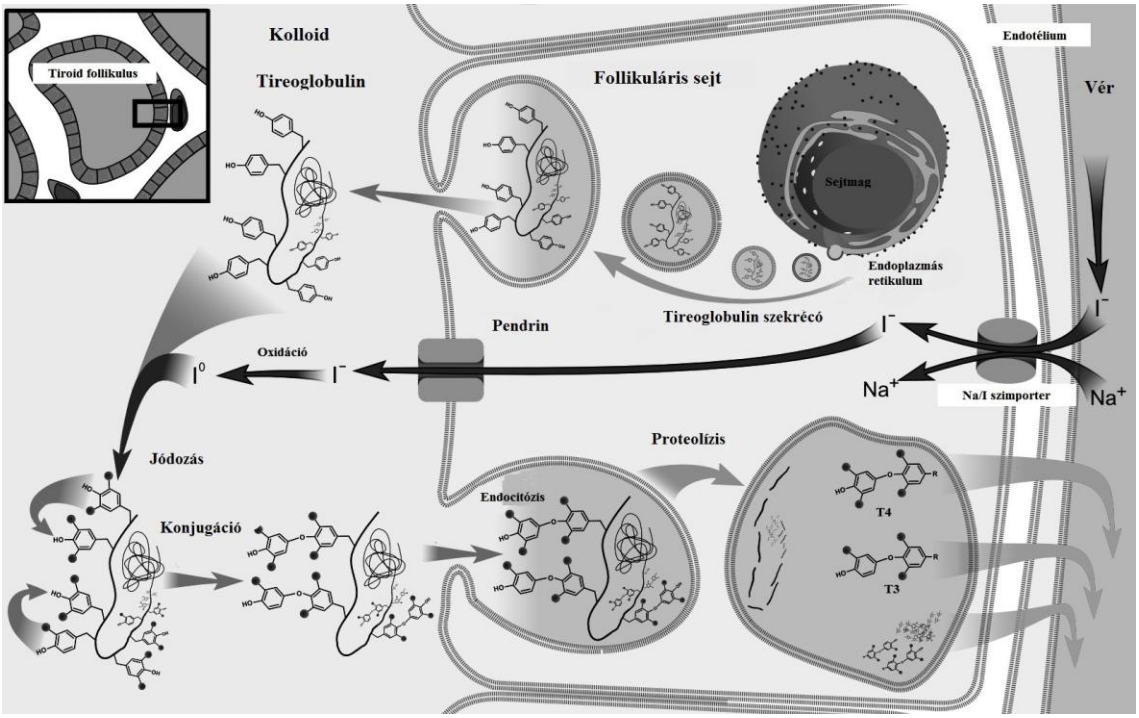
A vegyületek sajátsága a kovalensen kötött jód, mely emberi szervezetben más vegyületekben nem fordul elő. A pajzsmirigyhormonok egymástól a jódok számában és/vagy kötési helyében különböznek, amely okozója a vegyületek eltérő fizikai-kémiai tulajdonságainak, és felelős élettani, biokémia szerepük eltéréséért is. Az eddigi közel 100 éves kutatómunka eredményeképpen a vegyületek (pato)fiziológiás funkcióiról igen sokat tudunk. A pajzsmirigyhormonok felelősek a szervezet szöveteinek optimális növekedéséért, fejlődéséért, és fenntartásáért [4,13]. A pajzsmirigyhormonok alultermelődése illetve túltermelődése egyaránt súlyos betegségek okozója [14,15]. A pajzsmirigyhormonok nagyon összetett, több szervrendszerre kiterjedő hatása sokáig nehezen volt magyarázható. Tata és munkatársai kutatása során vált biztossá, hogy a pajzsmirigyhormonok valamennyi hatásának alapja a génátírás szabályozása, vagyis az egyes fehérjék szintézisének fokozása, más fehérjék szintézisének gátlása [16]. Később az intracelluláris pajzsmirigyhormon-receptor felfedezésével tisztázódott az is, hogy a hatás receptorális [17,18]. Ez idáig két pajzsmirigyhormon-receptor (TR) izoforma (TRα és TRβ) elkülönítése sikerült [19]. Ma már ismerjük a receptorokat kódoló géneket, és a pajzsmirigyhormon bioszintézisének szabályozásában résztvevő

hipotalamusz-adenohipofízis tengely szerepét is [20]. Az egyre részletesebb biokémiai ismeretek ellenére sem áll össze azonban olyan koherens kép, amellyel meg lehetne magyarázni a pajzsmirigyhormonoknak a fejlődésre, az egyes szervekre ill. az egész szervezetre kifejtett hatásait [7]. Továbbá hiába ismert a pajzsmirigyhormon receptorok pontos szerkezete, az intenzív gyógyszerkutatás ellenére sem kerültek forgalomba olyan gyógyszervegyületek, amelyek pajzsmirigyhormon-receptor altípushoz szelektíven kötődnének. Ezek a példák is rávilágítanak arra, hogy szükség van a pajzsmirigyhormonok további vizsgálatára ahhoz, hogy a vegyületek biokémiai szerepét szubmolekuláris szinten tanulmányozhassuk és ezeket az új ismereteket felhasználhassuk akár új, potenciális gyógyszervegyületek előállítására is.

2.1.2 Pajzsmirigyhormonok bioszintézise

A pajzsmirigyhormonok bioszintézise a pajzsmirigyben folyik, amely egy kétlebenyű, belső elválasztású mirigy a pajzsporc és a légcső két oldalán. A pajzsmirigy tömege felnőtt emberben 15-25 gramm között van és egészséges állapotban nem változik. A pajzsmirigy két különböző hormont termel. A folliculus hámsejtek (pajzsmirigytüszők) felelősek a jódtartalmú pajzsmirigyhormonoknak, a tiroxinnak és a liotironinnak az előállításáért, tárolásáért és leadásáért. A parafollicularis sejtek vagy más néven C-sejtek a kalcitonin szekrécióért felelősek, amely egy peptid-típusú hormon és a szervezet kalcium szint szabályozásában játszik szerepet [21].

A pajzsmirigyhormonok bioszintézise három fő lépésből áll: jodidfelvételből, a felvett jodid kovalens kötésbe kerüléséből, majd egy fehérjeláncon a keletkező jódozott tirozin molekulák kondenzációjával alakulnak ki a pajzsmirigyhormonok. A fő folyamatokat a 2. ábra foglalja össze.



2. ábra A pajzsmirigyhormonok bioszintézisének fő lépései (Forrás: [22] újraszerkesztve)

A következő részben e mechanizmusokat tekintjük át, hangsúlyozva a bioszintézis pH függését is.

2.1.2.1 A pajzsmirigy jodidfelvétele

A jódot jodid formájában veszi fel a szervezet a táplálékból és az ivóvízből. Európa nagy része, így Magyarország is jódhiányos területnek számít. A WHO ajánlása alapján a felnőttek napi jódszükséglete 150 μg, ami várandósság és szoptatás alatt másfélszeresére nő [23]. Az elégtelen jódbevitel miatt a pajzsmirigy alulműködése miatt gyerekkorban kreténizmus, felnőttkorban mixödéma, strúma, hipotireózis alakulhat ki. Az endémiás golyva és kreténizmus a világ számos országában népbetegségnek számít, emberek millióit érintve. A táplálékból bevitt jodid jól felszívódik a bélcsatornából, majd a vérkeringéssel jut a folliculusokhoz. E sejtek bazális membránja tartalmazza azt a jodidtranszportrendszert, melynek segítségével a jodid belép a sejtbe (2. ábra) [24]. A transzportrendszer Na^+ - K^+ pumpából és Na^+-jodid kotranszportból áll. A transzport hatására a pajzsmirigyben a jód 30-szoros koncentrációnövekedése következik be. A

sejtekbe bejutott jód ezután kovalens kötésbe kerül, korlátozva a koncentrációgrádiens további emelkedését. Tazebay és mtsai. kimutatták, hogy a jodid transzportrendszer a humán mellrák minták több mint 80%-ában expresszálódik, míg egészséges sejtekben nem fordul elő. A felfedezés nagyban segítheti a mellrák diagnosztikáját [25]. Bizonyos szervetlen anionok - perklorát, tiocianát - a jodidhoz hasonló méretük miatt a jodidtranszport kompetitív gátlószerei. Egyes növények, például különböző káposztafélék tartalmaznak tiocianátot, illetve Afrikában a hagyományos ételkészítési módok a tiocianát-tartalmat annyira megnövelhetik, hogy az elégtelen jodidfelvételhez és a pajzsmirigy-alulműködéshez vezethet [26].

2.1.2.2 A jódozási reakció, a tironinváz kialakulása és a folyamat pH függése

A jodid szerves kötésbe kerülése a folliculusok lumenében történik, egy erősen glikozilált fehérje, a tireoglobulin, megfelelő tirozin oldalláncain [27]. Az egyes tirozinegységek jódozásához először az inert jodidionoknak reakcióképes szabad gyökké kell alakulnia. Ezt a pajzsmirigy peroxidáz enzim végzi, elektronakceptorként hidrogén-peroxidot használva. A jódozás során a tirozin oldallánc szubsztitúciójával MIT, majd további jódozással DIT keletkezhet. Ezt a lépést követi egy szintén peroxidáz-függő folyamat, a jódtirozinok összekapcsolódása, amivel jódtironin vegyületek alakulnak ki. A tireoglobulin lánc két közeli jódozott tirozinja közül az egyikben felbomlik a fenil gyűrű és az alanin-jellegű molekularész közti kötés, majd az aromás gyűrű éterkötéssel kapcsolódik a peptidlánc másik jódozott tirozinjához. A pajzsmirigyben ennek megfelelően két DIT molekulából képződő T4, vagy DIT és MIT egységből felépülő T3, vagy rT3 szintetizálódik, illetve keletkezhet két MIT-ból felépülő 3,3’ dijódtironin is (T2) (1. ábra). Miután a tireoglobulinon megtörtént az előanyagok kondenzációja pajzsmirigyhormonokká, a tireoglobulin hidrolizál, a T4 és a T3 kijut a véráramba (2. ábra) [28,29].

A pajzsmirigy túlműködés esetén használt gyógyszerek egy része a peroxidáz enzim működésének gátlásával, vagyis a jódbeépülés megakadályozásával hat. Ilyen vegyületek a kéntartalmú tiouracil- és merkaptoimidazol-származékok, mint a propiltiouracil, karbimazol és a tiamazol.

A pajzsmirigy hormonszekréciójának intenzitása viszonylag állandó. A pajzsmirigyhormonok szintézisét és szekrécióját a hipotalamusz-adenohipofízis rendszer szabályozza. A hipofízis hormonja a tireoid-stimuláló hormon (TSH) a pajzsmirigyhormonok termelését több lépésben, a jódfelvétel és a jódbeépülés növelésével és a tireoglobulin proteolízisének serkentése révén befolyásolja. A TSH mennyiségét a hipotalamusz mindössze 3 aminosavból álló trophormonja a tireotropin-felszabadító hormon (TRH) szabályozza a perifériás hormonmennyiség függvényében [20].

Taurog és Dorris tanulmányozta a pajzsmirigy peroxidáz és más peroxidáz enzimek aktivitásának pH függését a tireoglobulin tirozin oldalláncainak jódozásával, illetve a dijódtirozin molekulák kondenzációjának vizsgálatával [30]. A kísérletekből megállapítható, hogy a pajzsmirigy peroxidáz működésének optimumát 6,5-es pH-n éri el. Savasabb pH-n a pajzsmirigy peroxidáz által katalizált folyamatok alig játszódnak le. Ezen vizsgálatokból látszik, hogy mind a tireoglobulin jódozása, mind az előanyagok kondenzációja pajzsmirigyhormonokká pH függő folyamat. Ez az állítás képezte az alapját de Vijlder és den Hartog munkájának, akik az előanyagok kondenzációs folyamatának pH-függését vizsgálták, illetve azt, hogy a prekurzorok fenolátjának protonáltsági állapota hogyan befolyásolja a pajzsmirigyhormonok bioszintézisét [31]. A szerzők leírják, hogy a T4 képződésének pH-függése megfeleltethető a DIT fenolos hidroxilcsoportjának proton disszociációs görbéjének. pH 6,3 értéknél, ahol a DIT fenolos hidroxilcsoportja 50%-ban deprotonált formában található, a T4 képződés mennyisége a maximális T4 képződés értékének a fele. Hasonló megfigyelés tehető a két MIT-ból felépülő T2 esetén is, ennél a molekulánál a MIT fenolos hidroxiljának protonáltsága befolyásolja a bioszintézist. A T3 és az rT3 képződés pH-függéséből azt állapították meg, hogy a két előanyag közül annak a fenolátnak a protonálódási állandója befolyásolja jobban a bioszintézist, amelyből a hormon „belső” gyűrűje (az aminosav oldallánchoz kapcsolódó) jön létre. Feltehetőleg gyökös mechanizmusú bioszintézis miatt a külső gyűrű ionizációs állapota is szerepet játszik a bioszintézisben. Ezt az állítást bizonyítja, hogy T2 képződést pH 6-on nem lehet észlelni. Ugyanezen pH-n rT3 viszont képződik, annak ellenére, hogy e két vegyület belső gyűrűje azonos. A kísérletek azt mutatták, hogy az előanyagok anionos, deprotonált fenolos hidroxilcsoportja szükséges a pajzsmirigyhormonok bioszintéziséhez, vagyis a

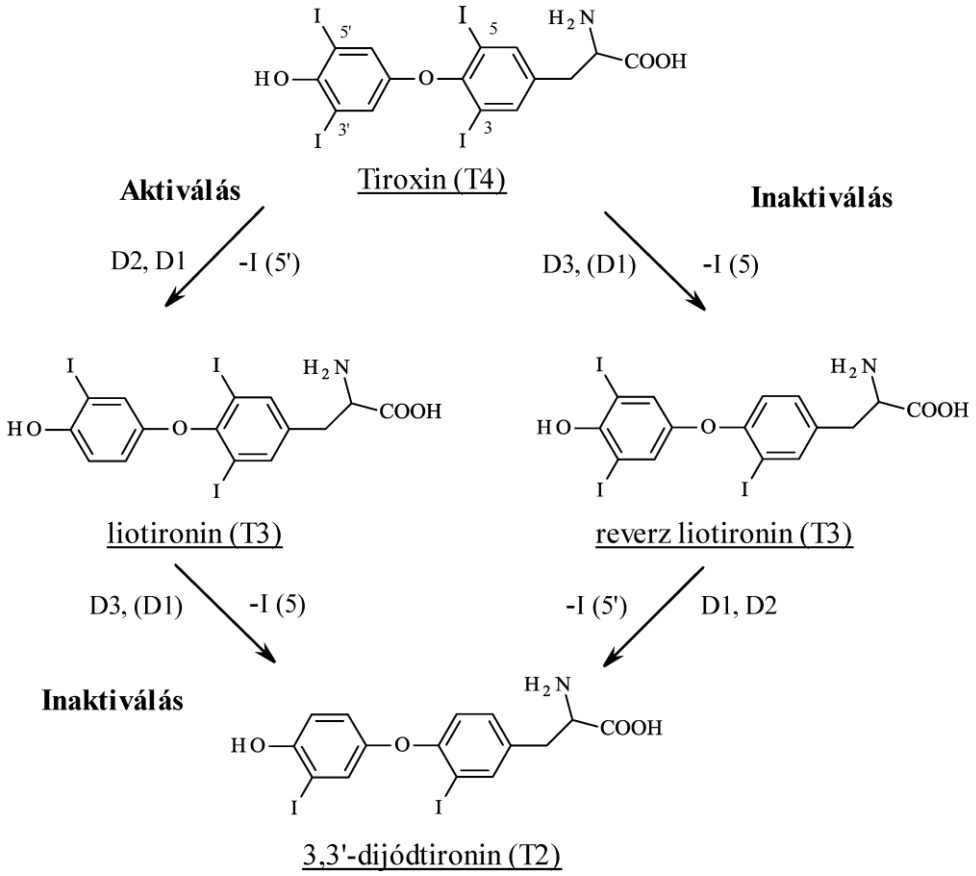
prekurzorok pontos protonálódási állandójának ismerete elengedhetetlen a bioszintézis molekuláris szintű értelmezéséhez. A pajzsmirigyben a szintetizálódó T4 mennyisége naponta 70 - 100 μg, míg a T3 mennyiség 6-8 μg [28,32], vagyis a két DIT molekulából képződő T4 szintetizálódik nagyobb mennyiségben, amelynek egyik magyarázata lehet az előanyagok fenolátjának eltérő ionizációs állapota a vér pH-ján, ugyanis itt a DIT molekulák fenolos OH-jának nagy része deprotonált, míg a MIT esetén protonált állapotban van.

2.1.2.4 Perifériás szövetek dejodinálási reakciói

A pajzsmirigyhormonok közül a T3 az aktív hormon, a T4 a T3 prekurzorának tekinthető. A T3 nagyobbrészt a T4 perifériás metabolizmusával keletkezik enzimatikus úton jódvesztéssel. Ezt a folyamatot jódtironin-dejodináz enzimek végzik. A szervezetben három különböző típusú jódtironin-dejodináz enzim (D1, D2, D3) működik, amelyek a T3 kialakítása mellett a T4 inaktiválásában is szerepet játszanak. Az inaktiválási folyamat részeként T4-ból rT3 illetve különböző dijódtironin molekulák keletkeznek [33]. Az inaktív dejodinált metabolitok ezután a májban metabolizálódnak és glükuronsavval történő konjugálódás után az epével ürülnek. A 3. ábrán a fő jódtironinok szelenojodinázok általi aktiválásának illetve inaktiválásának lépéseit ábrázoltuk.

Az I. típusú jódtironin-dejodináz enzim (D1) sajátossága, hogy aktív centrumában szelenociszteint tartalmaz, így szelénhiányban az enzim működésképtelen, aminek következtében a lecsökkent T3 szint hipotireózis tüneteit okozhatja [34,35].

A hipertireózisban használt tiouracil származék propiltiouracil a peroxidáz enzim működése mellett az I. típusú jódtironin-dejodináz enzimet is gátolja, csökkentve ezzel az aktív hormon mennyiségét.



3. ábra Pajzsmirigyhormonok szelenojodinázok általi aktiválása és inaktiválása. (Forrás [33] újraszerkesztve)

2.1.3 Pajzsmirigyhormonok szállítása a vérben

A jódtironin vegyületek erősen hidrofób karaktere miatt a vegyületek több mint 99%-a fehérjéhez kötött állapotban van. A pajzsmirigyhormon hatást csak a szabad, nem kötött forma tudja kiváltani. A fehérjekötődés jelentősége, hogy a pajzsmirigyben szintetizálódó T4/T3 nem ürül ki a vesén keresztül, nehezebben inaktiválódik, másrészt ez stabilizálja a hormonszinteket, a plazma pajzsmirigyhormon szintjében csak minimális ingadozás van. Részben a fehérjekötődésnek köszönhető az is, hogy a kívülről gyógyszeresen bejuttatott T4 hatása a tartós kötődés miatt lassabban áll be, és tartósabban megmarad, biológiai felezési ideje hét nap. A T3 kötődése a

plazmafehérjékhez valamivel kisebb, hatása is gyorsabban alakul ki, biológiai felezési ideje egy nap [37].

A pajzsmirigyhormonok megkötésében három plazmafehérje játszik szerepet: a tiroxinkötő-globulin (TBG), a transztiretin (TTR) és az albumin (HSA). A három pajzsmirigyhormon-kötő fehérje legfontosabb tulajdonságait az I. táblázatban és részletesen az alábbiakban foglaljuk össze.

I. táblázat A pajzsmirigyhormonok megkötésében szerepet játszó plazmafehérjék legfontosabb tulajdonságai [6,36]

	TBG	TTR	HSA
Molekulatömeg, kDA	54	55	66,5
Szerkezet	monomer	tetramer	monomer
szénhidrát tartalom %	20	-	-
T4/T3 kötőhelyek száma	1	2	számos
koncentráció (mg/l)	16	250	40 ezer
asszociációs konstans	$1x10^{10}$(T4)	$2x10^{8}$ (T4)*	$1.5x10^{6}$ (T4)*
	$1x10^{9}$ (T3)	$1x10^{6}$ (T3)	$2x10^{5}$ (T3)
T4 és T3 relatív megoszlása a szérumban, %	75 (T4)	20 (T4)	5 (T4)
	75 (T3)	<5 (T3)	20 (T3)
felezési idő, nap	5**	2	15

* Az adat a magas affinitású kötőhelyre vonatkozik.

** Ösztrogénhormon befolyásolja

2.1.3.1 Tiroxinkötő fehérje

A specifikus tiroxinkötő globulinnak (TBG) a legkisebb a pajzsmirigy-kötő kapacitása, de nagy affinitása miatt a keringő T4, T3 és rT3 legnagyobb részét ez a fehérje szállítja. Ennek megfelelően bármilyen változás a TBG koncentrációban jelentős kihatással van a vér pajzsmirigyhormon szintjére. A fehérjét egyetlen gén kódolja az X kromoszómán, a májban keletkezik és a májon át ürül. Egy jódtironin kötőhellyel rendelkezik, a T4-t valamivel nagyobb affinitással köti, mint a T3-t. Ha a kötőhely teljesen telített, a TBG körülbelül 200 μg T4-et szállít literenként. A szabad, tehát biológiai hatást kiváltó T4 koncentráció fordítottan arányos a plazma TBG-koncentrációjával. Amennyiben a TBG koncentráció emelkedik, a szabad T4 koncentráció csökkeni fog. A TBG szintézise hormonálisan szabályozott. Az ösztrogénhormonok a szintézist fokozzák [37], míg a tesztoszteronnak ellenkező, szintéziscsökkentő hatása van [38]. Így különböző nemi hormon túltermelődéshez kapcsolódó betegségben, terhességben és nagyobb ösztrogén mennyiséget tartalmazó fogamzásgátlók alkalmazása esetén a TBG szintnek, és ezzel a pajzsmirigyhormonok szintjének kedvezőtlen változására is számítani kell.

2.1.3.2 Transztiretin

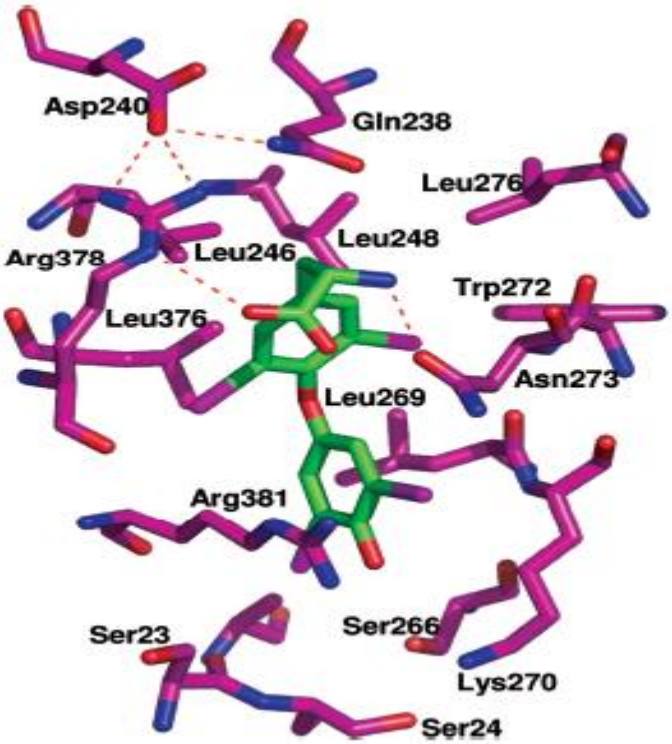
A transztiretint (TTR-t) a korábbi irodalmak tiroxinkötő prealbuminnak nevezték, mivel ez a fehérje az elektroforézises géleken az albuminnál gyorsabban futott. A transztiretin egy 55 kDA molekulatömegű homotetramer, amely a májban és a plexus choroideusban szintetizálódik és közvetlenül a véráramba illetve az agy-gerincvelői folyadékba ürül, amely utóbbiban a fő tiroxinkötő fehérjének számít. A TTR affinitása kisebb a pajzsmirigyhormonokhoz mint a TBG-hez, ennek megfelelően disszociációjuk gyorsabb a fehérjéről, és így a T4 és T3 azonnali, gyors szállításáért felel a szervezetben. A transztiretin felezési ideje mindösszesen két nap, ezért szintézisének gyors csökkenése (mely létrejöhet különböző májbetegségekben vagy cisztás fibrózisban) a fehérje koncentrációjának gyors csökkenését eredményezi. Ennek ellenére mindez a szabad keringő pajzsmirigyhormon koncentrációt csak csekély mértékben befolyásolja, mivel a TTR kisebb mértékben felelős a pajzsmirigyhormonok megkötéséért [39].

2.1.3.3 Humán szérum albumin

Az albumin nem specifikusan köti a pajzsmirigyhormonokat, de magas szérum koncentrációja miatt kapacitása nagy, így felelős a T4 mintegy 5%-ának megkötéséért. Az albuminhoz ezen kívül számos bio- és gyógyszermolekula is kötődik. Az albumin szintjének változása nincs hatással a szérum szabad pajzsmirigyhormon szintjére [40].

2.1.3.4 A szállítófehérjékhez való kötődés pH-függése

Az ionizálható vegyületek fehérjékhez kötődése pH-függő folyamat, hiszen ahhoz, hogy a kötődés létrejöjjön, a molekula megfelelő ionizáltsági állapota szükséges. Emiatt a pajzsmirigyhormonok szállítófehérjékhez való kötődését is befolyásolja mind a fehérje, mind a ligandum ionizáltsági állapota. A folyamat jelentőségének megfelelően többen, több technikával is vizsgálták a T4 és T3 szállítófehérjékhez való kötődésének pH függését. Davis és Gregerman gél elektroforézissel vizsgálva a T4 TBG közti kölcsönhatás pH függését, azt tapasztalta, hogy pH 7,4-en a T4 sokkal jobban kötődik a fehérjéhez, mint ennél lúgosabb közegben [41]. Marshall és Pensky evvel szemben azt állapította meg, hogy 1:1 arányú kötődést feltételezve a T4 affinitása a TBG-hez pH 6,5 körül eléri maximumát, és utána konstans lesz, míg pH 6,5 alatt a T4-TBG kölcsönhatás mértéke csökkeni kezd, és pH 4,2 körül teljesen megszűnik [42]. Ez a megfigyelés a szerzők szerint kétféleképpen magyarázható, vagy a T4 fenolátcsoportja játszik alapvető szerepet a kötődésben, vagy a fehérjében egy hisztidin imidazol oldallánc protonáltsági állapota befolyásolja a kölcsönhatást. A TBG szerkezetének feltérképezése során nyilvánvalóvá vált, hogy a fehérje aktív centrumában nem található hisztidin [43,44], ami arra utal, hogy a T4 protonáltsági állapota befolyásolja a kötődést. A 4. ábrán látható a TBG kötőzsebe a fontosabb kölcsönhatásokkal a T4 és a fehérje között.



4. ábra T4 kötődése a TBG-hez. (Forrás [44]).

