

INZULINUTÁNZÓ FÉMKOMPLEXEK BIOSPECIÁCIÓJA A
SEJTEN KÍVÜLI ÉS A SEJTEN BELÜLI TÉRBEN

OTKA PÁLYÁZAT ZÁRÓJELENTÉS

T49417

2005-2008

Témavezető

Dr. Kiss Tamás egyetemi tanár

A pályázat keretében különböző antidiabetikus hatású VO(IV) és Zn(II) komplexek vizsgálatát tűztük ki célul. Mivel ezek inzulinutánzó hatása összetett és a hatásmechanizmusuk csak részben feltárt az irodalomban, a biológiai közegben való viselkedésük és speciációjuk megjósolása egyensúlyi állandók ismeretében fontos információt adhatnak a hatás megértéséhez. A komplexek eredeti formájának minél teljesebb megismerése (pl. oldategyensúlyi mérések révén) természetesen fontos, de emellett a felszívódásukat követő lehetséges átalakulásaik talán még relevánsabb a biológiai hatás megértéséhez. A potenciális vércukorszint-csökkentő szerek ugyanis „prodrug”-nak tekinthetők, hiszen a hatásos formájuk nagy valószínűséggel különbözik az eredetitől, pl. a megfelelő szérumkomponensekhez, ill. sejtalkotókhoz való kötődésük miatt. Munkánk során így ezeknek a kölcsönhatásoknak a megismerése állt a középpontban. Elért eredményeinket a munkatervben foglaltak szerinti csoportosításban tárgyaljuk.

1. Vizsgáltuk az inzulinutánzó (IU) VO(IV) komplexek sejten belüli lehetséges átalakulásai: és kölcsönhatásai a potenciális biomolekulákkal, mint a glutation (GSH), és az ATP, illetve a V(V)/V(IV) redoxi tulajdonságai a fenti molekulákkal. A vizsgált tesztmolekula a VO(IV)-dipikolinát és a - maltolát komplex.

a.) A VO(IV)-IU komplexek sejten belüli speciációjának tisztázásához tanulmányoztuk a VO(IV)-dipicolinát és a VO(IV)-maltoltát kölcsönhatását két a sejtben jelentős (mM) koncentrációban jelenlevő alkotóval a glutationnal (GSH) és az ATP-vel. Megállapítottuk, hogy a GSH elsősorban a vanádium oxidációs állapotának meghatározásában és fenn-tartásában (alapvetően IV), míg az ATP a biner és terner komplexekben való megkötésében játszik szerepet.

A sejten kívüli kölcsönhatásokra vonatkozólag eredményeinket tovább finomítottuk és véleményünk szerint jelentős új eredményeket értünk el. Ezeket a következőkben összegyűjtjük.

b.) Több VO(IV)-IU komplex apo-transzferrin (apo-Tf) és szérum albumin (HSA) fehérjékkel való kölcsönhatásában részletes CD és ESR vizsgálatok igazoltuk, hogy a vegyes komplex képződés nem elhanyagolható folyamat. Az apo-Tf-nel végbemenő ligandum-kiszorítás csak részleges és úgy tűnik, hogy az egyik hordozó ligandum a fehérje közelében marad és valódi belső szférás vegyes ligandumú komplex képződik. Feltételezéseink szerint a Tf fémion kötésében résztvevő His és Asp szorul ki a koordinációs szférából. A HSA esetén a kölcsön-

hatás jóval gyengébb, a kötési helyre vonatkozólag az eddigi vizsgálataink nem adnak felvilágosítást. Úgy tűnik azonban, hogy ezek az eredmények nem befolyásolják azon korábbi feltételezésünket, hogy a VO(IV) vérben való szállításában a nagy molekulatömegű szérumbelül komponensek közül a transzferrinnel kell, mint kötőmolekulával számolnunk és az albumin szerepe ebben a folyamatban elhanyagolható.

c.) Az inzulinutánzó vanádium(IV)-komplexek, ill. a cink(II)-komplexek szérumbeli megoszlásának modellezésekor eddig csak a fémion – hordozó ligandum és a fémion – szérumbelül komponens (kis és nagy molekulatömegű alkotók) között kialakuló törzs- ill. fémion-központú vegyes-ligandumú komplexek képződését vettük figyelembe. Viszont a hordozó ligandumok és a szérumbelül közötti közvetlen kölcsönhatásra vonatkozólag eddig nem voltak ismereteink. A modellszámításainkat azonban egyes hordozó ligandumok esetén sokkal közelebb lehetett hozni az in vitro ultaszűrési/ICP mérési eredményeinkhez. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a figyelembevételével Ezen túlmenően a hordozóligandumok valódi szerepére vonatkozólag ismereteinket finomíthatnánk, hiszen eddigi vizsgálataink szerint azok csak a felszívódás folyamatában játszanak szerepet.

