HIDROXILÁLÓ RENDSZEREK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ MODELL VEGYÜLETEKEN

Doktori értekezés

Marián Miklós
tud. gyakornok

József Attila Tudományegyetem Állatélettani Tanszék
Biokémiai Csoport

Szeged
1970

JATE KÖZPONTI KÖNYVTÁRA
Folyóiratok
Szeged

Diss. B 350

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED

BEVEZETÉS

Az értekezés az in vitro hidroxilálási folyamatokkal foglalkozik. Általánosságban a hidroxilálás két szempontból érdekes: a/ mint az in vivo folyamatok egyik fontos lépése, b/ másrészt mint a szintetikus kémia egyik gyakori részmozzanata.

A kisérleti munkámban különböző in vitro hidroxiláló hatású rendszereket vizsgáltam. A kisérletek célja többirányú volt: a/ a különböző rendszerek hatásának vizsgálata aromás, indolvázas és szteroid vegyületekre, b/ egyes rendszerek hatásmechanizmusának tisztázása, c/ a szteroid-szulfátok felhasználhatóságának vizsgálata vizes közegü rendszerekben. A munka során több vegyület előállitását kellett elvégezni részben új eljárással. A vegyületek vizsgálatára új módszert is alkalmaztam.

Az elméleti részben kivonatosan összefoglalom a vizsgálatok során érintett területek irodalmát. Részletesebben kitérek a szteroid-szulfátokkal kapcsolatos vizsgálatokra. A közlemények ben már megjelent eredményeket csak röviden tárgyalom.

I. ELMÉLETI RÉSZ

1/ Biológiai hidroxilálási folyamatok

Az élő szervezetben az oxidációs folyamatok legnagyobb része enzimek segitségével játszódik le. Anaerob és aerob oxidációt különböztetünk meg.

Az oxigén jelenlétében müködő enzimeknek 4 csoportja ismert /1-3/: oxidázok, oxigenázok, kevert müködésü oxidázok /hidroxilázok/, vegyes oxigenázok.

A hidroxilázokat az jellemzi, hogy az oxigén molekulának csak az egyik atomja épül be a szubsztrátba, mig a másik vizzé alakul:

$$S + O_2 + AH_2 \rightarrow SO + H_2O + A$$

Az elektron donor lehet a NAD és NADP redukált alakja, aszkorbát, redukált pteridin, illetve még nem definiált vegyület. Ennek alapján a hidroxilázokat alcsoportokba sorolják /5/.

Tágabb értelemben szokás minden oxigén aktiválását és beépülését katalizáló enzimet oxigenáznak nevezni. /4/.

Ezek az enzimek az élő világban általánosan elterjedtek, szerepük sokrétü: általánosságban a metabolitok transzformációja, detoxifikálás, aromás és telitett ciklusos vegyületek kis fragmentumokra való darabolása, szteroidok és aminosavak stb. szintézise.

A hidroxiláz enzimek tiszta preparálása nehéz, eléggé instabilak, gyakran több komponensüek. Az aromás hidroxilázok közül alaposan tanulmányozott a fenilanalin-hidroxiláz /6-8/. A szteroid-hidroxilázok közül a 11β-hidroxilázt sikerült előállitani, azonban itt a mellékvese mitokondriumból izolált enzimhez még NADPH-t és melegitett mellékvese vagy máj extraktumot

kell adni /9, 10/.

Az in vivo kisérletekben részben a természetes anyagcsereutakat vizsgálják, részint pedig az idegen anyagok enzimes átalakulásait. A gyógyszerek hidroxilálódásával sokat foglalkoztak /aromások 19, 12, szteroidok 13, 14/. Az enzimes gyógyszerhidroxilálásokat Gillette foglalta össze /15/. A gyógyszerekre ható hidroxilázok nem specifikusan hatnak /nincs specifikus szubsztrátjuk/. A máj ugynevezett sima mikroszoma frakcióiban lokalizálódtak, amely endoplazmatikus retikulum lipoid anyagú tubulusaiból áll. Kismértékben más szervek is hidroxilálnak gyógyszereket. A hidroxilált származékok gyakran glükuronidokká vagy szulfátokká alakulnak és kiküszöbölődnek.

Az enzimes hidroxilációk mellett a szervezetben is számolni kell nem enzimatikus hidroxilációs folyamatokkal. E tekintetben elsősorban az L-aszkorbinsav játszik fontos szerepet.

Az aszkorbinsav redukáló hatású, miközben dehidro-aszkorbinsavvá alakul. Ezt a tulajdonságát fémekkel adott kötésben, valamint proteinekkel kapcsolt formában is megtartja /16, 17/. Lúgos és savas közegben is oxidálódik. A további oxidálódás során in vivo diketo-L-gulonsavvá alakul /18/. Oxidálódását fémek pl. /Cu/ siettetik. Komplex képzésre hajlamos.

Növényekben és állatokban is nagymennyiségben megtalálható. Állatokban koncentráltan van jelen a mellékvesében, lépben, herékben /19/, de jelen van még a porcban, bőrben, fogban is nagyobb mennyiségben /20/. Mennyisége az élő szervezet állapotától függően növényben /21/ és állatban /22/ is változik. Májban egy része kötött állapotban van jelen.

Szerepére nézve sok adat áll rendelkezésünkre. Részt vesz védekező folyamatokban, aminosav dezaminálásban /23/, tirozin oldallánc lebontásban /24/, homin átalakitásban /25/. In vitro igazolták, hogy az adrenalin és noradrenalin stabilitását oldatban csökkenti /26/, serkenti a metilvörös, tetrazoliumkék/27/, piridin-nukleotidok /28/ fotoredukcióját. Szerepel még demetilezésben, decetilezésben /29,30/, olefin epoxidálásban is. A hidroxilálási folyamatokban is szerepet játszik. Skorbutos állatban az aromás gyógyszerek nem hidroxilálódnak. A tirozináz koensime /31/. A kollagén bioszintézisben a prolin - hidroxiprolin átalakulásban részt vesz. A szteroid anyagcserével is kapcsolatos /ld. később/. Hatását vagy közvetlenül, vagy más vegyületek redox-állapotának befolyásolásával fejti ki.

In vivo szerepének megközelitésében jelentős lépés volt Udenfriend és mts. /31, 32/ vizsgálata, akik egy aszkorbinsav tartalmú model rendszert állitottak össze, amely in vitro hasonló hidroxilációs folyamatokat végzett el, mint az in vivo reakciók. Igy lehetőség nyilt mechanismus vizsgálatokra is.

2/ <u>In vitro hidroxiláló rendszerek</u>

A hidroxilációs folyamatok elvégzése általában elég nehéz feladat. Különböző oxidáló szerekkel pl. OsO_4, SeO_4, csoport kiépitésekkel /33/ bizonyos esetekben megoldható. A következőkben csak a direkt hidroxil csoport beépitését végző reakciókkal foglalkozom.

A direkt hidroxiláló eljárásokat 4 csoportba oszthatjuk: Fizikai, kémiai, model rendszerek és szerv inkubátumok.

a/ <u>Fizikai rendszerek</u>

Ide soroljuk a besugárzások hatására lejátszódó reakciókat.

Sugárforrásként felhasználhatunk: γ vagy röntgensugarakat, és neutron részecskéket, ultraibolya fényt. A nem vizes közegben végzett besugárzás különböző izomerizációs, hasitással járó stb. reakciókat válthat ki. Biológiai szempontból a vizes közegü reakciók érdekesek.

A sugárzás hatására vizes közegben az aromásokból fenolszármazékok képződnek /34-37/. A szteroidoknál is tapasztaltak hidroxiláló hatást /38-40/. Az α és neutron sugarak hatását is megvizsgálták aromásokra /41, 42/.

Az ultraibolya /UV/ sugárzás is hidroxiláló hatású vizes oldatokban /43-47/. Hatásosabb a hidroxilálódás ferro vagy ferri ion jelenlétében /48-50/, illetve H_2O_2 hig oldatában /51/. Az UV besugárzott pernitrosav /52/ és a dinitrogénoxid /53/ hidroxiláló hatású.

b/ Kémiai hidroxiláló rendszerek

Itt azon rendszereket emlitjük, amelyek egy változó vegyértékü fém iont és oxidálószert tartalmaznak.

Legrégebben ismert ilyen rendszer az u.n. Fenton-rendszer /54/, amelyet elsősorban a szénhidrát kémiában használnak fel oxidálószerként. Stöchiometrikus mennyiségü ferro ionból /ferroszulfát/ és H_2O_2-ból áll. Kénsavval erősen savanyitott vizes közegben hat, szük pH tartományban, szobahőmérsékleten. Főként aromások hidroxilálását vizsgálták a rendszerben /55-57/.

Ugyancsak hidroxiláló hatású a ferriin-ferroin-rendszer, valamilyen oxidálószer jelenlétében, magas redoxpotenciálja révén. /Ferriin: tris/1,10-fenantrolin/- vas/III/-ion, ferroin: Tris/1,10-fenantrolin/-vas/II/-ion./ A használatos összeállitás:

stöchiometrikus mennyiségü ferroiin-perklorát, ólom /IV/-oxid, 2 N kénsavas vizes közeg. Aromások, terpének, ciklóhexanon hidroxilálását és oxidációját mutatták ki vele /37/.

Ugyancsak aromás hidroxilációt végeztek el a Ti^{3+}-H_2O_2 rendszerben is. /58/. Ezen extrém savas pH-en müködő rendszerek nem hozhatók analógiába biológiai rendszerekkel. Ha azonban a Fenton rendszerben a vasat EDTA-val komplexbe viszik, akkor tetszőleges pH állitható be és a rendszer hidroxiláló készsége is nő. Ez az un. módositott Fenton-rendszer /58, 59/. Ujabban rámutattak arra, hogy a hidroxiláció minden autooxidábilis rendszerben bekövetkezik, a molekuláris oxigén felhasználásával /60/. Ilyen rendszerek: a Fe^{2+} /-difoszfát, Cu^{1+}, Ti^{3+}, Sn^{2+}, red. metilénkék /O_2.

A sugárforrások hatására lejátszódó folyamatok mechanizmusával sok közlemény foglalkozik. A folyamatok lényege az, hogy a sugárzás a vizes közegben különböző gyökök, ionok, atomok képződését váltja ki, amelyek az oldószerrel, az oldott molekulával és egymással láncreakcióba lépnek. /Keletkezik: OH, OH^-, H, HO_2 H_2, H_2O_2, e^-_{ag}./ A különböző sugárforrások ionizáló készsége eltérő, igy bizonyos különbségek a termékekben is adódnak.

Néhány gyökképző folyamat ferro iont tartalmazó közegben /61/: $e^-_{ag} + H^+ \rightarrow H$

$$H + O_2 \rightarrow HO_2$$

$$H^+ + Fe^{2+} + HO_2 \rightarrow Fe^{3+} + H_2O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$$

A Fenton-rendszer mechanizmusa hasonló a sugárzási reakciókhoz, amennyiben itt is gyökképződés játszódik le /62/. Pl.:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$$
$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + O_2H + H^+$$

A fenti rendszerek hidroxiláló hatásának lényege, hogy az aromás vegyületek ugyancsak gyökös formává reagálnak, majd az aril gyök és a hidroxil illetve perhidroxil gyök fenolt képez /63/:

$$C_6H_5\cdot + HO\cdot \rightarrow C_6H_5OH$$

Közben mellékreakciók is lejátszódnak /pl. diaril képződés stb./. A hidroxilációs termékek kialakulása ilyen formán a hidroxil gyök gyökös mechanizmusu aromás szubsztitucijának eredménye.

c/ Kémiai model rendszerek

Hatásukat enyhe, közel fiziológiás körülmények között kifejtő rendszereket soroljuk ide. Egyik legtöbbet vizsgált tipusa az un. Udenfried rendszer /31, 32/, amely ferroszulfátot, EDTA x 2 Na-t stöchiometrikus mennyiségü L-aszkorbinsavat tartalmaz pH 6-7-es foszfát pufferban. 37°C-on, oxigén atmoszférában való rázatás közben játszódik le a reakció.

Hasonló jellegü az un. Fenton-Cier-rendszer /64,/ amely ferroszulfátot, EDTA x 2 Na-ot, katalitikus mennyiségü L-aszkorbinsavat, H_2O_2-ot tartalmaz, foszfát pufferban, 37°C-on.

Az aszkorbinsavas rendszerek néhány jellemző vonása: Határozott, szubsztrát-függő pH optimumuk van, szerves oldószerek hatásukat gátolják, a H_2O_2 más oxidálószerekkel is helyettesithető /pl. MgO_2, $Ce/SO_4/_2$/, anaerob körülmények között nem hatnak, az EDTA és a vas is helyettesithető hasonló vegyületekkel, illetve fémmel. Az aszkorbinsavat is helyette-

sitheti más endiol vegyület /pl.dihidroximaleinsav/. A Fenton-Cior-rendszer kb. kétszer akkora hidroxilező készséget mutat, mint az Udenfriend rendszer. A következő tipusu folyamatokat mutatták ki a rendszerekben:

a/ aromások hidroxilálása fenollá vagy difenollá /31, 32/,

b/ az indolvázas vegyületek benzolgyürüjének hidroxilálódása /55/,

c/ prolin átalakulása hidroxi-prolinná /65/,

d/ szteroidok hidroxilálása /66-68/,

e/ demetilezés és deetilezés /29, 69/.

Egy másik analóg rendszer, amelyet a részletesen vizsgáltak az ugynevezett Hamilton rendszer, amely katalitikus mennyiségü ferri-perklorátot, katecholt, hidrogénperoxidot tartalmaz, acetát pufferban. Szobahőmérsékleten hat, anaerob körülmények között is müködik /70-72/.

d/ Szerv inkubátumok, mint hidroxiláló rendszerek

A hidroxilációs folyamatok elsődleges központja a máj általában. Szteroidok vonatkozásában a mellékvesének van még fontos szerepe. Mellett azonban szinte valamennyi szervben kimutattak különféle hidroxilációs folyamatokat, igy pl. lépben, placentában, tüdőben, vesében, bőrben stb..

Az in vitro rendszerekben perfundáltatott szerveket, szervhomogenizátumokat, szövetkivonatokat, vagy enzimeket használnak fel. /Megemlitem még az in vivo jellegü, de jól felhasználható mikróbákkal történő hidroxilációkat./ Az in vivo kisérletek megfelelő analogjai in vitro kialakitható.

A hidroxiláció mechanizmusát ma még nem ismerjük, bár ezen a területen ma is számos vizsgálatot végeznek. A vizsgá-

latok központi területe részint a máj mikroszomák hidroxilázainak, részint pedig a mellékvese mitochondriumainak szteroid-hidroxiláz vizsgálata. A mechanizmusok megismerését model rendszerek vizsgálatával is igyekeznek megközeliteni. E tekintetben jelentősek az aszkorbinsav tartalmú model rendszerek mechanizmusának megismerésére irányuló vizsgálatok.

Egyes korábbi elképzelések szerint ezen model rendszerekben is a hidroxil gyök a felelős a hidroxilációért, akár csak a Fenton rendszerben /32, 58/, és a szubsztitució elektrofil jellegü. Barron, majd Kaufman /30/ H_2O_2 keletkezését feltételezték. Pulman /1964/ HO_2 gyök jelenlétét tartotta valószinünek. A hidroxi-izomerek eloszlásának modern módszerekkel történő vizsgálata megállapitotta, hogy ezen rendszerek különböznek a Fenton rendszertől, amennyiben itt az izomerek eloszlása statisztikusabb és igy a támadó gyök nem lehet a hidroxil gyök. A H_2O_2-t mint ható tényezőt szintén ki kell zárni. Ugyancsak több tény ellent mond annak, hogy HO_2 gyök lenne jelen ezen rendszerekben. /60/.

A későbbi elképzelések szerint az ilyen jellegü folyamatokban komplexek képzésével kell számolni, amelyek az aktiv gyök forrásai. Igy feltételezték, hogy kelátképző anyag - Fe^{2+}-O_2 komplex /29, 69/ jön létre, mások szerint aszkorbinsav-H_2O_2 komplex is képződhet. /73/. Hamilton és mts. /70-72/ véleménye szerint a katechol-ferri ion-H_2O_2 komplex képződik és ez mint gyökös ágens támadja a szubsztrátot. Ugyancsak egy terner vas-aszkorbinsav-oxigén képződéssel kell számolni szerintük az Udenfriend rendszerben /74, 75/. A Fenton-Cier rendszerben Norman és Radda szerint /76/ OH gyök képződik, tehát a Fenton

rendszerhez hasonlóan viselkedik.

A hidroxiláz enzimek működésének mechanizmusát leginkább az Udenfriend rendszer közeliti meg, ezért még az ujabb vizsgálatok is foglalkoznak ezzel. Ullbrich és Staudinger /60/ megállapitották, hogy a nem aszkorbinsav tartalmi autooxidabilis rendszerek is képesek hidroxilálni a molekuláris oxigén felhasználásával aromásokat. Az itt talált izomer eloszlási arány bizonyos hőmérsékleten azonos volt a OH gyök által mutatott elektrofil jellegü eloszlással, más hőmérsékleten viszont közel statisztikus volt az eloszlás. Ez azt mutatja, hogy itt egy bizonyos második hidroxiláló mechanizmus létezésével is számolni kell.