Az ábrán látható, hogy a fenolátcsoport a fehérjében egy argininnel (Arg381) tud kölcsönhatást kialakítani, aminek guanidinium csoportja fiziológiás pH-n protonált állapotban van, így ez a csoport az anionos állapotú fenoláttal ($-O^-$) kedvező elektrosztatikai kölcsönhatást képes kialakítani, ami magyarázza a T4-nek a TBG-hez való kötődésének pH függését.

A T4 és analógjai ionizációs állapotainak szerepét a TTR-hez való kötődésben számítógépes módszerrel Natesan és mtsai. tanulmányozták molekulamechanikai módszerekkel (MS-MM CoMFA) [45]. A szerzők a molekulák többféle ionizáltsági állapotát, többféle orientációban TTR-hez dokkolva vizsgálták az egyes csoportok részecske-specifikus protonáltsági állapotának szerepét a molekuláris felismerésben. Megállapították, hogy a míg a kötődési affinitás értékeket a protonált aminocsoport jelenléte rontja, addig fenolát (O^-) javítja, amely összhangban áll bizonyos kísérleti megfigyelésekkel is [46,47].

2.1.4 Pajzsmirigyhormonok membrántranszportja

Ahhoz, hogy a vegyületek hatásukat ki tudják fejteni, át kell jutniuk biológiai membránokon. A ma elfogadott elmélet szerint a membrán egy alifás oldallánccal is rendelkező foszfolipid molekulák kettősrétegéből álló lipidkontinuum, amelybe integráns membránfehérjék ágyazódnak. Ezek a kettősrétegek egy poláris fejjel és egy 16-18 szénatom hosszúságú alifás láncból álló, apoláris lábbal rendelkeznek. Így elfogadott, hogy a membránon azok a molekulák képesek áthaladni passzív diffúzióval, energiafelhasználás nélkül, melyek poláris és apoláris formával és ezek kialakításához szükséges változékonysággal is rendelkeznek. A pajzsmirigyhormonok szerkezetükből adódóan rendelkeznek ilyen tulajdonságokkal és lipofilitásuk is magas, ezért nem véletlen, hogy egészen az 1950-es évek elejéig tartotta magát az a nézet, hogy a célsejtekhez a pajzsmirigyhormonok passzív diffúzióval jutnak el. Az első közlemény, amely a pajzsmirigyhormon membránon keresztüli transzportjában ATP, tehát energiaforrás szükségességét írja le 1954-ben született [48]. Ebben a munkában Christensen és mtsai. KCN-dal gátolták az ATP szintézist, és azt tapasztalták, hogy a pajzsmirigyhormon várt membrántranszportja elmaradt. Mára elfogadott, hogy a pajzsmirigyhormon membránon való szállítása energiafüggő, karrier mediált folyamat. A témában több összefoglaló közlemény is született [49-51]. A szállításban résztvevő transzportfehérjék felfedezése és (pato)fiziológiás szerepének tisztázása ma is folyik [52,53]. A II. táblázat összefoglalja az eddig ismert, fontosabb plazma membrán transzportereket, amelyek szerepet játszanak a pajzsmirigyhormonok membrántranszportjában.

II. táblázat A pajzsmirigyhormonok membrántranszportjában szerepet játszó fehérjék [36,49].

Fehérje	Gén	Kromoszóma	Szöveti eloszlás	Transzportálódó pajzsmirigyhormonok*
NTCP	SLC10A1	14q24.1	máj	T4, T3, rT3, T2
OATP1A2	SLCO1A2	12p12	agy, vese, máj	T3, T2, T4, rT3
OATP1B1	SLCO1B1	12p	máj	T3, T4
OATP1B3	SLCO1B3	12p12	máj	T3, T4
OATP1C1	SLCO1C1	12p12.3	agy, cochlea, testis	T4, rT3, T3
OATP4A1	SLCO4A1	20q13.33	nem szövetspecifikus	T3, T4, rT3
OATP4C1	SLCO4C1	5q21.2	vese, más szerv	T3, T4
LAT1	SLC7A5	16q24.3	nem szövetspecifikus, placenta, daganatok	T2, rT3, T3, T4
LAT2	SLC7A8	14q11.2	nem szövetspecifikus, daganatok	T2, rT3, T3, T4
MCT8	SLC16A2	Xq13.2	agy, máj, vese, szív, pajzsmirigy	T3, T2, T4, rT3

* A hormonok csökkenő affinitássorrendben szerepelnek a táblázatban.

A II. táblázatból látszik, hogy a pajzsmirigyhormonok transzportjában a szerves anion transzporterek és az aminosav transzporterek játsszák a fő szerepet.

2.1.4.1 Szerves anion transzporter-rendszerek

A szerves anionokat szállító transzporter-rendszerek közül a pajzsmirigyhormonoknak és szulfonált metabolitjaiknak membrán transzportjában az NTCP (Na^+-taurokolát

kotranszporter polipeptid) és az OATP (Na^+ független organikus anion polipeptid) család vesz részt. Az NTCP csak a májsejtekben expresszálódik, és főképp ez végzi a konjugált epesavak transzportját, pl. az enterohepatikus körforgásban. Az OATP-k számos vegyület transzportját végzik. A pajzsmirigyhormonok szállításában, ebben a családban az egyik legfontosabb és legspecifikusabb szerepet az OATP1C1 játssza. Ez a karrierfehérje főleg az agyban és a here Leydig sejtjeiben expresszálódik, és komoly szerepet játszik e szervek megfelelő pajzsmirigyhormon-szintjének kialakításában [54,55]. A megfelelő pajzsmirigyszint alapvető fontosságú egyrészt az agy időarányos fejlődéséért, másrészt a Leydig sejtek növekedéséért, differenciálódásáért, tehát összességében a tesztoszteron bioszintéziséért. Számos OATP-t mutattak ki egyéb szövetekben is, szerepük még nem teljesen tisztázott, de kiterjedt előfordulásuk miatt szerepük valószínűleg kevéssé szervspecifikus.

2.1.4.2 Aminosav transzporter-rendszerek

A pajzsmirigyhormonok jódozott tirozin egységekből épülnek fel, így membránon való átjutásukban az aminosav transzporterek, különösen az L- és T- típusúak játszanak szerepet. Számos szervben megtalálhatók [56], kiemelendő a szerepük a placentában, ahol elsősorban a LAT-1 transzporter felelős a megfelelő pajzsmirigyhormon-felvételéért, ezáltal fontos szerepet játszik a magzat fejlődésében [57].

A monokarboxilát transzporterek (MCT) között eddig 14 transzportert azonosítottak különböző fajokban és szövetekben [52], amelyek génjei mind autoszomális kromoszómákon találhatók. Kivételt képez az MCT8, egy X kromoszómához kapcsolt specifikus pajzsmirigyhormon-transzporter, amely agyi neuronokban végzi a pajzsmirigyhormonok membránon keresztüli szállítását [58]. Az X kromoszóma mutációja, meghibásodása az MCT8 génen pszichomotoros retardációban nyilvánul meg gyermekekben, amely jelzi e szállítófehérje fontosságát az agyi fejlődésben. Az MCT8 transzporter működését, az MCT8 gén mutációjának hatását [52,53], valamint a betegség (Allan-Herndon-Dudley szindróma) lehetséges diagnózisát és kezelését [59] összefoglaló közlemények tárgyalják.

2.1.4.3 A protonáltsági állapot szerepe a vegyületek membrántranszportjában

A pajzsmirigyhormonok lipofilitása a jódtartalmú aromás gyűrűk miatt magas, ezért – mint fentebb is említettük - sokáig feltételezték, hogy membrántranszportjuk passzív diffúzióval zajlik. Ma már tudjuk, hogy a pajzsmirigyhormonok ugyan könnyen bejutnak a membránokba, de transzportjuk ATP felhasználást igényel. A pajzsmirigyhormonok kimutathatóak biológiai membránokban [60], feltételezett hatásuk a membrán merevségének befolyásolása [61]. A hormonok elhelyezkedése a membránban olyan, hogy fenolos hidroxilcsoportjuk igazodik a foszfolipid kettősréteg belseje felé. A pajzsmirigyhormonok inkább amfifil tulajdonságúak a lipofil aromás gyűrűrendszernek és a hidrofil aminosav oldalláncnak köszönhetően. Ez az amfifil tulajdonság oly módon akadályozza a passzív transzportot, hogy a molekulák könnyen bejutnak, utána azonban megrekednek a membránban, így energia-befektetés nélkül nem jutnak be az intracelluláris térbe. Hillier tanulmányozta a pajzsmirigyhormonok pH-függő kötődését foszfolipid membránokhoz, és azt tapasztalta, hogy a pajzsmirigyhormonok azon a pH-n kötődnek legnagyobb mennyiségben a foszfatidilkolint tartalmazó kettősréteghez, ahol a fenolátcsoport protonált, vagyis a molekula (OH, NH_3^+, COO^-) ikerionos, leginkább amfifil formában van jelen [62].

A pajzsmirigyhormonok aktív transzportja is pH-függő folyamat [63-66]. Blondeau és mtsai. kimutatták [63], hogy patkányból izolált májsejtek T3 és T4 felvétele pH-függő, és a szerzők szerint a hormonok fenolátjának protonált formája szükséges a transzporthoz. Ez ellen szól azonban, hogy a hormon felvétel pH 5 alatt drasztikusan csökken [63-65].

Az egyes transzportfehérjék jobb megismerésével az utóbbi években lehetőség nyílt a transzportfehérjék egyedi vizsgálatára is. Leuthold és mtsai. 13 organikus anion transzportrendszer működésének pH függését tanulmányozták négy kiválasztott ligandumot - köztük a T4-et - felhasználva [66]. A vizsgálat kimutatta, hogy a legtöbb transzporter enyhén savas pH tartományban (~ pH= 6,5) nagyobb aktivitással rendelkezik, mint pH 8-as közegben. Egyetlen kivétel az OATP1C1 transzporter, amelynek működése kevésbé mutatott pH függést. Ennek feltételezett oka, hogy a vizsgált transzporterek közül a pajzsmirigyhormonok transzportjában kitüntetett szerepet játszó OATP1C1 fehérje az egyetlen, melynek harmadik, a ligandum

felismeréséért felelős transzmembrán doménje, hisztidin helyett glutamint tartalmaz. Így az is megállapítható, hogy a szerves anion transzporterek pH függő működését a hisztidin rész eltérő protonáltsági állapota okozza. Az eddigi irodalmi adatokból [63,66] levonható az a következtés, hogy a pajzsmirigyhormonok aktív transzportját egyaránt befolyásolja a transzportfehérje bizonyos aminosavainak, és magának a pajzsmirigyhormon molekulának az ionizáltsági állapota.

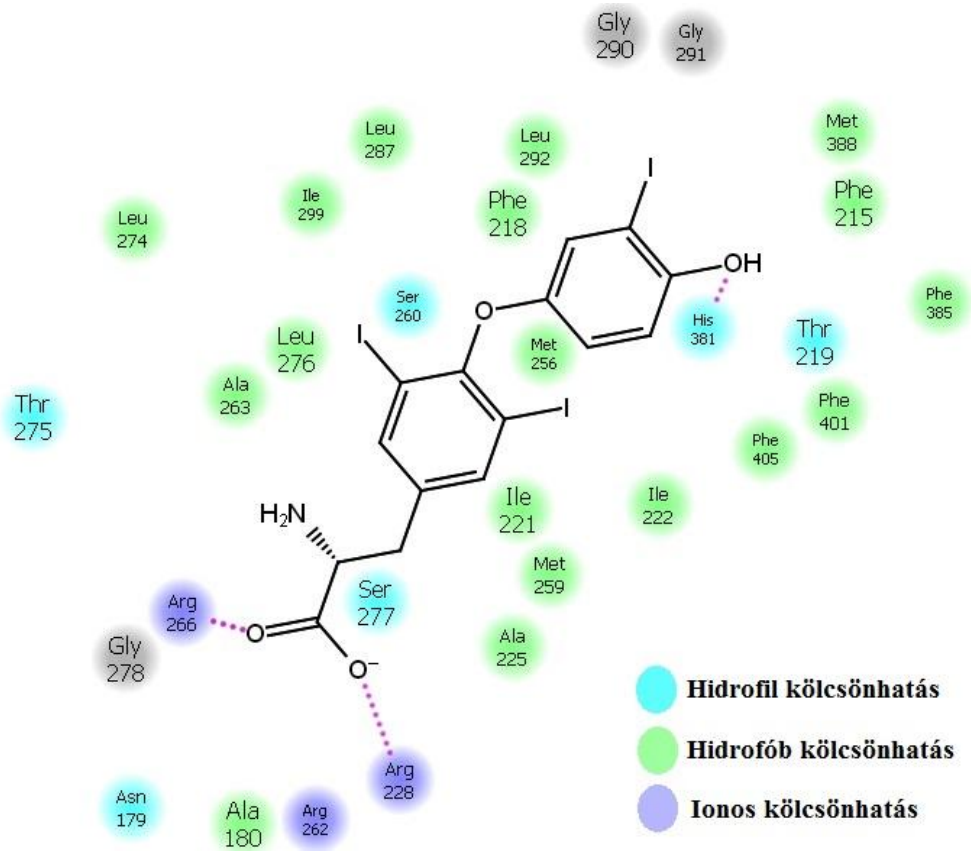
2.1.5 Pajzsmirigyhormonok receptorkötődése

A pajzsmirigyhormonok hatásukat a génátírás szabályozásán keresztül fejtik ki, sejtmag receptorokhoz kötődve. A sejtmag receptorok intracellulárisan helyezkednek el inaktív állapotukban, általában egy dajkafehérjéhez kötve és általa időlegesen gátolva. Ez a receptor-típus három jól elkülönült domént tartalmaz. A C-terminális régió köti meg a hormont, a második régió a DNS-kötő domén, amely egy meghatározott DNS szakaszhoz kötődik, az N-terminális végen pedig a transzkripciót, az illető gén átírását szabályozó rész található. A pajzsmirigyhormonokon kívül sejtmag receptorokhoz kötődnek többek között a különböző szteroidhormonok. Mivel ezek a vegyületek egyes gének átírásával fejtik ki hatásukat, ezért ez a hatás csak órák múltán észlelhető és hosszú távon, napokig fennmarad [67].

A pajzsmirigyhormon-receptornak két altípusát ismerjük: a pajzsmirigyhormon-receptor alfát (TRα) és pajzsmirigyhormon-receptor bétát (TRβ) [19,68]. Az egyes izoformák előfordulásának aránya az egyes szövetekben eltérő. A TRα a szívben, a barna zsírszövetekben és a vázizmokban expresszálódik nagy részben, míg a TRβ elsősorban a májban található. A pajzsmirigyhormonok által kiváltott hatás ennek megfelelően izoforma specifikus. A TRα aktiválódása szükséges a pajzsmirigyhormonok szívhatásaihoz: egyidejűleg növekszik a szív perctérfogata, a pulzustérfogat és a szívműködés frekvenciája [19]. A TRβ elsősorban az energiaháztartásban játszik szerepet, aktiválódása testsúlycsökkentést és a vér lipid szintjének csökkenését eredményezi [69].

Mindkét receptor altípus kötőzsebe pontosan feltérképezett [70]. A kötőzseb nagy konzervativitást mutat, az egyes altípusok között pusztán egy aminosav különbség van,

a TRα szerinje (Ser277) helyett a TRβ-ban aszparagin (Asn331) található. Az 5. ábrán látható a T3 illeszkedése a TRα kötőzsebébe.



5. ábra T3 és a TRα közti kölcsönhatások [71] (PDB ID: 2H77)

Jól látszik, hogy a receptor kötőzsebében számos hidrofób aminosav található, ami a jódozott aromás gyűrűkkel lép kölcsönhatásba. A hidrofób kölcsönhatás mellett két poláris régió található a kötőzsebben: egy hisztidin (His381) alakít ki hidrogénhidat a T3 fenolos hidroxilcsoportjával, illetve a kötőzseb legpolárisabb részén három arginin guanidinium csoport illetve egy szerin (TRα) vagy egy aszparagin (TRβ) alakít ki ionos kölcsönhatásokat a pajzsmirigyhormonok aminosav részével.

2.1.5.1 Szerkezet-hatás összefüggések

A pajzsmirigyhormonok szerkezet-hatás összefüggései ismertek [71-76], amelyek közül a konfiguráció, a jód atomok pozíciója, az aminosav oldallánc illetve a 4'-helyzetben lévő fenolos hidroxilcsoport szerepe a legfontosabb.

Az abszolút konfiguráció nagyban befolyásolja a hatást, hormonhatással kizárólag az (L)-S-tiroxin rendelkezik, ezzel szemben az (R)-D-tiroxin kifejezett koleszterinszint-csökkentő hatással bír [74].

A jód atomok száma és helyzete alapvetően befolyásolja a receptorkötődést. A 3'-helyzetű monoszubsztitúció és a 3, 5 pozícióban lévő diszubsztitúció szükséges a megfelelő receptorkötődéshez, amit jól mutat az is, hogy a receptorhoz a T3 kötődik, a T4 a vegyület előanyagának tekinthető, míg a metabolizmussal létrejövő rT3 teljesen hatástalan molekula. Az aromás gyűrűkhöz kapcsolódó jód szubsztituensek befolyásolják a molekula konformációját, ami lényeges a receptorzsebbe való illeszkedés szempontjából [75]. A 3, 5 pozícióban lévő szubsztituensek térgátlása miatt az aromás gyűrűk rotációja erőteljesen gátolt, amelynek következtében a két aromás gyűrű síkja egymásra merőleges.

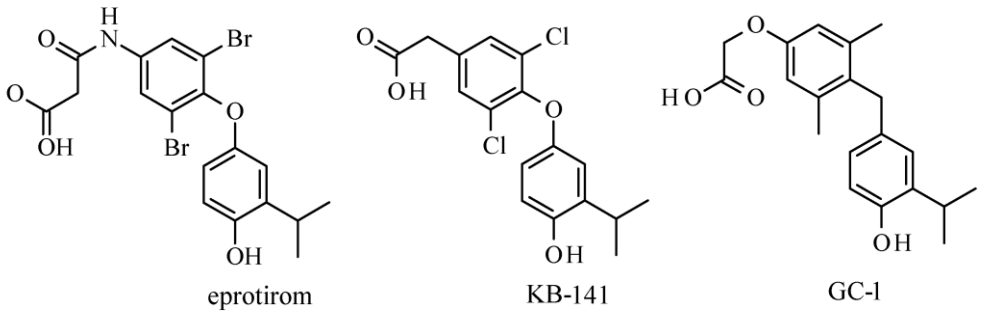
Érdekes tény, hogy az aminocsoport jelenléte csökkenti a receptoraffinitást, a dezaminált szintetikus származékok erősebben kötődnek a receptorhoz [73]. Az aminosav funkció azonban fontos szerepet játszik a vegyületek farmakokinetikájában.

A fenolos hidroxilcsoport 4'-helyzetben szükséges a hatáshoz, részt vesz a receptorhoz való kötődésben (4. ábra) [76].

2.1.5.2 Pajzsmirigyhormon-receptor béta szelektív vegyületek

A jelenlegi gyógyszerkutatás egyik fontos célja olyan kémiai entitások előállítása, amelyek mellékhatástól mentesen, vagy csekély mellékhatással érnek el testsúlycsökkentést és/vagy koleszterinszint-csökkentést [77]. A pajzsmirigyhormonok voltak az első vegyületek, amelyeket az elhízás kezelésére használtak. A külsőleg bejuttatott nagymennyiségű hormonok mellékhatásai miatt azonban a 80-as évektől

testsúlycsökkenés indikációban szedésüket betiltották. A leggyakoribb mellékhatások a tachycardia és arrythmia voltak, amely néhány esetben olyan súlyos volt, hogy a betegeknél azonnali halált okozott [78]. A pajzsmirigyhormonok szívhatásaiért a TRα felel, így TRβ szelektív szerekkel a lehetséges mellékhatások elkerülhetők. Emiatt intenzív kutatás folyik TRβ szelektív szerek előállítására [72,78-80], mivel ezek a vegyületek mind az obezitás, mind a hiperkoleszterinémia kezelésében sikeresek lehetnek. A szelektív szerek szintézise azért nehézkes, mert a két izoforma kötőzsebe között pusztán - a már említett - egyetlen aminosav különbség van. Szelektivitást elsősorban az aminosav oldallánc változtatásával lehet elérni [81]. A jelenleg ismert fontosabb TRβ szelektív szerek szerkezete a 6. ábrán látható.



6. ábra Fontosabb TRβ szelektív szerek konstitúciós képlete

Az eprotirom fázis III. vizsgálatait 2012 februárjában szüntették be lehetséges porckárosító mellékhatása miatt krónikus kezelés során [82]. Az addigi vizsgálati eredmények viszont azt mutatták, hogy a vegyület lényegesen csökkenti a koleszterinszintet szívre ható mellékhatások nélkül [83]. A GC-1 és KB-141 elhízás elleni, lipidszint csökkentő és antidiabetikus hatását több közlemény is tárgyalja [84-86], jelezve a vegyületcsoport potenciális klinikai szerepét.

2.1.5.3 pH-függő kötődés a receptorhoz

A hormonok pH-függő kötődését pajzsmirigyhormon-receptorhoz nem, azonban nem specifikus szolubilizált sejtmag receptorokhoz vizsgálták [87,88]. Ezek a kísérletek azt

mutatták, hogy a T3 affinitása a sejtmag receptorhoz pH 6 felett látványosan nő, optimuma pH 7,1 és pH 7,9 között van. A T4 esetén a kötődés pH optimuma alacsonyabb pH-tartományban van, és a receptorhoz való affinitás kevésbé függ a pH-tól. A szerzők ezekből a kísérletekből azt a következtetést vonják le, hogy a receptorkötődést leginkább a fenolát ionizációs állapota befolyásolja. A szerkezet-hatás összefüggésekből viszont tudjuk, hogy a receptorkötődést az aminocsoport jelenléte rontja. Figyelembe véve, hogy az aminosav oldallánc körül a receptor ligandkötő zsebében arginin aminosavak találhatók (4. ábra), feltételezhető, hogy a kedvezőtlen kötődést elsősorban a protonált aminocsoport és a szintén kationos állapotú arginin aminosavak guanidinium csoportjai közti taszítás okozza, vagyis e csoport ionizációs állapota is jelentős szerepet játszhat a molekuláris felismerésben.

2.1.6 Pajzsmirigyhormonok fő élettani funkciói

A pajzsmirigyhormonok hatásaikat a génátírás szabályozásán keresztül fejtik ki, a szervezet valamennyi sejtjének aktivitását befolyásolják. A pajzsmirigyhormonok élettani szerepét számos összefoglaló közlemény [4,89,90] és könyvfejezet [26,28,91] is tárgyalja. Jelen részben csak a pajzsmirigyhormonok legfontosabb élettani funkciót tekintjük át.

A pajzsmirigyhormonok elősegítik a sejt oxigénfelvételét, növelik az alapenergiaforgalmat. Működő pajzsmirigy nélkül az alap-energiaforgalom a normális érték csak mintegy 60%-a. Az oxigénfelvétel növekedésével befolyásolják a sejtszínű anyagcsere-folyamatokat, szabályozzák a táplálék fő elemeinek sejtszintű hasznosítását. Szelektíven képesek fokozni a fehérjeszintézist, növelik a szervezet érzékenységét a katekolaminokkal szemben.

A T4 és T3 energiaforgalmat fokozó hatásával növekszik a szív perctérfogata, a pulzustérfogat és a szívműködés frekvenciája is. Ezen szívhatásokért elsősorban a TRα receptor aktiválódása felelős.

A központi idegrendszer fejlődése nagy részben függ a pajzsmirigyhormonoktól. Pajzsmirigyfunkció hiányában a születést követően minden további neurális és mentális fejlődés retardált.

A pajzsmirigyhormonok szükségesek a posztnatális fejlődéshez is. A hormonok közvetlen hatással vannak a csont- és porcnövekedésre, illetve különböző növekedési faktorok szekrécióját is szabályozzák. Gyermekkorban a hormonok hiányában a hossznövekedés elmaradása miatt pajzsmirigy eredetű törpenövés következik be.

2.1.6.1 Pajzsmirigy betegségek

A pajzsmirigyhormonok biokémiájának molekuláris szinten való feltérképezése lehetővé tette a pajzsmirigybetegségek patofiziológiájának egyre részletesebb sejtszintű megismerését. Így derülhetett fény például arra, hogy az MCT8 gén mutációja - akadályozva az agyi neuronokban a T3 felvételét - szellemi retardációt okoz [52,53]. A következő fejezetben csak a két leggyakoribb, gyógyszeresen is befolyásolható betegséget a hipertireózist illetve a hipotireózist foglaljuk össze röviden.

Hipertireózis az az állapot, amikor a pajzsmirigy túlműködik, a pajzsmirigyhormonok szintje magas lesz. A betegség az emberek 1%-át érinti, nőkben szülést és a menopauzát követően gyakoribb. A betegség legjelentősebb tünetei az energiaforgalom jelentős növekedése, ami által emelkedik a szívfrekvencia, fokozódik a hőtermelés, ami verejtékezéssel jár, illetve fokozódik a táplálkozási igény, a betegek sokat esznek, ennek ellenére fogynak. A pajzsmirigy-túlműködés leggyakoribb formája egy autoimmun megbetegedés, a Basedow-Graves kór. A szervezet TSH-receptorokat stimuláló antitesteket termel, ami által a pajzsmirigyhormon szint megnövekszik. Ez felel a megbetegedések 30-40%-ért és általában fiatalabb korban (20-40 év) lép fel. Kezelése elsődlegesen gyógyszeresen történik pajzsmirigyhormon bioszintézist gátló szerrel (tiamazol, propiltiouracil) 1-1,5 évig folyamatos hormonszint monitorozás mellett. Ha a hipertireózis továbbra is fennáll, vagy a kezelést követően kiújul, a megnövekedett pajzsmirigyszövet részleges eltávolítására van szükség. Ez történhet radioaktív jódizotóp kezeléssel vagy műtéttel. A kezelések után viszonylag gyakran alakul ki pajzsmirigy-alulműködés, ami után szubsztitúciós terápia szükséges. A pajzsmirigy-

túlműködés további okai között szerepelhet még a tireociták spontán burjánzása (pajzsmirigy-adenoma), és igen ritkán a TSH túltermelődése [6,14,92].

Hipotireózis alakulhat ki elégtelen jódbevitel következtében, a pajzsmirigy krónikus gyulladása miatt (Hashimoto-tireoiditisz), a pajzsmirigy részleges vagy teljes eltávolítása után (daganat vagy pajzsmirigy-túlműködés miatt), veleszületett enzimhiba következtében, vagy ritka esetben a hipotalamusz vagy az agyalapi mirigy olyan eltérése miatt, amikor nem termelődik elég pajzsmirigy-serkentő hormon. A pajzsmirigyhormon hiány legjellegzetesebb tünete mind gyermek mind felnőtt korban az idegrendszeri funkciók nem megfelelő működése miatt alakul ki. Csecsemőknél a hormonok hiánya miatt súlyos szellemi visszamaradás (kretenizmus) következik be, továbbá a hossznövekedés elmaradása miatt pajzsmirigy eredetű törpenövés alakul ki. Közvetlenül a születés után megkezdett hormonpótlás megakadályozhatja a betegségek kialakulását, de akár pár hónapos késés miatt irreverzibilis idegrendszeri károsodás következik be; a nem idegrendszeri tünetek azonban még ekkor is reverzibilisek. Felnőttkorban az idegrendszeri tünetek mellett (szellemi működés lelassul, aluszékonyság, depresszió) megfigyelhető a bőr jellegzetes megvastagodása, a nyelv megnagyobbodása (ún. mixödémás tünetegyüttes), zavart szenvednek a nemi funkciók, csökken az alapenergiaforgalom. A hipotireózis egész életen át tartó szubsztitúciós terápiával (tiroxin per os szedésével) tünetmentesen kezelhető [32,91,93].