d.) Ennek tisztázás érdekében részletesen vizsgáltuk szérumbelül (elsősorban a humán szérumbelül albumin, HSA) és egyes hordozó ligandumok: maltol (mal); 3-hidroxi-1,2-dimetilhidroxi-piridinon (dhp), pikolinsav (pic), 6-metil-pikolinsav (6-Me-pic), dipikolinsav (dipic) között fiziológiás pH-n kialakuló asszociátumok összetételét, stabilitását, a ligandumok lehetséges kötődési helyeit ultaszűrési, fluorimetriás, UV spektrofotometriás és CD spektroszkópiás mérések segítségével. Ultaszűrési fizikailag különválasztható a belülhez kötött és a nem kötődő ligandum. Ezen ligandumok megoszlása a két frakcióban UV spektrofotometriával volt mérhető, majd az adatokból a PSEQUAD program segítségével asszociatív kötési állandókat tudtunk számolni. Megállapítottuk, hogy a fiziológiás pH-n semleges töltésű dhp egyáltalán nem, míg a többi, ezen pH-n nagyrészt negatív töltésű ligandum jelentős mértékben kötődik az albuminhoz. A vizsgált ligandumok közül a dipic megkötődését találtuk legerősebbnek. A ligandumok megkötődésének helyét fluorimetrián és CD spektroszkópiával kötőhely marker anyagok (warfarin, ibuprofen, bilirubin) segítségével vizsgáltuk kizorítási titrálási eljárást alkalmazva. Megállapítottuk, hogy a vizsgált ligandumok elsősorban a HSA II.A doménjében elhelyezkedő úgynevezett Sudlow-féle I. kötőhelyén kötődnek. A mérési adatokból specifikus kötési állandókat is számoltunk.

e.) A fent említett fémion megoszlásra vonatkozó ultaszűrési/ICP vizsgálatok mellett az antidiabetikus vanádium(IV)-komplexek esetén valódi vérszérumbelül mintákat használva HPLC–ICP-MS módszerrel az eddigi mesterséges modellekkel végzett méréseinkkel illetve

modellszámításainkkal összhangban, sikerült bizonyítanunk, hogy a vanádium(IV) szinte kizárólag a transferrinhez kötődik, míg az albumin gyakorlatilag nem köti a fémiont. Ez nagy sikere az egész problémakör modellszámításokon alapuló megközelítésének, amit évekként ezelőtt mi is célul tűztünk ki.

2. *A gyakorlatilag nem felderített Zn(II) komplexekre is szeretnénk kiterjeszteni a korábban a VO(IV)komplexekre sikeresen elvégzett biospeciációs vizsgálatokat. Tervezzük a biológiai hatással rendelkező potenciálisan inzulinutánzó tulajdonságú Zn(II)komplexek képződési egyensúlyainak leírását, és kölcsönhatásainak tisztázását a vérérszék kis- és nagy molekulatömegű alkotóival, illetve a sejt legfontosabb fentebb már említett kismolekulatömegű komponenseivel (GSH, GSSG, ATP).*

a.) Meghatároztuk számos (összesen hat) Zn(II)-IU komplex oldategyensúlyi és oldatszerkezeti sajátosságait. Ugyanazon komplexeket, amelyeket korábban VO(IV)-mal is vizsgáltunk. Ezek inzulinutánzó hatását japán kooperációs partnereink igazolták. Az összehasonlító vizsgálatok a fémion eltérő geometriájának meghatározó szerepét igazolták.

b) Az inzulinutánzó cink(II)-komplexek hatásmechanizmusának jobb megértése céljából oldategyensúlyi módszerekkel (pH-metria, UV-spektrometria, CD-spektroszkópia, ESI-MS) tanulmányoztuk öt inzulinutánzó Zn(II)-komplex (mal, hdp, pic, 6-Me-pic, dipic) kölcsönhatását a sejtekben mM-os koncentrációban jelenlévő redukált L-glutation (GSH) és adenozin 5'-trifoszfát (ATP) ligandumokkal. A képződő vegyes ligandumú komplexek összetételének és stabilitási állandóinak meghatározása mellett megállapítottuk, hogy a dipikolinsavval a legkevésbé kedvezményezett a vegyes ligandumú komplexek képződése, míg a kétfogú hordozó ligandumok esetén a sejtben feltételezhető koncentrációviszonyok mellett fiziológiás pH-n minden esetben számolni lehet a Zn(II) – hordozó ligandum – GSH /ATP vegyes komplexek kialakulásának a lehetőségével.