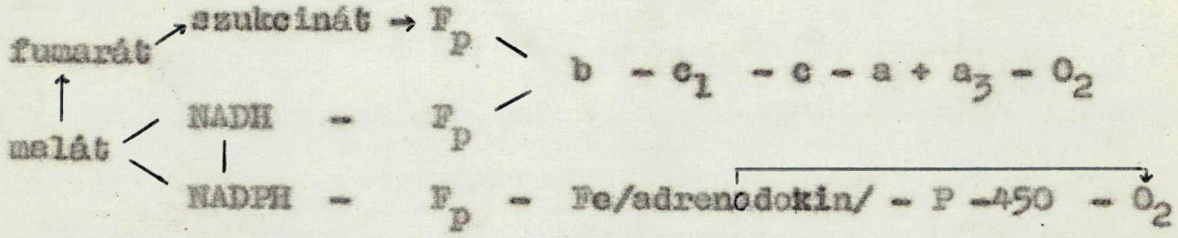
Ezen kisérletek szerint minden aerob hidroxiláló rendszer ugyanolyan termék eloszlást ad, függetlenül attól, hogy milyen fém ion és komplex képző ágens van benne. Hamilton elképzeléseivel szemben megállapitható, hogy az endiol nem szükséges a hidroxiláló ágens képzéséhez. Az előbbi általános jellegből következik az is, hogy nem a vas-oxigén illetve általában nem a fém-oxigén komplex jelenti az aktiv oxigént, mint azt Norman és mts. gondolták /77/. Ullrich és Staudinger /60/ szerint ezen rendszerek, amelyek O_2H-t és redukáló ágenst tartalmaznak közös mechanizmussal működnek. Véleményük szerint a hidroxilációért az oxigén atom a felelős, amely a O_2H-ból képződik:

$$O_2H + \frac{1}{2} H_2 \rightarrow O + H_2O \qquad F = -3{,}1 \text{ Kcal}$$

gyengén exergonos reakcióban. Célszerüen az "oxen-hidroxiláció" elnevezést javasolták. A O_2H gyökök könnyen diszproporcionálódnak molekuláris oxigénné és H_2O_2-á. Véleményük szerint a vas és más fém komplexek szerepe az O_2H gyökök stabilizálásában

mutatkozik meg, amivel az atomos oxigén képződést elősegitik /78/. Ezt az elképzelésüket a mikroszomális hidroxilázokra is alkalmazták. A kevert müködésü oxidázok mechanizmusa megismerésének másik vizsgálati területe az, hogy in vitro biológiai rendszerekben kutatják azokat a komponenseket, amelyek felelősek a hidroxilációért. Ezen hidroxilázok a máj mikroszomában és a mellékvese mitochondriumban kapcsolatban vannak a lipoprotein membránnal, amelyben különböző redox komponensek is találhatók.

A mellékvesében elsősorban a 11β-hidroxilázokat vizsgálják. Megállapitották, hogy ez legalább 3 komponensből álló multienzim. A jelenlegi álláspont szerint a mitochondriumokban két elektron transzport rendszer van: a/ a hagyományos energia termelő rendszer, b/ a szteroid hidroxilálás elektron transzport rendszere.



Ilyen formán a hidroxilációban a következő komponensek játszanak szerepet: NADPH koenzim, adrenodoxin reduktáz /flavoprotein/, adrenodoxin /nem-hem protein/, citochrom P450, molekuláris oxigén. Valószinü, hogy ezen kivül még járulékos enzimek katalizálják az aktiv oxigén beépülését az egyes szteroidokba.

A komponensek néhány adata. Az adrenodoxint 1965-ben izolálták /80/. Az adrenodoxin-reduktáz NADPH specifikus. A P450 hemproteint 1964-ben irták le /81/. Instabil, könnyen az inak-

tiv P420 formává alakul. A P450-nek két formája van, amelyek oxigén iránti affinitása eltérő /82/.

Bár a végső mechanizmust még nem tisztázták, feltételezik, hogy a szteroid-szubsztrát az oxidált P450-hez kötődik. A terner komplex a hidroxilációs termékké bomlik le. Ennek a feltételezett mechanizmusnak egyezésben kell lenni a bizonyitott stöchiometrikus egyenlettel:

$$S + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow SO + NADP^+ + H_2O$$

A májban lévő hidroxilázok szintén ilyen elektrontranszport segitségével működnek. Valószinü azonban, hogy a májban egyszerübb elektrontranszport folyamatok játszódnak le /83/.

Ullrich és Staudinger az emlitett "oxen-hidroxilációs mechanizmust" alkalmazta ezen enzimes folyamatokra. Ismert azonban, hogy a máj hidroxilázok elektrofil jellegü hidroxilezést végeznek /84/, mig a model rendszerek statisztikusan hidroxilálnak. Ennek ellenére a két rendszer analog, a következő meggondolással.

A P450 ferri ionjához csatlakozó molekuláris oxigén az ugynevezett III. komplexet adja /85/. Ez redukálódik NADPH révén. Itt az oxen mechanizmus analogiájára ugynevezett oxen komplex képződik, amely ugy tevékenykedhet, mint az oxigén atom, de elektron eloszlása révén mono-gyökként viselkedik és elektrofil sajátságokkal bir.

$$\left[Fe^{2+}_{cit}\, O_2 \longleftrightarrow Fe^{3+}_{cit}\, O_2^- \right]$$

komplex III.

$$+ e \quad -OH^-$$
$$+H^+$$

$$\left[Fe^{3+}_{cit} \cdot \underline{\bar{O}} \cdot \longleftrightarrow Fe^{4+}_{cit}\, |\underline{\bar{O}}\cdot \longleftrightarrow Fe^{5+}_{cit}\, |\underline{\bar{O}}| \right]$$

Az aszkorbinsav tartalmu model rendszerek vizsgálatát az emlitetteken kivül az is sugallja, hogy az aszkorbinsav bizonyitottan kapcsolatban van a szteroid biosszintézissel. Pontos szerepét még nem ismerik. Egyes korábbi eredmények szerint a NAD és NADP közti elektronátmenetben játszik szerepet, miközben dehidroaszkorbinsavvá oxidálódik a cit b_5 közreműködésével/86, 87/. Minden esetre várható, hogy redox sajátságai révén közvetett, vagy közvetlen kapcsolatba kerül a fenti hidroxilációs folyamatokkal.

3/ Szteroid-szulfátok

A szteránvázas vegyületek vizes közegü reakcióinak vizsgálata során célszerünek látszott, ha különböző oldódást segitő anyagok használata helyett vizoldékony származékot használok fel szubsztrátként. Legmegfelelőbbnek a szteroid alkoholok szulfát észtereinek felhasználása kinálkozott. A következőkben röviden ismertetem ennek a területnek az irodalmát, mivel az utóbbi évek biokémiai vizsgálatainak egyik lényegos részét képezik, és kisérletünkben több szempontból is vizsgáltuk ezeket a vegyületeket.

a/ A szteroid-szulfátok előfordulása az élő szervezetben és biológiai jelentőségük

Számos közlemény foglalkozik a szteroid konjugátok biológiai jelentőségének tisztázásával, azonban végleges álláspont még nem alakult ki. Főként a hormonhatású vegyületek vizsgálata intenziv.

Az élő szervezetben kimutatott szteroid származékok: szulfátok, foszfátok, glükuronidok, amelyek közül csak a szulfátokkal foglalkozom.

A szteroid szulfátok Na és K só formájában találhatók meg, részben fehérjékhez kötve. Eleinte a májnak tulajdonitottak kizárólagosan szulfátképző szerepet, főként állatkisérletek kapcsán /93, 94/. Igazolták azonban, hogy a dehidroepiandroszteron /DEA/-szulfátot a mellékvesekéreg szekretálja /89, 90, 92/ naponta 5-30 mg mennyiségben az emberben /88/. A kisérleteket részben betegek mirigyeivel folytatták. A pregn-4-en sorozat szulfátjait ugyancsak a mellékvese készíti,amint az emberi embrionál és ujszülöttön igazolták/pl.91/.

A szteroid-szulfátok a vérbe jutva a szervezet különböző helyeire jutnak el, majd a vizelettel ürülnek ki. Egyes szteroidoknál, pl. a DEA-nál a szulfát tulsulyban van a szabad szteroiddal szemben /95/, mig más esetben /pl.kortizol/ a szabad forma dominál /12-21 % szulfát/ /96/ a vérben.

Korábban pusztán végtermékeknek tekintették a szulfátokat,amelyek a vizeletbe exkretálódnak. Számos kisérlet igazolta azonban, hogy aktivan részt vesznek az in vivo átalakulási folyamatokban. Néhány példa: a placenta in vitro a DEA-szulfátot ösztronná, ösztradiollá, ösztriollá transzformálja /97/. A placenta képes hasitani is a szulfátot, miközben szabad DEA keletkezik /98/. A nyúl ováriumban in vitro a DEA-szulfát átalakul androszten-diol-3-szulfáttá, tesztoszteronná, Δ^4-androszten-dionná és 3β-hidroxi-5α-telitett szteroiddá /99/. A pregnenolon-szulfát DEA-szulfáttá alakul mellékvesében /101/. A vérplazma és a vizelet 17-hidroxi-kortikoid-szulfát szintje változik a diurnális ritmussal /9/.

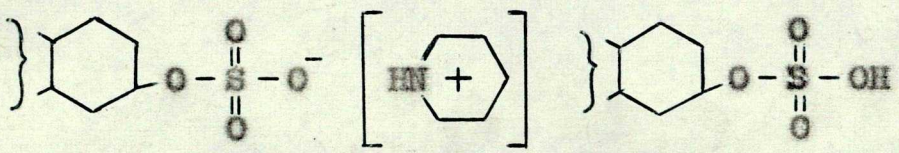
Feltételezték, hogy a szabad szteroidoknál nagyobb vizoldékonyságú szerepet játszhat az exkretorikus mechanizmusban,

azonban például a 17-ketoszteroidok szabadon is elég oldékonyak ahhoz, hogy az össz szteroid szintet a vizeletben létrehozzák. Valószinübb, hogy a membránokon való transzfer folyamatokban a polárosabb szulfátoknak szerepe van /100/.

A szteroid-szulfátok in vivo keletkezését illetően elfogadott, hogy az enzimatikus folyamatokban az aktiv szulfát forrás az adenozin-3'-foszfát-5'-foszfoszulfát /102/. A szulfokináz a foszfokinázhoz hasonlóan hat, amely utóbbi ATP-t használ fel. Az enzimet nyúl májból izolálták, amely több elkülöníthető komponensü /fenol-illetve DEA-szulfokináz/. Mások rámutatnak arra, hogy az aszkorbinsav-3-szulfát észtere is szerepelhet szulfatáló ágensként, ezt androszteron-szulfát szintézisnél in vitro igazolják is/103/. Ez a kisérleti tény összhangban van az aszkorbinsavnak a szteroid biogenezisben betöltött szerepével, ami még ugyancsak tisztázatlan részben.

b/ A szteroid-szulfátok készitése és analizise

A szteroid-szulfátok a szteroidok hidroxil csoportjának kénsavval adott észterei. A szteránváz bármely szénatomján vagy oldalcsoportján található hidroxilcsoport képezhet szulfát észtert, a különböző hidroxilok affinitása azonban eltérő. A szteroid-hidrogén-szulfátok nem stabil vegyületek, tisztán még nem állitották elő, ezért különböző sók formájában történik a vizsgálatuk, általában a K, Na, ammonium, piridinium só használatos.



szteroid-szulfát-piridinium só szteroid-hidrogén-szulfát

A szulfát sók fehér kristályok, amelyek általában jól oldódnak metanolban, etanolban, butanolban, etilacetátban, vizben,

nem oldódnak éterben, metilénkloridban. Átkristályositásuk leggyakrabban/K, Na sóknál/ metanol-éter elegyből történik.

Készitésüknek több módja ismeretes: a/ a szteroidot piridines közegben reagáltatják piridinium-szulfáttal és ecetsavanhidriddel. A kapott szulfát-piridinium sót Na sóvá alakitják, majd a szulfátot butanollal extrahálják /104/.

b/ A szteroid dimetilformamidos oldatához diciklóhexilkarbodiimidet és dimetilformamidban oldott kénsavat adnak. A terméket dietilaminoetil-cellulóz oszlopon tisztitják /105/.

c/ A szteroid alkoholt trietilamin-kéntrioxiddal reagáltatva a szulfát észter trietil-ammónium sóját kapják /106/.

d/ A legáltalánosabban használt eljárás alapja az, hogy a szteroid alkoholok a piridinium-kéntrioxiddal szteroid-szulfát-piridinium só képződése közben reagálnak /107/. /A piridinium-kéntrioxid a piridin és a klórszulfonsav reakciójából keletkezik./ A reakció általában piridines közegben, szobahőn játszódik le /108-111/, vagy benzolos közegben 56-60°C-on /107/. A piridinium sót petroléterrel kicsapják és a megfelelő sóvá átalakitják, de lehetséges a külön elválasztás nélküli piridinium só - nátrium só átalakitás is /108/.

Minthogy a különböző helyzetü hidroxilok reakció készsége eltérő, valamely több hidroxilt tartalmazó szteroidnál a mono-, di-, triszulfát származékok aránya eltérő. Például tetrahidrokortizol esetében a d/ szerinti eljárásban 18 % a 3-szulfát, 79 % a 3, 21-diszulfát és 3 % a 3, 17, 21-triszulfát képződési aránya /108/. A reakció körülmények megválasztásával az egyik szulfát képződése kizárólagossá tehető. Például a diciklohexilkarbodiimid-mediált szulfációnál a reagensek koncentrációjának

megfelelő megválasztásával elérhető, hogy az ösztradiolnál csak a fenolos szulfatálás, vagy csak az alkil-hidroxil szulfatálás játszódik le /105/. A nem kívánatos észtereződést a hidroxil csoport védésével is elérhetjük, pl. az ösztradiolnál benzoát képződés révén, amit a reakció végén eltávolitunk /111/.

A szulfát észterek sóinak kation cseréjére több lehetőség van. 1/ telitett Na_2SO_4 oldatba vitt szteroid-szulfát-piridinium sók pH 7-8-n néhány óra alatt Na sóvá alakulnak. /A kicserélődés heterogén fázisu, egyik só sem oldódik az oldatban./ /109/. 2/ A piridinium sót 10 %-os sóoldatban szuszpendálják. Sok sóoldatot kipróbáltak például K_2CO_3, $MgCl_2$, NaCl, $BaCl_2$, $FeCl_3$, $AgNO_3$, $Pb/OAc/_2$, $Hg/OAc/_2$ stb.. A megfelelő kationok sói az oldat felszinén, vagy alján kiválnak /107/. 3/ A kation-csere ioncserélő gyanta segitségével is megoldható pl. Dowex 50 Na forma oszlopon /105/.

A szteroid-szulfátok vizes közegből való extrakciójára több eljárást dolgoztak ki, e tekintetben eltérés adódik a különböző polaritásu vegyületek esetében.

A korábban használt módszer szerint savanyitott vizes oldatból folyamatos éteres extrakcióval nyerték ki a szulfátokat /112, 113/. Az androgén-szulfát-Na, vagy K sók esetében az etilacetát is megfelelő extrahálónak bizonyult, az oldatot 2N kénsav szintre savanyitják, vagy 3M-s NaCl koncentrációju és 0,1 N kénsav tartalmu azoldat /114/. Kortikoszteroid-szulfátoknál a legjobb módszerek: a vizes fázist pH 1-re savanyitják és telitik ammónium szulfáttal, majd egyszeri extrakciót végeznek n-butanollal, vagy etanol:éter /1:3/ eloggyel, vagy etilacetáttal /115,116/. Az ilyen tipusu extrakció az ugynevezett erőltetett

extrakció. Az extrakció során szteroid-hidrogén-szulfátok extrahálódnak, amelyek labilisak, ezért a bepárlásnál piridint adunk, hogy piridinium só képződjék. A 17-oxo-szteroidok vizeletből, vagy plazmából oly módon extrahálhatók, hogy piridinium-szulfát adásával a szulfát sókat piridinium sóvá alakitjuk, majd kloroformal extraháljuk /80-100 %-osan//95, 117/. További lehetőség a festékekkel adott komplex formába való extrahálás,igy metilzölddel /118/ és metilénkékkel /119/. Az extrakció a szulfát jégecetben bekövetkezett acettáttá való transzeszterifikált termékének éteres extrakciójával is megoldható /118/.

A szteroid-szulfát-észtereket az analitikai vizsgálatokhoz hidrolizálni kell. Alapvetően két megoldás van, enzimes és nem enzimes jellegü.

Az enzimatikus hidrolizis főként Mollusca-k enzimeivel végezhető el. Négy féle szulfatáz enzim van a puhatestüekben,ugymind: aril-, glüko-, chondro-, szteroid-szulfatáz. A Pattella vulgata enzimeit Roy vizsgálta részletesen /119/. Az itt található szteroid szulfatáz specifikus az 5α és Δ^5 sorozatú szteroid 3β-szulfátjaira, ezért nem használhatók általánosságban. Az aril-szulfatáz a kortizon-szulfátot is képes hidrolizálni. Emlősökből is izoláltak szteroid-szulfatázt. A patkány here szövetben kimutatott enzim legkönnyebben a pregnenolon-szulfátot hasitja, de még több szteroidot is hasit /120/.

A nem enzimes hidrolizisnek számos formája ismert, amelyek gyakran az extrahálással összefüggőek. A biológiai anyagok izolálása és hidrolizise a 3β- hidroxi-17-ketoszteroidok esetében a savanyitott vizes oldat kimerítő folytonos éteres extrakciója révén megoldható /121, 122/. A szulfátok vizes oldatban

szobahőn nem hidrolizálnak mérhető sebességgel még akkor sem, ha az oldat pH-ja erősen savas. Melegités hatására a vizes oldatban hidrolizis játszódik le, ilyenkor azonban mellékterméket is képződnek /123/. Feltünően jó hidroxiláló közegnek bizonyult a dioxán, amelyet először fenolos szteroid-szulfátokra irtak le, /124/, majd más szteroidokra is kiterjesztették az eljárást. /125/. Fokozott hidrolizist észleltek, ha 1,4 dioxán-triklórecetsavat alkalmaztak oldószerként /125/.

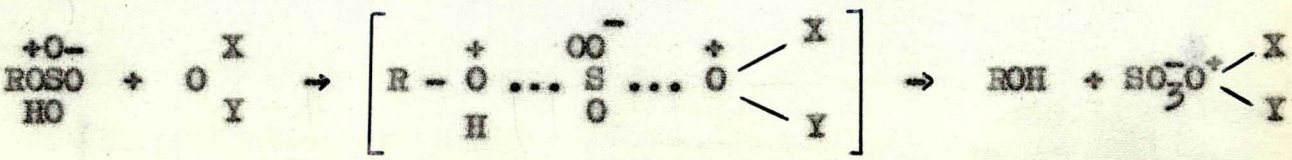
Néhány tanulmány foglalkozik a hidrolizis mechanizmusával /126, 127/. Általánosságban megállapitható, hogy a szolvolizis a szerves fázisban megy végbe, nem pedig a vizes fázisban, ugyanakkor azonban az alkalmazott szerves fázis mindig tartalmazott egy kevés vizet. A hidrolizis sebessége függ a szulfát szerves fázisba való átextrahálásának sebességétől és az ott folyó szolvolizis sebességétől. A szolvolizis során ekvivalens mennyiségü sav szabadult fel /pl. K só esetében $KHSO_4$/.