2.2 Sav-bázis egyensúlyok

Jelen fejezetben többértékű savak és bázisok ionizációjának egyensúlyi leírását tekintjük át. A makroszkopikus leírás keretében csak a felvett protonok számával foglalkozunk, a kötődés helyével nem. A csoportspecifikus vagy mikroszkopikus szintű folyamatban valamennyi kötőhely protonaffinitását külön egyensúlyi állandóval jellemezzük [1,2,94]. A gyógyszerkutatás során a protonálódási állandók meghatározása alapvető fontosságú, hiszen ez az érték dönti el, hogy egy adott vegyület milyen ionizáltsági állapotban van különböző pH értékeknél, ami pedig a gyógyszer szervezetbeni sorsát befolyásolja. A protonálódási folyamatokat kétféle módon a protonasszociáció vagy protondisszociáció oldaláról tekinthetjük. Az előbbi esetben

beszélünk protonálódási állandóról (K, logaritmusa log$K$), míg az utóbbi esetben disszociációs vagy ionizációs állandóról (K_a, negatív logaritmusa pK_a). Egycsoportos molekuláknál a két érték logaritmusa megegyezik, és egyértelműen jellemzi a molekula a protonálódását. Többcsoportos molekulánál a protonálódási és a disszociációs állandók között az alábbi összefüggés áll fenn:

$$\log K_i = pK_{a,\,n-i+1} \tag{1}$$

ahol n a maximálisan felvehető protonok számát jelenti.

A protonálódási egyensúlyokat az egységes tárgyalhatóság miatt a (konjugált) bázis protonfelvételének irányából szemléljük a továbbiakban.

2.2.1 Makroszkopikus protonálódási egyensúlyok leírása

Egy L vegyület i-ik csoportjának protonálódására érvényes:

$$H_{i-1}L^{z+i-1} + H^+ \rightleftharpoons H_iL^{z+i}$$

$$K_i = \frac{[H_iL^{z+i}]}{[H_{i-1}L^{z+i-1}][H^+]} \tag{2}$$

(ahol i=1,2,3,…n, z a molekula töltése)

Több proton felvétele esetén a K_i lépcsőzetes protonálódási állandók helyett az azokból képzett kumulatív állandók az alábbiak szerint használhatóak:

$$L^z + iH^+ \rightleftharpoons H_iL^{z+i}$$

$$\beta_i = \frac{[H_iL^{z+i}]}{[L^z][H^+]^i} = \prod_{j=1}^{i} K_i \tag{3}$$

Ki kell hangsúlyozni, hogy a mérések módjától, azaz elektródkalibrációtól függően más-más egyensúlyi állandóhoz jutunk: a látszólagos egyensúlyi állandókat a p[H] skála használatakor kaphatjuk meg, a (2) egyenlet szerint. Ha pufferkalibrációt végzünk,

vagyis az elektródot a hidrogénion-aktivitásra kalibráltuk, akkor az ún. vegyes vagy Brønsted állandókhoz jutunk:

$$K = \frac{[\mathrm{H_i L^{z+i}}]}{[\mathrm{H_{i-1} L^{z+i-1}}]\alpha_{\mathrm{H^+}}} \tag{4}$$

Bár minden mérésünket aktivitás-alapú pH-skála alkalmazásával végeztük, a továbbiakban nem jelöljük az egyenletekben, hogy a hidrogénion-aktivitást mértük, egységesen a $[H^+]$ jelölést alkalmazzuk.

A makroszkopikus protonálódás leírásához gyakran alkalmazott az ún. Bjerrum-görbe vagy $\bar{n}_H$ függvény, amely a pH függvényében megadja a molekulák által megkötött protonok átlagos számát:

$$\bar{n}_{\mathrm{H}} = \chi_{\mathrm{HL^{z+1}}} + 2 \cdot \chi_{\mathrm{H_2 L^{z+2}}} + \ldots n \cdot \chi_{\mathrm{H_n L^{z+n}}} = \frac{\sum_{i=0}^{n} i \cdot \beta_i [\mathrm{H^+}]^i}{\sum_{i=0}^{n} \beta_i [\mathrm{H^+}]^i} \tag{5}$$

2.2.1.1 Makroállandók meghatározása

A protonálódási makroállandók meghatározására mindazon módszerek alkalmasak, amelyekben a mért fizikai – kémiai mennyiség pH-függő változása a molekula H^+-felvételével egyértelmű kapcsolatba hozható. A protonálódási állandók meghatározásának egyik leggyakrabban használt módszere a pH-potenciometriás titrálás [95]. A potenciometriás titrálás hátránya, hogy csak nemillékony és tiszta anyagok vizsgálatára alkalmas, amelyek titrálás közben sem bomlanak. A méréseket a légköri CO_2 is zavarja. A titrálások csak akkor adnak megbízható eredményt, ha a vizsgálandó anyag legalább 0,5 mM koncentrációban oldódik a teljes titráltsági tartományban. Továbbá a potenciometria csak 2-12 közötti log*K* értékű vegyületek mérésére alkalmas. A gyógyszermolekulák sav-bázis egyensúlyainak – különösen a mikroszkopikus sav-bázis egyensúlyoknak – modern vizsgálati módszere az NMR-pH titrálás. Ennek alapja, hogy a protonálható csoport közelében lévő NMR magok kémiai eltolódása a bázikus csoport protonálódásának hatására megváltozik. Az NMR-pH

titrálás előnye a potenciometriával szemben, hogy szennyezett vegyületek meghatározására is alkalmas, illetve *in situ* indikátormolekulák használatával a teljes pH tartományban megbízhatóan meghatározhatóak a protonálódási állandók értékei. A karboxilátcsoport várhatóan alacsony log*K* értéke miatt illetve az egyes származékvegyületek esetleges szennyezése miatt a makroállandókat NMR-pH titrálással határoztuk meg, így a továbbiakban csak ezt a módszert tekintjük át.

2.2.1.1.1 NMR-pH titrálás

Az NMR-pH titrálás jól használható vegyületek makroállandóinak meghatározására mindaddig, amíg a pH függvényében változó NMR spektrumon külön-külön követhetők a vizsgált anyag, valamint az esetleges szennyezők, bomlástermékek jelei.

Egy NMR aktív mag ppm-ben mért δ kémia eltolódását a következő egyenlettel definiáljuk:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_o} \cdot 10^6 = \frac{\sigma_{ref} - \sigma}{1 - \sigma_{ref}} \cong \sigma_{ref} - \sigma \qquad (6)$$

ahol ν a megfigyelt mag, ν_{ref} egy referenciaanyag magjának rezonancia frekvenciája [Hz], σ és σ_{ref} ugyanezek árnyékolási tényezője, ν_0 a spektrométer alapfrekvenciája [MHz].

A protonálódás hatására a funkciós csoport körül csökken az elektronsűrűség, ezért a közeli NMR magok diamágneses árnyékolása, így kémiai eltolódása is megváltozik. Mivel a molekulák protonálódása pillanatszerűen megy végbe, az NMR időskáláján láthatatlan marad a folyamat, így egy közös rezonanciajel figyelhető meg a részecskék egyedi kémiai eltolódásainak móltörtekkel súlyozott átlagánál:

$$\delta^{\text{mért}} = \delta_{\mathrm{L}^z}\chi_{\mathrm{L}^z} + \delta_{\mathrm{HL}^{z+1}}\chi_{\mathrm{HL}^{z+1}} + \ldots + \delta_{\mathrm{H_nL}^{z+n}}\chi_{\mathrm{H_nL}^{z+n}} = \frac{\sum_{i=0}^{n} \delta_{\mathrm{H_iL}^{z+i}} \beta_i [H^+]^i}{\sum_{i=0}^{n} \beta_i [H^+]^i} \qquad (7)$$

ahol δ_{L^z}, $\delta_{HL^{z+1}}$, $\delta_{H_nL^{z+n}}$, az egyes makroszkopikus protonáltsági állapotokhoz tartozó kémiai eltolódásokat, χ_{L^z}, $\chi_{HL^{z+1}}$, $\chi_{H_nL^{z+n}}$, a móltörtjeiket jelölik.

A (7) egyenletet a mért pH / δ adatpárokra illesztve a protonálódási állandó(k) meghatározható(k). A mágnesek térerejének növekedésével a kémiai eltolódások egyre pontosabban mérhető mennyiséggé válnak [96,97] így a számolt log*K* érték pontosságát a pH-mérés precizitása (±0,02 [98]) szabja meg. A protonálódási állandó meghatározásának pontossága javítható, ha minél több magra szimultán illesztjük a (7) egyenletet.

A kémiai eltolódásokat minden esetben viszonyítanunk kell valamilyen referenciához, ezért fontos egy olyan anyag választása, amely a vizsgált pH-tartományban nem változtatja az ionizációs állapotát, ebből következően a kémiai eltolódását sem. A fenti kitételt figyelembe véve a legmegfelelőbb referenciaanyagnak NMR titrálások során a 3-trimetil-1-propánszulfonsav (DSS) bizonyult.

Egy NMR-pH titrálás során azonos ionerősségű és ligandum koncentrációjú, de eltérő pH-jú oldatok NMR spektrumát regisztráljuk. NMR-pH titrálásnál a potenciometriával ellentétben a kiértékelésben nem jelent problémát, ha a ligandum koncentráció a titrálás során változik, mivel csak a pH és a kémiai eltolódás adatok szükségesek a kiértékeléshez.

Egy NMR-pH titrálás többféleképpen is kivitelezhető. Az egyedi minták módszerénél az oldatok pH-ját savas és bázikus törzsoldatok megfelelő arányú elegyítésével állítjuk be. A pH-t nagy térfogatú oldatokban (5-25 ml), állandó kevertetés mellett üvegelektróddal mérjük, és ezekből az oldatokból vesszünk ki 600-700 µl-t, amiből regisztáljuk az NMR spektrumokat. Egycsöves titrálásnál a mérendő anyagot egyetlen NMR csőbe töltjük, ehhez kis, µl-es mennyiségben adagoljuk a titráló oldatot, a pH-t kevertetés nélkül mérjük mikroelektróddal. A módszer kevés anyagot igényel, azonban pontatlan, hiszen megfelelő kevertetés nélkül mérjük a pH-t. Mindkét módszernél a pH pontos meghatározására *in situ* indikátormolekulákat is használhatunk. Ez esetben a pH-t az indikátormolekula mért kémiai eltolódásából számítjuk az alábbi egyenlet szerint:

$$\mathrm{pH} = \log K_{\mathrm{ind}} + \log \frac{\delta_{\mathrm{ind}}^{\mathrm{mért}} - \delta_{\mathrm{Hind}}}{\delta_{\mathrm{ind}} - \delta_{\mathrm{ind}}^{\mathrm{mért}}} \quad (8)$$

ahol a δ_{Ind} és δ_{HInd} indikátormolekula határeltolódások, illetve K_{ind} az indikátor protonálódási állandója, aminek értéke független kísérletekből ismert, $\delta_{ind}^{mért}$ a megfigyelt kémiai eltolódás. A (8) egyenletből kapott pH pontosságát a kémiai eltolódások standard deviációja határozza meg, és a pH a logK_{ind} ± 1 tartományban számítható ki elfogadható pontossággal [99]. Szakács és mtsai. 5 indikátorból álló sorozatot állítottak össze a pH = 0-12 tartomány lefedésére [99]. Ezt egészítette ki Orgován és Noszál, akik új indikátorokat vezettek be a lúgos tartomány torzításmentes meghatározására [100]. Így 1M ionerősség mellett 5 indikátormolekula alkalmazásával (diklórecetsav, aceton oxim, szarkozin, ecetsav, imidazol) a teljes pH tartomány lefedhető. Az egycsöves titrálás pontossága jelentősen javítható indikátor molekulák használatával. Egyes indikátormolekulák irodalmi adatait a III. táblázat tartalmazza.

III. táblázat Egyes indikátormolekulák log*K* értékei, a kémiai határeltolódások ppm-ben és a megbízhatóan alkalmazható pH intervallum [99,100]

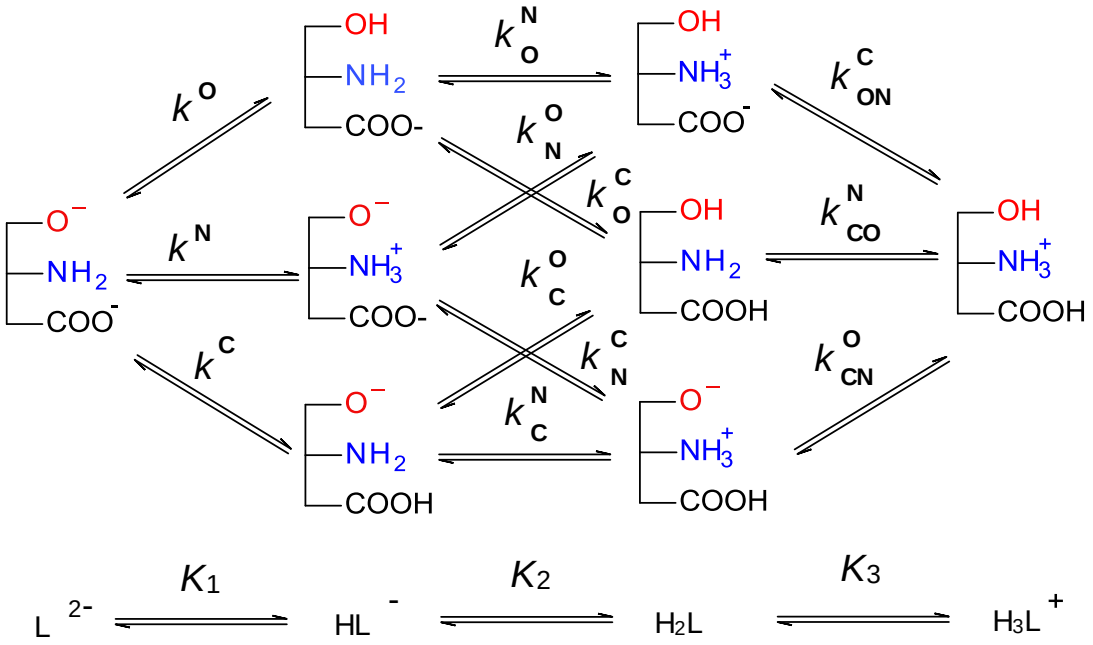
pH indikátormolekula	logK_{ind}	δ_{ind}	δ_{Hind}	pH intervallum
diklórecetsav	1,14	6,050	6,350	0 – 2,2
monoklórecetsav	2,27	4,049	4,280	1,2 – 3,3
ecetsav	4,57	1,907	2,086	3,6 - 5,6
imidazol	7,26	7,781 (H2) 7,139 (H4)	8,696 (H2) 7,487 (H4)	5,5 – 8,9
TRIS	8,13	3,509	3,733	7,1 – 9,2
szarkozin	10,24	3,107 (CH_2) 2,283 (CH_3)	3,613 (CH_2) 2,737 (CH_3)	8,8 - 11,8

2.2.2 Protonálódási mikroegyensúlyok vizsgálata és leírása

A makroállandók csak a felvett protonok átlagos számát adják meg adott pH-n, azonban az egyes funkciós csoportok egyedi sav-bázis karakteréről nem adnak információt. A protonok funkciós csoportok közötti eloszlását a mikroszkopikus protonálódási állandók jellemzik.

A vizsgált molekuláink három báziscentrumot tartalmaznak, ezek a karboxilát-, az amino- és a fenolátcsoport. Az alapvető összefüggéseket egy ilyen háromcsoportos molekulán tárgyaljuk.

A fenolátcsoportot O^-, az aminocsoportot NH_2, a karboxilátcsoportot COO^- jelöli.



7. ábra Vizsgált vegyületeink protonálódási makro-és mikroegyensúlyai

A 7. ábrán jól látható, hogy vegyületeink 4 protonáltsági állapota (L^{2-}, HL^-, H_2L, H_3L^+) összesen 8 mikrorészecskével és 12 mikroszkopikus egyensúlyi állandóval jellemezhető.

A mikro- és makrorészecskék koncentrációja között az alábbi összefüggés áll fenn:

$[HL^-]=[OH, NH_2, COO^-] + [O^-, NH_3^+, COO^-] + [O^-, NH_2, COOH]$

$[H_2L]=[OH, NH_3^+, COO^-] + [OH, NH_2, COOH] + [O^-, NH_3^+, COOH]$ (9)

A mikrospeciáció alatt az egyes mikrorészecskék pH-függő eloszlását értjük [1]. A lépcsőzetes *k* mikroállandók az adott funkciós csoport bázicitását jellemzik, a többi csoport meghatározott állapotában. A mikroszkopikus protonálódási állandók felső indexe jelöli az adott folyamatban protonálódó csoportot, az esetleges alsó index a már protonált csoportot.

A fenolátcsoport bázicitását például négy mikrorészecskére (O^-, NH_2, COO^-), (O^-, NH_3^+, COO^-), (O^-, NH_2, COOH), (O^-, NH_3^+, COOH) írhatjuk fel a következőképpen:

$$k^{O} = \frac{[OH, NH_2, COO^-]}{[O^-, NH_2, COO^-][H+]}; k_N^O = \frac{[OH, NH_3^+, COO^-]}{[O^-, NH_3^+, COO^-][H^+]};$$

$$k_C^O = \frac{[OH, NH_2, COOH]}{[O^-, NH_2, COOH][H^+]}; \; k_{NC}^O = \frac{[OH, NH_3^+, COOH]}{[O^-, NH_3^+, COOH][H^+]} \quad (10)$$

A protonálódási makro-, és mikroállandók között rendszerünkben az alábbi összefüggések érvényesek:

$$\beta_1 = K_1 = k^O + k^N + k^C \quad (11)$$

$$\beta_2 = K_1 K_2 = k^O k_O^N + k^O k_O^C + k^N k_N^C = k^O k_O^N + k^C k_C^O + k^C k_C^N = \ldots \quad (12)$$

$$\beta_3 = K_1 K_2 K_3 = k^O k_O^N k_{NO}^C = k^C k_C^N k_{CN}^O = \ldots \quad (13)$$

Kismolekulákban általában az egyik kötőhely protonálódása a másik bázicitását csökkenti, mivel ilyenkor az egész molekulában csökken az elektronsűrűség így az azzal arányos bázicitás is, ezáltal az azonos csoportra vonatkozó mikroállandók sorrendje az alábbiak szerint alakul $k^O > k_N^O > k_{CN}^O$; $k^N > k_O^N > k_{OC}^N$ …. Ez a jelenség történhet kötéseken keresztül, amely hatás általában 4-5 nem konjugált kötés felett elhanyagolható, illetve flexibilis molekulák esetén, téren át is létrejöhet.

A bázicitás csökkentő hatás a kölcsönhatási tényezővel *(E)* számszerűsíthető. A kölcsönhatási tényező illetve annak logaritmusa az alábbi módon számolható (például az amino- és a karboxilátcsoport között):

$$E^{\mathrm{N\text{-}C}} = \frac{k^{\mathrm{N}}}{k_{\mathrm{C}}^{\mathrm{N}}} = \frac{k^{C}}{k_{\mathrm{N}}^{\mathrm{C}}} \tag{14}$$

$$\log E^{\mathrm{N\text{-}C}} = \log k^{\mathrm{N}} - \log k_{\mathrm{C}}^{\mathrm{N}} = \log k^{\mathrm{C}} - \log k_{\mathrm{N}}^{\mathrm{C}} = \ldots \tag{15}$$

Amint a fenti egyenletből látható, a hatás és annak értéke viszonos. A kölcsönhatási tényezők az adott molekularészben lévő, két adott csoport kölcsönhatást jellemző értéküket más molekulákban is megőrzik [101].

A kölcsönhatási tényező és az intrinsic bázicitások segítségével bármely tetszőleges mikroállandó kifejezhető, például:

$$log\, k_C^N = log\, k^N - log\, E^{N-C} \tag{16}$$

A 7. ábráról leolvasható, hogy a HL^-, H_2L makrorészecske háromféle protonáltsági izomer (mikrorészecske) formájában fordulhat elő. A protonáltsági izomerek mindig együtt fordulnak elő az oldatban, de mivel a protonálódási folyamatok pillanatszerűen gyorsak, így a részecskék egymásba történő átalakulása az elválasztástechnikák számára láthatatlan. A mikroszkopikus rendszerek jellegzetessége, hogy a protonáltsági izomerek koncentrációjának hányadosa a pH-tól és az összkoncentrációtól független. Az egyéb részecskék hányada ugyanakkor függ a pH-tól: a pH csökkenésével a kationos, aminocsoporton protonált részecske részaránya, pH növelésével a dianionos formáé nő. A protonáltsági izomerek arányát tautomerizációs állandónak nevezzük és például a töltésmentes (OH, NH_2, COOH) és ikerionos (OH, NH_3^+,COO^-) formára az alábbi egyenlettel számolható:

$$k_z = \frac{[\mathrm{OH}, \mathrm{NH_2}, \mathrm{COOH}]}{[\mathrm{OH}, \mathrm{NH_3^+}, \mathrm{COO^-}]} = \frac{k_O^N [\mathrm{OH}, \mathrm{NH_2}, \mathrm{COO^-}]}{k_O^C [\mathrm{OH}, \mathrm{NH_2}, \mathrm{COO^-}]} = \frac{k_O^C}{k_O^N} \tag{17}$$

A tautomerizációs állandó értékét a hőmérséklet és az oldószer polaritása befolyásolja, például szerves oldószerekben, ahol az oldószer polaritása kicsi a töltésmentes részecske részaránya növekedni fog az ikerionos forma rovására.

A mikroformák egymásba való átalakulásának a lehetősége biztosítja, hogy a molekulák képesek a szervezet egyes eltérő pH-jú, dielektromos állandójú, ionerősségű kompartmentjeihez „alkalmazkodni" és biológiai hatást létrehozni.

2.2.2.1 Mikroszkopikus protonálódási állandók meghatározásának lehetőségei

Makroszkopikus titrálási görbékből nem lehet mikroállandókat számolni (kivételt képeznek a totál szimmetrikus molekulák). Szükség van valamilyen többletinformációra, ami lehet rokon szerkezetű vegyületek bázicitás adata, vagy valamilyen spektroszkópiai méréssel nyert információ, amelyből számítható az egyes csoportok protonáltsági fokát jellemző *f* függvény. A molekula spektrális tulajdonságaitól függően UV-pH, NMR-pH és CD-pH titrálás egyaránt szóba jöhet, bár infravörös, Raman és fluoreszcens spektrometriát is találhatunk az irodalomban [94,102,103]. A következőkben a mikroállandók meghatározására alkalmas módszerek közül az általunk is használt deduktív módszert, az NMR-pH és az UV-pH titrálást részletezzük.

2.2.2.2 Modellvegyületek bázicitás adatainak felhasználása (Deduktív módszer)

A módszer során a meghatározandó molekulához szerkezetileg közel azonos, de kevesebb számú protonálható csoporttal rendelkező vegyület protonálódási makroállandóit építjük be a mikrospeciációs sémába, adott mikroállandók helyére. Az első ilyen jellegű meghatározást Ebert végezte [104], aki a glicin metil-észterének aminocsoportjára mért makroállandóval jellemezte a glicin minor protonáltsági izomerjének (H_2N-CH_2-COOH) amino-bázicitását. A meghatározás során abból indult ki, hogy az észter- és a karboxilcsoport hatása az aminocsoport bázicitására azonos.

A deduktív módszert előnyben kell részesíteni a spektroszkópiás módszerekkel szemben, ha a funkciós csoportok bázicitása nem összemérhető, így a minor protonáltsági izomer spektroszkópiás jele elhanyagolható, illetve ha az adott proton felvételére alkalmas kötőhely bázicitását nem lehet szelektíven mérni spektroszkópiás módszerrel [1]. Saját munkánk bizonyította, hogy a fluorokinolonok minor protonálódási útvonalán a mikroállandók megbízhatóbban határozhatóak meg deduktív módszerrel, mint spektroszkópiásan az egyes funkciós csoportok eltérő bázicitása miatt [105].

Legegyszerűbben a –COOH csoport „modellezhető" metil-észterként [104,105] vagy etil-észterként [106]. Ezen származékok további előnye, hogy általában az anyavegyületekből könnyen előállíthatóak. Az irodalomban a karbonsav funkció imitálására savamidot is használtak [107]. A primer aminocsoportot acetamidként modellezték [108], míg a protonált aminocsoportok kvaternerezett származékokkal helyettesíthetők [109]. Fontos megjegyezni, hogy a deduktív módszer esetében mindig olyan származékot kell választani, ami a minor protonáltsági izomert modellezi.

A deduktív meghatározások másik módja a modellvegyületek kölcsönhatási paraméterek átvitelén alapul. Két molekula szerkezeti hasonlósága esetén, ha az egyik molekulának ismertek a protonálódási mikroállandói, akkor a kölcsönhatási paraméter értéke átvihető a hasonló molekulára. Szakács és Noszál bizonyította, hogy a kölcsönhatási tényezők jobban átvihetők egy adott vegyületcsalád tagjai között, mint maguk a mikroállandók [101], amely számos közleményben alkalmazásra került [110,111]. Jelen dolgozatban a pajzsmirigyhormon mikroállandóinak meghatározására a deduktív módszer mindkét módját alkalmaztuk.

2.2.2.3 Mikroállandók meghatározása UV-pH titrálással

A spektrofotometriás titrálás makroállandók meghatározása mellett alkalmazható protonálódási mikroállandók meghatározására abban az esetben, ha a vizsgált molekula UV spektrumának pH-függését csak egyetlen csoport protonálódása befolyásolja [112]. Ilyen esetben egy alkalmasan megválasztott k hullámhosszon az abszorbanciák pH-függéséből az adott (j) csoportra kiszámítható a protonáltsági móltört függvény (f_j):

$$f_j = \frac{A_{k,mért} - A_{k,L}}{A_{k,HL} - A_{k,L}} \quad (18)$$

ahol $A_{k,mért}$ az adott pH-n és hullámhosszon mért abszorbancia, $A_{k,HL}$ és $A_{k,L}$ pedig a csoport teljes protonáltsága illetve deprotonáltsága esetén mért abszorbancia érték. A protonáltsági móltört és a makroállandók ismeretében a mikroállandók a kísérleti (*f*, pH) értékpárokból nemlineáris regresszióval számíthatóak a következő összefüggés értelmében egy kétcsoportos molekulára:

$$k^j = \frac{f_j(1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2) - \beta_2[H^+]^2}{[H^+]} \quad (19)$$

ahol k^j az adott (*j*) csoportra jellemző mikroállandó, míg β_1 és β_2 kumulatív makroállandók. A (19)-es egyenletből látszik, hogy a mikroállandók számításához, a makroállandók ismerete szükséges.