c.) A sejtben kívüli térben, a vérérszék kis molekulatömegű alkotói közül a cinkmegkötőképességük és a szérumkoncentrációjuk alapján a cit, His és a Cys kölcsönhatása lehet számottevő az inzulinutánzó Zn(II)-komplexszel, ezért meghatároztuk ezekkel a szérumalkotókkal képződő vegyes ligandumú komplexek összetételét és stabilitási állandóit. Megállapítottuk, hogy fiziológiás pH-n, a dipic kivételével, képződnek vegyes ligandumú komplexek, és a legkedvezményezettebb a ciszteinnel való kölcsönhatás. A hordozó ligandumok közül a 6-Me-pic esetén valószínűleg a metil-szubsztituens térigénye, ill. a dipic

esetén a három koordinálódó donoratom miatt *tris* ($[ZnABH_x]$) vegyes ligandumú komplexek nem képződnek.

Hasonló vizsgálatokat végeztünk néhány VO(IV) – 5-metoxi-karbonil-pikolinsav származék – cit, tejsav, foszforsav vegyes ligandumú rendszerben is. A VO(IV) esetén ugyanis ezen ligandumokkal való kölcsönhatással kell leginkább számolni a vérben. Megállapítottuk, hogy pH = 4-8 tartományban igen jelentős a vegyes ligandumú komplexek képződése ezen kis molekulatömegű szérumkomponensekkel. Minden esetben $[VOABH_x]$ összetételű komplexek képződését tudtuk számolni a foszfát kivételével, mert a foszfáttal nem képződött mérhető mennyiségű *turner* komplex a mérési körülményeink között.

d.) Mivel általában elmondható, hogy a véráramba kerülő cink ill. vanádium nagy része fehérjékhez kötődik, igen fontos a fémkomplexeink nagy molekulatömegű szérumalkotókkal, azaz szérumfehérjékkel való kölcsönhatásainak is a vizsgálata. Általánosan ismert, hogy a vér transzport fehérjei pl. nagymértékben módosíthatják egy gyógyszervegyület biohosszú élettartamát és *in vivo* eloszlását.

A Zn(II) kis (hordozó ligandum, Cys, His, cit) és nagy molekulatömegű komponensek (HSA, Tf) közötti megoszlását vizsgáltuk fiziológiás pH-n ultraszűrővel és azt követő ICP-AES mérésekkel olyan mintákban, melyek releváns koncentrációban tartalmazta ezen vegyületeket és megállapítottuk, hogy a Zn(II) döntő része a fehérje fázishoz kötődik. Hasonló méréseket végeztünk a VO(IV)-mal; VO(IV)-pic ill. különböző VO(IV)-5-metoxi-karbonil-pikolinsav komplex esetén is, de a vanádium kimutatási határa miatt a hatásostól (kb. 10 μ M) csak jóval nagyobb (200 μ M) VO(IV) koncentráció mellett. A VO(IV) komplexek esetén is megállapítottuk, hogy a fehérje fázishoz igen nagy mennyiségű vanádium kötődik.

Ilyen összetett rendszerekben (fémion – hordozó ligandum – kis (LMM) és nagy (HMM) molekulatömegű komponensek) kialakuló egyensúlyi viszonyok ismeretében a kialakuló fémion eloszlást a kis és nagy molekulatömegű fázisok között (ill. azon belül is, hogy melyik szérumfehérjéhez kötődik a fémion inkább) modellszámolások segítségével (PSEQUAD program) meg tudjuk határozni. Ezen modellszámolások azonban rámutattak arra, hogy nem elegendő a (i) fémion-hordozó ligandum, (ii) fémion-LMM, (iii) fémion-HMM és (iv) fémion-hordozó ligandum-LMM rendszerekben képződő fémkomplexek és azok stabilitási állandóinak az ismerete, hanem a teljesebb megértéshez fontos a szérumfehérjék és a hordozó ligandumok közötti kölcsönhatást is figyelembe venni, melyre vonatkozó irodalmi adatot azonban nem találtunk. Így részletesen vizsgáltuk a fehérje-hordozó ligandum asszociátumokat is (ld. fentebb). Megállapítottuk, hogy a fehérje-ligandum

komplexek modellbe való bevétele sokkal jobb egyezést hoz a számolt és mért eredmények között. A modellszámolásaink során megállapítottuk, hogy biológiailag releváns koncentráció viszonyok mellett a Zn(II) esetén a fémion döntően a HSA-hoz kötődik, míg a VO(IV) esetén a Tf a domináns fémmegkötő.