A hidrolizis sebességét erősen befolyásolja a szolvens ionizáló ereje. A kevésbbé poláros közegben gyorsabb a sebesség, ami egészen különleges a szokásos reakciókhoz képest. Az erősen poláros oldószerekben, pl. viz, gyakorlatilag nincs is hidrolizis. Az etanol-benzol /1:9/ elegy 16 x gyorsabb hidrolizist okoz, mint a tiszta etanol. A jelenséget a dielektromos állandó változása alapján nem lehet kielégitően megmagyarázni. A döntő fontosságú a hidrolizis sebességét illetően az éterek rendelkezésre álló magányos elektronjainak a száma. A valószinü mechanizmus szerint a hidrolitikus reagens támadása a központi kén atomon történik, amint ezt hasonló esetekben is igazoltak/pl. alkil- hidrogén-szulfátok, ciklikus-szulfitek stb./. A III.-os dipoláris ion a

reaktiv forma, amely a nukleofil XOY-al reagál. Ez utóbbi természete még nem tisztázott /víz, alkohol, vagy éter lehet/. Minden olyan hatás, amely az /1/ egyenletet jobbra tolja el, növeli a hidrolizis sebességét. Ilyen hatású az oldószer polaritásának csökkenése is éterek esetében.

$$ROSO_3^- + H^+ \rightleftharpoons ROSO_3H \rightleftharpoons \underset{H}{RO^+}SO_3^- \qquad /1/$$

I. szolvatált ion II.nem szolvatált ion III.reaktiv ágens



A gyakorlatban jól használható kvantitativ és gyors hirdolizist kapunk a 17-keto-szteroidoknál, ha 2 N kénsav tartalmú oldatból etilacetáttal kirázzuk a szteroid-hidrogén-szulfátot, majd ehhez vízzel telitett étert adunk /114/. Kortikoszteroidoknál az extrahálás hatékonyságának növelése érdekében a korábban említett módosításra van szükség /115, 116/. A hidrolizis szobahőn 18 óra alatt végbemegy, melléktermékek képződése nélkül.

Az extrahált szteroid-szulfátok egymástól való elválasztására több módszer kínálkozik. Az elválasztás megoldható vékony-réteg-kromatográfiával, szilikagélen /pl. 103, 128/, papirkromatográfiával /128, 129, 130/, papirelektroforézissel /118, 131/, oszlopkromatográfiával /Celite oszlopon /132/, DEAE-Sephadex oszlopon /133, 134/, aluminiumon /118/, szilikagélen /119/, florisilen /113//. Ezekkel a módszerekkel megoldható a mono-és diszulfátok elválasztása, valamint a szulfátok elválasztása a glükuronidoktól.

A szulfátok kvalitativ és kvantitativ meghatározására

alapvetően két megoldás lehetséges: a/ a szulfátokat hidrolizáljuk, majd a szabad szteroidokat a szokásos módon mérjük, b/ magát a szulfát konjugátot mérjük. Általánosságban mielőtt a szulfátokat valamely biológiai közegből extrahálnánk, szükséges, hogy eltávolitsuk a szabad szteroidokat. Ezt előzetes metilénkloridos, illetve éteres extrakcióval végezzük el a szokásosan vizsgált kortikoidok, illetve 17-ketoszteroidok esetében.

A szteroid-szulfátok vizsgálatának egyik módja az, hogy felhasználjuk azokat a reagenseket, amelyeket a szabad szteroidokra használnak. Ezek akkor használhatók fel természetesen, ha a reagens-specifikus csoport nincs szulfát észter formában. Ilyen eljárások: 17-ketoszteroidok kvantitative mérhetőka Zimmermann reakcióval /135/ illetve módositott formájával /136, 139, 113/, ahol dinitrobenzol a reagens. A 17, 21-dihidroxi-20-ketoszteroidoknál a Porter-Silber által /137/ kidolgozott kénsavas fenilhidrazin reagens használható kvantitativ mérésre, illetve ennek módositásai /115, 138/. Kromatográfiás előhivó szerként használható még a tettrazoliumkék, a redukáló hidroxil csoport jelenlétében /131/. Általánosan felhasználható a foszformolibdén sav /131/, UV fény. Fenolos szteroidokra pedig a Barton-reakció /141/.

A hidrolizis után felszabaduló szulfát ionok kimutatására a bárium-rodizonát tesztet használjuk /142/

Az irodalom mindössze két eljárást ismer, amely specifikus a szteroid-szulfátokra. Eberlein módszerének /118/ az az alapelve, hogy a vizes oldatban lévő szteroid-szulfátok a metilzölddel, kloroformmal extrahálható komplexet képeznek, amelyet bepárolnak, majd jégecetben perklórsav nyomok jelenlétében melegitik.

A reakció eredménye a szteroid-szulfát átészteresődése a megfelelő szteroid-acetáttá. Ezt a szteroid-acetátot mérik a szokásos reagensekkel /pl.Oertel, Eik-Nes vagy Zimmermann reagens/. Minthogy csak a szteroid-szulfátok extrahálódtak, a módszer a szulfátokra specifikus. Meg kell azonban jegyezni, hogy az eljárás igen hosszadalmas, ezért nem is terjedt el általánosan.

A másik gyakrabban használt direkt szulfát vizsgálati eljárás a Roy által kidolgozott módszer /119/, amely Vlitos /143/ aromás szulfátokra kidolgozott módszerén alapul. Az eljárás lényege az, hogy a szteroid-szulfát vizes oldatához metilénkék reagenst adnak, majd extrahálják kloroformmal, etanolt adnak hozzá és a kapott kék szín intenzitását mérik 700 nm-nél. A módszert 3-hidroxi-17-ketoszteroidokon használták fel és papirkromatográfiás kvantitativ mérésre is felhasználták /95/. A módszer γ-nyi szteroid-szulfát mérésére is felhasználható.

II. KISÉRLETI RÉSZ

A/ Anyagok

Amennyiben külön utalás nem történik, a felhasznált oldószerek és más anyagok "a. l. t. Reanal" minőségüek voltak. Kromatográfiás adszorbensek: Kieselgel G nach Stahl /Merck/, Szilikagél G /Reanal/.

Az összehasonlító anyagok egy részét magam szintetizáltam.

A felhasznált készülék tipusok: Unicam SP200 infravörös automata spektrofotométer, Unicam SP800B ultraibolya automata spektrofométer, Spektromom 201 spektrofotométer, Spektromom 360 spektrofotométer, "Desaga" tipusu kromatográfiás rétegező készülék.

IGV tipusu ultraibolya lámpa. /A mérésekhez 1 ml-es üveg és kvarc küvettákat használtam./

B/ A hidroxiláló rendszerek összeállitása

a/ Fizikai hidroxiláló rendszerek

UV besugárzási vizsgálatok:

α/ Szubsztrát vizes oldata.

β/ 100 ml deszt.viz, 1,0 mMol $FeCl_3$, 1,0 mMol szubsztrát /pH 6,0/.

γ/ 100 ml deszt.viz, 1,0 mMol $FeCl_3$, 1,0 mMol EDTA x 2 Na, 1,0 mMol szubsztrát /pH 7,0, NaOH-val beállitva/.

δ/ 100 ml deszt.viz, 0,2 mMol H_2O_2, 1,0 mMol szubsztrát.

A besugárzásokat nyitott edényben végeztem, a lámpától 15 cm-re, az oldatok 39°C-ra melegedtek fel. Általában 24 órás besugárzást használtam. A β és δ összeállitásu rendszerek irodalmiak /49,51/, a γ összeállitást a pH szabad beállitása miatt készitettem.

b/ Kémiai hidroxiláló rendszerek

α/ Fenton rendszer: 100 ml 0,4 N kénsav 3 mMol $FeSO_4x7H_2O$, 6 mMol H_2O_2, 3 mMol szubsztrát. 30-60 perc.

β/ Módositott Fenton rendszer: 100 ml 0,1 M foszfát puffer pH 7,2, 1,0 mMol $FeSO_4x7H_2O$, 1,0 mMol EDTAx2Na, 2,0 mMol H_2O_2, 2 mMol szubsztrát, 30-60 perc.

γ/ Fenton-Cier rendszer: 100 ml 0,1 M foszfát puffer pH 7,2, 1,0 mMol $FeSO_4x7H_2O$, 1,0 mMol EDTAx2Na, 0,5 mMol L-aszkorbinsav, 2,0 mMol H_2O_2, 2,0 mMol szubsztrát 15-30 perc.

δ/ Udenfriend rendszer: 100 ml 0,1 M foszfát puffer pH 6,7, 0,5 mMol $FeSO_4x7H_2O$, 2,6 mMol EDTAx2Na, 5,6 mMol L-aszkorbinsav, 2,0 mMol szubsztrát. Levegő atmoszférában rázatva.

A b/ reakciók szobahőmérsékleten vagy 37°C-on játszódtak le. A megfelelő kontrol kisérleteket mindig elvégeztem a ható reagensek kihagyásával.

A Fenton- és a módositott Fenton rendszerek összeállitása az irodalmi rendszerek /58, 59/ célnak megfelelő módositásával történt. Az Udenfriend- és Fenton-Cier rendszerek az irodalmi összeállitásnak megfelelnek /31, 32/.

A reakciók általános kivitelezése: A megadott összeállitású rendszerekben a jelölt ideig végbement reakció után az anyagokat izoláltam. A H_2O_2 tartalmú rendszereket szürtem. Szükség esetén a pH-t az extrakciónak megfelelő értékre állitottam, majd szerves oldószerrel extraháltam a termékeket. Az extraktumot szárító anyagon száritottam, majd bepároltam vakuumban, N_2 atmoszférában.

c/ Mellékvese inkubátumok

Friss marha mellékvesét használtam, amelyet felhasználásig

jégen hütöttem. Pengével vékony szeletekre vágtam, majd Krebs-Ringer foszfát pufferba helyeztem a szeleteket.

Mitokondrium és mikroszoma frakciók elkülönitését differenciált centrifugálással végeztem el Sweat módszere alapján /144/. A 30 g mellékveséből nyert mitokondrium és mikroszoma frakciókat 100 ml Krebs-Ringer foszfát pufferban /pH 7,2/ szuszpendáltam. Ezt használtam fel a kisérletekhez.

Az aszkorbinsav oxidázt Tauber /145/ szerint preparáltam. A NADH koncentrációt a 340 nm-nél mért abszorpció alapján határoztam meg /146/.

Az inkubátumok összetétele:

a/ 10 g mellékvese szelet, $2x10^{-2}$ M szubsztrát, 10^{-2} M K-fumarát, 100 ml Krebs-Ringer foszfát puffer, pH 7,0.

b/ Mint a/ és $1,5x10^{-2}$ M L-aszkorbinsav.

c/ 10 g mellékvese szelet, 10^{-4} M szubsztrát, 10^{-3} M K-fumarát, 10^{-3} M L-aszkorbinsav, 0,001 g aszkorbinsav-oxidáz, $2x10^{-5}$ M NADH.

d/ A b/ és c/ szerinti összeállitás, de a mellékvese szelet helyett 10 ml mitokondrium, vagy mikroszoma szuszpenzió adása.

Az inkubálásokat 37°C-on végeztem el, állandó O_2 átbuborékoltatás közepette. Reakció idő 5 óra. Az inkubálás után 20 ml 10 %-os triklór-ecetsavval a fehérjéket kicsaptam. Az oldatot szürtem. A szürletet extraháltam.

A termékek azonositása: az extrahált termékeket kromatográfiásan választottam szét. Felhasználtam papirkromatográfiát, vékonyréteg kromatográfiát /normál lapok és tárgylemezes mikrolapok/, preparativ vastagréteg kromatográfiát /1 ml-es adszor-

bens vastagság /.

Az azonositást összehasonlitó vegyülettel való párhuzamos futtatással végeztem el általában 3 különböző kromatográfiás rendszerben. Egy vegyületet több féle előhivó reagenssel megvizsgáltam. További azonositási módszerek: op. mérés, infravörös és ultraibolya spektroszkopia.

Az egyes vegyületekre vonatkozóan a kisérletek kivitelezésében, az elválasztásban és az azonositásban különféle eljárásokat használtam. A vegyületenként részletezett adatok a később idézendő közleményeinkben találhatók meg.

C/ Összehasonlitó anyagok szintézise

Több vegyület nem állt rendelkezésünkre, ezért ezeket magam állitottam elő.

1/ 4-hidroxi-antranilsav készitése

A korábbi eljárások /147, 148/ felhasználásával a következő uton készitettem el /itt, mint melléktermék keletkezik a 4-amino-2-hidroxi-benzoesav mellett/:

40 g m-amino-fenolt és 160 g ammoniumkarbonátot oldottam 200 ml vizben. 12 órán át 110°C-on autoklávozás. A kivált kristályt szürjük. A szürlet pH-ját 3,2-re állitjuk. 30 g csapadék válik ki. Ezt 100 ml 2N sósavval 2 óráig rázatjuk, szürjük. A szürletet 3x200 ml éterrel extraháljuk, majd az extraktumot bepároljuk. A maradékot 2N sósavban oldjuk, két óráig rázatjuk. A pH-t 3,2-re állitjuk. Éterrel kirázzuk, az extraktumot bepároljuk. 10 mg kristályos anyagot kapunk, ez a 4-hidroxi-antranilsav. Op.: 161°C.

2/ A 4-hidroxi-ösztront az irodalmi eljárás szerint állitottam elő /149,150/, majd ennek analógiájára szintetizáltam 2-hidroxi-ösz-

ront és 2,4- dihidroxi-ösztront.

3/ Hidroxi-etilgramin izomerek készitése /152/

A módszer alapja az, hogy az indol preparative hidroxilálható a benzolgyürün /55/. A továbbiakban a hidroxi-indolból kiindulva szintetizálható a megfelelő hidroxi-etilgramin. A szintézis egyes lépéseinek kidolgozásánál felhasználtam a más, hasonló tipusu vegyületeknél alkalmazott módszereket /155, 156/.

Hidroxi-indol készités: 6 g indolból Eich és Rochelmeyer módszere alapján /55/ a Fenton-Cier rendszerben elkészitjük a 4-, 5-, 6- és 7- hidroxi-indolok keverékét. Kitermelés: 1,5 g izomer keverék.

2/ Acetoxi-indol készités: a fenti termék indolt, és 4-, 5-, 6- és 7- hidroxi-indolokat tartalmaz. Az 1,5 g keverékmt 150 ml ecetsavanhidrid-piridin /25:30/ elegyben oldottam. 5 óráig szobahőn állni hagyjuk. Vakuumban bepároljuk. 1,4 g anyagot kapunk.

3/ Acetoxi-etilgramin készités/Mannich kondenzációval/: a fenti termék indolt és acetoxi-indol izomereket tartalmaz. 1,4 g anyagot 10 ml dioxánban oldunk. Ezt jeges hütés közben 6 ml dioxán, 6 ml jégecet, 0,825 ml 37 %-os formaldehid, 2,7 ml dietilamin elegyébe csepegtetjük 15 perc alatt. 2 órás hütés után szobahőre hagyjuk felmelegedni. Egy napig állni hagyjuk. 80 ml vizet adunk hozzá, barna csapadék válik ki az elegyből. Kitermelés: 0,250 g. Az igy kivált csapadék az acetoxi-etilgraminok keveréke /kromatográfiásan egységes/. Az oldatot meglugositjuk, ekkor az etilgramin kiválik.

4/ Hidroxi-etilgramin készités: A fenti 0,250 g acetoxi-etilgramint 7 ml ammoniás metanolban oldjuk, hütés közben. Egy napig hütőszekrényben állni hagyjuk. Bepároljuk az oldatot. Éterben

felvesszük a hidroxi-etilgramin izomereket, majd bepároljuk az oldatot. 0.150 g anyagot kapunk. Ezt vastag-réteg kromatográfiásan elválasztjuk propanol:etilacetát:konc. NH_4OH /5:3:2/ elegyben, szilikagélen. Az anyagokat éterrel eluáljuk az adszorbensről. Op.-ok: 4-hidroxi-etilgramin 150°C, 5-hidroxi-etilgramin 168°C, 6-hidroxi-etilgramin 133°C, 7-hidroxi-etilgramin 108°C.

/Egy másik lehetőség, hogy az acetoxi-indol izomerekot Kieselgel Woelm 1 oszlopon metilénklorid-benzol eleggyel szétválasztjuk, majd külön-külön végezzük el a szintézist./

D/ A szteroidok szulfát észtereinek készitése

Három különféle alapvázú szteroid monoszulfátját készitettem el. Az irodalomban le van irva ezek közül a dehidroepiandrosszteron /DEA/, az ösztron és a kortizol szulfát észtere, ezenkivül elkészitettem a még le nem irt Reichstein S vegyület szulfát észterét. Az elméleti részben emlitett eljárások egyes lépéseit felhasználtam, igy a következő fontosabb lépéseket alkalmaztam: A piridin + klórszulfonsav reakció elegyéhez adtam a szteroid piridines oldatát, a szulfatálás szobahőn ment végbe; a piridinium sót petroléterrel kicsaptam és kloroformos oldással a piridinium-kéntrioxidtól megtisztitottam. A nátrium sóvá történő átalakitást telitett Na_2SO_4 oldatban végeztem el. Az átkristályositás metanol:éter elegyből történt. Ilyen formán lehetséges volt a szulfát-piridinium só, valamint a szulfát-Na só külön-külön való előállitása. Bizonyos oldékonysági különbségek miatt az egyes szteroid tipusoknál kisebb változtatásokra volt szükség az egyébként egységesen használható eljárásban.

Dehidroepiandroszteron-3-szulfát készitése

Piridinium só: 5 ml száraz piridinbe jeges hütés közben 0,3 ml klórszulfonsavat csepegtetünk. A keletkezett piridinium-kéntrioxidhoz öntünk 20 ml piridinben oldott DEA oldatot. 45 percig szobahőn állni hagyjuk az elegyet, időnként rázogatjuk. Ezután kb. 30 ml petroléterrel jeges hütés közben kicsapjuk a DEA-szulfát-piridinium sót./A kristályos formában történő kiválást előzetesen adott 10 ml kloroformmal elősegithetjük./ A csapadékot G-4-es szürőn szürjük, majd a piridinium sót 20 ml kloroformban oldjuk, hogy a nem oldodó el nem reagált piridinium-kéntrioxidot szüréssel eltávolitsuk. A kloroformos szürletből 30 ml petroléterrel ujra kicsapjuk a DEA-3-szulfát-piridinium sót. Kitermelés: 1,51 g /95 %/.