Ha a molekula egynél több csoportjának protonálódása is hozzájárul a mért spektrális változáshoz, a szelektív hullámhossz(ak) kiválasztása problematikussá válhat. A mikrorészecskék koncentrációarányának eltolására ekkor az UV-pH titrálást különböző hőmérsékleteken vagy szerves oldószerkomponens jelenlétében hajtják végre [113]. Az így kapott spektrumsorozatból kedvező esetben rekonstruálni lehet az egyes mikrorészecskék egyedi spektrumát.

Fontos feltétel az UV-pH titrálás esetén, hogy az egész meghatározás során az össz ligandum koncentráció ne változzon. A módszer elsősorban fenol-, tiol- és primer aromás aminocsoportok ionizációjának szelektív követésére használható [1,114]. UV-pH titrálással csak abban az esetben kaphatunk pontos értékeket, ha a kérdéses csoportok bázicitása összemérhető. Emiatt munkánk során a Tyr, MIT és T3 fenolátjának bázicitását tudtuk meghatározni UV-pH titrálással.

2.2.2.4 Mikroállandók meghatározása NMR-pH titrálással

Az NMR-pH titrálás abban az esetben alkalmazható mikroállandók meghatározására, ha bármelyik megfigyelt mag kémiai eltolódását csak egyetlen csoport befolyásolja. Ez a

feltétel ^{1}H NMR spektroszkópia esetén akkor teljesül, ha legalább ötkötésnyi távolság van a másik báziscentrum és a megfigyelt mag között. (Hetero)aromás rendszerekben a π-elektronok az ionizáció hatását több kötésen át is közvetíthetik. Emiatt általában ^{1}H NMR-pH titrálással csak a fehérje, peptid oldalláncok funkciós csoportjainak bázicitása követhető szelektíven. Kismolekulákban kevés kivételtől eltekintve ez a módszer nem használható pontos mikroállandók meghatározására. Ha sikerült találnunk egy magot, amellyel szelektíven követhető egy funkciós csoport protonálódása, az UV-pH titrálásnál leírtakhoz hasonlóan a csoport protonáltsági foka kiszámítható a kémiai eltolódásból [97,115]:

$$f = \frac{\delta^{mért} - \delta_L}{\delta_{H_nL} - \delta_L} = \frac{\Delta\delta^{mért}}{\Delta\delta^{max}} \tag{20}$$

Ez a módszer is, mint minden spektroszkópiás módszer csak akkor alkalmazható protonálódási mikroállandók meghatározására, ha a kérdéses csoportok bázicitása összemérhető.

Természetesen a ^{1}H-en kívül más NMR aktív magok protonálódását is követhetjük (^{13}C, ^{19}F, ^{15}N, ^{31}P), amelyek közül kiemelném a ^{15}N-t, mivel ^{15}N NMR-pH titrálás során közvetlenül a nitrogénatomok protonálódását követhetjük, így nitrogén tartalmú bázisok protonálódásának vizsgálatára alkalmazható. A legfőbb probléma evvel a technikával, hogy a ^{15}N nagyon alacsony természetes előfordulása miatt (0,37%) érzékenysége kicsi, pusztán 0,1% a protonhoz viszonyítva. A módszer rendkívül alacsony érzékenysége szükségessé teszi rendkívül hosszú mérési idők vagy tömény oldatok (természetes izotóparány mellett) vagy pedig ^{15}N dúsított minták használatát. A mérési idő csökkenthető hidrogénen detektált többdimenziós módszerek (^{1}H – ^{15}N HMBC) alkalmazásával. A pajzsmirigyhormonok alacsony oldhatósága miatt ezt a módszert nem tudtuk alkalmazni az aminocsoport protonálódásának szelektív követésére.

2.3 Lipofilitás

A lipofilitás egy olyan anyagi tulajdonság, amely kifejezi egy vegyület affinitását zsírszerű, apoláris (lipofil) környezethez. A lipofilitás a gyógyszervegyületek egyik

legrégebbi és legfontosabb fizikai-kémiai tulajdonsága, amely szerepet játszik a vegyületek farmakokinetikai és farmakodinámiás jellemzésében egyaránt. Általánosan elfogadott, hogy minél lipofilebb egy molekula annál könnyebben tud átjutni biológiai membránokon. A lipofilitás jellemzésére leggyakrabban az oktanol/víz megoszlási hányados logaritmusát használjuk (log*P*) [5]. Az oktanol/víz rendszer a biológiai megoszlás jó prediktora, ugyanis amfifil tulajdonsága révén jól képes modellezni a gyógyszer és a membrán foszfolipidjei között létrejövő kölcsönhatásokat. Nyilvánvaló, hogy egyetlen oldószerrendszerrel nem lehet modellezni a sokféle biológia membránt, így a biológiai megoszlás modellezésére több oldószerrendszert is alkalmaztak (kloroform/víz, ciklohexán/víz, heptán/víz stb.). Egyre nagyobb szerep jut a nemizotróp rendszereknek is (liposzóma/víz), de az oktanol/víz rendszer máig megőrizte kitüntetett szerepét.

Híg oldatokban egy anyag valódi megoszlási hányadosán két egymással nem elegyedő oldószerben, azonos molekuláris állapotban (pl. azonos protonáltsági formák) mért koncentrációinak arányát értjük, mely adott hőmérsékleten és nyomáson, az egyensúlyi állapot elérése után konstans érték. Ennek megfelelően az alábbi összefüggéssel számíthatjuk ki a valódi megoszlási hányados értéket:

$$P = \frac{C_o}{C_v} \tag{21}$$

Konvencionálisan a szerves fázisban mérhető koncentráció szerepel a számlálóban, így a megoszlási hányados nagyobb számértéke nagyobb lipofilitást is jelez. Megoszlás szempontjából a gyógyszereket két fő csoportra oszthatjuk, neutrális és ionizációra képes vegyületekre. Neutrális molekuláknál, ha asszociáció nem lép fel, a kísérletileg mérhető és a valódi megoszlási hányados azonos. Ionizálható molekuláknál azonban, ahol a közeg pH-jától és a vegyület log*K* értékétől függően ionizáció következhet be, a valódi megoszlási hányadost meg kell különböztetni az adott mérési körülmények között meghatározható ún. látszólagos megoszlási hányadostól (log*D*). Ezekben az esetekben a töltésmentes, monomer forma mellett bizonyos, általában kisebb mértékben az ionos formák is megoszlanak. A látszólagos megoszlási hányados az oldatban jelenlévő részecskék megoszlási hányadosainak a megfelelő móltörttel súlyozott összege:

$$D_{(pH)}=\sum\chi_i P_i \quad (22)$$

ahol χ_i az egyes részecskék relatív koncentrációja vizes fázisban, P_i pedig azok megoszlási hányadosa. A log*D* vs. pH függvényt lipofilitás-pH profilnak nevezzük.

Az ionizálható/ionos vegyületek lipofilitása, különösen a protonáltsági izomereké alulreprezentált az irodalomban az olyan módszer hiánya miatt, amivel az ionos formák megoszlási hányadosa meghatározható. Kutatócsoportunk a közelmúltban kidolgozott egy deduktív módszert, amellyel az amfoter vegyületek részecske-specifikus megoszlási mikroegyensúlyai meghatározhatóak [116]. Ennek a módszernek segítségével több kétcsoportos gyógyszermolekula – nifluminsav [116], apovinkaminsav [117], morfin [118] - mikroszkopikus lipofilitása is meghatározásra került. A részecske-specifikus lipofilitás adatokból a nifluminsav és az apovinkaminsav esetén az derült ki, hogy nem a töltés nélküli részecske hozzájárulása a legnagyobb a molekulák bruttó lipofilitásához, ami jelzi, hogy amfoter vegyületek esetén szükség van a lipofilitás részecske-specifikus jellemzésére, hiszen nem biztos, hogy egy molekula bruttó lipofilitáshoz a töltés-mentes részecske hozzájárulása lesz a legnagyobb. Ez pedig azt jelentheti, hogy az egyes amfoter vegyületek membrántranszportjában a töltés-mentes részecske mellett az ikerionos formának is jelentős szerep juthat. A következő alfejezetben a lipofilitás meghatározására alkalmas módszereket tekintjük át.

2.3.1 log*P* érték meghatározására alkalmas módszerek

A megoszlási hányados kísérleti meghatározására alkalmas módszerek két csoportba oszthatók. Az első csoportba tartoznak a direkt módszerek (hagyományos rázótölcséres technika, keverőedényes módszerek, kétfázisú potenciometriás titrálás), amik a megoszlási hányados közvetlen meghatározását teszik lehetővé. A második csoportba tartoznak az indirekt módszerek (fordított fázisú VRK, HPLC), amikkel a megoszlási hányadossal arányos retenció határozható meg [119]. A kromatográfiás log*P* meghatározás elvi alapját a folyadék/folyadék megoszláson alapuló kromatográfiás retenció és a megoszlási hányados között fennálló lineáris összefüggés adja meg (VRK esetén $\log P = aR_M + b$, ahol R_M a mérhető retenciós faktorral hozható összefüggésbe;

HPLC esetén $\log P = a \log k' + b$, ahol log*k*' a kapacitás faktor). A jódozott aminosavak megoszlási hányadosát keverőedényes módszerrel határoztuk meg, így részletesebben csak a hagyományos rázótölcséres illetve keverőedényes módszert ismertetjük.

2.3.1.1 Hagyományos rázótölcséres és keverőedényes módszerek

A módszer lényege, hogy két egymással nem elegyedő oldószer között, intenzív fázisérintkezés útján (rázatás vagy keverés), termosztált körülmények között, a vizsgálandó anyagot megosztjuk. A megoszlási egyensúly beállta után a fázisokat szétválasztjuk, és azokban a megosztott anyag koncentrációját alkalmas analitikai módszerrel, általában spektrofotometriásan meghatározzuk. A mérési eredményeket befolyásolja megosztó fázisok egymással történő telítésének időtartama, a mérés hőmérséklete és az ionerősség, így ezekre a paraméterekre a mérések kivitelezésénél nagy hangsúlyt kell fektetni. Validált körülmények között az eljárás átlagos hibája ± 0,05 – 0,10 log egység a -2 és +3 tartományban. A módszer hátránya közé tartozik, hogy azoknak a vegyületeknek a megoszlási hányadosát, amelyek log*P* értéke -2-nél kisebb, vagy nagyobb mint +4 nem lehet pontosan meghatározni, mivel ilyenkor extrém fázisarányokat kell alkalmazni. További hátránya, hogy a meghatározások időigényesek, nagy mennyiségű és nagytisztaságú anyagot igényelnek. A hagyományos rázótölcséres eljárás HT módszerré alakításával többen próbálkoztak és kifejlesztettek egy célkészüléket is, melynél 96 mérőhelyes mikrotálcán történik a fázisok érintkeztetése a megoszlási egyensúly beálltáig, majd robotizált mintavételt követően, diódasoros UV detektorral mérik a koncentrációt [120].

2.4 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik fizikai – kémiai állandói - irodalmi előzmények

A vizsgált vegyületeink közül a tirozin mikroállandói régóta ismertek az irodalomban. Martin és mtsai. UV-pH titrálással és származékvegyületek felhasználásával határozták meg a tirozin összes protonálódási makro- és mikroállandóit [121]. A tirozin protonálódási állandóit azért határoztuk meg mi is, mert így az általunk és Martin és

mtsai. által meghatározott protonálódási állandók összevetésével lehetőségünk nyílik módszerünk helyességének ellenőrzésére. Továbbá az összes vizsgált vegyület protonálódási állandóinak azonos módon történő meghatározása teszi lehetővé, hogy a jódozás bázicitáscsökkentő hatását vizsgáljuk az egyes vegyületeken. A jódozott tirozin származékok teljes mikrospeciációját még nem közölték. Yamazaki és mtsai. a monojódtirozin és dijódtirozin két makroállandóját (K_1, K_2), a monojódtirozin négy (k^{O}, k^{N}, k_N^O ,k_O^N) és a dijódtirozin két (k^{N}, k_N^O) mikroállandóját határozták meg potenciometriás illetve spektrofotometriás titrálással [122]. A pajzsmirigyhormonok esetén a protonálódási makroállandók értékében is jelentős ellentmondások találhatóak az irodalomban [123,124], amelynek legfőbb oka a vegyületek rossz vízoldhatósága [123]. Box és Comer fejlesztett ki egy gyors UV-pH titrálási módszert rosszul oldódó vegyületek protonálódási állandóinak meghatározására, amit sikerrel alkalmaztak a T4 K_1 (logK_1=8,72) és K_2 (logK_2=6,84) makroállandójának meghatározására [125]. A két makroállandón kívül csak a fenolát protonálódására jellemző k^{o} mikroállandó értéke ismert a T3 és T4 esetén Gemmill és Tata munkája nyomán [126,127]. A vizsgált vegyületeink lipofilitásának jellemzése is alulreprezentált az irodalomban: oktanol/víz megoszlási hányados értéket egyedül a T4 esetén határoztak meg (log$P$ = 3,21) [125]. A T4 és T3 esetén a membránhoz való kötődést jellemezték már az irodalomban foszfatidilkolin és vizes közeg közti „megoszlási hányadossal” illetve többrétegű (multilamelláris) liposzóma lipid fázisa és a víz közti megoszlási hányadossal [62,128]. Ezekből a vizsgálatokból az derül ki, hogy a megoszlást a vegyületek jódozottságának mértéke és ionizációs állapota jelentősen befolyásolja [62].

3. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a pajzsmirigyhormonok – T4, T3, rT3– és előanyagaiknak – Tyr, MIT, DIT,– részecske-specifikus sav-bázis egyensúlyainak és lipofilitásuknak meghatározását, illetve annak vizsgálatát, hogy e paraméterek hogyan befolyásolják a vegyületek szervezetbeni sorsát, receptorkötődését.

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

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

Terveztük a jódozott aminosavak részecske-specifikus lipofilitásának a meghatározását is. Az egyes mikrorészecskék lipofilitását az intézetünkben a közelmúltban kidolgozott módszer alapján [116] karboximetil- és *O*-metil-származékvegyületek felhasználásával, különböző pH-kon mért megoszlási hányadosok meghatározásával végeztük. A kémiai módosítás hatása korrekciós faktor bevezetésével minimalizálható. Az egyes mikrorészecskék megoszlási hányadosának ismeretében irodalmi adatok felhasználásával terveztük vizsgálni, hogy a pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus lipofilitása hogyan befolyásolja a vegyületek membrántranszportját.

4. Módszerek

4.1 Anyagok

A vizsgálataink tárgyát képező molekulák, a tirozin, monojódtirozin, dijódtirozin, liotironin, 3,3',5'-trijodo-l-tironin (reverz liotironin) és a tiroxin a Sigma-Aldrich cég termékei voltak. A protonálódási állandók meghatározásához használt alapvegyszereket (NaOH, NaCl, KCl, tömény sósav), az elektród kalibrációhoz és a megoszlási hányados mérésénél alkalmazott puffer komponenseket (nátrium-tetraoxalát, kálium-hidrogénftalát, KH_2PO_4, Na_2HPO_4, bórax, TRIS, citromsav, dinátrium-citrát), a csökkentett protonálható csoporttal rendelkező modellvegyületek szintézise során felhasznált vegyszereket (metanol, ecetsavanhidrid, hangyasav, dimetil-szulfát, diazometán) a Reanal és a Sigma-Aldrich gyártóktól szereztük be. Az NMR spektroszkópiához referenciaanyagként a 3-trimetilszilil-1-propánszulfonsav nátriumsóját (DSS ≥99%, Fluka) használtuk, a minták megfelelő térfogatszázalékban ≥99,8 atom% izotóptisztaságú D_2O oldószerrel (Aldrich) készültek. A szintetikus vegyületek szerkezetigazolását DMSO-d_6 (deuteráltság ≥ 99,5 atom%) (Aldrich) oldószerben végeztük az NMR spektroszkópiás vizsgálatok során. A megoszlási hányados mérésénél HPLC tisztaságú oktanolt használtunk, amely szintén a Sigma-Aldrich cég terméke volt. A titrálások oldószereként nagytisztaságú (18,2 MΩcm fajlagos ellenállású) Millipore vizet használtunk. A kereskedelemből beszerzett anyagokat tisztítás nélkül használtuk.

4.2 Modellvegyületek előállítása

Mind a protonálódási mikroállandók, mind a részecske-specifikus lipofilitás meghatározásához szükségünk volt csökkentett protonálható csoporttal rendelkező származékokra. Az anyavegyületekből metil-észter [129], *O*-metil-éter [130,131], és *O*-metil-karboximetil-észter [129,130] származékokat szintetizáltunk a megadott irodalmi hivatkozások alapján. Az észtereket direkt észteresítési reakcióval állítottuk elő. A megfelelő aminosavat metanolban oldva és tionil-kloridot hozzáadva az oldószer bepárlása után a termék sósav sóját nyertük ki [129]. Az *O*-metil-éter származékokat két módszerrel is előállítottuk. Az első módszerben az aminocsoportot annak formilezésével

védtük, majd a fenolátcsoport metilezést dimetil-szulfáttal végeztük lúgos közegben. A védőcsoportot 3M sósavval távolítottuk el, majd az oldat semlegesítésével (T4, DIT) vagy a sósav csökkentett nyomáson való bepárlásával (Tyr, MIT, T3) nyertük a kívánt termékeket [130]. A második módszert csak a pajzsmirigyhormonok (T4, rT3, T3) esetén végeztük el, ahol a metilezést diazometánnal végeztük. Az első lépésben a vegyületek *O*-metil-karboximetil-észtere keletkezett, majd az észtercsoport lúgos hidrolízise után kaptuk a megfelelő hormon *O*-metil-éterét [131]. Az előállított termékek szerkezetigazolása 1D és 2D NMR, illetve nagyfelbontású, pontos tömeg adataik alapján történt. Az előállított vegyületek illetve közti termékek közül hét (*N*-formil-monojódtirozin, *N*-formil-*O*-metil-tiroxin, *N*-formil-*O*-metil-liotironin, *O*-metil-karboximetil-tiroxin, *O*-metil-karboximetil-liotironin, *O*-metil-karboximetil-reverz-liotironin) új, az irodalomban még le nem írt vegyületek. Az irodalomban már ismert vegyületek spektrális tulajdonságai megegyeztek az ott leírtakkal, az új vegyületek ^{1}H NMR asszignációja és HRMS adatai a következők:

N-formil-O-metil-monojódtirozin

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): 8,34 (d, 1H, formil NH), 7,99 (s, 1H, formil CH), 7,54 (d, 1H, H-2), 7,03 (d, 1H, H-5), 6,85 (dd, 1H, H-6), 4,43 (m, 1H, CH), 3,80 (s, 3H, *O*-CH_3), 2,90 (dd, 1H, CH_2), 2,74 (dd, 1H, CH_2); HRMS (ESI-TOF$^+$) m/z számított [M+H$^+$] 349,9811, talált 349,9815.

N-formil-O-metil-tiroxin

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): 8,32 (d, 1H, formil NH), 7,99 (s, 1H, formil CH), 7,84 (s, 2H, H-2 és H-6), 7,09 (s, 2H, H-2’ és H-6’), 4,51 (m, 1H, CH), 3,81 (s, 3H, *O*-CH_3), 3,03 (dd, 1H, CH_2), 2,72 (dd, 1H, CH_2); HRMS (ESI-TOF$^+$) m/z számított [M+H$^+$] 819,6972, talált 819,6969.

N-formil-O-metil-liotironin

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): 8,35 (d, 1H, formil NH), 7,99 (s, 1H, formil CH), 7,97 (s, 2H, H-2 és H-6), 7,20 (d, 1H, H-2’), 6,91 (d, 1H, H-5’), 6,77 (dd, 1H, H-6’), 4,52 (m, 1H, CH), 3,80 (s, 3H, *O*-CH_3), 3,05 (dd, 1H, CH_2), 2,82 (dd, 1H, CH_2); HRMS (ESI-TOF$^+$) m/z számított [M+H$^+$] 693,8006, talált 693,8001.

O-metil-karboximetil-tiroxin

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): 7,85 (s, 2H, H-2 és H-6), 7,09 (s, 2H, H-2’ és H-6’), 4,08 (m, 1H, CH), 3,81 (s, 3H, *O*-CH_3), 3,66 (s, 3H, COO-CH_3), 3,28 (dd, 1H, CH_2), 2,97 (dd, 1H, CH_2); HRMS (ESI-TOF$^+$) m/z számított [M+H$^+$] 804,7180, talált 804,7186.

O-metil-karboximetil-liotironin

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): 7,96 (s, 2H, H-2 és H-6), 7,19 (d, 1H, H-2’), 6,90 (d, 1H, H-5’), 6,67 (dd, 1H, H-6’), 4,12 (m, 1H, CH), 3,80 (s, 3H, *O*-CH_3), 3,66 (s, 3H, COO-CH_3), 3,29 (dd, 1H, CH_2), 3,06 (dd, 1H, CH_2); HRMS (ESI-TOF$^+$) m/z számított [M+H$^+$] 678,8213, talált 678,8216.

O-metil-karboximetil-reverz-liotironin

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): 7,83 (d, 1H, H-2), 7,12 (dd, 1H, H-6), 7,08 (s, 2H, H-2’ és H-6’), 6,86 (d, 1H, H5), 4,09 (m, 1H, CH), 3,80 (s, 3H, *O*-CH_3), 3,66 (s, 3H, COO-CH_3), 3,26 (dd, 1H, CH_2), 3,02 (dd, 1H, CH_2); HRMS (ESI-TOF$^+$) m/z számított [M+H$^+$] 678,8213, talált 678,8221.

4.3 Üvegelektród kalibrálása

A pH pontos meghatározására pH 3 és 12,5 között Metrohm 6.0234.110 katalógusszámú kombinált üvegelektródot használtunk, melyet a mérések előtt, a IUPAC irányelveknek megfelelően [132], négy, ismert pH-jú, standard tompítóoldattal kalibráltuk. Minden mérés termosztált körülmények között történt 25 ± 0,1 °C-on. A pufferoldatokat az Európai Gyógyszerkönyv előírása alapján készítettük. A kalibráló pufferek összetételét és deklarált pH-ját a IV. táblázat tartalmazza.

IV. táblázat Kalibráló pufferek összetétele és pH-ja

pH	összetétel
1,68	0,05 M kálium-tetraoxalát (oxalát)
4,01	0,05 M kálium-hidrogénftalát (ftalát)
6,87	0,025 M KH_2PO_4 + 0,025 M Na_2HPO_4 (foszfát)
9,18	0,01 M $Na_2B_4O_7$ (bórax)

4.4 ^{1}H NMR-pH titrálás

A méréseket inverz geometriájú 5 mm-es gradiens mérőfejjel rendelkező Varian Unity Inova 600 MHz-es NMR spektrométeren végeztük 25 ± 0,1 °C-on. Az NMR titrálások egységesen 5 mm-es NMR csőben történtek, a kémiai eltolódásokat DSS belső referensre vonatkoztattuk. Az oldatok 5 v/v% D_2O-t tartalmaztak, amely csak 0,02 egységgel változtatja meg a pH-skálát az üvegelektróddal történő mérések pontosságán belül, így korrekciót nem végeztünk [133]. A víz rezonanciajelének csökkentésére kettős spin echo (dpfgse) pulzust alkalmaztunk [134]. A méréseket konstans 0,15 M ionerősség mellett végeztük, az ionerősség beállítására KCl-ot alkalmaztunk. A pH-mérésre pH 3-12,5 között kombinált üvegelektródot használtunk. Savas közegben pH <3 alatt, hogy kiküszöböljük az elektród hibáját, a pontos pH-t két *in situ* indikátormolekula, a diklórecetsav és a klórecetsav eltolódásaiból számítottuk ki a (8) egyenletnek megfelelően. A pH torzításmentes meghatározásához használt indikátor paraméterek a III. táblázatban találhatóak.

A titrálásokhoz különböző pH-jú oldatokat készítettünk 0,15 M ionerősség mellett KCl, NaOH és HCl felhasználásával 1 mM indikátormolekula és 0,1 mM DSS tartalom mellett. A titrálások során a Tyr, MIT, DIT és e vegyületek származékvegyületeiből 1,5 mM-os oldatokat használtunk és 8-16 tranziensből vettük fel a spektrumokat az egyes pH-kon. A pajzsmirigyhormonokból (rT3, T3, T4) és származékaikból a rossz oldhatóság miatt csak 0,1 mM-os oldatokat tudtunk készíteni, lúgos pH tartományban

128-256 tranzienst, míg savas pH-n több ezer tranzienst kellett alkalmaznunk a jelek megfelelő detektálásához.

A könnyen bomló, lúgérzékeny metil-észterek esetén 0,14 M KCl felhasználásával egy alapoldatot készítettünk, amit 0,01/0,02 M HCl és NaOH oldattal titráltuk, így az ionerősség a vizsgálat során végig 0,16 M alatt maradt. A metil-észterek jelei pH 11-ig biztonságosan kivehetőek voltak.

A protonálódási egyensúlyok makroszkopikus kiértékeléséhez az OPIUM és a Microcal OriginPro 8.0 programokat használtuk.

4.5 UV-pH titrálás

A Tyr, MIT és T3 fenolát mikroállandójának (k^{o}) meghatározásra a deduktív módszer mellett UV-pH titrálást is alkalmaztunk. A titrálás során a színképeket szobahőmérsékleten 0,5-1 nm lépésközzel vettük fel 200-400 nm-es tartományban 1 cm úthosszú Aldrich kvarcküvettát használva egy Jasco V-550 típusú diódasoros spektrofotométeren. A Tyr-ból és a MIT-ból 0,2 mM-os koncentrációjú törzsoldatot, a T3-ból 2 nM-os törzsoldatot készítettünk, amely elegendő volt a meghatározáshoz a T3 magas moláris fajlagos abszorpciója miatt. A ligandumok hígulásának elkerülése miatt a törzsoldatokat két egyforma térfogatú részletre osztottuk és az aliquotokhoz megfelelő, egyazon mennyiségű HCl-ot és NaOH-ot adtunk, létrehozva a savas illetve lúgos törzsoldatokat. A két oldat elegyítésével kalibrált elektród mellett különböző kémhatású oldatokat készítettünk, majd az oldatok UV-VIS spektrumát rögzítettük. Az oldatok ionerősségét (I = 0,15 M) kálium-kloriddal állítottuk be. A kiértékelést azon a hullámhosszon végeztük, ahol az eltérő pH-jú oldatok spektrumán a legnagyobb abszorbanciaváltozás volt megfigyelhető (~298 nm). Az UV-pH titrálási adatok kiértékeléséhez Statistica 6.0 programot használtunk.