A fent említett fémionok megoszlásra vonatkozó ultraszűrési-ICP(AES) vizsgálatok mellett az antidiabetikus VO(IV)-komplexek esetén valódi vérszérumszámításokat használva HPLC-ICP(MS) módszerrel az eddigi méréseinkkel illetve modellszámításainkkal összhangban sikerült bizonyítanunk, hogy a VO(IV) szinte kizárólag a Tf-hez kötődik, míg a HSA gyakorlatilag nem köti a fémiont. A Zn(II)-komplexek HSA ill. Tf-hez való kötődését a mal és dipic ligandumok esetén CZE-ICP(MS) mérésekkel sikerült összehasonlítani, a kapott eredmények ezekben az esetekben is jól egyeztek a modellszámításokkal. Ismételten hangsúlyoznánk, hogy ezek a humán szérummal végzett vizsgálatok teljes megerősítést adták a mi modellszámításainknak, ami nagy eredménye a biológiai rendszerek speciációjának modellszámításokon alapuló általunk alkalmazott és javasolt leírásának.

(3) *Folytatjuk vizsgálatainkat új potenciális inzulinutánczó vanádium- és cinkkomplexek előállítására és oldategyensúlyi, valamint oldatszerkezeti jellemzése céljából pH-potenciometriás, spektrális és mágneses mérések révén. A tervezett ligandumcsaládok a diamino és szerves aldehidekkel képezett Schiff bázisok és redukált Schiff bázisok, melyek utóbbiak hidrolitikus stabilitása korábbi vizsgálataink szerint jóval jobbnak bizonyult. Ezen kívül a szalicilsavnak aminosavakkal képezett „pseudo oligopeptid” jelenti a másik vizsgálni kívánt vegyületcsaládot (SalAsp, SalGlyAsp, stb.), melyeknél a fémion indukálta amid deprotonálódás lehet érdekes részprobléma a fémionkötés erősségét tekintve.*

a.) A fokhagymából izolált természetes eredetű *allixin* és annak *N-metil-tio-származék*ának Zn(II)-komplexeit vizsgáltuk pH-potenciometriás mérésekkel. Ezen komplexek igen kiemelkedő inzulinutánczó szerek, de *in vivo* alkalmazásuk során a tio-származék bizonyult hatásosabbnak. Oldategyensúlyi vizsgálataink azt mutatták, hogy az (S₂O₂) koordinációjú N-metil-tio-allixin komplexe sokkal stabilisabb, ami a bélrendszerből való felszívódásnál valószínűleg előnyt jelent.

Néhány aminosav (His, Ile, Trp) 5-metoxi-karbonil-pikolinsav származékának antidiabetikus hatást mutató VO(IV)-komplexeit is vizsgáltuk elsősorban pH-potenciometriás

módszerrel. Meghatároztuk a képződő komplexek összetételét, stabilitási állandóit, javaslatot tettünk a legvalószínűbb kötésmódokra, amit az ESR mérések is alátámasztottak. Megállapítottuk, hogy ezen ligandumokkal a komplexképződés már kis pH-n is jelentős, azaz a vizsgált VO(IV)-komplexek a gyomor savas pH-ján nagy valószínűséggel stabilisak. Fiziológias pH-n mindegyik esetben a $[\text{VO}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_n(\text{OH})]^-$ ($n=2,3$) összetételű komplexek bizonyultak dominánsnak.

b.) A fenolos hidroxilcsoport jó „horgony” donorcsoport szerepét igazoltuk a SalAsp és a SalGlyAsp di és tripeptidek VO(IV) kölcsönhatásában. Ennek megfelelően a peptidamid koordinációjára már gyengén savas pH-n pH 4-5, illetve pH 5-6 tartományban sor kerül. Megállapítottuk, hogy a tripeptid származék esetén fellépő kooperatív deprotonálódás, a két proton teljesen átfedő folyamatban szabadul fel a peptid molekulából) feltétele a mindkét oldalról a VO(IV)-hoz stabilisan kötődni képes horgony donorcsoport jelenléte.

c.) Vizsgáltuk néhány fenolszármazék etiléndiaminnal képezett Schiff bázisának, illetve ezek redukált származékainak Zn(II)-nal való komplexképző sajátosságait. Meghatároztuk a képződő komplex kristályszerkezetét és követtük a komplexek oldásakor az azok szerkezetében bekövetkező változásokat. Tisztáztuk a különböző koordinációs szám és az eltérő geometria okozta eltérő sajátosságokat a megfelelő VO(IV) komplexekkel való összevetésben.