Nátrium só: a DEA-szulfát-piridinium sót /1 g/ 10 ml telitett Na_2SO_4 oldatba visszük keverés közben, miközben a pH-t 7,5-re állitjuk telitett $NaHCO_3$ oldattal. Két óráig szobahőn állni hagyjuk. /A kation csere megtörténik, a nátrium só kiválik az oldatból, amiben egyébként a piridinium só sem oldódott fel a kiindulásnál./ A csapadékot szürjük, kevés vizzel és petroléterrel átmossuk. Átkristályositás etanol-éterből, 2x. Kitermelés: 0,80 g /98 %/. Op.: 170-171°C. /Irodalomban a K só op.-je adott. /114//

Ösztron-szulfát készitése

Az eljárás azonos a dehidroepiandroszteronnál alkalmazottal. Kitermelés: 1 g ösztronból 1,3 g ösztron-3-szulfát-piridinium só /81,2 %/. 1 g ösztron-3-szulfát-piridinium sóból 0,8 g /95 %/ ösztron-3-szulfát-nátrium só keletkezik. /2 -szer átkristályositva metanol-éterből/. Op.: 230°C. /Irodalmi op.: 229-231°C/157//

Reichstein S-21-szulfát készitése.

Előállitható Kornel és mts. által kortizolra leirt eljárás segitségével /108/, ahol a piridinium sót nem nyerjük ki külön. Ennél az eljárásnál 1 g Reichstein S-ből 0,64 g /50 %/ Reichstein S-21-szulfát-nátrium-só keletkezik. Op.: 190-191°C.

A piridinium sót külön is kinyerő eljárás a következő: 0,3 ml klórszulfonsavat adunk 5 ml száraz piridinbe jeges hütés közben. Ehhez adunk 8 ml piridinben oldott 1 g Reichstein S-t. 2 óráig szobahőn állni hagyjuk. Jeges hütés közben petroléterrel kicsapjuk a Reichstein S-21-szulfát-piridinium sót. /A kloroformban a piridinium só nem oldódik, igy ez a lépés nem használható./ Kitermelés: 1,043 g /70 %/.

Nátrium só készitése: a piridinium sót /1 g/ 20 ml telitett Na_2SO_4-ben oldjuk, pH 7,3 /telitett $NaHCO_3$ oldattal beállitva/. Öt óráig szobahőn állni hagyjuk. A csapadékot centrifugálással választjuk el. 40 ml metanolban oldjuk, szürjük szürőpapiron. Bepároljuk az oldatot, majd 30 ml metanolban oldjuk az anyagot és kb. 60 ml éterrel kicsapjuk a Reichstein S-21-szulfát-natrium sót. A metanol-éteres átkristályositást megismételjük. Kitermelés: 0,75 % g /87 %/. Op.: 189,5-190°C.

Kortizol-21-szulfát előállitása

Kornel és mts. /108/ módszerével a nátrium só 62,5 %-osan előállitható, azonban a piridinium sót itt külön nem nyerik ki. A kortizol-21-szulfát-piridinium só előállitása megegyezik a Reichstein S-szulfát-piridinium só előállitásával. 1 g kortizolból 1,03 g /70 %/ kortizol-szulfát-piridinium sót kapunk.

A nátrium só készités: /telitett Na_2SO_4 oldatban való oldó-

dás miatt nem lehetséges a fenti módon/ a piridinium sót 10 ml vizbe visszük és 0,5 g $NaHCO_3$-t adunk hozzá. A kapott tiszta oldatot vakuum exikátorban bepároljuk, majd metanol-éterből kétszer átkristályositjuk. Kitermelés: 1 g piridinium sóból 0,78 g /90 %/ kortizol-21-szulfát-Na só. Op.: 180-185°C.

A kapott szulfátok elemi analizise kielégitő eredményt adott. A termékek vékonyréteg kromtográfiásan vizsgálva Szilikagél G-en n-butanol:viz /9:1/ elegyben futtatva, 25 %-os kénsavval való előhivás után egységesnek bizonyultak és hidrolizis után a megfelelő alapvegyületet adták. A kapott szteroid-szulfát nátrium és piridinium sók vizben jól oldódnak. 0,1 M-os foszfát pufferban a DEA-szulfát-Na só oldódik, mig a Reichstein S-szulfát-nátrium só nem oldódik. Az utóbbi veronál pufferban oldódik.

A szulfátok infravörös spektrumát az 1-5. ábra mutatja, amelyeken a szerves szulfát észterekre jellemző sávokat /61/ megtalálhatjuk. Elsősorban a kb. 1250 cm^{-1}-nél és a kb. 750 cm^{-1}-nél lévő erős sáv jellemző /S=O illetve CO-S vibrációs rezgések/.

A szteroid-szulfátok vizsgálati módszerei

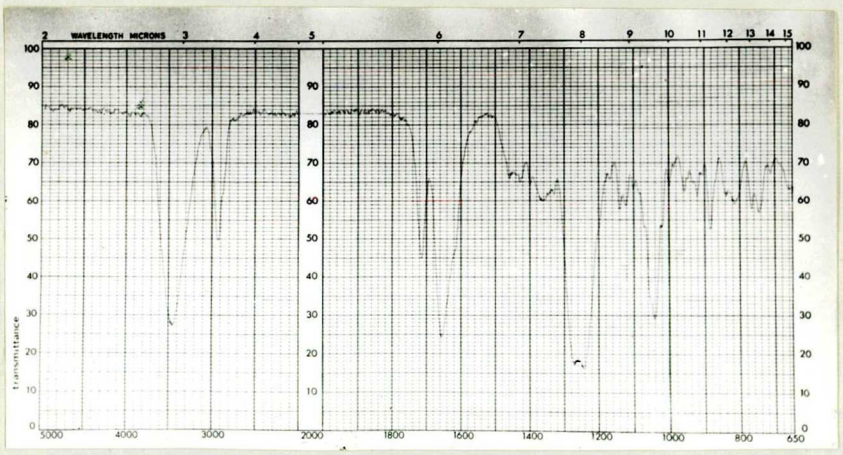
A vizsgált vizes közegü reakciók befejeződése után a szteroid-szulfátokat extraháltam. A DEA-szulfát-nátrium só és a Reichstein S-szulfát-nátrium só a vizes oldat Na_2SO_4-al való telitése és lugositása után kivált, és szüréssel kinyerhető volt. A Reichstein S-szulfát-Na só esetében jól bevált az etanol-éter /1:3/ eleggyel való extrakció is, ammoniumszulfátos telités és kénsavval pH 1-re való savanyitás után /115/.

A szulfátok szolvolizisét Burstein és Lieberman módszerével /114/, valamint ennek módositásával /116/ végeztem el.

Infravörös spektrumok

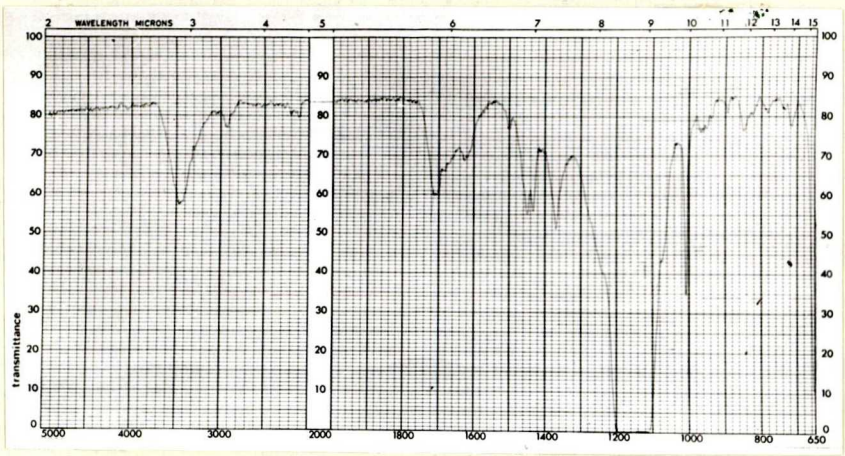
1. ábra

Reichstein S-21-szulfát-nátrium só



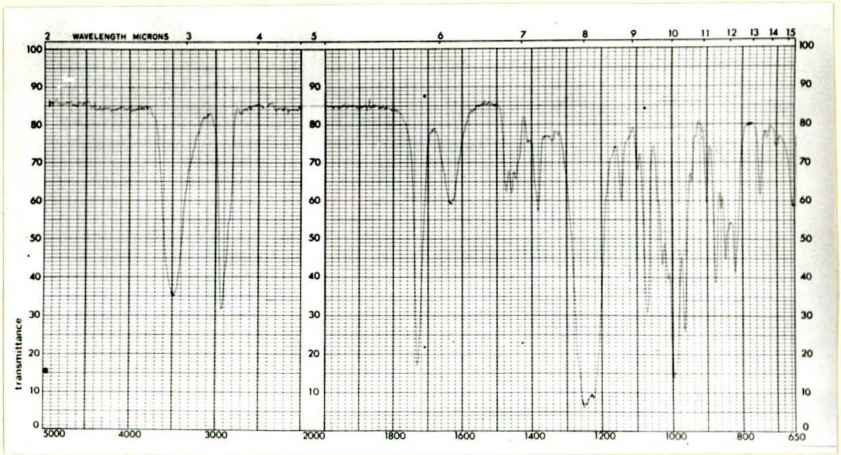
2. ábra

Kortizol-21-szulfát-nátrium só



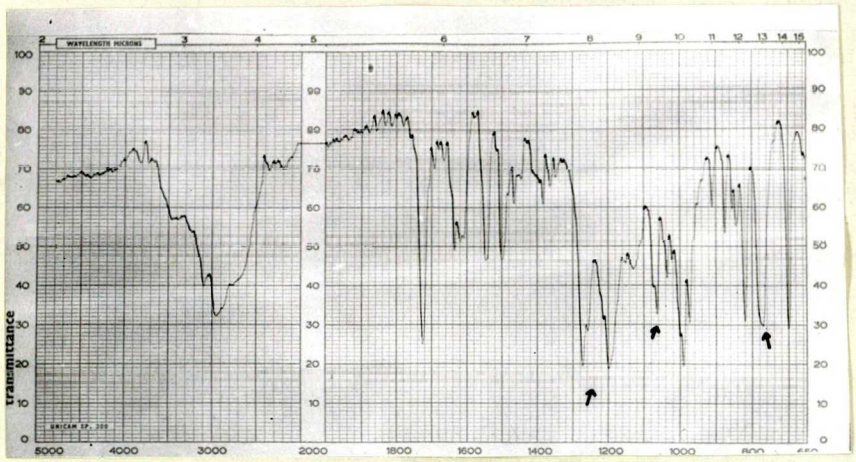
3. ábra

Ösztron-3-szulfát-nátrium só



4. ábra

Dehidroepiandrosztoron-3-szulfát-nátrium só



5. ábra

Dehidroepiandroszteron-3-szulfát-piridinium só

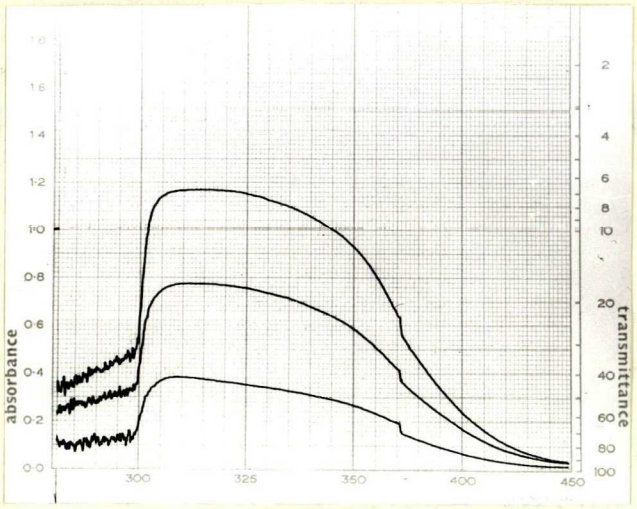
B/ Kvantitativ módszer a szteroid-szulfátok mérésére

Amint az elméleti részben utaltam rá, a szteroid-szulfátok specifikus kimutatása csak Eberlein /118/ és Roy /119/ módszerével lehetséges. Az Eberlein módszer végső soron az átészteresített szteroidot méri acetát formában és igen hosszadalmas. Ilyen formán a gyakorlat számára csak a Roy által alkalmazott metilénkékes módszer adott.

A szteroid-szulfátok-piridinium sóinak előállitása közben észleltem azt a jelenséget, hogy a rézzel rendkivül intenziv szint képeznek ezen vegyületek. Ennek alapján dolgoztam ki az alábbi kvantitativ eljárást, amelynek lényege az, hogy a szteroid-szulfát-piridinium sók piridines oldata rézzel rázatva intenziv színeződést mutat, amelynek intenzitása a szteroid-szulfát koncentrációval arányos.

Az optimális feltételek tisztázása

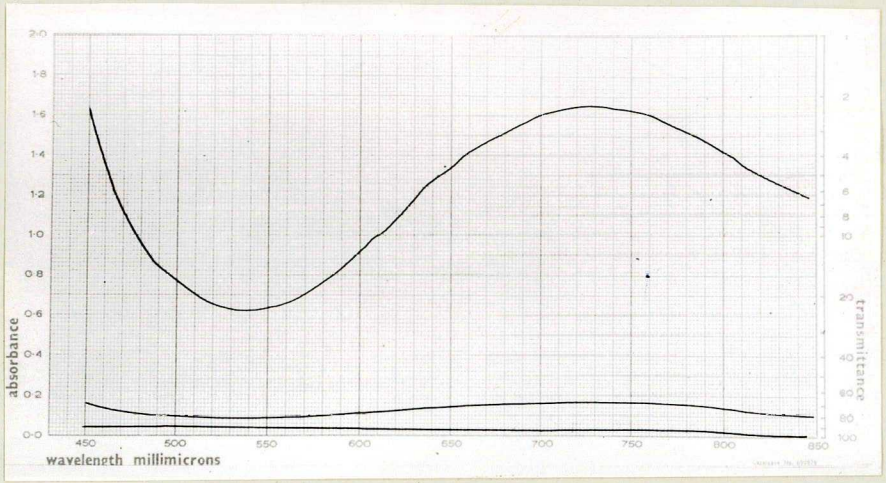
Ha piridint részel rázatunk, akkor a 6. 7. és 8. ábra alsó görbéinek megfelelő spektrumu szineződést kapunk. 300-420 nm-nél elég erős az abszorpció, a látható tartományban viszont kicsi, és csak a 8. ábra méret viszonyainál tünik fel.



6. ábra

Első görbe: DEA-szulfát-piridinium só piridinben + réz.
Középső görbe: Reichstein S-szulfát-piridinium só piridinben + réz.
Alsó görbe: 5 ml piridin + 0,020 g réz, 3 perc rázás.

Ha a piridinbe szteroid-szulfát-piridinium sót teszünk és részzel rázatjuk, akkor a pusztán piridin és réz hatására kapott szin intenzitásának erős növekedését figyelhetjük meg, ugyanakkor azonban az abszorpciós spektrum alakja nem változik meg. Az extinkció növekedés az UV és a látható tartományban is bekövetkezik, ami vizuálisan is megfigyelhető a zöld szineződés megjelenésével. Látható, hogy a különböző szteroid-szulfátok hatása nem specifikus, az abszorpciós görbe formája azonos maradt/6.ábra/

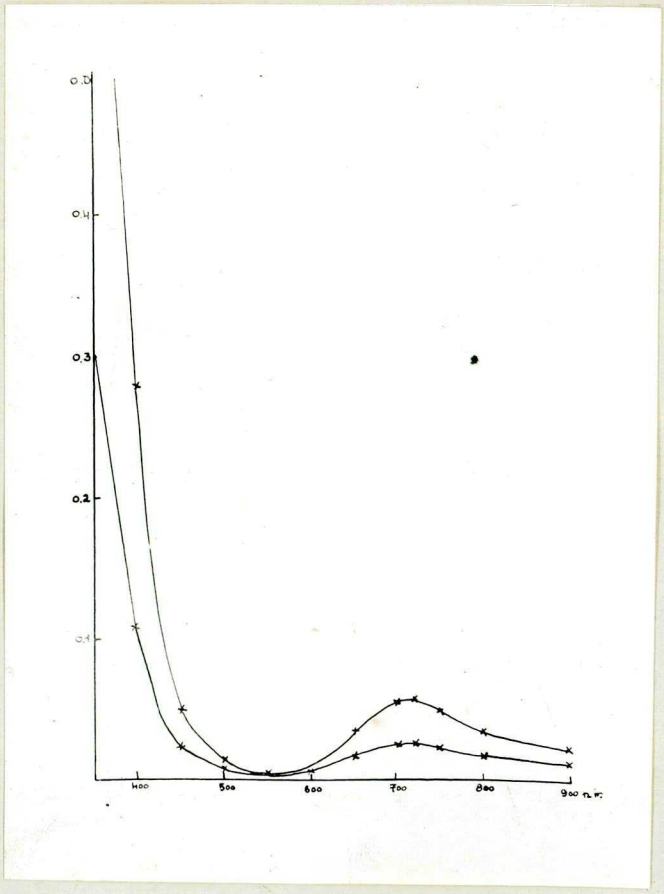


7. ábra

Felső görbe: DEA-szulfát-piridinium só nagy konc.-ju piridines oldata + réz

Középső görbe: A fenti kis konc.-ju piridines oldata + réz

Alsó görbe: 5 ml piridin + 0,020 g réz, 5 perc rázás.



8. ábra

Felső görbe: DEA-szulfát-pir.só híg piridines oldata + réz

Alsó görbe: 5 ml piridin + 0,020 g réz, 3 perc rázás.

Ha a fenti kísérletet piridinium-szulfáttal végezzük el, akkor ugyancsak kapunk egy- a szteroidoknál sokkal halványabb-zöldes színeződést, amely azonban 10-20 perc mulva megszünik, ha a rezet kiszürjük, mivel $CuSO_4$ válik ki kék színnel az oldatból, ami a kation csere eredménye.

Lényegében tehát arról van szó, hogy a piridin a rézzel egy színterméket képez. Ez a tendencia a piridinium sóknál fokozott /pl.piridinium-szulfátnál/ és igen erős a szteroid-hidrogén-szulfátok piridinnel képzett piridinium sójánál.

Ez a jelenség vizes közegben nem figyelhető meg. A szteroid-szulfátok nátrium sói nem mutatnak reakciót. Ha Cu_2O-t adunk a reakció elegybe, akkor melegités hatására a szteroid-szulfát-piridinium sónál észlelt színeződés fokozódik. Rézszulfát kiválás kis mértékben a DEA-szulfát-piridinium sóknál is megfigyelhető, ami az észter kötés hasadására mutat. Ez nem figyelhető meg Reichstein S-szulfát-piridinium só esetében.