4.6 Megoszlási hányados meghatározása keverőedényes módszerrel

A vizsgált anyavegyületek és egyes származékainak oktanol/víz látszólagos megoszlási hányadosát keverőedényes módszerrel határoztuk meg a megoszlás előtti és utáni mért abszorbanciák felhasználásával különböző fázisarányoknál. A megoszlási kísérlet előtt az oktanolos illetve vizes fázisokat egymással telítettük legalább 3 órán át tartó intenzív kevertetéssel 25 °C-on, majd legalább 24 órás szételegyedési idő eltelte után használtuk az egymással telített fázisokat. A meghatározáshoz szükséges különböző pH-jú oldatok elkészítéséhez citrát, foszfát, TRIS puffereket, illetve faktorozott sósavat és NaOH oldatokat használtunk, figyelembe véve, hogy adott pH-n adott puffernek minél nagyobb legyen a pufferkapacitása. Az ionerősség minden esetben 0,15 M volt. A rossz oldhatóság miatt a pajzsmirigyhormonok esetén az oktanolos fázisban, a MIT és a DIT esetén a vizes fázisban határoztuk meg a koncentrációjukat. A pajzsmirigyhormonok abszorpciós maximumának hullámhosszán az oktanol fényelnyelése elhanyagolható, ígyaz oktanolos fázisból is pontos abszorbanciákat lehet mérni. A fázisarányt úgy választottuk meg, hogy analitikailag jól mérhető anyagmennyiség maradjon az egyes fázisokban a megoszlás után is. A megfelelő fázisok koncentrációcsökkenését UV spektrofotometriás módszerrel követtük, 250 és 400 nm között a teljes UV spektrumot regisztráltuk.

4.7 HRMS mérések

Az általunk előállított vegyületek szerkezetigazolására pontos, nagyfelbontású tömegméréseket is végeztünk Jet Stream ionforrással (elektrospray ionizáció) felszerelt Agilent 6230-as TOF (time of flight, repülési idő analizátor) tömegspektrométeren pozitív ion módban. A kb. 1 mg/10 ml koncentrációjú metanolos oldatokból 0,1 – 0,3 µl-t injektáltunk a tömegspektrométerbe Agilent 1260 Infinity HPLC (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia) rendszert használva. Eluensként 70% metanol-víz elegyet alkalmaztunk, amit 0,1% hangyasavval savanyítottuk, az áramlási sebesség 0,5 ml/perc volt. A meghatározás alatt folyamatosan 121,050873 és 922,009798 tömeg/töltésű anyagokat használtunk a tömeg skála kalibrálására. A

vizsgálatokhoz a spektrumokat 100-2500 tömeg/töltés tartományban vettük fel, a kiértékelést Agilent MassHunter B.02.00 szoftverrel végeztük.

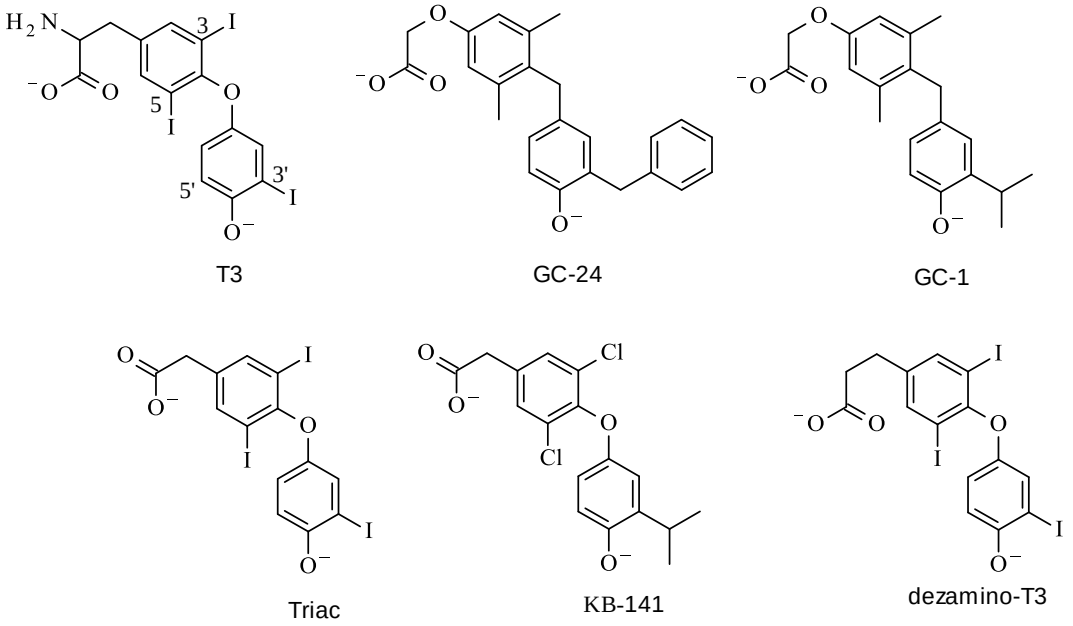
4.8 *In silico* receptorkötődés vizsgálat

A számítógépes modellezés során a célunk a pajzsmirigyhormonok egyes mikrorészecskéinek flexibilis dokkolása volt a pajzsmirigyhormon-receptor (TR) két izoformájához (TRα és TRβ).

A pajzsmirigyhormon-receptor – ligand együtt kristályosított komplex szerkezeteket a Protein Data Bank adatbázisból (www.pdb.org) töltöttük le. Módszerünkhöz és annak validálásához használt szerkezeteket a megfelelő PDB ID (Protein Data Bank azonosító) feltüntetésével az V. táblázatban foglaltuk össze. A tireomimetikumok konstitúciós képlete a 8. ábrán látható. A dokkolások során használt fehérjék röntgenkrisztallográfiás felbontása minden esetben 2,8 Å-nél kisebb volt.

V. táblázat A számítógépes dokkolási kísérletek során használt kristályszerkezetek

TR izoforma	Ligandum	PDB-ID	TR izoforma	Ligandum	PDB-ID
α	T3	2H77 [70]	β	T3	3GWS [70]
α	GC1	3HZF [135]	β	GC1	3IMY [135]
α	TRIAC	3JZB [136]	β	TRIAC	3JZC [136]
α	KB141	1NAV [69]	β	KB141	1NAX [69]
			β	GC24	1Q4X [137]



8. ábra *Az in silico* dokkolás során használt vegyületek szerkezeti képlete

Munkánk során a szerkezetek geometriai optimálásait és a dokkolásokat a Schrödinger molekulamodellező program különböző moduljaival végeztük el. Grafikus átalakítónak a Maestrot alkalmaztuk [138]. A fehérjeszerkezeteket a Protein Preparation Wizard alkalmazásával készítettük elő a kötőhely modellezéséhez. A letöltött röntgenkrisztallográfiás szerkezeteket a fiziológiás körülményeknek megfelelően (pH=7,4) egészítettük ki hidrogénekkel. Emiatt az Arg és Lys oldalláncok minden esetben kationos, míg a karboxilátot tartalmazó Glu és Asp aminosavak anionos állapotban voltak. A fehérjeszerkezetben található felesleges vizeket (lone water) és egyéb ligandokat eltávolítottuk. A fehérjemolekulák esetében OPLS2005 erőteret használtunk a geometriai optimalizálás végrehajtásához. A fehérje megfelelő optimálása után a dokkolási doboz kijelölése történt meg, amelynek középpontját a fehérjében lévő ligand helyzete, míg nagyságát annak mérete befolyásolta. A ligandumok geometriai optimalizálását a Schrödinger program LigPrep moduljával végeztük MMFF94s erőteret alkalmazva. Az egyes protonáltsági mikrorészecskéket egyesével dokkoltuk a receptor fehérjékhez a Glide modult használva. A dokkolásokat minden esetben flexibilisen végeztük XP (extra precíz), azaz nagyfelbontású mód használatával, azért, hogy minél pontosabb értékeket kapjunk [139]. A dokkolások kimeneteleként a legjobb három eredményt írattuk ki a Glide pontozási funkciójának megfelelően.

4.8.1 Validálás

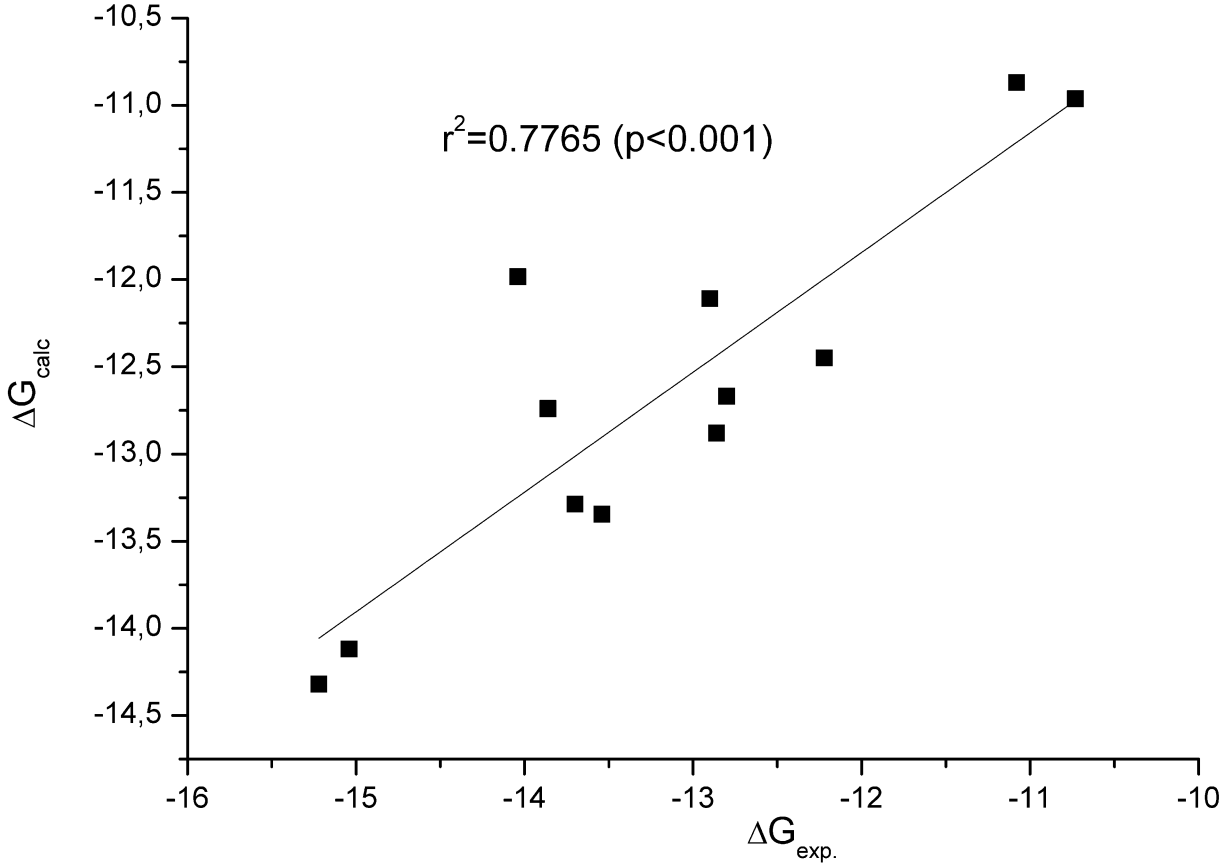
Az *in silico* módszerünk alkalmazhatóságát a kitűzött célunkra de Araujo és mtsai. által kidolgozott validálási vizsgálattal bizonyítottuk [81]. Hat olyan pajzsmirigyhormon agonistát dokkoltunk a receptor mindkét izoformájához, ahol a kísérletes kötődési szabad-energia (ΔG) értékek az irodalomban megtalálhatóak, illetve a receptor-ligand komplexek röntgenkrisztallográfiás szerkezete adatbázisból letölthető. A validálás során vizsgált ligandumok szerkezete a 8. ábrán látható.

Az *in silico* dokkolással számított és a kísérletesen meghatározott kötődési szabad energia értékeket korreláltattuk egymással. A lineáris korrelációs együttható magas értéke (r^2=0,7765) illetve a kis átlagos eltérés (Δ=0,55 kcal/mol) a két adatsor között bizonyítja, hogy az általunk használt eljárás alkalmazható a pajzsmirigyhormon

mikrorészecskéi és a receptorfehérje közötti kölcsönhatás vizsgálatára (VI. táblázat, 9. ábra).

VI. táblázat Az irodalomban megtalálható kísérletes ($\Delta G_{exp.}$), valamint az *in silico* dokkolás ($\Delta G_{calc.}$) során meghatározott kötődési szabad energia értékek a pajzsmirigyhormon-receptor két izoformájához kcal/mol-ban megadva

ligand	$\Delta G_{exp.}$		$\Delta G_{calc.}$	
	TRα	TRβ	TRα	TRβ
T3	-12,9 [140]	-12,6 [141]	-12,11	-12,67
GC-24	-10,73 [81]	-13,54 [81]	-10,96	-13,35
GC-1	-12,28 [81]	-13,70 [81]	-12,46	-13,29
Triac	-13,86 [81]	-14,04 [81]	-12,74	-11,99
KB-141	-11,08 [141]	-12,86 [141]	-10,87	-12,88
Dezamino-T3	-15,04 [81]	-15,22 [81]	-14,52	-14,59



9. ábra A kísérletes és az általunk számított kötődési szabad energia értékek korrelációja.

5. Eredmények

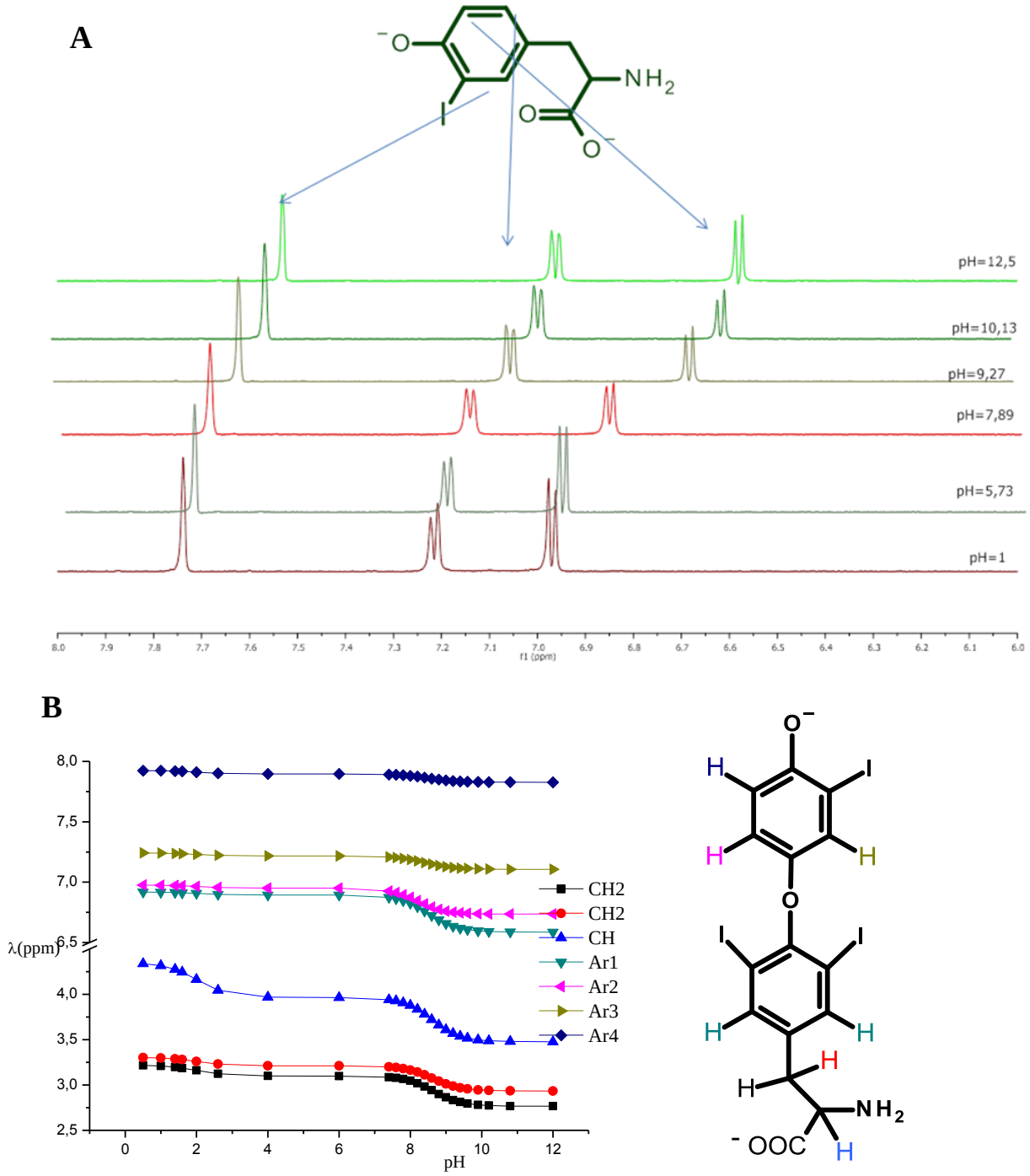
5.1 Pajzsmirigyhormonok és előanyagainak részecske-specifikus bázicitásának meghatározása

A pajzsmirigyhormonok és előanyagaik mindegyike három báziscentrummal rendelkezik, ezek a fenolát, az amino és a karboxilát. Ahogy a 7. ábrán is látható az egyes vegyületek protonálódása 3 makroállandóval és 12 mikroállandóval jellemezhető. A pajzsmirigyhormonok és előanyagainak teljes mikrospeciációját a következők szerint határoztuk meg:

- Elvégeztük az anyavegyületek, a metil-észter, a metil-éter és a dimetil származékok ^{1}H NMR-pH titrálását. pH <3 alatt a pontos pH-t *in situ* indikátormolekulák (klórecetsav és diklórecetsav) használatával határoztuk meg.
- A titrálási görbékből meghatároztuk a megfelelő számú (3,2 illetve 1) makroállandót. A származékvegyületek makroállandóit behelyettesítettük az anyavegyületek mikrospeciációs sémájába a megfelelő mikroállandók helyére.
- A Tyr, MIT, T3 esetén a fenoláthoz tartozó k^{o} mikroállandót UV-pH titrálással (is) meghatároztuk.
- Ezen kísérleti adatokból a mikroállandók és a mikrorészecskék eloszlása már számítható.

5.1.1 Protonálódási makroállandók meghatározása ^{1}H NMR-pH titrálással

^{1}H NMR-pH titrálás során a vizsgált vegyületek valamennyi megfigyelhető szénkötésű protonjának pH – $\delta^{mért}$ adatsorára egyszerre illesztve a 7. egyenletet határoztuk meg a lépcsőzetes protonálódási állandókat. A protonálódási makroállandók meghatározása során a legtöbb vegyület esetén az összes szénkötésű hidrogén jelét meg tudtuk figyelni, kivétel a T4, az *O*-metil-T4, karboximetil-T4, karboximetil-T3, *O*-metil-rT3 és a karboximetil-rT3 esetén, ahol savas pH-kon a rossz oldhatóság miatt csak a 2H és a 3H intenzitású protonok jeleit használtuk fel a kiértékeléshez. Azonban ez is elegendőnek bizonyult a makroállandók torzításmentes meghatározásához. A 10. ábrán látható a MIT aromás protonjainak pH függő ^{1}H NMR spektruma, illetve a T3 titrálási görbéje.



10. ábra (A) A MIT aromás protonok kémiai eltolódásának pH függése, (**B**) A T3 ^{1}H NMR-pH titrálási görbéi

Az anyavegyületek protonálódási állandóit a VII. táblázatban, míg a csökkentett protonálható csoporttal rendelkező modellvegyületek protonálódási állandóit a VIII. táblázatban foglaltuk össze.

VII. táblázat Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik protonálódási makroállandói (T=25 °C, I=0,15 M)

	Tyr	MIT	DIT	T4	T3	rT3
logK_1	10,17 ±0,02	9,63 ±0,01	9,41 ±0,01	8,60 ±0,03	8,87 ±0,05	9,01 ±0,03
logK_2	9,06 ±0,03	8,12 ±0,01	6,23 ±0,02	6,59 ±0,03	8,20 ±0,05	6,71 ±0,03
logK_3	2,27 ±0,03	2,16 ±0,01	2,07 ±0,02	2,01 ±0,06	2,03 ±0,03	2,04 ±0,03

VIII. táblázat Az *O*-metil, karboximetil és dimetil származékok protonálódási makroállandói (T=25 °C, I=0,15 M)

		Tyr	MIT	DIT	T3	T4	rT3
O-metil	logK_1	9,21 ±0,01	9,01 ±0,01	8,79 ±0,01	-	8,55 ±0,02	8,80 ±0,02
	logK_2	2,25 ±0,02	2,19 ±0,02	2,07 ±0,04	-	2,05 ±0,05	2,07 ±0,05
C-metil	logK_1	9,78 ±0,01	8,47 ±0,02	7,46 ±0,04	8,42 ±0,03	6,90 ±0,03	7,09 ±0,04
	logK_2	7,17 ±0,01	6,95±0,02	5,87 ±0,04	6,63 ±0,04	6,25 ±0,03	6,43 ±0,02
dimetil	log$K$	7,19 ±0,01	7,00 ±0,02	6,79 ±0,03	-	-	-

A lépcsőzetes protonálódási állandók értékei azt mutatják, hogy a karboxilátcsoport protonálódása elkülönül a másik két csoport protonálódásától, mint ahogy ezt az anyavegyületek logK_3 illetve az *O*-metil-származékok logK_2 értékei is mutatják. A DIT mindhárom makroállandója közti különbség több mint 3 log$K$ egységnyi, míg a T4 és az rT3 esetén a makroállandók közti különbség legalább 2 log$K$ egységnyi, vagyis e

molekuláknál mindhárom csoport protonfelvétele elkülönül. A jódatom(ok) beépülése az egész molekula bázicitását csökkenti, ami legjobban a logK_2 értékében fejeződik ki.

A pajzsmirigyhormonok dimetil-származékainak protonálódási állandóinak értékét a rossz oldhatóság miatt nem tudtuk meghatározni, míg az *O*-metil-liotironin protonálódási makroállandóinak ismerete nem szükséges a T3 további mikroállandóinak meghatározásához, mivel az UV-pH titrálással meghatározott logk^o mikroállandó és az amino-karboxilát kölcsönhatási tényező ismerete elégséges a T3 teljes mikrospeciációjának leírásához.

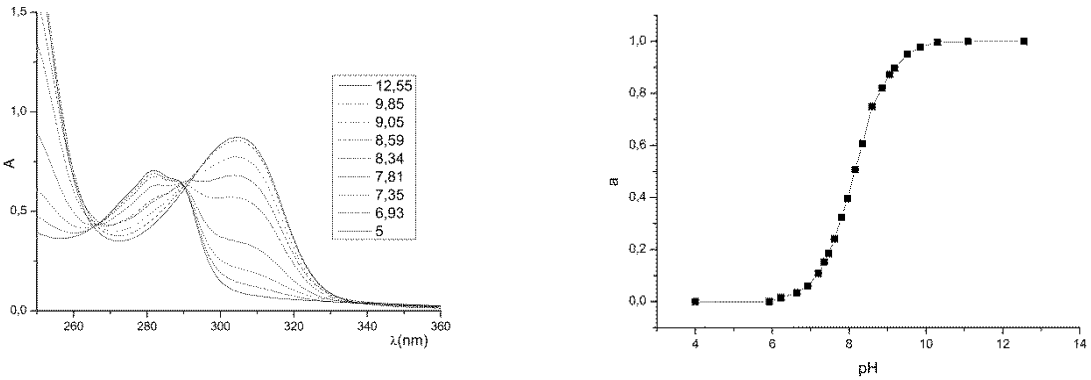
5.1.2 Protonálódási mikroállandók meghatározása UV-pH titrálással

A protonálódási mikroállandók meghatározhatók UV-pH titrálással, ha a megfelelő mikrorészecskék aránya összemérhető, illetve ha a spektrumváltozást szelektíven csak az egyik csoport protonálódása okozza. A fenolátra jellemző mikroállandók általában meghatározhatóak evvel a módszerrel, mert 290 nm körül az UV-spektrum pH-függése szelektíven a fenolátcsoporthoz rendelhető. Ezt az állítást támasztja alá az UV-pH titrálási görbéken megjelenő izobesztikus pont is (11. ábra).

A vizsgált vegyületeink közül a k^o értéke UV-pH titrálással a Tyr, MIT és T3 esetén határozható meg, mivel a többi molekulában az amino és a fenolát bázicitás nem összemérhető nagyságú.

A fenolátra jellemző mikroállandót a mérési adatpontokból a (18-19) összefüggések segítségével számoltuk. A 11. ábrán látható a MIT pH-függő UV spektruma illetve az UV titrálás segítségével meghatározott fenolát móltört pH függvény.

A **B**



11. ábra (A) A MIT pH-függő UV spektruma **(B)** MIT fenolát móltört pH függvény

A meghatározáskor figyelembe vettük, hogy a karboxilát protonáltsági állapota pH 5 felett nem változik, így ebben a pH tartományban a vegyületek kétcsoportos molekulaként kezelhetőek. A kísérletesen meghatározott k^{o} mikroállandó illetve a ^{1}H NMR-pH titrálások során meghatározott K_1 és K_2 makroállandók értékeit felhasználva a k^{N}, k_N^O és k_o^N mikroállandók az alábbi egyenletekkel számolhatóak:

$$K_1 = k^{O} + k^{N} \tag{23}$$

$$K_1 K_2 = k^{O} k_O^N = k^{N} k_N^O \tag{24}$$

Az UV-pH titrálásból származó mikroállandók illetve fenolát-amino kölcsönhatási tényező logaritmizált értékeit a IX. táblázat tartalmazza.

IX. táblázat Az UV - pH titrálás során meghatározott mikroállandók logaritmusainak és a $\log E^{ON}$ értékei

	Tyr	MIT	T3
$\log k^{O}$	10,03 ± 0,01	8,72 ± 0,03	8,43 ± 0,02
$\log k^{N}$	9,61	9,57	8,67
$\log k_{N}^{O}$	9,62	8,18	8,40
$\log k_{O}^{N}$	9,20	9,03	8,64
$\log E^{ON}$	0,41	0,54	0,03

5.1.3 Vizsgált vegyületeink teljes mikrospeciációja

A vizsgált hat vegyület egyenként 12 mikroállandójának meghatározásához a következő adatokat használtuk fel:

- a kérdéses vegyület makroállandói
- a csökkentett protonálható csoporttal rendelkező származék makroállandói
- az UV-pH titrálás során meghatározott mikroállandók
- az amino- és a karboxilátcsoport közötti kölcsönhatási tényező

Összhangban a vegyületeink protonálódási sémájával (7. ábra) és felhasználva a (11) – (15) egyenleteket a mikroállandók meghatározhatóak az alábbi metodikát követve:

1. $\log K_3 = \log k_{NO}^{C}$, mivel a k_{NO}^{C} útvonalon történő protonálódás sokkal jelentősebb, mint a k_{NC}^{O} és k_{CO}^{N} -nek megfelelő protonfelvétel.
2. k_{CO}^{N} értéke megegyezik a dimetil-származékok protonálódási makroállandójával.
3. k_{O}^{N} értéke és k_{O}^{C} meghatározható az *O*-metil-éter származékok makroállandóiból felhasználva k_{CO}^{N} értékét.