A témába tartozó, de a munkatervben előre nem rögzített kutatások eredményei:

a.) A vizsgálataink középpontjában álló Zn(II) komplexek (hordozó ligandumok: mal; dhp, pic, 6-Me-pic) inzulinutánzó hatása mind *in vivo*, *in vitro* tanulmányozott az irodalomban, azonban a Zn(II)-dipic komplexek esetén hiányoztak ilyen adatok. Ezért a Szegedi Biológiai Kutatóintézet (SZBK) Genetikai Tanszékével közösen *ex vivo* tanulmányoztuk a Zn(II)-dipic komplexek biológiai hatását humán Mono Mac és 3T3-L1 adipocita sejtvonalakon, ill. összehasonlításként a mal és pic komplexeit is vizsgáltuk. A toxicitás vizsgálatok azt mutatták, hogy 100 μM koncentráció alatt a Zn(II) komplexek gyakorlatilag nem toxikusak. Mitokondrionális dehidrogenáz aktivitás mérése (EZ4U assay) közvetett információt szolgáltat a komplexek inzulinutánzó hatására vonatkozólag. Mind a három ligandum fémkomplexe hasonló aktivitást mutatott az 1-100 μM koncentrációtartományban, viszont ettől nagyobb koncentrációk esetén egyedül a dipic mutatott növekvő mitokondrionális aktivitást, valószínűleg a Zn(II)-mal és Zn(II)-pic komplexek nagyobb koncentrációknál jelentkező toxicitása miatt.

b.) Az inzulinutánzó Zn(II)- és VO(IV)-komplexek lipo-hidrofil sajátsága fontos fizikai paraméter a feltételezett passzív membrántranszport szempontjából. Ezekre a komplexekre az irodalomban megtalálható oktanol/víz megoszlási hányadosok meghatározásánál általában a ligandumok UV sávjait használják fel, ezekből az adatokból azonban nem számítható a fémkomplex oktanos fázisba történő átoldódása, hisz így az átoldódott, de komplexben nem kötött ligandumot is mérik. Másrészt az oktanos és vizes fázisban mért spektrumok közvetlenül nem is hasonlíthatók össze (csak az extrakció előtti vizes oldat, és az az utáni vizes fázis). Sok esetben a pH-független megoszlási hányados (P) és a pH-függő megoszlási állandó (D) használata is összekeveredik. Mivel számos esetben szoros korrelációt feltételeznek a fémkomplexek lipofilitása és a biológiai hatásosság között, ezért fontosak a megbízható(bb) módon meghatározott paraméterek ismerete. Pl. ICP-AES mérések segítségével, a fémionok oldaláról megközelítve az átoldódást, megbízhatóbb információkat kaptunk a komplexek lipo-hidrofil sajátságára vonatkozólag. Az víz-oktanol közötti egyensúlyi folyamatok mellett a teljes képhez és a P, D értékek számolásához a vizes fázisban az adott pH-n lejátszódó komplex disszociációs folyamatok, a komplexek és a ligandumok egyedi UV spektrumainak ismerete is fontos. Széles pH-tartományban történt vizsgálataik segítségével megállapítottuk, hogy a semleges töltésű $[ZnL_2]$ ill. $[VOL_2]$ komplexek lipofilitása (lgP) lineáris összefüggést mutat a hordozó ligandum lipofilitásával (lgP) a mal, dhp, 2-hidroxi-piridin-1-oxid és 2-merkaptó-piridin-1-oxid esetén, míg a pic, 6-Me-pic, dipic ligandumok esetén nem, valószínűleg a vizes közegben kialakuló ikerionos, ill. erős hidrogén-hidas szerkezetnek köszönhetően.

A kutatási témában résztvevők személyében jelentősebb változások történtek az évek folyamán. Egy résztvevő két éven át az USA-ban posztdoktorként dolgozott, egy másik munkatársam az MTA Bioszervetlen kémiai Kutatócsoport MTA támogatásának megszűnése miatt más forrásból lett fizetve és így kutatómunkája is módosult. Ugyanakkor 2005-ben csatlakozott hozzám jelen kutatási pályázathoz Enyedy Éva Anna OTKA posztdoktorként a PD050011. számú pályázat nyerteseként (csak bérállással), akinek munkája benne foglaltatik jelen zárójelentésben..

Szeged, 2009. február 19.

Kiss Tamás témavezető