A különféle egyéb réz sók nem használhatók fel, mert a piridinnel erős színterméket adnak, vagy maguk is színesek.

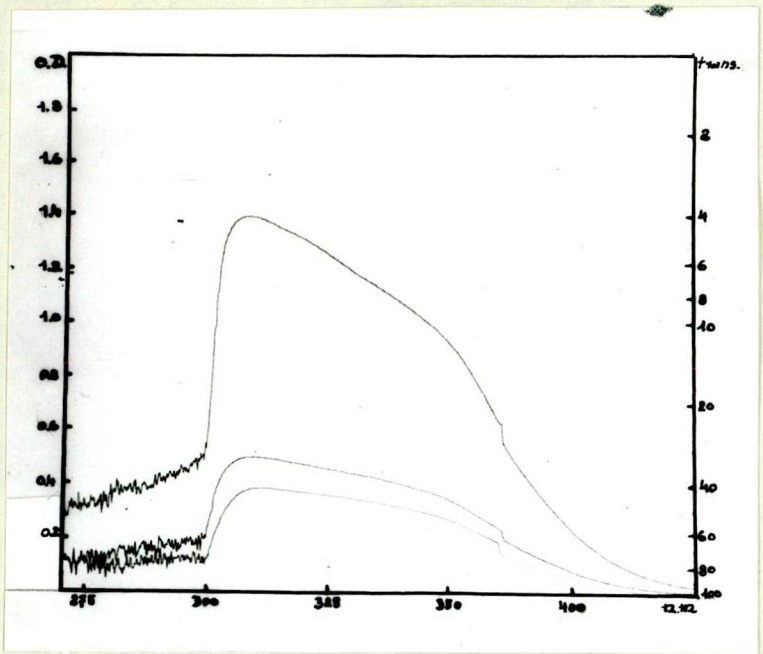
A szabad szteroidok UV fényben mutatnak ugyan elnyelést, azonban az adott esetben, ha a szteroid piridines oldatát rézzel rázatjuk, nem mutatkozik extinkció növekedés a piridin + réz extinkciójához képest. Ez a 9. ábrán látható, ahol a felső görbe a DEA vagy a Reichstein S egymás között azonos görbéje , ami ugyanolyan gyakorlatilag, mint a piridin + réz görbe.

E tekintetben az ösztron eltérést mutat, mert itt a rézzel sárgás színeződést kapunk, ami az UV tartományban is mutatkozik, amint ezt a 10. ábra középső görbéje mutatja. Egyébként az ösztron-szulfát-piridinium só hasonló színeződést ad a többi

szteroid-szulfáthoz /lásd. a felső görbén/; az ábrán kissé eltérő ugyan a görbe alakja, de ez valószinüleg a kevésbbé tiszta vegyület miatt van.

9. ábra

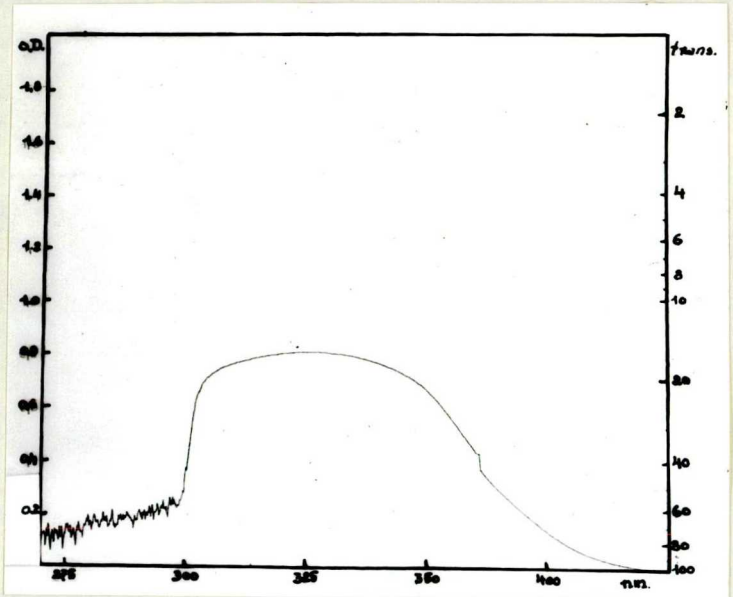
Felső görbe: Reichstein S vagy DEA piridines oldata + réz.
Alsó görbe: 5 ml piridin + 0,020 g réz, 5 perc rázás



10. ábra

Felső görbe: Ösztron-szulfát-piridinium só piridinben + réz.
Középső görbe: Ösztron piridinben + réz.
Alsó görbe: 5 ml.piridin + 0,020 g réz, 3 perc rázatás.

Optimális mérési hullámhossz. A láthatóban a maximum 725 nm-nél van. Ebben a tartományban azonban az extinkciós érték egy nagyságrenddel kisebb, ami tizszer kisebb koncentráció mérését teszi lehetővé. A 11. ábra a DEA-szulfát-piridinium só + réz és a csak piridin + réz abszorpciós görbék különbségi görbéje. Látható, hogy a szteroid-szulfát-piridinium só a piridin + réz kontrollhoz képest 330 nm-nél mutat maximális elnyelést. Ez tehát az optimális mérési hullámhossz. Ugyanakkor láthatjuk, hogy 360 nm-nél is még elég nagy az abszorpció, ilyen formán a látható fény hullámhossz tartományában működő spektrofotométerekkel is elvégezhetjük a meghatrozást ezen a hullámhosszon /pl.Spektromom 360 készülék/.

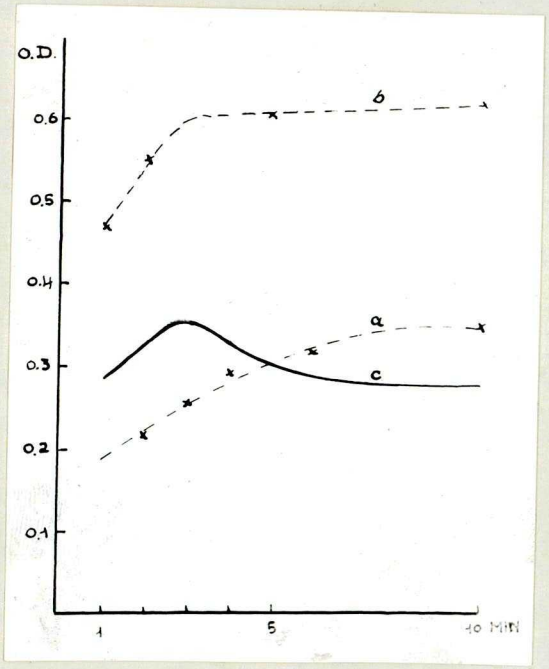


11. ábra

DEA-szulfát-piridinium só piridinben + réz és piridin + réz görbék különbségi görbéje.

A reakció idő optimuma. A 12. ábra a görbéje a piridin és réz rásatásakor kapott 330 nm-nél mért extinkció időbeni változását mutatja. A b görbe a szteroid-szulfát-piridinium só je-

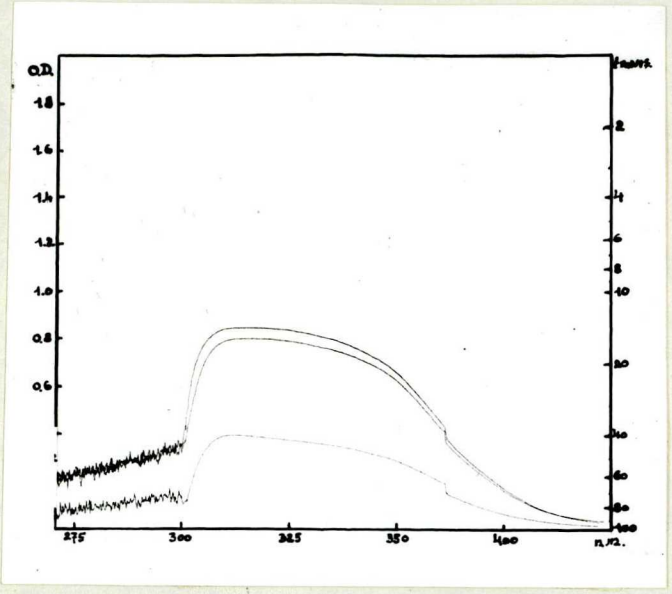
lenlétében kapott extinkciót mutatja 330 nm-nél az idő függvényében. A c görbe a kettő különbségi görbéje, amely, mint látható 3 percnél éri el a maximumát. Eszerint tehát a legnagyobb extinkciókat 3 perces rázatás után kapnánk, azonban az eredmények reprodukálhatósága miatt célszerűbb a méréseket 5, vagy 10 perc után végezni, ugyanis a szín stabilitás lényegesen nagyobb.



12. ábra

A reakció idő- optimum görbéje

A 3 percnes méréshez képest csökken extinkciós értéket mutatja be a 13. ábra, ahol a felső görbe a 3 perc, az alsó görbe pedig a 10 perc után mért abszorpciós spektrum. Láthtó, hogy a görbe alakja nem változik az idő függvényében.



13. ábra

Felső görbe: Reichstein S-szulfát-pir.só piridinben + réz, 3 perc rázás.

Középső görbe: A fenti összeállitás, 15 perc rázás.

Alsó görbe: 5 ml piridin + 0,020 g réz, 3 perc rázás.

A réz mennyiségének növelésével az extinkciós értékek is növekednek, ez azonban kb. azonos a pusztán piridin, illetve a szteroid-szulfát jelenlétében, igy nem jelentős. A pontos bemérés miatt 0,010-0,020 g réz alkalmazása célszerü.

A rázás intenzitása befolyásolja a szin keletkezését, ezért minden esetben azonosan kell rázatni.

A reakció végén a reset szürő papiron szürjük, ilyenkor a szin intenzitása hosszu ideig állandó marad. Higitásra az abszorpció mértéke arányosan csökken, nagy koncentráció tartományban is.

A fentiek alapján a szteroid-szulfát-piridinium sók kvantitativ mérését a következőképpen végezzük el. A kérdéses szteroid-szulfát-piridinium sóval standard görbét készitünk. A ve-

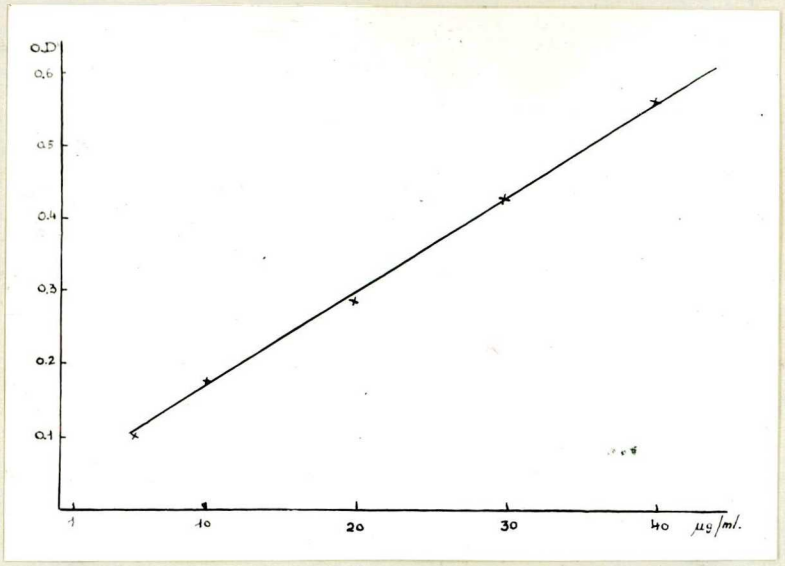
gület ismert koncentrációju piridines oldatából különböző mennyiségeket mérünk kémcsőbe, majd 5 ml-re egészitjük ki piridinnel. 0,020 g rezet mérünk be. A bedugott kémcsöveket rázógéppel egyenletesen rázatjuk 5-10 percig, szobahőmérsékleten. Ezután azonos nagyságu száraz szürőpapiron kiszürjük a rezet. A kapott oldat intenzitását mérjük. Kontrolként az azonosan kezelt piridines oldat szolgál /5 ml piridin + 0,020 g réz, 5-10 perc rázás, szürés/. A mérést 330 nm-en végezzük. /Ilyen müszer hiányában 360 nm-en./ Ismeretlen anyagmennyiségnél hasonlóan járunk el, majd az extinkcióból a koncentrációt a standard görbe segitségével olvassuk le.

A mérés hibája erősen függ a munka precizségétől, általában 1-5 %.

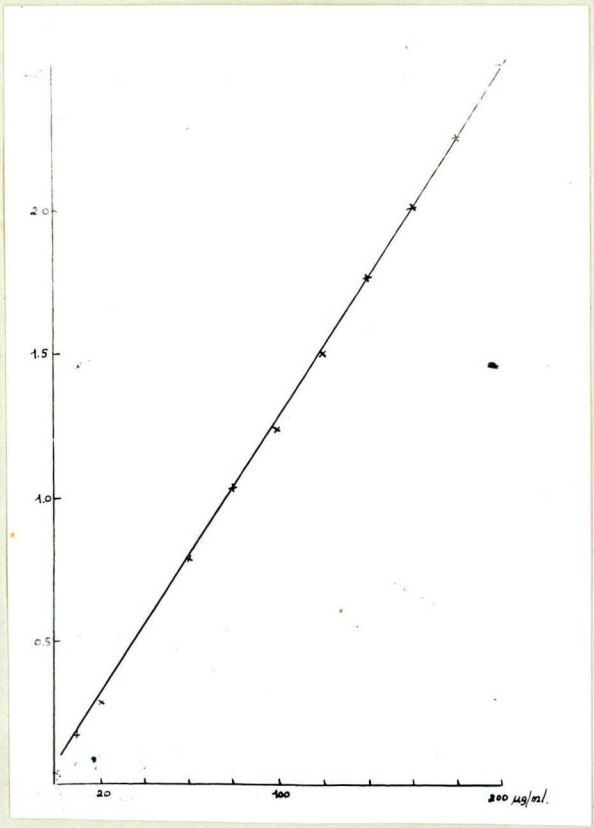
A 14. és 15. ábra a DEA-szulfát-piridinium só esetében az abszorpció-koncentráció függést mutatja be 360 nm-nél. Amint látható a linearitás széles intervallumban fennáll. A mérés 5-200 µg/ml koncentrációnál lehetséges.

A 16. ábra a Reichstein S-szulfát-piridinium só standardgörbéje 330 nm-nél mérve.

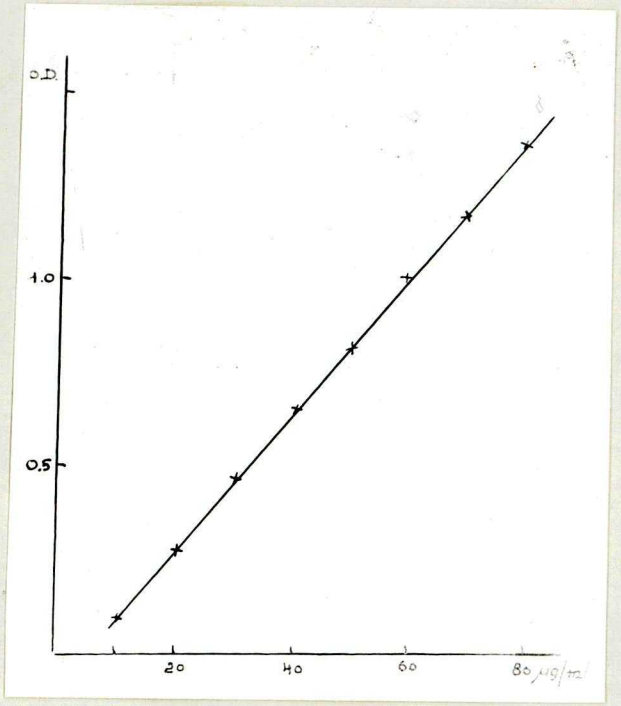
A fenti összeállitás mellett reprodukálhatóan kb. 5 µg/ml koncentrációjú oldatokat tudtam mérni. 3 ml-es küvettát használva ez 15 µg anyagmennyiséget jelent. Az ennél kisebb koncentrációnál is van színképződés, azonban a szin intenzitás nem volt reprodukálható. Lehetséges, hogy más reagens mennyiségek alkalmazásával a mérési határ lejjebb vihető.



14. ábra
DEA-szulfát-piridinium só standard görbéje



15. ábra
DEA-szulfát-piridinium só standard görbéje



16. ábra

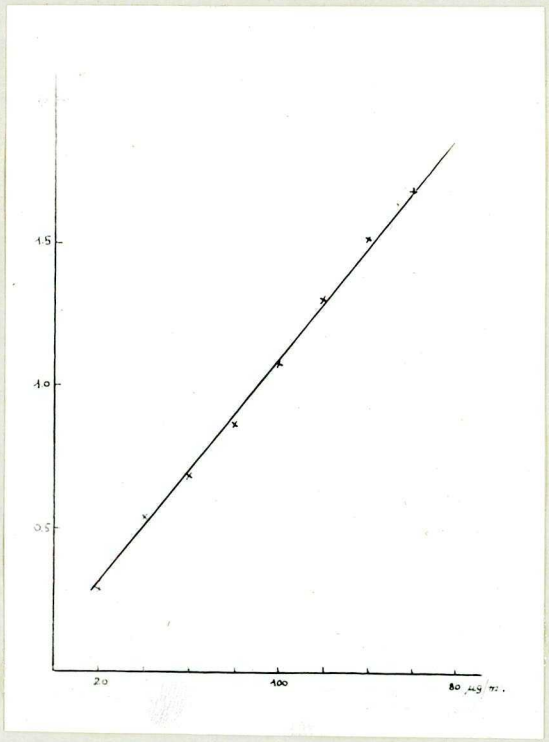
Reichstein S-szulfát-piridinium só standard görbéje

A biológiai fontosságu szteroidok Na, vagy K só formában fordulnak elő. Viszont a már ismertetett kirázások során /115/ a szteroid-hidrogén-szulfátokat extraháljuk és ha az extraktumot piridin hozzáadásával pároljuk be, akkor szteroid-szulfát-piridinium sókat kapunk, amelyek a fenti módon mérhetők. A 17.ábrán a deszt.vizből etanol:éter /1:3/ eleggyel extrahált /115/ és piridinium sóvá alakitott Reichstein S-szulfát-Na só standard görbéjét láthatjuk 360 nm-nél mérve. Ez gyakorlatilag azonos a tiszta Reichstein S-szulfát-piridinium só görbéjével. Ez azt mutatja, hogy a módszer a biológiai objektumokban előforduló szteroid-szulfátok kvantitativ meghatározására is felhasználható.