4. k_C^O értéke meghatározható a karboximetil származékok makroállandóiból felhasználva k_{CO}^N értékét.

5. k^O és k^C értéke számítható a 13. egyenletből.

6. k^N értéke a 11. egyenlet segítségével számítható.

7. A többi mikroállandó értéke megkapható a 13. és 15. egyenlet felhasználásával.

A T4 és a rT3 esetében a dimetil származékok protonálódási makroállandóit a rossz vízoldékonyság miatt nem tudtuk meghatározni. Ebben az esetben k_{CO}^N értékét a DIT-ban meghatározott amino-karboxilát kölcsönhatási tényező felhasználásával kaptuk meg, mivel a kölcsönhatási tényező értékének átvitele azonos szerkezetű molekulák esetén nem okoz hibát a mikroállandók meghatározásában [101].

A T3 esetén négy mikroállandó értékét (k^O, k^N, k_N^O, k_O^N) az UV-pH titrálásból kaptuk meg, míg a többi mikroállandót a karboximetil-T3 két makroállandójának és a DIT amino-karboxilát kölcsönhatási tényezőjének felhasználásával határoztuk meg.

A protonálódási mikroállandók értékei illetve az egyes csoportok közti kölcsönhatási tényezőket a vizsgált molekulák esetén a X. táblázat tartalmazza.

X. táblázat Vizsgált vegyületeink protonálódási mikroállandói és kölcsönhatási tényezői

Fenolát mikroállandók	Tyr	MIT	DIT	T3	T4	rT3
$\log k^{O}$	10,04	8,71	6,85	8,43	6,64	6,76
$\log k_{N}^{o}$	9,65	8,18	6,23	8,40	6,59	6,71
$\log k_{c}^{o}$	9,76	8,42	6,54	8,41	6,60	6,72
$\log k_{NC}^{O}$	9,37	7,89	5,92	8,38	6,55	6,67
Amino mikroállandók						
$\log k^{N}$	9,58	9,57	9,41	8,67	8,60	8,85
$\log k_{o}^{N}$	9,19	9,04	8,79	8,64	8,55	8,80
$\log k_{c}^{N}$	7,58	7,53	7,41	6,67	6,60	6,85
$\log k_{CO}^{N}$	7,19	7,00	6,79	6,64	6,55	6,80
Karboxilát mikroállandók						
$\log k^{C}$	4,55	4,49	4,37	4,05	4,05	4,07
$\log k_{O}^{C}$	4,27	4,20	4,06	4,03	4,01	4,03
$\log k_{N}^{C}$	2,55	2,45	2,37	2,05	2,05	2,07
$\log k_{NO}^{C}$	2,27	2,16	2,06	2,03	2,01	2,03
Kölcsönhatási tényezők						
$\log E^{ON}$	0,39	0,53	0,62	0,03	0,05	0,05
$\log E^{NC}$	2,00	2,04	2,00	2,00	2,00	2,00
$\log E^{OC}$	0,28	0,29	0,31	0,02	0,04	0,04

Összehasonlítva az UV-pH titrálással és a deduktív módszerrel kapott mikroállandók értékeit (IX. és X. táblázat) Tyr és MIT esetén, azt látjuk, hogy az értékek jó egyezést mutatnak, a különbség az egyes mikroállandók között mindenhol kisebb, mint 0,05 log*k* egység. A két különböző megközelítéssel kapott azonos állandók bizonyítják, hogy a meghatározásaink helyesek. Az adatainkból levonható következtetéseket a Megbeszélés című fejezet tárgyalja.

5.2 Pajzsmirigyhormonok mikrorészecskéinek in silico receptorkötődés vizsgálata

A három vizsgált pajzsmirigyhormon (T3, T4, rT3) összes mikrorészecskéjét a két ismert pajzsmirigyhormon receptor izoformához (TRα és TRβ) dokkoltuk. A dokkolás során a kapott kötődési szabadenergia értékeket a XI. táblázatban foglaltuk össze.

XI. táblázat Számított kötődési szabad energia értékek a három pajzsmirigyhormon összes mikrorészecskéjére. A kisebb kötődési érték nagyobb affinitást jelent a receptorhoz. Az értékek kcal/mol-ban vannak megadva.

	T3 (TRα)	T3 (TRβ)	T4 (TRα)	T4 (TRβ)	rT3 (TRα)	rT3 (TRβ)
NH_2, COO^-,O^-	-12,11	-12,69	-11,15	-10,44	-7,05	-7,62
NH_3^+, COO^-,O^-	-9,46	-10,65	-8,69	-9,29	-5,17	-6,41
NH_2, COOH, O^-	-9,30	-8,47	-8,45	-9,34	-5,87	-6,01
NH_3^+,COOH, O^-	-4,83	-6,35	-4,31	-6,80	-3,89	-5,74
NH_3^+, COO^-, OH	-11,70	-11,70	-10,40	-9,71	-8,44	-8,58
NH_2, COO^-, OH	-13,18	-11,75	-12,15	-11,07	-9,51	-9,73
NH_2, COOH, OH	-9,96	-10,13	-9,53	-9,76	-7,13	-8,21
NH_3^+, COOH, OH	-5,30	-6,86	-5,75	-6,98	-5,12	-6,49

A táblázat adataiból látszik, hogy a T3 kötődik a legjobban a receptorokhoz, míg a legkevésbé az rT3, ami egybevág a fiziológiás receptorkötődési adatokkal: a T3 az aktív hormon, ez a vegyület kötődik jobban a receptorhoz, és vált ki biológiai hatást, a T4 a T3 prekurzorának tekinthető [7, 29]. Az *in silico* dokkolásokból levonható élettani következtésket, beleértve a pajzsmirigyhormon mikrorészecskéi és a receptorok közti kölcsönhatások részeletes elemzését a Megbeszélés fejezet tárgyalja részletesen.

5.3 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik részecske-specifikus lipofilitása

Az egyes mikrorészecskék lipofilitásának meghatározáshoz először kiválasztottuk azokat, amelyek szignifikánsan hozzájárulnak a molekulák makroszkopikus lipofilitásához. Az egyszeresen protonált forma (O^-, NH_2, COOH) figyelmen kívül hagyható a nagyon alacsony előfordulási aránya miatt minden molekulában. A relatív koncentrációja a kétszeresen protonált (O^-, NH_3^+, COOH) formának minden esetben kisebb, vagy egyenlő, mint a várhatóan nagyobb lipofilitással rendelkező töltésmentes

(OH, NH_2, COOH) mikrorészecskének. Így megállapíthatjuk, hogy hat mikrorészecske járul hozzá jelentősebb mértékben a molekula bruttó lipofilitásához ((O^-, NH_2, COO^-), (OH, NH_2, COO^-), (O^-, NH_3^+, COO^-), (OH, NH_2, COOH), (OH, NH_3^+, COO^-), (OH, NH_3^+, COOH)). A továbbiakban ezek megoszlási hányadosát határoztuk meg.

A részecske-specifikus lipofilitás meghatározásához a kutatócsoportunkban kidolgozott módszert alkalmaztuk [6], bizonyos mikrorészecskék lipofilitásának meghatározásához származékvegyületek megoszlási adatait használtunk fel. A töltésmentes, semleges formát (OH, NH_2, COOH) karboximetil-észterrel, míg a (OH, NH_2, COO^-) részecskét *O*-metil-éterrel modelleztük. Nyilvánvalóan egy metilcsoport bevitele megnöveli a molekula lipofilitását, ezért szükséges a korrekciós faktor bevezetése, amivel a kémiai módosítás okozta hiba a minimálisra csökkenthető. A korrekciós faktort a metilezett származék és az anyavegyület látszólagos megoszlási hányadosainak különbségéből számoltuk erősen savas pH-n (pH≈1), ahol az összes vizsgált molekula egységesen kationos állapotban fordul elő. A XII. táblázat tartalmazza a részecske-specifikus lipofilitás meghatározásához szükséges log*D* értékeket.

XII. táblázat Vizsgált vegyületeink log*D* értéke oktanol/víz rendszerben. A pH(a), pH(b), pH(c) értékeket a kérdéses vegyület sav-bázis tulajdonságainak megfelelően választottuk. Az értékek az egyes vegyületek esetén az alábbiak: pH (a) 4,31 (T4); 5,10 (T3); 4,40 (rT3); 4,15 (DIT); 5,15 (MIT); pH (b) 6,75 (T4); 7,55 (T3); 6,75 (rT3); 6,65 (DIT); 7,70 (MIT). pH (c) 7,61 (T4); 8,50 (T3), 7,80 (rT3), 7,80 (DIT), 8,88 (MIT).

Vegyületek	pH 0,82	pH (a)	pH (b)	pH (c)	pH 13,18
T4	3,04 (0,02)	2,60 (0,02)	-	2,28 (0,03)	-1,89 (0,03)
karboximetil-T4	3,05 (0,05)	-	2,99 (0,06)	-	-
O-metil-T4	3,25 (0,06)	-	-	-	2,47 (0,05)
T3	2,06 (0,03)	2,24 (0,02)	-	1,77 (0,03)	- 2,70 (0,10)
karboximetil-T3	2,14 (0,04)	-	2,60 (0,04)	-	-
O-metil-T3	2,39 (0,02)	-	-	-	1,97 (0,03)
rT3	2,18 (0,02)	2,39 (0,02)	-	1,52 (0,03)	-2,58 (0,06)
karboximetil-rT3	2,27 (0,03)	-	2,75 (0,03)	-	-
O-metil-rT3	2,52 (0,03)	-	-	-	2,20 (0,04)
DIT	-0,51 (0,02)	-0,05 (0,03)	-	-1,18 (0,02)	<-4,5
karboximetil-DIT	-0,28 (0,02)	-	0,95 (0,03)	-	-
O-metil-DIT	-0,06 (0,04)	-	-	-	-0,53 (0,04)
MIT	-1,37 (0,05)	-0,79 (0,02)	-	-1,59 (0,05)	<-5
karboximetil MIT	-1,12 (0,03)	-	0,26 (0,02)	-	-
O-metil MIT	-0,90 (0,04)	-	-	-	-1,25 (0,04)

Erősen savas pH-n (pH ≈1) az anyavegyületek mért log*D* értékei megfeleltethetőek a kationos (OH, NH_3^+, COOH) mikrorészecskék megoszlási hányadosának. A származékvegyületek log*D* értéke ezen a pH-n a korrekciós faktor számolásához szükséges. Erősen lúgos pH-n (pH≈13) az anyavegyületek esetén mért log*D* értékek a kétszeresen negatív töltésű részecske (O^-, NH_2, COO^-) lipofilitását adja meg, mivel a többi részecske előfordulása ezen pH-n elhanyagolható. Lúgos pH-n az *O*-metil származékok log*D* értékéből a korrekciós faktort kivonva kapjuk a fenoláton protonált, egyszeresen negatív töltésű (OH, NH_2, COO^-) részecske log*p* értékét. A metil-észterek izoelektromos pontján (pH (b) a XII. táblázatban) mért log*D* értékből kivonva a korrekciós faktort kapjuk a semleges, töltéssel nem rendelkező részecske (OH, NH_2, COOH) megoszlási hányadosát. Az ikerionos (OH, NH_3^+, COO^-) és az anionos forma (O^-, NH_3^+, COO^-) lipofilitása az alábbi két egyenlet segítségével számolható:

$$p^{(OH,NH_3^+,COO^-)} = (D_{(pH)} - x_{(OH,NH_2,COOH)} p^{(OH,NH_2,COOH)} - x_{(OH,NH_3^+,COOH)} p^{(OH,NH_3^+,COOH)}) / x_{(OH,NH_3^+,COO^-)}$$

(25)

$$p^{(O^-,NH_3^+,COO^-)} = (D_{(pH)} - x_{(OH,NH_3^+,COO^-)} p^{(OH,NH_3^+,COO^-)} - x_{(OH,NH_2,COO^-)} p^{(OH,NH_2,COO^-)}) / x_{(O^-,NH_3^+,COO^-)}$$

(26)

A *D* értéke ezekben az esetekben azokon a pH-kon lett meghatározva, ahol a semleges részecskék illetve az egyszeresen negatív töltésű részecskék előfordulása a legnagyobb (pH (a) és pH (c) a XII. táblázatban).

A fenti módszerrel meghatározott hat részecske-specifikus megoszlási hányados értékeit az általunk vizsgált öt vegyületre a XIII. táblázatban foglaltuk össze.

XIII. táblázat A T4, T3, rT4, DIT és MIT mikroszkopikus megoszlási hányadosok logaritmusainak értékei oktanol/víz rendszerben 25°C-on, 0,15 M ionerősségnél.

	T4	T3	rT3	DIT	MIT
(O^-, NH_2, COO^-)	-1,89	-2,70	-2,58	<-4	<-5
(OH, NH_2, COO^-)	2,26	1,72	1,86	-0,98	-1,72
(O^-, NH_3^+, COO^-)	2,27	1,13	1,27	-1,35	-2,19
(OH, NH_2, COOH)	2,98	2,52	2,66	0,72	0,01
(OH, NH_3^+, COO^-)	2,60	2,24	2,39	-0,04	-0,79
(OH, NH_3^+, COOH)	3,04	2,06	2,18	-0,51	-1,38

A részecske-specifikus adatok részletes elemzése a Megbeszélés fejezetben található.

6. Megbeszélés

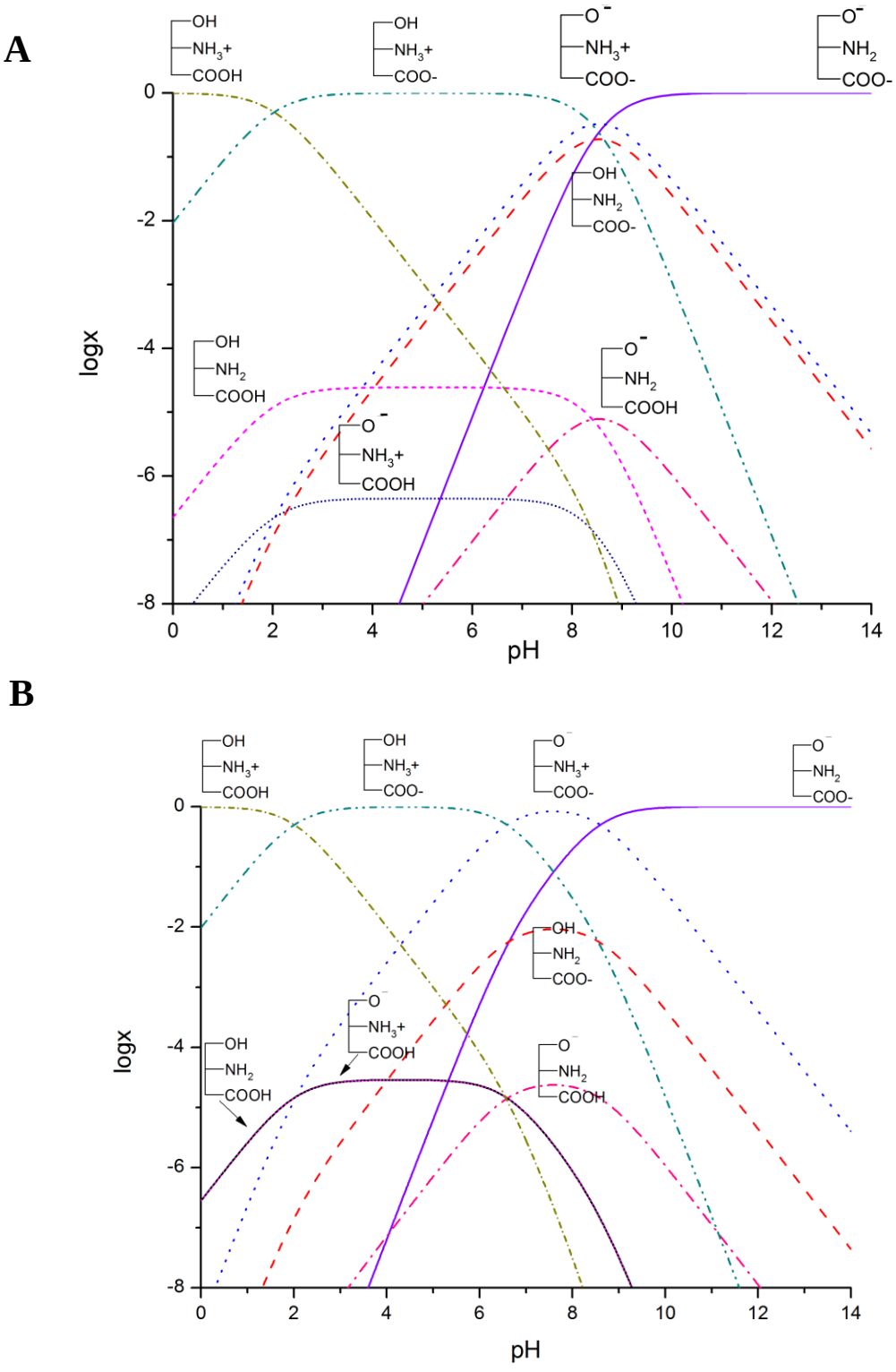
6.1 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik részecske-specifikus bázicitás adatai

A munkánk során vizsgáltuk a jódozás hatását az egyes mikroállandók értékére, illetve azt, hogy a pajzsmirigyhormonok és előanyagok ionizáltsági állapota hogyan befolyásolja a hormonok bioszintézisét és receptorkötődését.

A X. táblázat értékeiből látszik, hogy a jód atom minden protonálható csoport bázicitását csökkenti, leginkább a fenolátét. A második jód atom beépülésével a bázicitás csökkentő hatás még kifejezettebb. A MIT logk^{o} értéke 1,33-mal kisebb a Tyr-hoz képest, míg a DIT esetén a második jód atom beépülése 1,86-tal csökkenti tovább a fenolát bázicitását a MIT-hoz képest.

Másodlagos hatásként megfigyelhető, hogy a kölcsönhatási tényező értéke az amino- és a fenolátcsoport között egyre nő, mivelhogy a jód atom beépülésével az elektronsűrűség az aromás gyűrűben nagyobb mértékben csökken, mint az alifás láncon. Az amino és karboxilát közötti kölcsönhatási tényező értéke 2,00 – 2,04, amely jó egyezést mutat az aminosavaknál megfigyelhető kölcsönhatási tényező értékével [121].

A protonálódási mikroállandók értékeit felhasználva megszerkeszthető a vegyületek pH függő részecske-eloszlás függvénye, amikről leolvasható, hogy a szervezet egyes kompartmentjeiben melyik mikrorészecske mekkora valószínűséggel fordul elő. A T3 és T4 pH függő részecskeeloszlás diagramja a 12. ábrán látható.



12. ábra T3 (A) és T4 (B) részecske-specifikus eloszlás diagramja.

Az eloszlás diagramokon látható, hogy pH 2 alatt minden molekula esetében döntően a teljesen protonált forma (OH, NH_3^+, COOH) fordul elő, míg pH 10,5 felett a teljesen deprotonált forma (O^-, NH_2, COO^-) dominál. A köztes pH értékeknél különbségek figyelhetőek meg az egyes mikrorészecskék eloszlásában a különböző vegyületekben elsősorban a fenolátcsoport eltérő bázicitása miatt. A MIT és T3 esetén, ahol csak egy jód található a fenolos hidroxilcsoport közelében, egy a fenoláton protonált forma (OH, NH_3^+, COO^-) eloszlása széles pH tartományban (2 <pH <8) dominál. A DIT, T4, rT3 esetében ez a pH tartomány közel másfél pH egységgel szűkebb (2 <pH <6,5). Az utóbbi vegyületeknél a vér pH-ján egy anionos forma (O^-, NH_3^+, COO^-) fordul elő legnagyobb valószínűséggel. Továbbá megfigyelhetjük, hogy a T3 és a MIT esetén a két anionos mikrorészecske ((O^-, NH_3^+, COO^-) vs. (OH, NH_2, COO^-)) koncentrációjának az aránya összemérhető a fenolát- és az aminocsoport hasonló bázicitása miatt. Ezek a különbségek az egyes vegyületek mikrorészecskéinek eloszlásában hozzájárulhatnak a vegyületek eltérő biológiai szerepéhez. A következő fejezetben a pajzsmirigyhormonok olyan biokémiai tulajdonságait tárgyaljuk, ami az általunk meghatározott mikrospeciációs adatokkal magyarázhatók.

6.1.1 A vegyületek részecske-specifikus bázicitás adataiból levonható következtetések

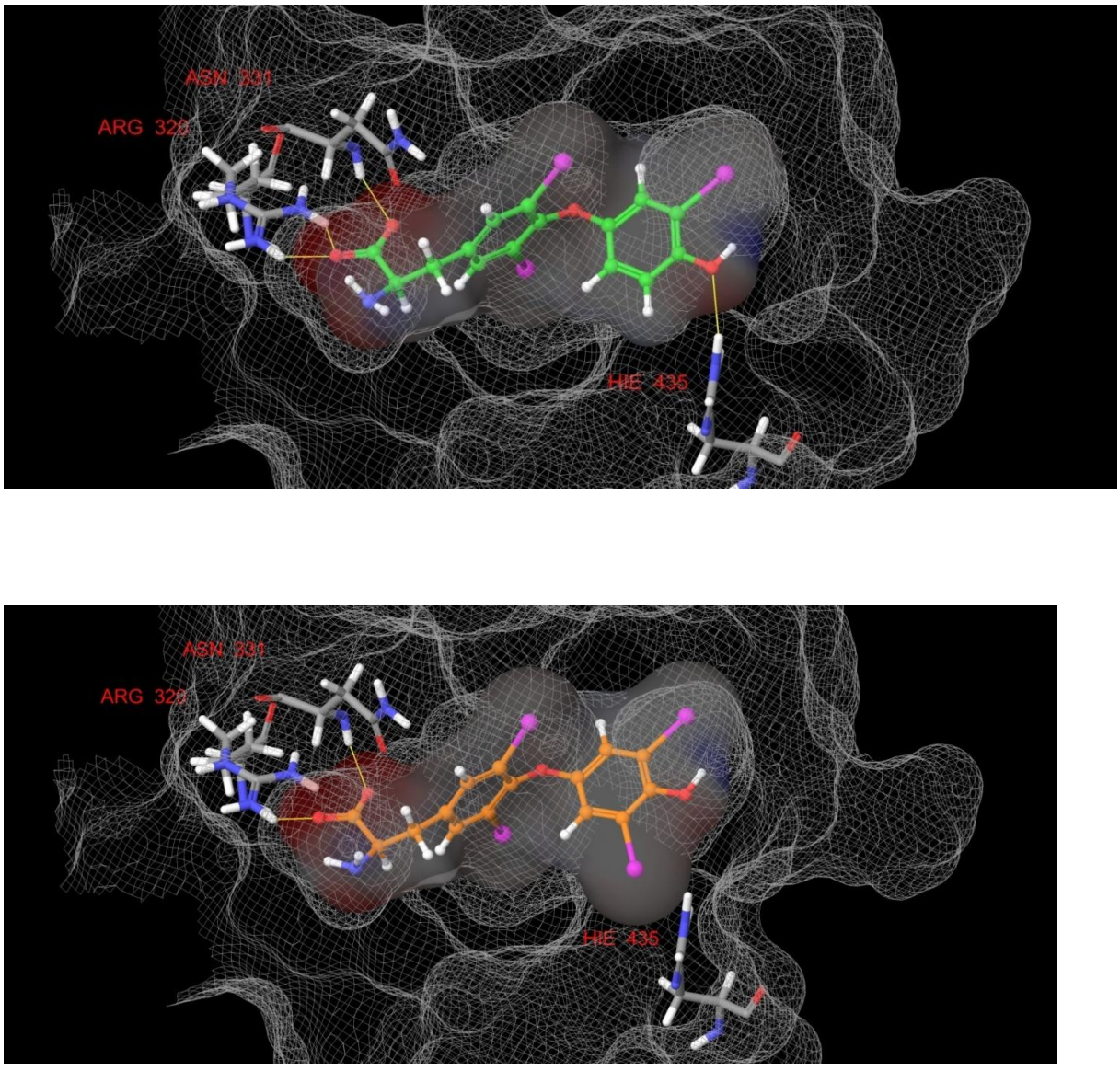
Az általunk meghatározott fenolát mikroállandók azt mutatják, hogy a DIT-ban a fenolát 93%-ban anionos formában fordul elő a vér pH-ján, míg ez az érték a MIT esetén csak 14%. A pajzsmirigyhormonok bioszintézise ugyan egy komplex, enzim katalizálta folyamat, ismert azonban az is, hogy a pajzsmirigyhormon bioszintézishez a prekurzor fenolátjának anionos formája szükséges [31]. A mi általunk meghatározott fenolát mikroállandók alapján a pajzsmirigyben a szintetizálódó hormonnak közel 90%-ban a két DIT összekapcsolódásával képződő T4-nek kell lennie, ami jó összhangban áll élettani adatokkal [28,32]. Az általunk meghatározott fenolát mikroállandók értékéből kitűnik, hogy a DIT molekulák nagy része ionizált állapotban van jelen, amely elfogadható magyarázatot nyújt arra, hogy miért a T4 a legnagyobb részben szintetizálódó hormon fiziológiás körülmények között.

Az általunk meghatározott mikrospeciációs adatokkal a vegyületek egyes fehérjékhez való affinitása is jobban értelmezhetővé válik. Biokémiai vizsgálatok szerint mind a transzportfehérjékhez, mind a receptorfehérjékhez való kötődés pH függő folyamat, amelyet a pajzsmirigyhormonok egyes csoportjainak ionizációs állapota is befolyásol [45,71,72]. A vérben lévő transzportfehérjékhez való kötődést elsődlegesen a jód atomok száma és pozíciója befolyásolja, de a fenolátcsoport ionizációs állapota is fontos szerepet játszik [49]. Mindegyik szállítófehérjéhez (TBG, TTR, HSA) a T4 nagyobb affinitással kötődik, mint a T3 [36], amelynek egyik oka lehet, hogy a T4 fenolos OH-ja a vér pH értékén nagyobbrészt deprotonált formában ($-O^-$) van jelen. A TBG esetén ismert, hogy a fehérje aktív centrumában pozitív töltéssel rendelkező arginin alakít ki kölcsönhatást a pajzsmirigyhormon fenolos hidroxilcsoportjával, amely nyilván kedvezőbb, ha a ligandum deprotonált formában ($-O^-$) van jelen.

A pajzsmirigyhormonok szerkezet-hatás összefüggéseiből tudjuk, hogy a fenolos –OH csoport központi helyet játszik a receptorhoz való kötődés kialakításban, illetve, hogy azok a származékok, amelyek nem tartalmaznak aminocsoportot erősebben kötődnek a receptorhoz [28,71,72]. Az egyes funkciós csoportok protonáltsági állapotának szerepét a receptorkötődésben molekulamodellezési kísérlettel tisztáztuk. A számítógépes modellezési kísérletek eredményeit és a belőlük levonható következtetéseket a következő fejezet részletezi.