F/ A Reichstein S-szulfát hidrolisis sebességének mérése

A Reichstein S-szulfát-Na só UV besugárzása során hidrolisist észleltem, ennek vizsgálatára az alábbi összeállitást használtam:

0,05 g Reichstein S-szulfát-Na sót 25 ml deszt.vízben oldottam. Nyitott főzőpohárban 15 cm távolságból UV fénnyel besugároztam. Egy óránként 1 ml-es mintát vettem az oldatból. /Az elpárolgott vizet pótoltam a kivétel előtt./ Az 1 ml-es mintákból etanol:éter /1:3/ eleggyel ammoniumszulfátos telítés és pH 1-re savanyitást után extraháltam a szteroid-szulfátot /115,/, majd 0,1 ml piridin hozzáadása után bepároltam a oldatot. A piridinium sót piridinben oldottam és a fenti eljárással az egyes minták koncentrációját meghatároztam.



17. ábra

Reichstein S-szulfát-Na só standard görbéje.

III. EREDMÉNYEK

Az aromás és az indolvázas vegyületekre vonatkozó eredményeket csak röviden, az ábrák bemutatásával ismertetem, mivel ezeket az eredményeket a korábbi közleményeink részletesen ismertetik /151-154/.

1/ Aromás vegyületek

a/ Antranilsav /o-amino-benzoesav/ /153/

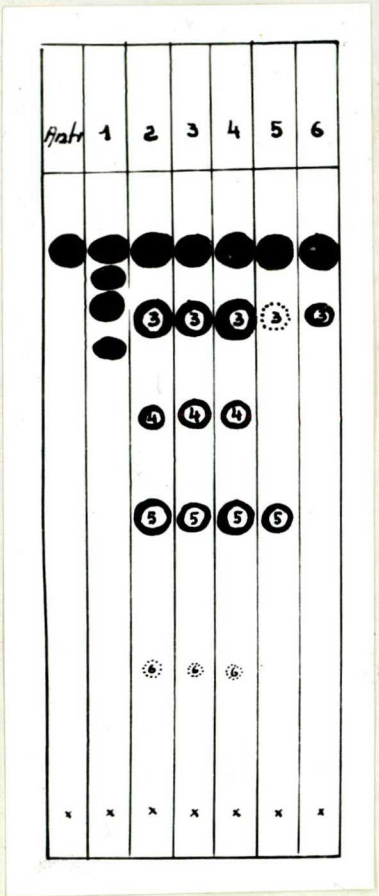
A Fenton rendszerben nem keletkezik hidroxi származék, csak más termékek /18.ábra 1/. A módosított Fenton r.-ben, a Fenton-Cier r.-ben és az Udenfriend r.-ben a 3-, 4-, 5-, 6- hidroxi izomer keletkezik /18. ábra 2, 3, 4 rendre/. UV besugárzás hatására a H_2O_2-os oldatban 24 óra alatt 5-hidroxi-antranilsav és kevés 3-hidroxi-antranilsav keletkezik /18.ábra 5/. Mellékvese inkubátumban 3-hidroxi-antranilsav keletkezik /18.ábra 6/.

Az Udenfriend és a Fenton-Cier r.-ben mutatkozó melléktermék eltérést a 19.ábra szemlélteti.

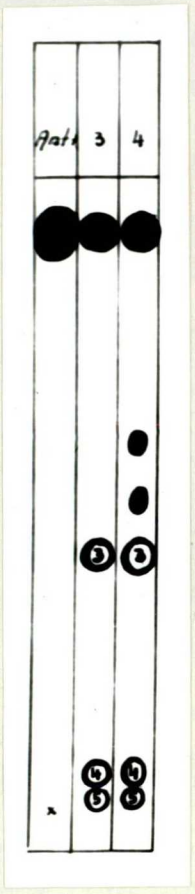
A vastagréteg kromatográfiás szétválasztást a 20.ábra mutatja be.

Az izomerek eloszlását kvantitativ kromatográfiás uton határoztam meg /1.táblázat/. A 6-hidroxi-izomer nem keletkezik összehasonlitható mennyiségben.

	3-OH	4-OH	5-OH	6-OH
Mód.Fenton rendszer	2,91	1,00	1,82	min.
Fenton-Cier rendszer	1,72	1,00	1,05	min.
Udenfriend rendszer	2,20	1,00	1,49	min.



18.ábra



19.ábra

Antranilsav hidroxilálás

szilikagél

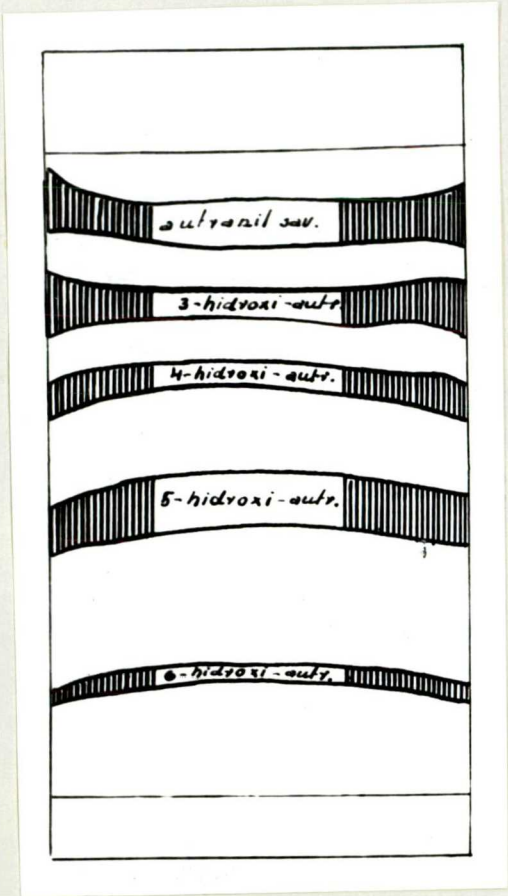
Kloroform: metanol: jégecet /75:20:5/ Kloroform: jégecet /95:5/

2/ Indolvázas vegyületek

a/ Indol /153/

A Fenton r.-ben nincs hidroxilálódás /21.ábra 1/ a módosított Fenton r.-ben, Fenton-Cier r.-ben és Udenfriend r.-ben 4-, 5-, 6-, 7- és 2-hidroxi izomerek keletkeztek. /21.ábra 2, 3, 4 rendre/.

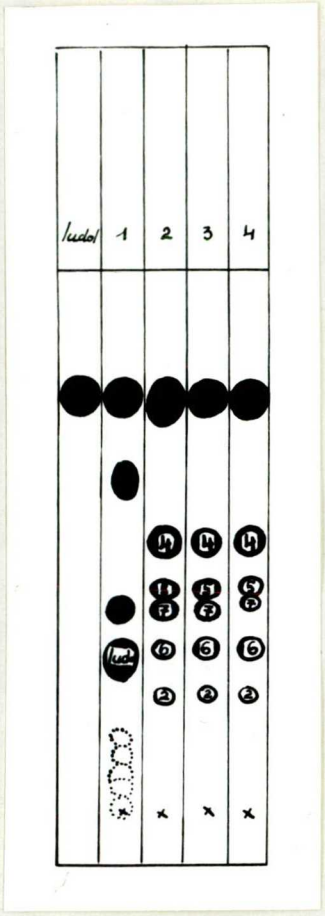
Az eltérő rendszerben kapott kromatogramot a 22.ábra mutatja az Udenfriend r.-nél.



20.ábra.

Antranilsav hidroxilálás szilikagél

Kloroform: metanol: jégecet /75:20:5/



21. ábra

Indol hidroxilálás

Benzol:aceton /9:1/

Az izomerek eloszlása kromatográfiás uton meghatározva:

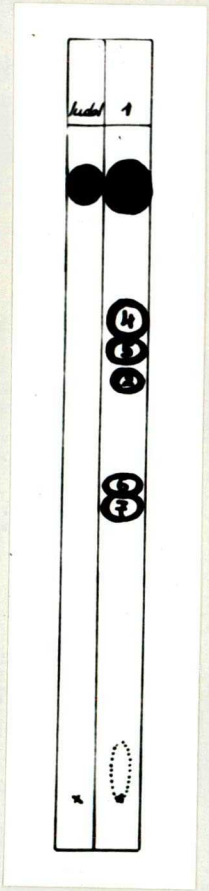
	4-OH	5-OH	6-OH	7-OH
Mód.Fenton rendszer	32	22	20	27
Fenton-Cier rendszer	24	28	25	23
Fenton-Cier rendszer[x]	25	33	25	17
Udenfriend rendszer[x]	35	20	35	10

A [x]-al jelölt eredményeket Eich /56/ munkájából vettem.

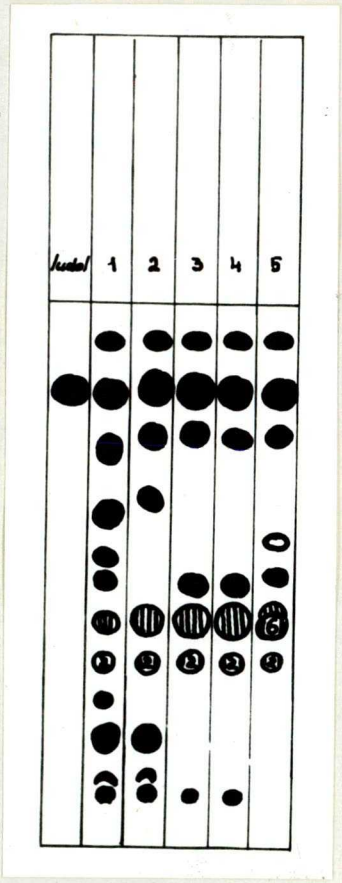
A kisérleti részben ismertetett α, β, δ tipusu UV besugárzott rendszerekben 2-hidroxi-indol, indigó, izatin és más m l-

léktermékek keletkeztek /23.ábra 1, 2, 3, 4/.A ferri ion rendszerekben 6-hidroxi indol is keletkezett. /23.ábra 5/.

A mellékvese inkubátumban kapott termékek extraktumát a 7.ábra 1 sáv mutatja, amelyből a megfelelő rész ujra kromatografálásával a 4-, 5-, 6-, 7-és 2- hidroxi izomert azonositottam /24.ábra 2 és 4/.



22.ábra



23.ábra

Indol hidroxilálás

szilikagél

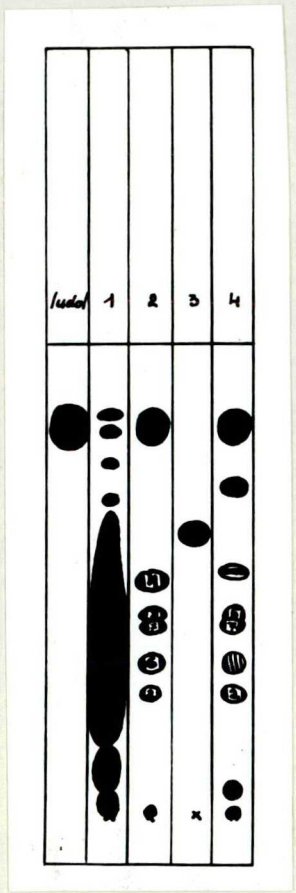
Metilénklorid:etilacetát /65:35/ ammónia atm. Benzol:aceton/9:1/

b/ Triptofán /153/

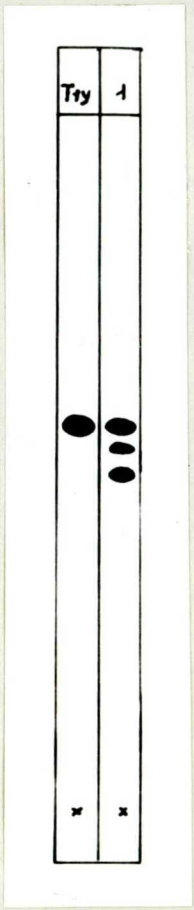
A Fenton-Cier r.-ben és az Udenfriend r.-ben kis mértékü 4-, 5-, 6-, és 7-hidroxi-L-triptofán képződés figyelhető meg.

SZEGED

A 25.ábra a vékonyréteg kromatográfiás képet mutatja, amelynek további szétválasztását papirkromatográfiásan végeztem el Eich szerint /55/.



24.ábra
Indol hidroxilálás
szilikagél
Benzol:aceton /9:1/



25.ábra
L-triptofán hidroxilálás
Izopropanol:Etilacetát:25%NH_4OH
/5:3:2/, 2 x futtatva

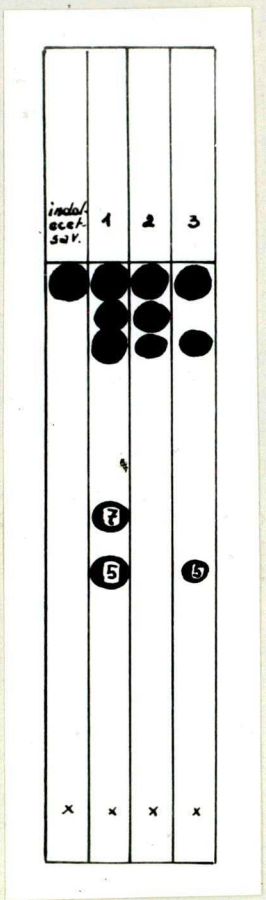
UV besugárzás hatására nincs hidroxilálódás. A mellékvese inkubátumban kevés 5- és 7-hidroxi izomer volt kimutatható.

c/ β- indolecetsav /153/

Udenfriend r.-ben és Fenton-Cier r.-ben 5-és 7-hidroxi származék keletkezik /26.ábra 1/. UV besugárzás hatására a δ típusu rendszerben 5-hidroxi-indolecetsav keletkezik.

d/ Etilgramin /151/

Az etilgramin-hidroklorid az Udenfriend r.-ben és a Fenton-Cior r.-ben 4-, 5-, 6- és 7-hidroxi származékot képez kis mértékben /27.ábra 1/.

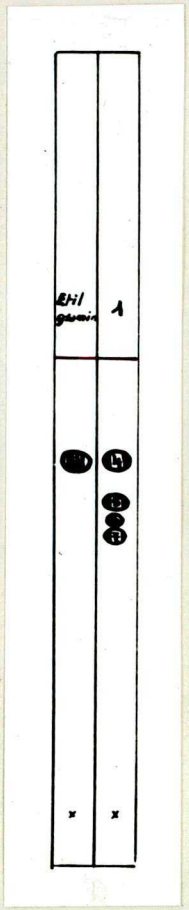


26. ábra

β-indolecetsav hidroxilálás

szilikagél

Kloroform:metanol:jégecet /75:20:5/



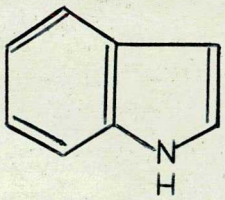
27. ábra

Etilgramin-hidroxilálás

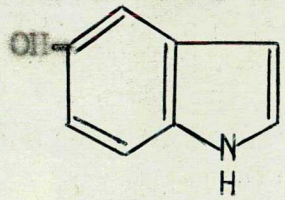
Etanol:25 %NH_4OH/8:2/

Az etilgramin hidroxi izomerek szintézise /152/

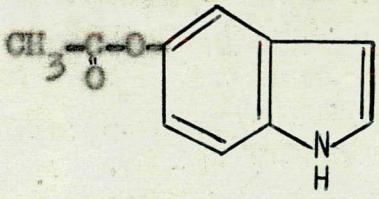
Az alkalmazott szintetikus út, az 5-ös izoméren bemutatva:



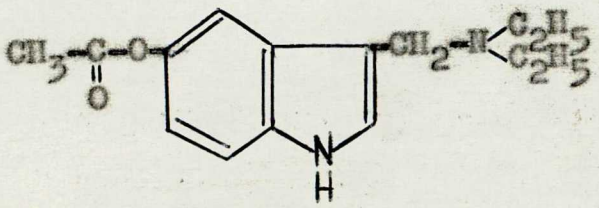
indol



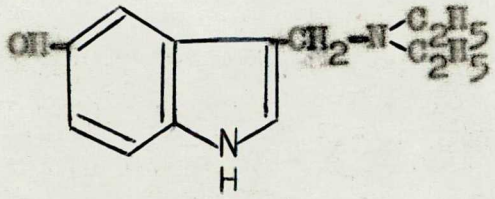
hidroxi-indol



acetóxi-indol

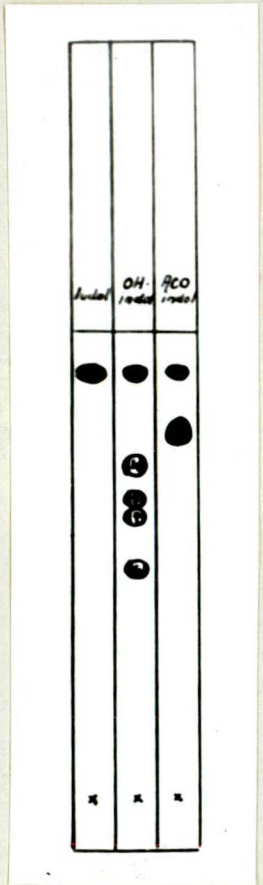


acetoxi-etilgramin

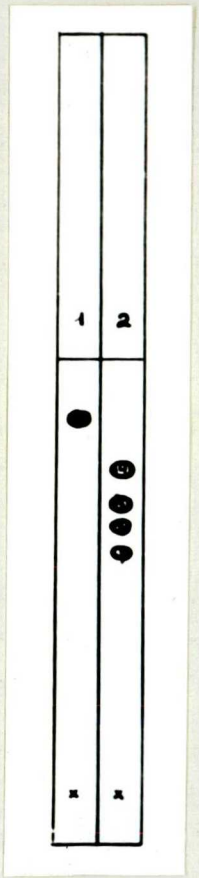


hidroxi-etilgramin

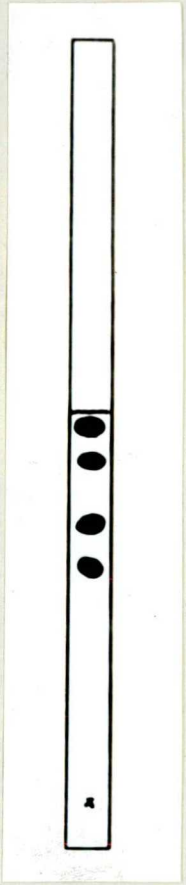
A folyamatot kromatográfiásan végigkisérhetjük: indol/28.ábra 1/ hidroxi-indolok /28.ábra 2/, acetoxi-indolok /28.ábra 3/, acetoxi-etilgraminok /29.ábra 1/, hidroxi-etilgraminok /29.ábra 2, 30.ábra/.



28.ábra



29.ábra



30.ábra

Hidroxi-etilgraminok kószitése

szilikagél

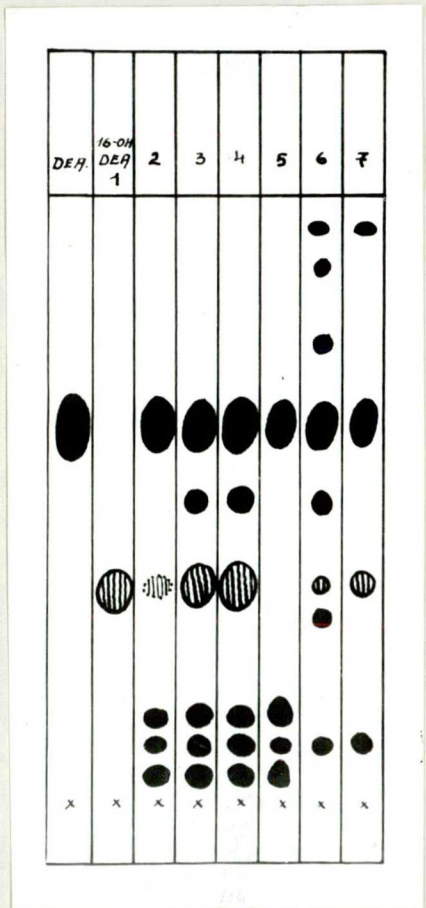
benzol:etanol /9:1/ | etanol:konc.NH_4OH /8:1/ | i-propanol:etilacetát:konc.NH_4OH /5:3:2/

3/ Szteroidok

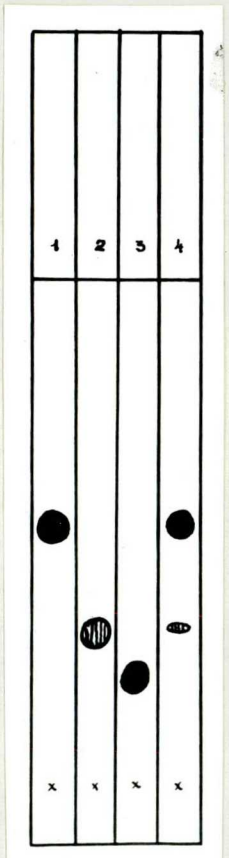
α/ Biológiai és kémiai rendszerek

a/ Dehidroepiandrosztéron /androszt-5-en-3 β-ol-17-on//154/

Azonosító származéknak a 16α-hidroxi-DEA állt rendelkezésünkre. /31.ábra 1/. A Fenton r.-ben nem keletkezik 16α-hidroxi-DEA. A mód.Fenton r.-ben, a Fenton-Cier r.-ben és Udenfriend r.-ben kimutattam 16α-hidroxilezödést /31.ábra 2, 3,4/. A mellékvese inkubátum gyenge 16α-hidroxiláló hatást mutat /31.ábra 7./.



31.ábra
DEA hidroxilálás
szilikagél
Benzol:etilacetát/3:2/



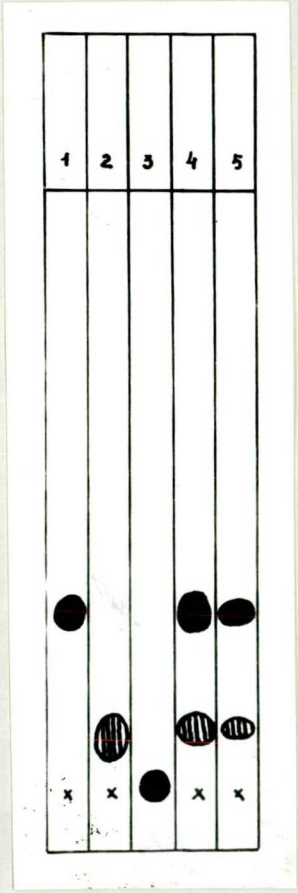
32.ábra
Reichstein S hidroxilálás
Kieselgel G
Kloroform:etanol/9:1/

b/ Reichstein S hidroxilálása /154/ /Pregn-4-en-17α, 21-diol-3, 20-dion/

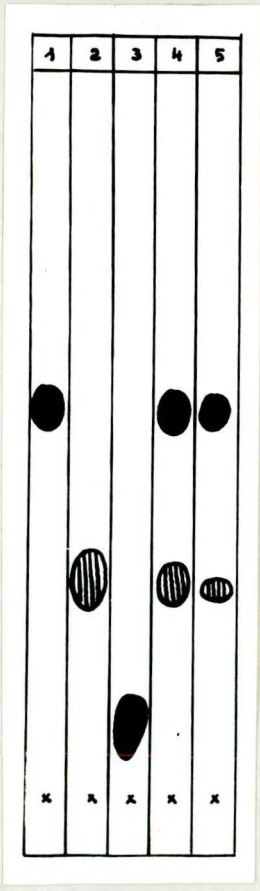
Összehasonlító anyagok: kortizol /11β-hidroxi származék/, epikortizol /11α-hidroxi származék/.

A Fenton és módosított Fenton rendszer nem hidroxilál. A Fenton-Cier r. és az Udenfriend rendszerben nyomokban keletkezett a 11β-hidroxi származékkal azonos kromatográfiás sajátságu vegyület. /32. ábrán a sorrend: Reichstein S, kortizol, epikortizol, termék./

A mellékvese inkubátumban /c tipus/ négy órás inkubálás után jelentős mennyiségü kortizol képződését mutattam ki kromatográfiásan /33. ábra 5 és 34. ábra 5/.



33. ábra



34. ábra

Reichstein S. hidroxilálás

Kieselgel G

Benzol:etanol /95:5/ Metilénklorid:aceton /8:2/

β/Ultraibolya besugárzások vizsgálata

A DEA-szulfát-Na só a $FeCl_3$-as rendszerben 28, 50 és 70 órás besugárzás alatt azonos termékeket adott. A hidrolizis utáni képet mutatja a 35. ábra 3. A 16α-hidroxi származékkal azonos Rf-ü anyag jóddal azonos, kénsav-fluoreszcenciában viszont eltérő szineződést mutat az összehasonlitótól. A fő termék a satirozottan jelölt anyag, amely kénsavas előhivás után élénk sárga fluoreszcenciáju.

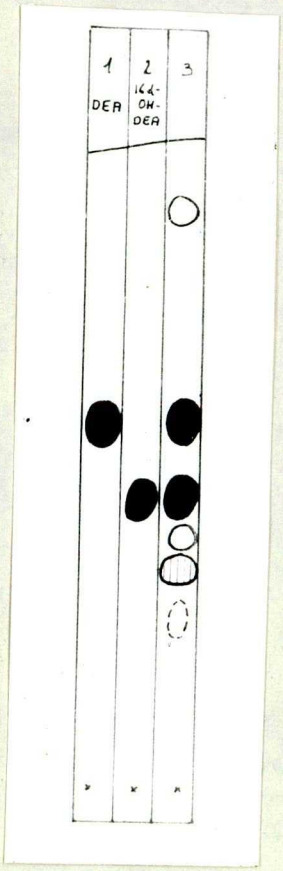
Az ösztron-szulfát-Na só vizes /+$FeCl_3$/ oldatának 24 órás besugárzásakor kapott képét mutatja a 36. ábra 1. A szabad ösztron vizes oldatának 24 órás besugárzását a 36. ábra 2. mutatja. A 3. sáv a 2, 4-dihidroxi-ösztront, a 4.sáv a 2-hidroxi-ösztront mutatja. A 2, 4-dihidroxi-ösztronnal azonos polaritásu és szineződésü anyag is keletkezik. A szabad és konjugált ösztron besugárzási termékei eltérőek.

Reichstein S besugárzások: Számos kisérletet végeztem ennek vizsgálatára.

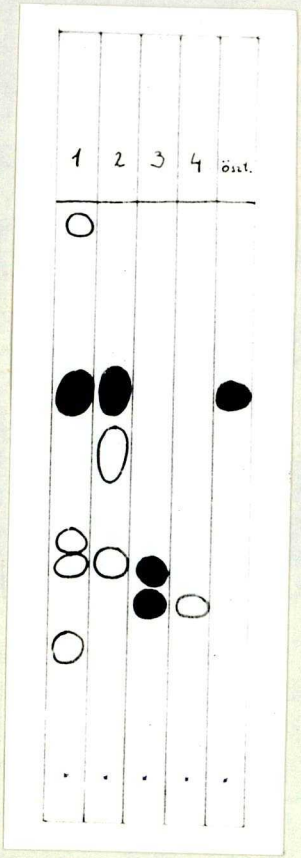
A Reichstein S-szulfát-Na só a $FeCl_3$-as rendszerben besugározva pH 8,5-n a kortizollal azonos kromatográfiás sajátságu /Rf, szineződés, fluoreszcencia/ anyagot ad, elég jelentős mennyiségben /kb. 20 %/ 18 óra alatt. Még néhány melléktermék is képződik./37. ábra 3./

A Reichstein S vizes oldatának /propilén-glikolos/ 24 órás besugárzásakor a 37. ábra 4 képét kapjuk. Látható, hogy más termékek keletkeznek, mint a szulfát besugárzásakor.

A H_2O_2-os közegü Reichstein S-szulfát-Na só 24 órás besugárzása szintén más termékeket ad /37. ábra 5./



35. ábra
DEA-szulfát-Na; UV
Szilikagél
Benzol:etilacetát/3:2/



36. ábra
Ösztron és szulfátja; UV
Kieselgel G
Ecetsav:c-hexán-kloroform/1:2:2/

A Reichstein S-szulfát-piridinium só $FeCl_3$-os oldatának besugárzásakor a 37. ábra 6. sávjának anyagait kapjuk.

Megvizsgáltam a kortizol lebomlását is. A 38. ábra 2 a kortizol-szulfát-Na só lebomlását mutatja vízben 24 órás UV besugárzás hatására. A 38. ábra 3 a kortizol vizes közegben történő lebomlását mutatja 24 óra alatt.

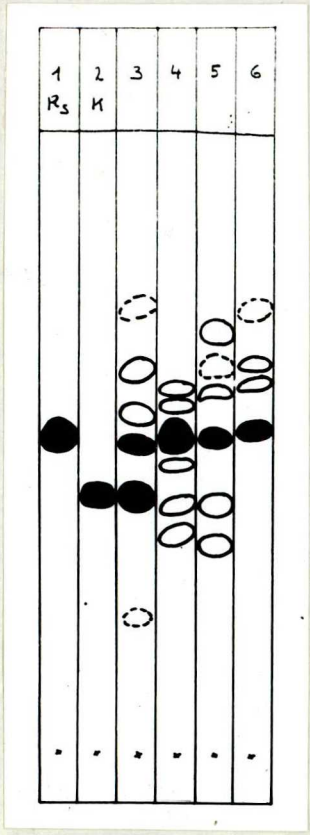
γ/ Reichstein S-szulfát-Na só hidrolizise

A kisérletek során megállapitottam, hogy ez a vegyület UV besugárzás hatására vizes közegben hidrolizist szenved /sö-

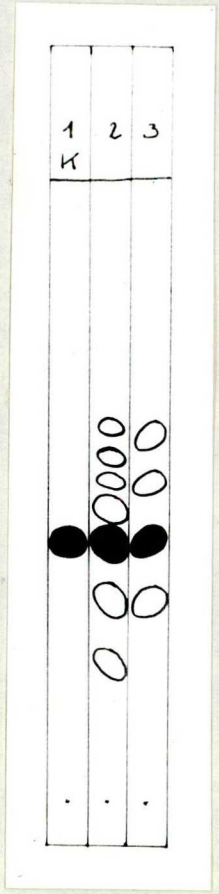
tétben, azonos hőmérsékleten nincs hidrolizis vizes közegben/. Ennek folytán $NaHSO_4$ szabadul fel, ami a pH fokozatos csökkenésével jár. A savas pH-n a szteroid-szulfát-Na só nem oldódik vízben, így ez is kiválik a hidrolizis során képződött oldhatatlan szabad szteroid mellett. Ezen jelenség kiküszöbölése miatt végeztem pH 7,5-8,0 között a kisérleteket a $FeCl_3$-os rendszerben. /Ilyen pH-nál 18 óra alatt a zavarosodás nem éri el a kicsapás szintjét./

A hidrolizis sebességét deszt.vízben oldott Reichstein S-szulfát-Na són mértem meg, a kisérleti részben leirt módon. Az adott körülmények között a kiindulási pH 5,0-ról 7 óra alatt pH 1,0-ra csökkent.

A szteroid-szulfát koncentráció csökkenésének követésével mértem a hidrolizis sebességét. /A méréshez a fent ismertetett módszert alkalmaztam./ A hidrolizis sebességi állandó: $2,9 \times 10^{-5}$ sec^{-1}-nek adódott, ami kb. az etanolban 26°C-on végbemenő hidrolizis sebességének felel meg /126/.



37. ábra
Reichstein S és szulfátja;UV
Kieselgel G
Benzol:etanol /85:15/



38. ábra
Kortizol és szulfátja; UV
Benzol:etanol /85:15/

IV. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

1/ Az in vitro rendszerek hatás mechanizmusa

Az aromásokon és az indolvázas vegyületeken végzett kísérletek a hidroxilált termékek kvalitativ és kvantitativ vizsgálatával a rendszerek természetét világitják meg.

Hasonló jellegü vizsgálatokat korábban a következő indolvázas vegyületeken végeztek: Szkatol: Udenfriend r., Fenton-Cier /158/, triptofán:Udenfriend r., Fenton-Cier r. /31, 55, 159/, triptamin:Udenfriend r. /31/, β-indolecetsav:Udenfriend

r., mód. Fenton r. /59, 59/, indol:Udenfriend r., Fenton-Cier r. /55/.

Vizsgálataimban ezen kisérleteket egészitettem ki részint uj szubsztrát vizsgálatával /etilgramin/, részint a rendszerek közötti összehasonlitó vizsgálattal.

Általánosságban megállapitható, hogy a Fenton r. az erősen savas feltételek között indolvázasokra nem hidroxiláló hatásu. A semleges pH-n ható mód. Fenton r., továbbá a Fenton-Cier r. és az Udenfriend r. kvalitative azonos hidroxi származékokat ad. A 3-szubsztituált-indol vegyületeknél és az indolnál a hidroxilálás a benzol gyürün következik be,nem pedig a pirrol gyürün, ami gyökös mechanizmusra mutat./ld.később/.

Az aromások közül az antranilsavat választottam model vegyületnek. Ezt korábban az Udenfriend r.-ben már vizsgálták, és csak a 3- és 5-hidroxi származékokat mutatták ki, kvantitative nem vizsgálták a reakciót/59, 159/. Amint az eredményekből kitünik, az Udenfriend r., a Fenton-Cier r. és a mod. Fenton r. is minden lehetséges hidroxil csoport szubsztituciót végrehajt, az izomerek azonban nem azonos mennyiségben képződtek és a különböző rendszerek közötti izomer eloszlás is eltérést mutat.

A hidroxi izomerek eloszlása az adott vegyület esetében a lejátszódott reakció mechanizmusára felvilágositást ad. Az antranilsav $-NH_2$ csoportja első osztályú szubsztituens, amely elektrofil támadás esetén orto és para szubsztitucionak kedvez. A -COOH csoport másod osztályú szubsztituens, amely meta hely-

zetü elektrofil szubsztitució dominanciáját eredményezi. Tekintettel a két csoport egymáshoz viszonyitott orto helyzetére, az elektron felhő eltorzulását /az elektron sürüség megváltozását/ azonos irányban befolyásolja mindkét szubsztituens, amint ezt az ábrák szaggatott vonala jelzi.

Ha tehát a molekulán elektrofil szubsztitució játszódna le, akkor szinte kizárólag a 3-as és 5-ös szénatomon következne be hidroxil képződés. Az izomer eloszlás azonban mutatja, hogy jelentős mennyiségü 4-hidroxi-antranilsav is képződik. Ebből következik, hogy a hidroxiláció gyökös mechanismus szerint játszódik le. A szabad gyökök a szubsztituens természetétől függetlenül orto és para helyzetet részesitenék előnyben, az izomer eloszlás egyenletesebb, mint elektrofil szubsztituciónál. Mivel az antranilsavon két szubsztituens van, az izomer eloszlás semlegas gyök támadása esetén még egyenletesebbnek várható.

Amint az elméleti részben utaltam rá, a Fenton r.-ben hidroxil gyök képződik. Az izomerek eloszlása a mód. Fenton r.-ben azt mutatja, hogy bár a reakció lényegében gyökös jellegü, az eloszlás bizonyos mértékig elektrofil jelleget mutat. A Fenton reakcióban a hidroxiláló ágens tehát a szabad gyökös hidroxil, amely elektrofil sajátságu és igy az elektrofil szubsztitució a homolitikus szubsztitucióra mintegy ráépül. Ezek az eredmények a korábbi vizsgálatokkal, amelyeket mono-szubsztituált aromásokon végeztek, egyezésben vannak /160/.

A kapott eredmények a Fenton-Cier r.-ben és az Udenfriend r.-ben is gyökös mechanizmusra utalnak. Amint az antranilsav hidroxi-izomerek eloszlása alapján /a 4-hidroxi-izomer arányát tekintve/ megállapithatjuk, az elektrofil jelleg a következő képpen csökken az egyes rendszerekben:

Fenton r.> Udenfriend r. > Fenton-Cier r.

A hidroxiláló ágens pontos természetére ezek a vizsgálatok nem adnak kielégitő választ. /főként elektronspin rezonancia tanulmányok szükségesek a kérdés eldöntéséhez./ Ezen eredmények azonban ellent mondanak Norman és Radda /76/ azon feltételezésének, hogy a Fenton-Cier r.-ben is hidroxil gyök hat, és ez a rendszer nem különbözik a Fenton r.-től. Az Ullrich és Staudinger által javasolt, a rendszerekben általánosan ható, atomos oxigén jelenléte nem kizárt, azonban ebben az esetben a rendszer egyéb komponenseinek hatása okozza az elektrofil jelleg különbözőségében mutatkozó eltérést.