6.2 Pajzsmirigyhormonok *in silico* receptordokkolása

A XI. táblázat értékeiből látható, hogy az ismert szerkezet-hatás összefüggést, miszerint a 3’5’-helyzetű diszubsztitúció kevésbé hatékony vegyületet eredményez, a mi dokkolási kísérletünk is alátámasztja. A 13. ábrán látható a T3 és a T4 két azonos ionizáltságú mikrorészecskéjének (NH_2, COO^-, OH) dokkolása a TRβ receptorhoz. A T4 esetén nem tud kialakulni hidrogénhíd a 4’-helyzetű fenolos hidroxilcsoport és a receptor hisztidinje (435His) között a nagy térkitöltésű jód atomok miatt, ami kisebb receptoraffinitást eredményez.

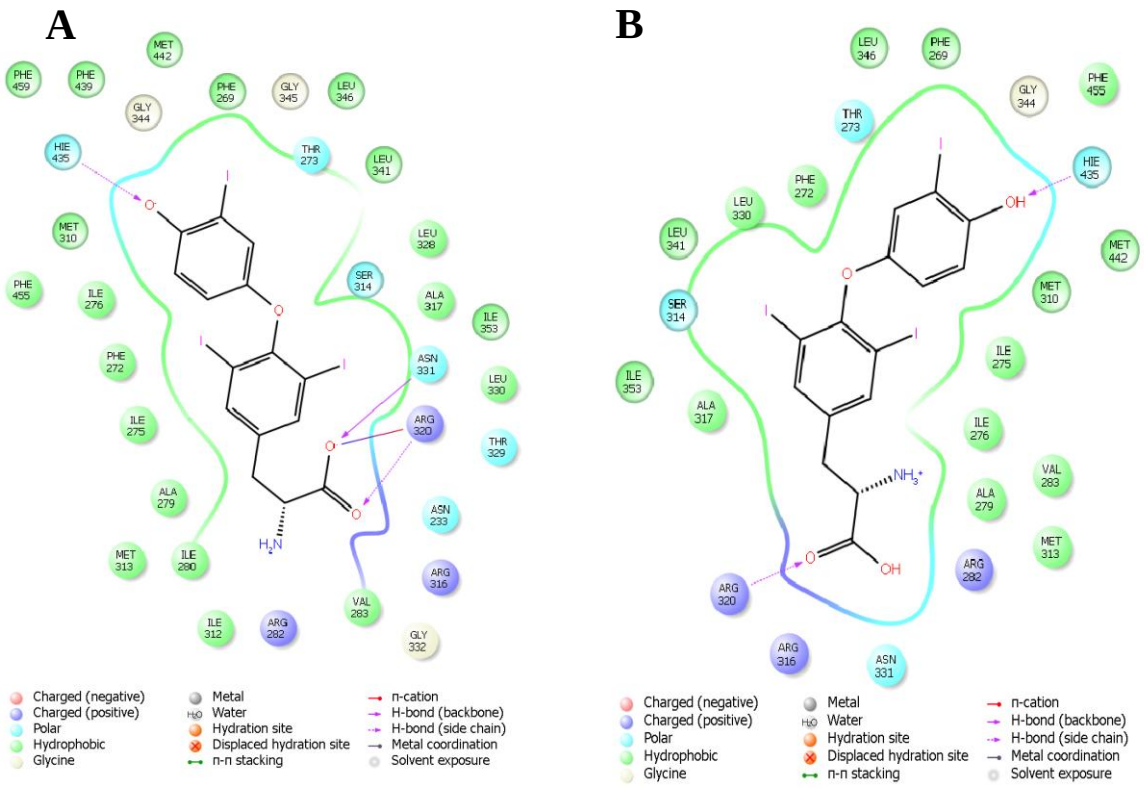


13. ábra T3 (fent) és T4 (lent) kötődése a TRβ receptorokhoz

A XI. táblázat értékeiből kitűnik az is, hogy a vegyületek protonáltsági állapota jelentősen befolyásolja a receptorhoz való kötődést. Az általunk alkalmazott módszerrel az is vizsgálható, hogy az egyes csoportok protonáltsági állapotának külön-külön milyen hatása van a receptoraffinitásra.

A kötődési szabad energia értékeket vizsgálva láthatjuk, hogy a receptorhoz való affinitást legjobban a molekulák aminosav részének ionizációs állapota befolyásolja. Megfigyelhető, hogy azoknál a mikrorészecskéknél, ahol az amino- és a karboxilátcsoport is protonált formában van jelen a legrosszabbak a kötődési értékek, míg a legjobbak ahol e csoportok deprotonált formában vannak jelen. Az értékekből az

is látszik, hogy a fenolátcsoport protonáltsági állapota kevésbé befolyásolja a receptoraffinitást. A 14. ábrán látható a T3 két mikrorészecskéjének dokkolása (NH_2, COO^-, O^-) és (NH_3^+, COOH, OH), a TRβ receptorhoz.



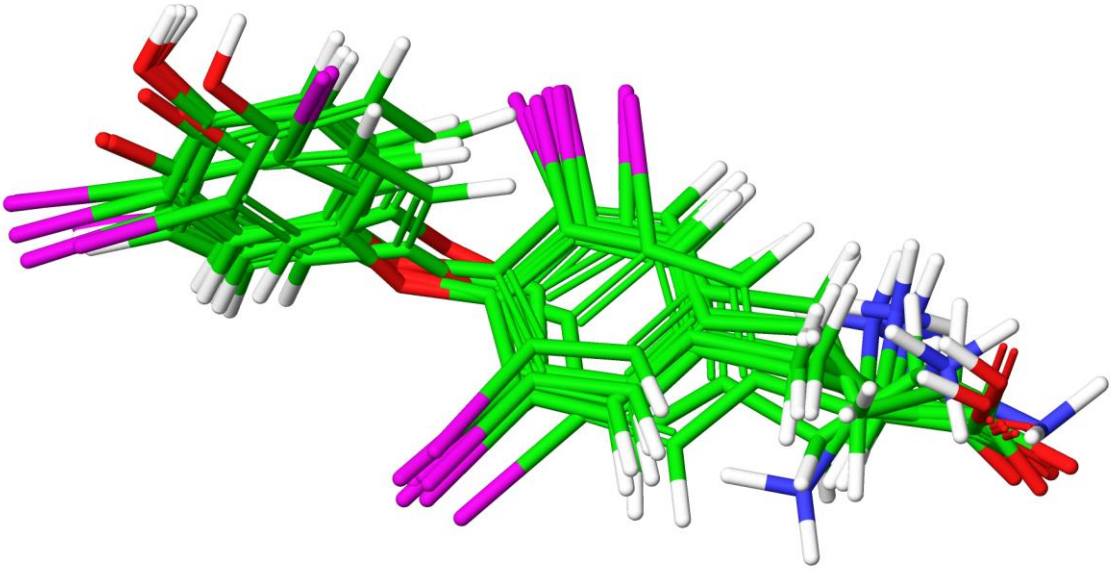
14. ábra Receptor-ligand kölcsönhatások a TRβ és a T3 két mikrorészecskéje **A,** (NH_2, COO^-, O^-) **B,** (NH_3^+, COOH, OH) között.

A fenti ábrán látható, hogy számos hidrofób aminosav található a receptor kötőzsebében, amelyek a jódtartalmú aromás gyűrűvel alakítanak ki kölcsönhatást. Ezen kívül két poláris régió található a kötőzsebben, az egyik egy hisztidin aminosav, ami hidrogénhidat képez a T3 fenolos OH-jával, a másik - három argininből és egy aszparaginból (Asn331) a TRβ esetén illetve három argininből és egy szerinből (Ser227) álló régió a TRα esetén -, ami a flexibilis aminosav résszel képes erős másodlagos kölcsönhatásokat kialakítani. Az aminosav rész protonálódásának hatására ez utóbbi kölcsönhatások változnak meg kedvezőtlenül. Az aminocsoport protonfelvételével az arginin rész és a protonált aminocsoport között taszító kölcsönhatás lép fel, amely azt eredményezi, hogy a másodlagos kötőerők nem tudnak kialakulni, továbbá a molekula

elhelyezkedése a kötőzsebben is kedvezőtlenül változik. Ezek a változások együttesen okozzák, hogy a kötődési értékek a legjobbak azoknál a mikrorészecskéknél, ahol az aminocsoport és a karboxilátcsoport is deprotonált állapotban van. Ezek a megfigyelések jó összhangban állnak kísérletileg meghatározott receptoraffinitási adatokkal, miszerint az aminocsoport a receptorkötődést csökkenti, ellenben fontos szerepet játszik a membránon keresztüli transzportban és a vegyületek metabolizmusában [28].

A fenolátcsoport proton felvétele kevésbé befolyásolja a fehérjéhez való kötődés erősségét, mivel a hisztidin és a fenolát között kialakuló hidrogénhíd kialakulását a fenolos hidroxilcsoport ionizáltsági állapota nem befolyásolja, viszont az aromás gyűrűrendszer elektronsűrűségét igen, ami magyarázza a különböző kötődési energiákat. Az értékekből az látszik, hogy a receptorhoz való kötődésnek a fenolos -OH állapot jobban kedvez.

Azt is vizsgáltuk, hogy a kötődési konformációt a protonálódási állapot hogyan befolyásolja. Az egyes receptor altípusokhoz dokkolt mikrorészecskéket egymásra helyeztük (szuperpozicionáltuk), és vizsgáltuk az egyes funkciós csoportok eltérését a röntgenkrisztallográfiával meghatározott szerkezethez képest. A T3 összes dokkolt mikrorészecskéinek szuperpozíciója az 15. ábrán látható. Összhangban a dokkolások során kapott kötődési szabad energia értékekkel, a ligandum fenolátcsoportjának receptorzsebben való helyzete sokkal kevésbé változik, mint az aminocsoporté. Az átlagos távolság a röntgenkrisztallográfiával meghatározott fenolát oxigén és a dokkolt mikrorészecskék fenolát oxigénjei között 0,67 Å, míg a legnagyobb távolság is csak 1,40 Å. Evvel szemben az átlagos távolság a röntgenkrisztallográfiával meghatározott amino nitrogén és a dokkolt mikrorészecskék amino nitrogénje között 1,83 Å és a legnagyobb mérhető távolság 3,30 Å. Ezekből az adatókból is kitűnik, hogy az aminocsoport protonálódása rontja a receptor kötőzsebbe való illeszkedést.



15. ábra T3 TRβ receptorhoz dokkolt mikrorészecskéinek szuperpozíciója

6.3 Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik részecske-specifikus lipofilitása

A XII. és XIII. táblázat értékeiből az anyavegyületek esetén a következő lipofilitás sorrend állítható fel: T4 > rT3 > T3 > DIT > MIT. Nyilvánvaló, hogy a hormonok lipofilitása nagyobb, mint az előanyagoké, illetve, hogy a molekulában található jód atomok számának növekedésével a lipofilitás is nő. Megfigyelhető az is, hogy a rT3 összes mikrorészecskéjének lipofilitása nagyobb, mint a T3 megfelelő mikrorészecskéié, annak ellenére, hogy ezek a molekulák szerkezeti izomerek és Marvin programmal végzett számítógépes log*P* predikciójuk alapján lipofilitásuk azonos. Ez az eredmény is jól mutatja a nehezen előre jelezhető tényezők - pl. sztérikus - szerepét az egyes molekulák lipofilitásának kialakításában.

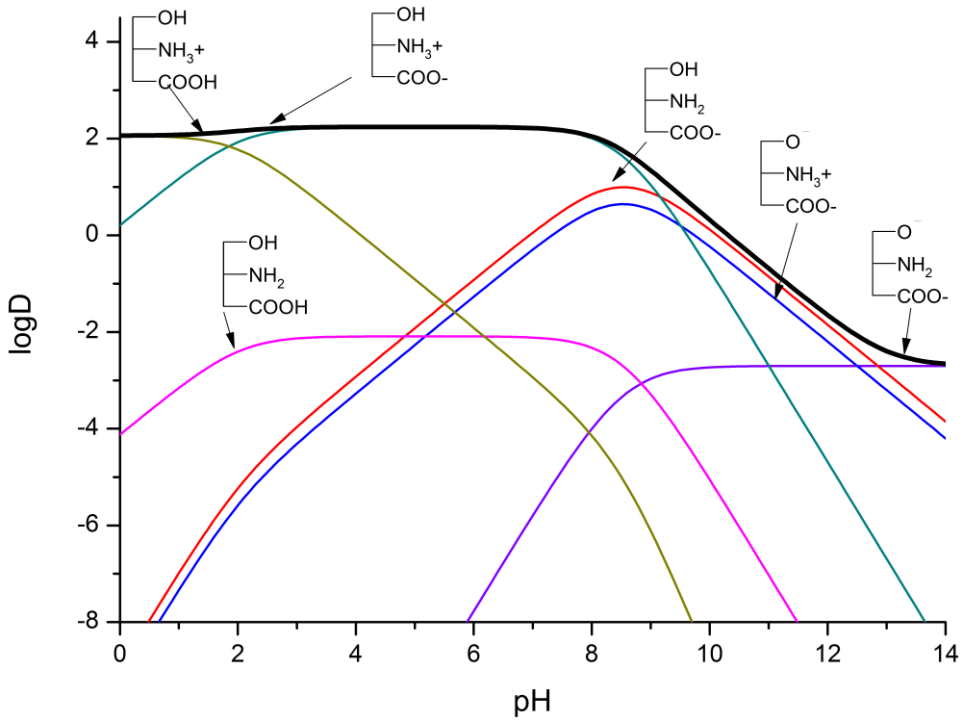
Az általunk meghatározott log*p* értékek azt mutatják, hogy a pajzsmirigyhormonok lipofilitását döntően a jódozott aromás gyűrűrendszer határozza meg. Emiatt megfigyelhető, hogy a pajzsmirigyhormonok esetén a karboximetil-észterek lipofilitása nem tér el szignifikánsan az anyavegyület lipofilitásától, míg a fenolos hidroxilcsoport metilezése lényegesen megnöveli a log*D* értéket, mivel ez utóbbi változás közvetlenül a lipofil aromás központot befolyásolja. Továbbá az adatokból látható, hogy a fenolos

hidroxilcsoport deprotonálódása sokkal nagyobb változást okoz a molekulák lipofilitás értékeiben, mint bármelyik másik funkciós csoport (de)protonálódása.

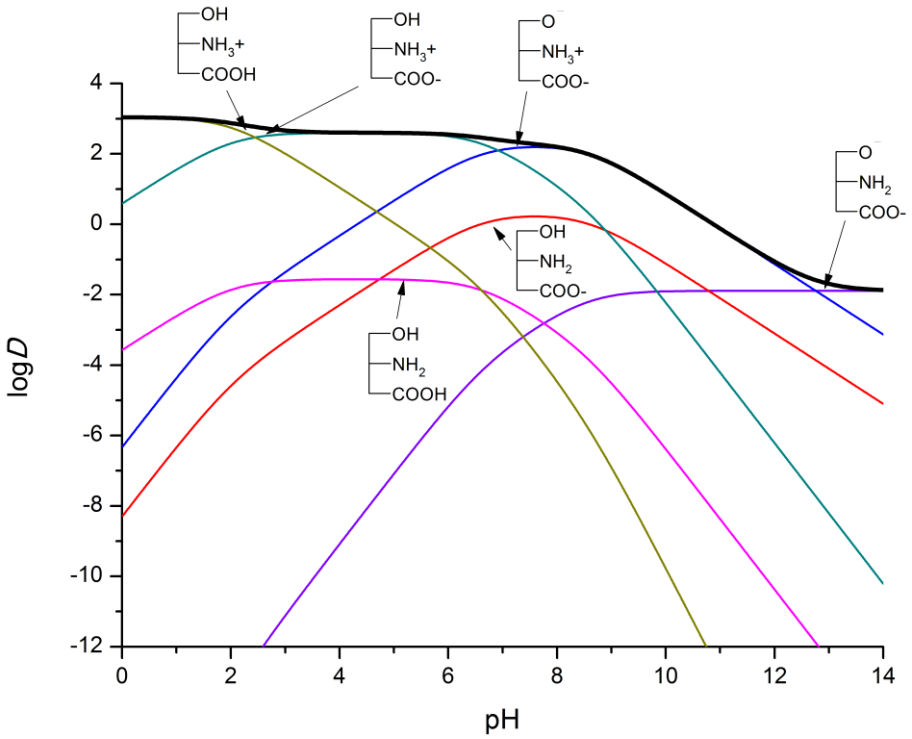
A pajzsmirigyhormonok részecske-specifikus megoszlási hányadosai azt mutatják, hogy ezen vegyületek amfifil tulajdonságúak, hiszen egy hidrofil oldallánccal és egy lipofil aromás gyűrűrendszerrel rendelkeznek. A vegyületek e tulajdonsága lehet a molekuláris magyarázata, hogy a pajzsmirigyhormonok nem passzív diffúzióval jutnak át a membránokon, hanem transzporter molekulák által elősegített energiaigényes folyamatban. Ennek oka, hogy a hormonok, mint amfifil vegyületek könnyen bejutnak, utána azonban megrekednek a membránban, így energia-befektetés nélkül nem jutnak át az intracelluláris térbe [49].

A mikroszkopikus megoszlási hányados értékeit (XIII. táblázat) felhasználva számolható és ábrázolható az egyes mikrorészecskék hozzájárulása a látszólagos megoszlási hányadoshoz. A 16. ábrán a T4 illetve a T3 egyes mikrorészecskéinek hozzájárulása látható a vegyületek lipofilitás pH-profiljához. A vastagított fekete vonal a molekulák összlipofilitás pH-profilja, amely az egyes mikrorészecskéknek a bruttó lipofilitáshoz való hozzájárulásának összege.

A



B



16. ábra A T3 (A) és a T4 (B) egyes mikrorészecskéinek hozzájárulása a molekulák összlipofilitásához

Közös minden vizsgált molekulában, hogy pH 1,8 alatt az egyszeresen pozítiv töltésű mikrorészecske (OH, NH_3^+, COOH), míg pH 13 fölött a kétszeresen negatív töltésű mikrorészecske (O^-, NH_2, COO^-) lipofilitása dominál. Köztes pH-kon, így a vér pH-ján is az egyes mikrorészecskék hozzájárulásának a mértéke a vegyületek bruttó lipofilitásához eltér az egyes vegyületekben. pH 7,4-en T3 esetén az ikerionos mikrorészecske (OH, NH_3^+, COO^-) míg T4 esetén egy, a fenoláton anionos forma (O^-, NH_3^+, COO^-) szerepe domináns a vegyületek megoszlási tulajdonságának kialakításában. Ez a különbség lehet molekuláris szinten a magyarázata az egyes pajzsmirigyhormonok eltérő kötődésének különböző membránalkotó molekulákhoz [62].

A 16. ábrán szembetűnő, hogy a töltés nélküli részecske hozzájárulása a molekulák lipofilitásához minden pH-n elhanyagolható, amely jól mutatja, hogy amfoter vegyületek esetén szükség van a lipofilitás részecske-specifikus jellemzésére, hiszen nem biztos, hogy egy molekula bruttó lipofilitáshoz a töltés-mentes részecske hozzájárulása lesz a legnagyobb [116, 117].

6. Következtetések

Doktori munkám során meghatároztuk a pajzsmirigyhormonoknak – tiroxinnak, liotironinnak, reverz liotironinnak – és e hormonok biológiai előanyagainak - monojódtirozinnak, dijódtirozinnak, tirozinnak – részecske-specifikus bázicitását és lipofilitását, illetve *in silico* modellezést végeztünk a hormonok receptorkötődésének vizsgálatára. Kutató munkánk eredményeképpen szubmolekuláris szinten magyarázhatóvá vált számos eddig csak empirikusan ismert tény a pajzsmirigyhormonok biokémiai szerepével kapcsolatban. Legfontosabb tudományos eredményeim és az ezekből levonható következtetések az alábbiakban foglalhatóak össze:

Meghatároztuk a pajzsmirigyhormonok és előanyagaik protonálódási makroállandóit ^{1}H NMR-pH titrálással. Az ^{1}H NMR titrálás diklórecetsav és klórecetsav *in situ* pH szenzor használatával lehetőséget adott az erősen savas közegbe eső K_3 makroállandó meghatározására is. A mikroállandókat UV-pH, NMR-pH és deduktív módszer kombinációjával határoztuk meg, csökkentett számú protonálható csoporttal rendelkező származékvegyületek bázicitás adatait felhasználva. Megállapítottuk, hogy az eltérő jódozottsági mintázat elsősorban a fenolátcsoport bázicitását befolyásolja. A tiroxin, dijódtirozin és reverz liotironin esetén, ahol a fenolátcsoport közelében két kovalensen kötött jód atom is található, a fenolát bázicitás annyira lecsökken, hogy a vér pH-ján egy anionos (O^-, NH_3^+, COO^-) mikrorészecske fog dominálni. Ezzel szemben a liotironin és a monojódtirozin esetén, ahol csak egy jód van a fenolátcsoport közelében, egy a fenoláton protonált forma (OH, NH_3^+, COO^-) fog legnagyobbrészt előfordulni. Ez a különbség magyarázhatja azt, hogy a pajzsmirigyben a két dijódtirozinból felépülő tiroxin keletkezik nagyobbrészt, mivel a pajzsmirigyhormonok szintéziséhez előanyagaiknak fenolos hidroxil csoportjának deprotonált formája szükséges. Az eltérő ionizáltsági állapot befolyásolhatja a pajzsmirigyhormonok receptor- és szállítófehérjéhez való kötődését is.

A receptorkötődés vizsgálatára számítógépes modellezést végeztünk, ahol a pajzsmirigyhormonok összes mikrorészecskéit pajzsmirigyhormon receptorokhoz dokkoltuk. Az *in silico* dokkolás eredményei azt mutatták, hogy az egyes mikrorészecskék receptorkötődése között jelentős különbségek vannak, amely

alátámasztja azt, hogy az egyes mikrorészecskéknek nemcsak eltérő farmakokinetikai, hanem eltérő farmakodinámiás szerepük is lehet. Módszerünkkel vizsgálható, hogy az egyes csoportok ionizáltsági állapota hogyan befolyásolja a receptorkötődést. Megállapítottuk, hogy a pajzsmirigyhormonok alifás oldalláncának protonáltsági állapota meghatározó a receptorkötődésben, továbbá azt is, hogy nem a vér pH-ján legnagyobb mértékben előforduló mikrorészecske kötődik legjobban a receptorhoz. Vizsgálatunk lehetőséget teremt a ligand és receptorja közötti kölcsönhatás jobb feltérképezésével új gyógyszerek fejlesztésére is.

Vizsgáltuk a jódozott aminosavak részecske-specifikus lipofilitását rokon szerkezetű molekulák megoszlási hányadosának felhasználásával. Az oktanol-víz megoszlási hányados egyik prediktora a gyógyszerek membránon való áthaladásának. Eredményeink azt mutatják, hogy a pajzsmirigyhormonok esetén a jódozott aromás gyűrűk alapvetően meghatározzák a vegyületek lipofilitását és így az alifás lánc protonálódási állapota kevéssé befolyásolja ezt a paramétert, ellentétben az előanyagokkal, ahol a molekulákban kisebb lipofil rész található. A pajzsmirigyhormonok a vér pH-ján amfipatikus tulajdonságúak, a lipofil aromás rész és a hidrofil alifás lánc miatt. Ez a tulajdonság jól magyarázza azt a biológiai megfigyelést, hogy a pajzsmirigyhormonok annak ellenére, hogy magas log*P* értékekkel rendelkeznek, aktív transzporttal jutnak át membránokon.

7. Összefoglalás

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

A vegyületek protonálódási makroállandóit ^{1}H NMR-pH titrálással, míg a mikroállandókat csökkentett protonálható csoporttal rendelkező származékvegyületek felhasználásával, kombinált spektroszkópiai-deduktív módszerrel határoztuk meg. A fenolátcsoport eltérő ionizációs állapotai jelentős szerepet játszanak a pajzsmirigyhormonok bioszintézisében és fehérjékhez való kötődésében. A báziscentrumok protonálódási állapotának szerepét a receptorkötődésben *in silico* dokkolással tisztáztuk. A pajzsmirigyhormonok összes mikrorészecskéit a pajzsmirigyhormon-receptor két izoformájához dokkoltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a ligand és a receptor közötti kölcsönhatás kialakításában az aminosav oldallánc protonáltsági állapota meghatározó, továbbá megállapítható, hogy nem a vér pH-ján legnagyobb valószínűséggel előforduló mikrorészecske kötődési affinitása a legjobb. Az egyes mikrorészecskék lipofilitását karboximetil- és *O*-metil-származékvegyületek felhasználásával, különböző pH-kon mért megoszlási hányadosok meghatározásával végeztük. A kémiai módosítás hatását korrekciós faktor bevezetésével minimalizáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a pajzsmirigyhormonok lipofilitásában a döntő szerkezeti elem a jódozott aromás gyűrűrendszer, az alifás rész protonálódása csekély hatással bír a vegyületek megoszlási hányadosára. A vegyületek részecske-specifikus lipofilitásával a vegyületek membrántranszportja molekuláris szinten vált magyarázhatóvá. Fiziológiás pH-n a pajzsmirigyhormonok amfifil tulajdonságúak a lipofil aromás gyűrű és a hidrofil aminosav oldallánc miatt, ami azt eredményezi, hogy a molekulák csak szállítófehérje segítségével képesek átjutni a membránokon.

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

8. Summary

In my PhD tesis surveys the site-specific physico-chemical parameters (basicity and lipophilicity) and related biological functions of thyroid hormones (thyroxine, liothyronine and reverse liothyronine) and their biological precursors (tyrosine, monoiodotyrosine and diiodotyrosine).

The protonation macroconstants of thyroid hormones and their precursors were determined by ^{1}H NMR-pH titration while the microconstants were determined by a multi-modal spectroscopic-deductive methodology using auxiliary derivatives of reduced complexity. Our results show that the ionization state of phenolate is crucial in the biosynthesis and protein binding of thyroid hormones. The role of the protonation state in the receptor binding was investigated by in silico docking method. Microspecies of thyroid hormones were docked to the thyroid hormone receptor isoforms. Our results quantitate at the molecular level how the ionization stage and the charge distribution influence the protein binding. The combined results of docking and microspeciation studies show that microspecies of the highest concentration at the pH of blood are not the strongest binding ones. The site-specific lipophilicity of our investigated molecules was determined with the measurement of distribution coefficients at different pH using carboxymethyl- and *O*-methyl-derivatives to mimic the partition of some of the individual microspecies. Correction factors were determined and introduced. Our data show that the iodinated aromatic ring system is the definitive structural element that fundamentally determines the lipophilicity of thyroid hormones, whereas the protonation state of the aliphatic part plays a role of secondary importance. The membrane transport of thyroid hormones can be well interpreted with the site-specific lipophilicity. At physiological pH these biomolecules are strongly amphipathic due to the lipophilic aromatic rings and hydrophilic amino acid side chains which can well be the reason why thyroid hormones cannot cross membranes by passive diffusion and they are constituents of biological membranes.

The site-specific physico-chemical characterization of the thyroid hormones is of fundamental importance to understand their (patho)physiological behavior and also, to influence their therapeutic properties at the molecular level.

9. Hivatkozott irodalmak jegyzéke

1. Noszal B (1990) Acid-base properties of bioligands. In: Burger K (ed) Biocoordination chemistry: coordination equilibra in biologically active system. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp 18-55

2. Noszal B, Mazak K, Szakacs Z (1999) Microequilibrium of drug molecules. Acta Pharm Hung 69 (3):108-114

3. Noszál B, Scheller-Krattiger V, Martin RB (1982) Unified view of carbon-bound hydrogen exchange of H(2) in imidazoles and H(8) in purine nucleosides and their metal ion complexes. J Am Chem Soc 104 (4):1078-1081

4. Stathatos N (2012) Thyroid physiology. Med Clin North Am 96 (2):165-173.

5. Hansch C (1994) On the future of QSAR. In: Wermuth CG KN, König H (ed) Medicinal Chemistry for the 21st century. Metcalf Blackwell, Oxford, pp 281-293

6. Fonyó A (2005) Élettan gyógyszerészhallgatók részére. Medicina, Budapest, pp. 399-413

7. Kendall EC (1919) Isolation of iodine compound which occurs in the thyroid: First paper. J Biol Chem 39:125-147

8. Kendall EC, Osterberg AE (1919) The chemical identification of thyroxin: Second paper. J Biol Chem 40:265-334

9. Harington CR (1926) Chemistry of Thyroxine. Biochem J 20 (2):293-299

10. Harington CR, Barger G (1927) Chemsitry of Thyroxine. Biochem J 21 (1):169-183

11. Hird F, Jr., Trikojus VM (1948) Paper partition chromatography with thyroxine and analogues. Am J Bot 35 (7):185-187

12. Gross J, Pitt-Rivers R (1953) 3:5:3' -triiodothyronine. 1. Isolation from thyroid gland and synthesis. Biochem J 53 (4):645-650

13. Neal MJ (2000) Rövid Farmakológia. B+V (medical and technical) Lap- és Könyvkiadó Kft., Budapest, pp 76-78

14. Gessl A, Lemmens-Gruber R, Kautzky-Willer A (2012) Thyroid disorders. Handb. Exp. Pharmacol. 214:361-386

15. Ilyes I (2011) Current questions of thyroid diseases in childhood. Orv Hetil 152 (16):617-627.

16. Tata JR, Widnell CC (1966) Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones. Biochem J 98 (2):604-620

17. Oppenheimer JH, Koerner D, Schwartz HL, Surks MI (1972) Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. J Clin Endocrinol Metab 35 (2):330-333
18. Samuels HH, Tsai JS (1974) Thyroid hormone action. Demonstration of similar receptors in isolated nuclei of rat liver and cultured GH1 cells. J Clin Invest 53 (2):656-659.
19. Lazar MA (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. Endocr Rev 14 (2):184-193
20. Chiamolera MI, Wondisford FE (2009) Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. Endocrinology 150 (3):1091-1096.
21. Stantistaban P (2005) Development and Anatomy of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in: Braverman LE, Utiger RD (eds) Werner & Ingbar's the Thyroid: A Fundamental and Clinical Text, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, pp 8-26
22. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Thyroid_hormone_synthesis.png.Thyroid hormone synthesis (2013). Elérhető 2013.12.16
23. World Health Organization/UNICEF/International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders (1996) Recommended iodine levels in salt and guidelines for monitoring their adequancy and effectiveness. (WHO/NUT/96.13) Geneva, WHO
24. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N (2003) The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. Endocr Rev 24 (1):48-77
25. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH, Deng HF, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N (2000) The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. Nat Med 6 (8):871-878.
26. Timár J (2007) Pajzsmirigyhormonok és antitireoid anyagok in:Gyires K, Fürst Zs (eds.) Farmakológia. Medicina, Budapest, pp 702-708
27. van de Graaf SAR, Ris-Stalpers C, Pauws E, Mendive FM, Targovnik HM, de Vijlder JJM (2001) Up to date with human thyroglobulin. J Endocrinol 170 (2):307-321
28. Farwell PA, Braeman LE (2006) Thyroid and antithyroid drugs. In: Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (eds) Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York, pp 1563-1596

29. Cavalieri RR (1997) Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. Thyroid 7 (2):177-181

30. Taurog A, Dorris ML (1992) Myeloperoxidase-catalyzed iodination and coupling. Arch of Biochem Biophys 296 (1):239-246

31. de Vijlder JJ, den Hartog MT (1998) Anionic iodotyrosine residues are required for iodothyronine synthesis. Eur J Endocrinol 138 (2):227-231

32. Bunevicius R, Kazanavicius G, Zalinkevicius R, Prange AJ, Jr. (1999) Effects of thyroxine as compared with thyroxine plus triiodothyronine in patients with hypothyroidism. N Engl J Med 340 (6):424-429.

33. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocr Rev 23 (1):38-89

34. Beckett GJ, Beddows SE, Morrice PC, Nicol F, Arthur JR (1987) Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. Biochem J 248 (2):443-447

35. Beckett GJ, MacDougall DA, Nicol F, Arthur JR (1989) Inhibition of type I and type II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. Biochem J 259 (3):887-892

36. Feldt-Rasmussen U, Rasmussen AK (2007) Thyroid hormone transport and action. In: Krassas GE, Rivkess SA, Kiess W (eds) Diseaeses of the thyroid in Childhood and Adolescence. Karger, Basel, pp 80-103

37. Ain KB, Mori Y, Refetoff S (1987) Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. J Clin Endocrinol Metab 65 (4):689-696

38. Federman DD, Robbins J, Rall J (1958) Effects of methyl testosterone on thyroid function, thyroxine metabolism, and thyroxine-binding protein. J Clinical Invest 37 (7):1024

39. Oppenheimer JH (1968) Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. N Engl J Med 278 (21):1153-1162

40. Hollander CS, Bernstein G, Oppenheimer JH (1968) Abnormalities of thyroxine binding in analbuminemia. J Clin Endocrinol Metab 28 (7):1064-1066

41. Davis PJ, Gregerman RI (1970) Separation of Thyroxine (T4)-Binding Proteins of Human Serum in Polyacrylamide Gel at pH 7.4. I. Effect of pH on Distribution of Tracer Quantities of T4. J Clin Endocrinol Metab 30 (2):237-245

42. Marshall JS, Pensky J (1971) Studies on thyroxine-binding globulin (TBG): III. Some physical characteristics of TBG and its interaction with thyroxine. Arch Biochem Biophys 146 (1):76-83

43. Cheng S-Y (1977) Partial amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin. Further evidence for a single polypeptide chain. Biochem Biophys Res Commun 79 (4):1212-1218

44. Zhou A, Wei Z, Read RJ, Carrell RW (2006) Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood. Proc Natl Acad Sci 103 (36):13321-13326

45. Natesan S, Wang T, Lukacova V, Bartus V, Khandelwal A, Balaz S (2011) Rigorous Treatment of Multispecies Multimode Ligand-Receptor Interactions in 3D-QSAR: CoMFA Analysis of Thyroxine Analogs Binding to Transthyretin. J Chem Inf Model. 51 (5):1132-1150

46. Andrea TA, Cavalieri RR, Goldfine ID, Jorgensen EC (1980) Binding of thyroid hormones and analogs to the human plasma protein prealbumin. Biochemistry 19 (1):55-63

47. Nilsson SF, Peterson PA (1971) Evidence for multiple thyroxine-binding sites in human prealbumin. J Biol Chem 246 (19):6098-6105

48. Christensen HN, Hess B, Riggs TR (1954) Concentration of taurine, β-alanine, and triiodothyronine by ascites carcinoma cells. Cancer Res 14 (2):124-127

49. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ (2001) Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. Endocr Rev 22 (4):451-476

50. Friesema EC, Jansen J, Milici C, Visser TJ (2005) Thyroid hormone transporters. Vitam Horm 70:137-167

51. Friesema ECH, Jansen J, Visser TJ (2005) Thyroid hormone transporters. Biochem Soc Trans 33 (1):228-232.

52. Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ (2005) Thyroid hormone transporters in health and disease. Thyroid 15 (8):757-768

53. Heuer H, Visser TJ (2009) Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. Endocrinology 150 (3):1078-1083

54. Tohyama K, Kusuhara H, Sugiyama Y (2004) Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. Endocrinology 145 (9):4384-4391

55. Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. Biochem Biophys Res Commun 254 (2):497-501

56. Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J (1990) The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. Endocrinology 126 (6):3245-3250

57. Ritchie J, Shi Y-B, Hayashi Y, Baird F, Muchekehu R, Christie G, Taylor P (2003) A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. Mol Endocrinol 17 (4):653-661

58. Lafrenière RG, Carrel L, Willard HF (1994) A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13. 2. Human Mol Genet 3 (7):1133-1139

59. Schwartz CE, Stevenson RE (2007) The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan–Herndon–Dudley syndrome. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21 (2):307-321

60. Hulbert A (2000) Thyroid hormones and their effects: a new perspective. Biol Rev 75 (4):519-631

61. Farías R, Chehin R, Rintoul M, Morero R (1995) Differential effect of triiodothyronine and thyroxine on the liposomal membrane in liquid-crystalline and gel state. J Membr Biol 143 (2):135-141

62. Hillier A (1970) The binding of thyroid hormones to phospholipid membranes. J Physiol 211 (3):585-597

63. Blondeau J, Osty J, Francon J (1988) Characterization of the thyroid hormone transport system of isolated hepatocytes. J Biol Chem 263 (6):2685-2692

64. Riley Jr W, Eales J (1993) Characterization of l-Thyroxine Transport into Hepatocytes Isolated from Juvenile Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). Gen Comp Endocrinol 90 (1):31-42

65. Riley W, Eales J (1994) Characterization of 3, 5, 3′-Triiodo-L-thyronine Transport into Hepatocytes Isolated from Juvenile Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss), and Comparison with L-Thyroxine Transport. Gen Comp Endocrinol 95 (2):301-309
66. Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B (2009) Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. Am J Physiol Cell Physiol 296 (3):C570-C582
67. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 83 (6):835-839
68. Wagner RL, Huber BR, Shiau AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, Apriletti JW, Baxter JD, West BL, Fletterick RJ (2001) Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. Mol Endocrinol 15 (3):398-410
69. Ye L, Li YL, Mellstrom K, Mellin C, Bladh LG, Koehler K, Garg N, Garcia Collazo AM, Litten C, Husman B, Persson K, Ljunggren J, Grover G, Sleph PG, George R, Malm J (2003) Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor beta1. J Med Chem 46 (9):1580-1588.
70. Nascimento AS, Dias SM, Nunes FM, Aparicio R, Ambrosio AL, Bleicher L, Figueira AC, Santos MA, de Oliveira Neto M, Fischer H, Togashi M, Craievich AF, Garratt RC, Baxter JD, Webb P, Polikarpov I (2006) Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. J Mol Biol 360 (3):586-598.
71. Andrea TA, Dietrich SW, Murray WJ, Kollman PA, Jorgensen EC, Rothenberg S (1979) A model for thyroid hormone--receptor interactions. J MedChem 22 (3):221-232
72. Du J, Qin J, Liu H, Yao X (2008) 3D-QSAR and molecular docking studies of selective agonists for the thyroid hormone receptor beta. J Mol Graph Model 27 (2):95-104.
73. Szakonyi Zs, Fülöp F (2010) Pajzsmirigyműködésre ható szerek. In: Fülöp F, Noszál B, Szász Gy, Takácsné Novák K (eds) Gyógyszerészi Kémia. Semmelweis Kiadó, Budapest, pp 507-511
74. Bommer C, Werle E, Walter-Sack I, Keller C, Gehlen F, Wanner C, Nauck M, März W, Wieland H, Bommer J (1998) D-thyroxine reduces lipoprotein (a) serum concentration in dialysis patients. J Am Soc Nephrol 9 (1):90-96

75. Dietrich SW, Bolger MB, Kollman PA, Jorgensen EC (1977) Thyroxine analogs. 23. Quantitative structure-activity correlation studies of in vivo and in vitro thyromimetic activities. J Med Chem 20 (7):863-880

76. Koerner D, Schwartz H, Surks M, Oppenheimer J (1975) Binding of selected iodothyronine analogues to receptor sites of isolated rat hepatic nuclei. High correlation between structural requirements for nuclear binding and biological activity. J Biol Chem 250 (16):6417-6423

77. Weigle DS (2003) Pharmacological therapy of obesity: Past, present, and future. J Clin Endocrinol Metab 88 (6):2462-2469

78. Li YL, Litten C, Koehler KF, Mellstrom K, Garg N, Garcia Collazo AM, Farnegard M, Grynfarb M, Husman B, Sandberg J, Malm J (2006) Thyroid receptor ligands. Part 4: 4'-amido bioisosteric ligands selective for the thyroid hormone receptor beta. Bioorg Med Chem Lett 16 (4):884-886.

79. Raval S, Raval P, Bandyopadhyay D, Soni K, Yevale D, Jogiya D, Modi H, Joharapurkar A, Gandhi N, Jain MR, Patel PR (2008) Design and synthesis of novel 3-hydroxy-cyclobut-3-ene-1,2-dione derivatives as thyroid hormone receptor beta (TR-beta) selective ligands. Bioorg Med Chem Lett 18 (14):3919-3924.

80. Hangeland JJ, Doweyko AM, Dejneka T, Friends TJ, Devasthale P, Mellstrom K, Sandberg J, Grynfarb M, Sack JS, Einspahr H, Farnegardh M, Husman B, Ljunggren J, Koehler K, Sheppard C, Malm J, Ryono DE (2004) Thyroid receptor ligands. Part 2: Thyromimetics with improved selectivity for the thyroid hormone receptor beta. Bioorg Med Chem Lett 14 (13):3549-3553.

81. de Araujo AS, Martinez L, de Paula Nicoluci R, Skaf MS, Polikarpov I (2010) Structural modeling of high-affinity thyroid receptor-ligand complexes. Eur Biophys J 39 (11):1523-1536.

82. Sweetlove M (2012) Phase III Trial of Eprotirome. Pharm Med 26 (3):185-187

83. Ladenson PW, Kristensen JD, Ridgway EC, Olsson AG, Carlsson B, Klein I, Baxter JD, Angelin B (2010) Use of the thyroid hormone analogue eprotirome in statin-treated dyslipidemia. N Engl J Med 362 (10):906-916

84. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover GJ, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS (2000) The thyroid hormone receptor-β-

selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. Endocrinology 141 (9):3057-3064

85. Baxter JD, Webb P, Grover G, Scanlan TS (2004) Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight. Trends Endocrinol Metab 15 (4):154-157

86. Grover GJ, Mellstrom K, Malm J (2005) Development of the thyroid hormone receptor beta-subtype agonist KB-141: a strategy for body weight reduction and lipid lowering with minimal cardiac side effects. Cardiovasc Drug Rev 23 (2):133-148

87. Latham KR, Ring JC, Baxter JD (1976) Solubilized nuclear "receptors" for thyroid hormones. Physical characteristics and binding properties, evidence for multiple forms. J Biol Chem 251 (23):7388-7397

88. Wilson BD, Gent WL (1985) Effects of pH and ionic strength on the binding of L-tri-iodothyronine to the solubilized nuclear receptor. Biocheml J 232 (3):663-667

89. Epstein FH, Brent GA (1994) The molecular basis of thyroid hormone action. N Engl J Med 331 (13):847-853

90. Dussault JH, Ruel J (1987) Thyroid hormones and brain development. Annu Rev Physiol 49 (1):321-332

91. Kovacs WJ, Ojeda SR (2011) Textbook of endocrine physiology. Oxford University Press, New York, pp 307-320

92. Weetman AP (2000) Graves' disease. N Engl J Med 343 (17):1236-1248

93. Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, Franklyn JA, Hershman JM, Burman KD, Denke MA (2004) Subclinical thyroid disease. JAMA 291 (2):228-238

94. Borkovec M, Jönsson B, Koper GJ (2001) Ionization processes and proton binding in polyprotic systems: small molecules, proteins, interfaces, and polyelectrolytes. In: Surface and colloid science. Springer, pp 99-339

95. Avdeef A (2001) Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). Curr Top Med Chem 1 (4):277-351

96. Govindaraju V, Young K, Maudsley AA (2000) Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. NMR Biomed 13 (3):129-153

97. Rabenstein DL, Hari SP, Kaerner A (1997) Determination of Acid Dissociation Constants of Peptide Side-Chain Functional Groups by Two-Dimensional NMR. Anal Chem 69 (21):4310-4316

98. Naumann R, Alexander-Weber C, Eberhardt R, Giera J, Spitzer P (2002) Traceability of pH measurements by glass electrode cells: Performance characteristic of pH electrodes by multi-point calibration. Anal Bioanall Chem 374 (5):778-786

99. Szakács Z, Hägele G, Tyka R (2004) 1H/31P NMR pH indicator series to eliminate the glass electrode in NMR spectroscopic pKa determinations. Anal Chim Acta 522 (2):247-258

100. Orgovan G, Noszal B (2011) Electrodeless, accurate pH determination in highly basic media using a new set of (1)H NMR pH indicators. J Pharm Biomed Anal 54 (5):958-964.

101. Szakács Z, Noszál B (1999) Protonation microequilibrium treatment of polybasic compounds with any possible symmetry. J Math Chem 26 (1-3):139-155

102. Sturgeon RJ, Schulman SG (1977) Electronic absorption spectra and protolytic equilibria of doxorubicin: direct spectrophotometric determination of microconstants. J Pharm Sci 66 (7):958-961

103. Elson EL, Edsall JT (1962) Raman spectra and sulfhydryl ionization constants of thioglycolic acid and cysteine. Biochemistry 1:1-7

104. Ebert L (1926) Determination of double ions in solutions of ampholytes. Z phys Chem 121:385-400

105. Rusu A, Toth G, Szocs L, Kokosi J, Kraszni M, Gyeresi A, Noszal B (2012) Triprotic site-specific acid-base equilibria and related properties of fluoroquinolone antibacterials. J Pharm Biomed Anal 66:50-57

106. Neuberger A (1936) Dissociation constants and structures of glutamic acid and its esters. Biochem J 30 (11):2085

107. Noszal B, Sandor P (1989) Rota-microspeciation of aspartic acid and asparagine. Anal Chem 61 (23):2631-2637

108. Szilágyi L, Pusztahelyi ZS, Jakab S, Kovács I (1993) Microscopic protonation constants in tobramycin. An NMR and pH study with the aid of partially N-acetylated derivatives. Carbohydr Res 247:99-109

109. Kovacs Z, Hosztafi S, Noszal B (2006) Site-specific acid-base properties of pholcodine and related compounds. Anal Bioanal Chem 386 (6):1709-1716.

110. Marosi A, Kovacs Z, Beni S, Kokosi J, Noszal B (2009) Triprotic acid-base microequilibria and pharmacokinetic sequelae of cetirizine. Eur J Pharm Sci 37 (3-4):321-328.

111. Szakacs Z, Beni S, Varga Z, Orfi L, Keri G, Noszal B (2005) Acid-base profiling of imatinib (gleevec) and its fragments. J Med Chem 48 (1):249-255.

112. Takács-Novák K, Tam KY (2000) Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: Part V: microconstants and tautomeric ratios of diprotic amphoteric drugs. J Pharm Biomed Anal 21 (6):1171-1182

113. D'Angel JC, Collette TW (1997) A method for the measurement of site-specific tautomeric and zwitterionic microspecies equilibrium constants. Anal Chem 69 (8):1642-1650

114. Benesch RE, Benesch R (1955) The acid strength of the-SH group in cysteine and related compounds. J Am Chem Soc 77 (22):5877-5881

115. Rabenstein DL, Sayer TL (1976) Determination of microscopic acid dissociation constants by nuclear magnetic resonance spectrometry. Anal Chem 48 (8):1141-1146

116. Mazak K, Kokosi J, Noszal B (2011) Lipophilicity of zwitterions and related species: a new insight. Eur J Pharm Sci 44 (1-2):68-73.

117. Mazak K, Noszal B (2012) Zwitterions can be predominant in membrane penetration of drugs: experimental proof. J Med Chem 55 (15):6942-6947.

118. Mazak K, Noszal B (2012) Lipophilicity of morphine microspecies and their contribution to the lipophilicity profile. Eur J Pharm Sci 45 (1-2):205-210. 119. Takácsné Novák K (1997) Practical aspects of partition measurements according to GLP rules. Acta Pharm Hung 67 (5):179-191

120. Sangster J (1997) Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. Eur J Med Chem 32 (11)

121. Martin RB, Edsall JT, Wetlaufer DB, Hollingworth BR (1958) A complete ionization scheme for tyrosine, and the ionization constants of some tyrosine derivatives. J Biol Chem 233 (6):1429-1435

122. Yamazaki F, Fujiki K, Murata Y (1965) The ionization constants of organic compounds I. The microscopic ionization constants of tyrosine and related compounds. Bull Chem Soc Jpn 38:8

123. Collance E, Paris M (1983) Physical chemistry of thyroid hormones. II. Effect of dimethyl sulfoxide concentration on protonation constants measured in water-dimethylsulfoxide media containing 0.5 M sodium perchlorate. Extrapolation to aqueous medium. NO. 7-8I:I-149-I-154

124. Wearly L, Anthony G (1976) Analytical Profiles of Drug Substances, K. Florey (Ed.), vol. 5. Academic Press, New York,

125. Box K, Comer J (2008) Using measured pKa, LogP and solubility to investigate supersaturation and predict BCS class. Curr Drug Metab 9 (9):869-878

126. Gemmill CL (1955) The apparent ionization constants of the phenolic hydroxyl groups of thyroxine and related compounds. Arch BiochemBiophys 54 (2):359-367

127. Tata J (1959) An unusual property of thyroxine and other iodophenols. Biochem J 72 (2):214

128. Dickson P, Aldred A, Menting J, Marley P, Sawyer W, Schreiber G (1987) Thyroxine transport in choroid plexus. J Biol Chem 262 (29):13907-13915

129. Ishigami K, Katsuta R, Shibata C, Hayakawa Y, Watanabe H, Kitahara T (2009) Synthesis and structure revision of tyroscherin, and bioactivities of its stereoisomers against IGF-1-dependent tumor cells. Tetrahedron 65 (18):3629-3638

130. Izumiya N, Nagamatsu A (1952) Walden Inversion of Amino Acids. VI. The Synthesis of D-Surinamine (N-Methyl-D-tyrosine). Bull Chem Soc Jpn 25 (4):265-267

131. Loeser A, Ruland H, Trikojus V (1938) Darstellung, Eigenschaften und biologische Wirkungen von Derivaten (Äthern) des Thyroxins, Dijodthyronins und Dijodtyrosins. N-S Arch Pharmacol 189 (5):664-678

132. Buck R, Rondinini S, Covington A, Baucke F, Brett C, Camoes M, Milton M, Mussini T, Naumann R, Pratt K (2002) Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002). Pure Appl Chem 74 (11):2169-2200

133. Purlee EL (1959) On the solvent isotope effect of deuterium in aqueous acid solutions. J Am Chem Soc 81 (2):263-272

134. Hwang T-L, Shaka A (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. J Magn Reson, Ser A 112 (2):275-279

135. Bleicher L, Aparicio R, Nunes FM, Martinez L, Gomes Dias SM, Figueira AC, Santos MA, Venturelli WH, da Silva R, Donate PM, Neves FA, Simeoni LA, Baxter JD, Webb P, Skaf MS, Polikarpov I (2008) Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. BMC Struct Biol 8:8.

136. Martinez L, Nascimento AS, Nunes FM, Phillips K, Aparicio R, Dias SM, Figueira AC, Lin JH, Nguyen P, Apriletti JW, Neves FA, Baxter JD, Webb P, Skaf MS, Polikarpov I (2009) Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. Proc Natl Acad Sci U S A 106 (49):20717-20722.

137. Borngraeber S, Budny MJ, Chiellini G, Cunha-Lima ST, Togashi M, Webb P, Baxter JD, Scanlan TS, Fletterick RJ (2003) Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 100 (26):15358-15363.

138. Schrödinger Suite (2011) Protein Preparation Wizard; Epik version 2.2., Schrödinger LLC, New York, NY 2011; Impact version 5.7, Schrödinger LLC, New York, NY, 2011; Primer version 3.0, Schrödinger LLC, New York, NY, 2011

139. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT (2006) Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. J Med Chem 49 (21):6177-6196.

140. Boyer SH, Jiang H, Jacintho JD, Reddy MV, Li H, Li W, Godwin JL, Schulz WG, Cable EE, Hou J, Wu R, Fujitaki JM, Hecker SJ, Erion MD (2008) Synthesis and biological evaluation of a series of liver-selective phosphonic acid thyroid hormone receptor agonists and their prodrugs. J Med Chem 51 (22):7075-7093.

141. Erion MD, Cable EE, Ito BR, Jiang H, Fujitaki JM, Finn PD, Zhang BH, Hou J, Boyer SH, van Poelje PD, Linemeyer DL (2007) Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. Proc Natl Acad Sci U S A 104 (39):15490-15495.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Az értekezés alapját képező közlemények

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

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

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

Tóth G, Baska F, Schretner A, Rácz A, Noszál B (2013) The site-specific basicity of thyroid hormones as regulators of their receptor binding: in silico investigation. Eur Biophys J 42: 721-730

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

10.2 Az értekezés témaköréhez kapcsolódó saját közlemény

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

10.3 Más témához kapcsolódó közlemények

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

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

3. **Tóth G**, Mohácsi R, Rácz Á, Rusu A, Horváth P, Szente L, Béni Sz, Noszál B (2012) Equilibrium and structural characterization of ofloxacin-cyclodextrin complexation. J Incl Phenom Macro in press DOI: 10.1007/s10847-012-0245-2

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

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

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

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

8. Rusu A, Hancu G, Völgyi G, **Tóth G**, Noszál B, Gyéresi Á (2013) Separation and determination of quinolone antibacterials by capillary electrophoresis J Chrom Sci in press DOI: 10.1093/chromsci/bmt10

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

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

11. Szabó B, Kállai N, **Tóth G**, Hetényi G, Zelkó R (2013) Correlation between the changes of the free volume and the drug release characteristics of cast and freeze dried buccal films, J Pharm Biomed Anal, közlésre elfogadva

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Noszál Béla egyetemi tanárnak, a már diákkörös hallgatóként is nyújtott szakmai támogatásért és munkám irányításáért.

Külön köszönet illeti Dr. Kovács Zsuzsanna egyetemi tanársegédet azért, hogy bevezetett a kutató munka rejtelmeibe.

Köszönet illeti Dr. Hosztafi Sándor és Kökösi József tudományos főmunkatársakat a modellvegyületek szintézisében nyújtott segítségért.

Köszönöm Baska Ferencnek az in silico dokkolásokban nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Béni Szabolcs egyetemi adjunktusnak az NMR mérésekben nyújtott segítséget, Dr. Völgyi Gergely egyetemi adjunktusnak az értékes konzultációkat.

Hálával tartozom a Gyógyszerészi Kémiai Intézet valamennyi munkatársának a baráti atmoszféra megteremtéséért

Végül, de kiemeltem szeretném hálás köszönetemet kifejezni Családomnak, Feleségemnek, Marcikának és Szüleimnek, hogy nyugodt, szeretetteljes hátteret biztosítottak számomra.