Az indol hidroxiláció kvantitativ vizsgálata a fentiekkel összhangban álló eredményeket adott. /Az indolnál kifejezetten elektronegativ hely nincs a benzol gyürün/ A 3-szubsztituált indol származékoknál az elektron rendszer lényegében nem változik az indolhoz képest, mégis az 5- és 7-hidroxi származék dominál. Ennek egyik oka ezen vegyületek nagyobb stabilitása lehet.

Az ultraibolya besugárzási vizsgálatok szerint a leghatásosabb a Fe^{3+}, EDTA, pH 7,0 összetételü vizes oldat. A keletkezett termékek a OH gyök, mint hidroxiláló ágens termé-

szetének felelnek meg. A fenti rendszerektől eltérően az indol esetében jelentős mértékű indigó képződés figyelhető meg. Az indigó kondenzációs termék, amely 3-hidroxi-indol /indoxil/ vizes oldatában már levegő hatására képződik /161/. E szerint valószínű, hogy UV besugárzás hatására elsődlegesen 3-hidroxi-indól keletkezik, ami indigová kondenzál. A folyamat melléktermékeként képződő izatint is kimutattam.

2/ A vizsgált hidroxilálási folyamatok kapcsolata a triptofán anyagcserével

Részletesebben a közleményekben ismertettem /152,153/.

A triptofán-anyagcsere metabolitok között szerepel a triptofán, a β-indolecetsav, triptamin 5-hidroxi származéka. Direkt hidroxilálódást igazoltak triptofánnál /164/, triptaminnál, N, N-dimetil-triptaminnál, N-acetil-triptofánnál /162/ emlősöknél.

Kísérleti adataink ezen kérdéshez járultak hozzá, amennyiben a mellékvese inkubátum hidroxilező készségét mutattuk ki triptofánnál 5- és 7-es helyzetben. Érdekes továbbá az indol kismértékű hidroxileződése az inkubátumban 4-, 5-, 6- és 7-es helyzetben.

A triptofán anyagcsere még nem tisztázott része az antranilsav szerepe. Cholson és mts. /163/ in vivo kísérletei szerint emlősökben a kinurenin→3-hidroxi-kinurenin → 3-hidroxi-antranilsav ut a legfontosabb triptofán lebomlási ut, az 5-hidroxi-antranilsav nem keletkezik in vivo. Más kísérletek kimutatták közvetlen antranilsav → 5-hidroxi-antranilsav

átalakulást /164-167/ és a triptofán→kinurenin→antranilsav→ 5-hidroxi-antranilsav utat javasolták, azonban ez a lehetőség csak patologiásan áll fenn /168/. Mikroorganizmusokban az antranilsav-3-hidroxi-antranilsav átalakulás, valamint a katechollá való átalakulás is igazolt /169, 170/. Növényben ugyancsak van közvetlen 3-hidroxilálódás /171/.

Kisérleteimben kimutattam, hogy a mellékvese inkubátumban antranilsav → 3-hidroxi-antranilsav átalakulás történik, ami azért is érdekes, mert Otani /172/ szerint patkány mellékvesében az antranilsav nagy mennyiségben van jelen.

Általánosságban tehát a 3-hidroxi-antranilsav a normális metabolit, patológiásan azonban a máj és a mellékvese is képez 5-hidroxi-antranilsavat.

3/ Szteroidok hidroxilálása

A DEA hidroxilációját in vivo számos szerző vizsgálta és különböző szervek hidroxilációs készségét igazolták a szabad és a szulfát-származékokra is. Néhány példa: 16α-hidroxiláció patkány májban /173/, 16α-és 16β-hidroxiláció placentában és májban /174/, 7β-hidroxilálás májban, vesében, lépben, tüdőben, szivben, vérben, izomban in vitro /175, 176/, 16α- és 7α-hidroxilálódás bőrben /177/. A hidroxi származékok az androgének átalakulásainak közti termékei.

A végzett kisérletek ezen eredményekhez annyiban járultak hozzá, hogy a mellékvesében kismértékü 16α-hidroxilálódást igazoltam a dehidroepiandroszteronnál.

A kortikoszteroid bioszintézis egyik legérdekesebb kérdé-

se a 11β- hidroxiláció. Ez elsősorban a dezoxikortikoszteron→ kortikoszteron és a 17 -oxidezoxikortikoszteron /Reichstein S/ → kortizol átalakulásban játszik szerepet.

Mindkét folyamat a mellékvesében játszódik le. A Reichstein S 11β-hidroxilációját a következő kisérletekben igazolták. Intakt mellékvesében Nelson és mts. /178/, exstirpált mirigy perfuzálásával Hechter és mts. /179/ igazolták a reakciót. Mellékvese homogenizátummal Ginty és mts. /180/ végezték el a szintézist, Swaat igazolta, hogy a mitokondrium frakcióban játszódik le /181/. /Ezzel kapcsolatos adatok még: a 11β-hidroxilációt az A gyürü 4,5 redukciója csökkenti, a 6β -szubsztitució erősen gátolja, míg a 6α- csak kis hatásu /182/, a DEA és szulfátja gátol /183/,/

Kisérleteim ezeket az eredményeket megerősitik, amennyiben a Reichstein S 11β-hidroxilációját marha mellékvese inkubátumban kimutattam. A hidroxiláló hatás fokozott volt, ha az inkubátumban L-aszkorbinsavat, NADH-t és aszkorbinsav-oxidázt adtam. Egy ilyen összeállitásu rendszerben a kortizol képzés kvantitative megoldható. A fenti komponensek hidroxilációt növelő hatása azt is igazolja, hogy az aszkorbinsav szerepet játszik ezen folyamatban. Mint az elméleti részben utaltam rá, ez a szerep még nem ismert, azonban ezek az adatok is arra utalnak, hogy valószinüleg a koenzimek oxido-redukciós folyamatait segiti elő. Az aszkorbinsav-oxidáz szerepe az aszkorbinsav oxidáció elősegitése.

Az in vitro rendszerek általánosságban nem alkalmasak a

szteroid hidroxilálások elvégzésére. A korábbi ilyen vizsgálatok nem mutattak ki identifikált hidroxi-terméket /67, 66/. Lényegében véve csak a dehidroepiandrosztéron 16α- hidroxilációját sikerült kvantitative igazolni a Fenton-Cier és Udenfriend rendszerekben.

4/ Szteroid-szulfátok vizsgálata

Minthogy a vizsgált reakciók vizes közegben játszódtak le, célszerünek látszott vizoldékony szteroid vegyületekkel foglalkozni. Ezt alátámasztotta az is, hogy az élő szervezetben szulfát formában többféle átalakulás lejátszódik, igy a hidroxiláció is, amint erre az elméleti részben kitértem.

A szteroid-szulfát piridinium és nátrium sókat elég jó kitermeléssel /60-90 %/ és tiszta állapotban állitottam elő egyszerü eljárással. Irodalmilag a Reichstein S szulfátja nem volt még leirva az elkészitett vegyületek közül.

A szteroid-szulfátok-piridinium sójának kvantitativ meghatározására kidolgozott eljárás előnye, hogy rendkivül egyszerü és a szteroid-szulfátokra specifikus. A módszer felhasználható a biológiai objektumok szteroid-szulfátjainak mérésére.

Az UV besugárzás hatására megfigyelt Reichstein S-szulfát-Na só hidrolizise azért érdekes, mert egyébként a hidrolizis vizes közegben nem játszódik le ilyen hőmérsékleten.

Szteroid-szulfátok ultraibolya besugárzásával az irodalom még nem foglalkozott. A szabad szteroidok besugárzás hatására történő változását már vizsgálták. Igy kimutatták, hogy az ösztron 2-, 4-es hidroxi származékká alakul sugárhatására

/184/. A koleszterin az 5,6-os kettőskötésnél hidroxilálódik röntgensugár hatására, ugyanakkor a C7-es metilén csoport oxidálódik /185/. A kolsav 7α-hidroxilja 7-oxo-vá oxidálódik hasonló körülmények között /186/.

Részletesen csak a Reichstein S-szulfát-Na só besugárzását vizsgáltam a $FeCl_3$-as vizes közegben. A vékonyréteg kromatográfiás azonositás szerint az UV besugárzás hatására a kortizollal azonos kromatográfiás termék keletkezik. Ezt a származékot tovább vizsgáltam a kromatogramról való etanol: metanol /1:1/ oldószerrel való eluálás után. Minthogy azonban az eluálás előtt UV lámpa alatt történt a lekaparandó sáv kijelölése, az UV fény szabad szteroidra való hatása is felléppett, igy nem sikerült teljesen tiszta terméket eluálni. Mindazonáltal az UV fény hatására bekövetkező változások tendenciája megállapitható volt.

Az eluátum UV abszorpciós spektrumában a maximum értéke mintegy 15 nm-el a kisebb hullámhosszok irányába tolódott, ami a Δ^4-3-CO konjugáció bomlására mutat.

Felvettem a szteroid kloroformos oldatának infravörös spektrumát is. A spektrum a 39. ábrán látható. A hidroxi régióban /3400-3550 cm^{-1}/ a spektrum a kortizoléval azonos és eltér a Reichstein S-től. A kortizolnál ugyanis a hidroxi csucs nagyobb a 2900 körül jelentkező alapvázból származó rezgéseknél /CH_2, CH_3, CH vegyérték rezgések/, mig a Reichstein S-nél forditott a viszony. Ugyanakkor azonban a spektrum 1800 cm^{-1}-nél kisebb frekvenciáju részén eltérések vannak a Reichstein S és a kortizol egymás között hasonló spektrum részé-

től.

Az 1670 cm^{-1}-nél észlelt CO sáv a Reichstein S-nél és a kortizolnál a Δ^4-el való konjugáció miatt igen kifejezett. A konjugációban részt vevő C=C sáv 1620 cm^{-1}-nél jelentkezik. A 20-as ketocsoport sávja 1715 cm^{-1}-nél mutatkozik. A vizsgált terméknek hiányzik az 1670 cm^{-1}-es CO/konjugált/ sávja. Gyenge a C=C sáv és a 20-keto sáv is. Ez tehát azt mutatja, hogy a Δ^4-3CO konjugáció megszünt, mégpedig a 3-keto csoport eltünése miatt. Az igen gyenge 20-keto csoport sáv azt mutatja, hogy itt is változás történt. 3-hidroxi nem keletkezett, mert akkor 1050 cm^{-1}-nél /3 -hidroxi/, vagy 1000 cm^{-1}-nél /3 -hidroxi/ erős sáv lenne várható. Ugyanakkor egy egészen szokatlan sáv mutatkozik 1900 cm^{-1}-nél, ami a spektrumok nagy számát áttekintve, más szteroidoknál nem igen fordul elő. Ilyen frekvenciánál csak a C=C=C kötés nyel el.

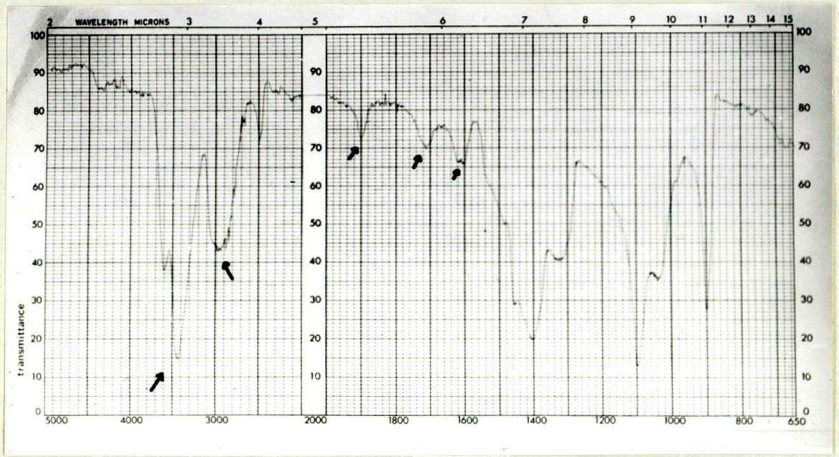
Egészében véve tehát megállapitható, hogy az emlitett körülmények között végzett UV besugárzás hatására a Reichstein S-szulfát-Na só egy, a kortizollal azonos kromatográfiás sajátságu terméket ad, amelynek pontos azonositását még nem végeztem el, de az infravörös spektrum alapján néhány jellemző változás megállapitható.

A felhasznált ultraibolya és infravörös spektroszkópiai irodalom /187-191/.

A Reichstein S különböző származékai esetében az UV besugárzási termékek eltérőek, amint ezt a kromatogrammokon

láthatjuk.

Ezek a kisérletek azt igazolják, hogy a szteroid-szulfátok ionizáló sugárzás hatására lejátszódó reakciói vizes közegben érdekes eredményekhez vezetnek és érdemes vizsgálatukkal foglalkozni.



39. ábra
Reichstein S-szulfát-Na vizes közegü UV besugárzási terméke

5/ Általános értékelés

Kisérleteim és az irodalmi adatok alapján a hidroxilációs folyamatokat alapvetően két csoportba sorolhatjuk: specifikus és nem specifikus folyamatok. Az előbbit specifikus hidroxilázok végzik, a szervezet természetes anyagcsere anyagain. Az utóbbiért vagy olyan enzimek felelősek, amelyek nem szubsztrát specifikusan is képesek hidroxilálni, vagy pedig olyan nem enzimatikus rendszerek, amelyek szubsztrát specificitás nél-

kül hidroxilálnak.

A vizsgált in vitro hidroxiláló rendszerek nem specifikus jellegüek. Ezen rendszerek a szervezetben folyó hidroxilációs folyamatok modeljeinek tekinthetők.

Ugyanakkor ezen rendszereket preparativ hidroxilálási folyamatok elvégzésére is felhasználhatjuk /pl.antranilsav,indol esetében/, másrészt speciális hidroxil vegyületek kis mennyiségben való előállitását végezhetjük el velük.

Általánosságban a homolitikus reakciók analógiába hozhatók az in vivo folyamatokkal, amint ezt az utóbbi időben több kisérlet megerősiti.

ÖSSZEFOGLALÁS

1/ In vitro kísérleteket végeztem nem specifikusan hidroxiláló rendszerek felhasználásával. Az alkalmazott rendszerek: a/ fizikai r. /ultraibolya sugárzás vizes közegben/, b/ kémiai r. /Fenton r., módosított Fenton r., Udenfriend r., Fenton-Cier r./, c/ biológiai r. /mellékvese inkubátum/.

A következő szubsztrátokat vizsgáltam: aromás /antranilsav/, indolvázasok /indol, L-triptofán, β-indolecetsav, etilgramin /, szteroidok /dehidroepiandroszteron, Reichstein S, ösztron /.

Az adott rendszerek esetében a következő reakciók voltak általánosak:

antranilsav → 3-, 4-, 5-, 6-hidroxi antranilsav

indol → 2-, 4-, 5-, 6-, 7-hidroxi-indol

L-triptofán → 4-, 5-, 6-, 7-hidroxi-triptofán

β-indolecetsav → 5-hidroxi-, 7-hidroxi-βindolecetsav

etilgramin → 4-, 5-, 6-, 7-hidroxi-etilgramin

dehidroepiandroszteron → 16α-hidroxi-dehidroepiandroszteron

Reichstein S → kortizol

Az egyes rendszerekben kvalitativ és kvantitativ különbségek is mutatkoztak.

2/ A hidroxi izomerek kvantitativ eloszlását az antranilsavnál és az indolnál vizsgáltam meg. Ezen adatok a reakciók

mechanizmusának jellegére nyujtottak felvilágositást.

3/ A hidroxi-etilgraminok előállitására preparativ eljárást alkalmaztam, amelyben az indol direkt hidroxilálhatóságát használtam fel.

4/ Néhány példát mutattam be ezen rendszerek felhasználására speciális hidroxi-származékok előállitásában /antranilsav, indol, dehidroepiandrosztéron esetében/.

5/ A kisérletek adatokat szolgáltatnak a triptofán és szteroid anyagcsere bizonyos részleteihez.

6/ Elkészitettem a kortizol-21-szulfátot, a dehidroepiandroszteron-3-szulfátot, az ösztron-3-szulfátot, valamint az irodalomban még le nem irt Reichstein S-21-szulfátot. Az alkalmazott eljárás a korábbi szintézisek előnyös lépéseit felhasználja és általánosan használható.

7/ Egy uj kvantitativ módszert dolgoztam ki a szteroid-szulfátok meghatározására, amely ezen vegyületek piridinium sóinak részel adott szintermékének spektrofotometriás mérésén alapul.

8/ Megvizsgáltam az ultraibolya fény hatását a vizes közegben oldott szteroid vegyületekre. Szubsztrátként a szteroid-szulfát-nátrium sókat használtam fel.

9/ Megállapitottam, hogy a szteroid-szulfát-Na sók UV fény hatására hidrolizist szenvednek a vizes közegben. Reichstein S-szulfát-Na só esetében mértem a hidrolizis sebességét.

Köszönetet mondok Dr. Matkovics Béla egyetemi docens urnak, aki munkámat mindvégig figyelemmel kisérte és értékes tanácsaival támogatta.

16/ Eckleu, M., Emmeric, A.: Biochem. J. 30 25/1936/

17/ Holtz, P.: Z.Physiol. Chem. 263 187/1940/

18/ Euler, H., Hasselquist, H.: Ark. Kemi. 5 112/1952/

19/ Sebrell, W.H., Harris, R.S.: The Vitamins 1954. Chap. 2. Acad. Press. N.Y.

20/ Bures, J.J., Burch, H.B., King, G.G.: J.Biol.Chem. 191 501/1951/

21/ Szalai, I.: Növényélettan, 1968, Tankönyvkiadó, Bp.

22/ Selye, H.: The Physiology and Pathology of Exposure to Stress. Montreal. Acta Endocrinologica

23/ Holtz, P., Trieu, G.: Z.Physiol. Chem. 248 5/1937/

24/ Lau, T.H., Sealock, R.: J.Biol. Chem. 155 483/1944/

25/ Karrer, P., Euler, H.V., Hellström, H.: Ars. Kemi.Mineralog. Geol. Ser.B. 11/6/1933/

26/ Oesterling, M.J.: Biochim. Biophys. Acta 24 178/1957/

27/ Aesh. O.K., Zaugg, W.S.; Vernon, L.P.: Acta Scandinavica 15 1629/1961/

28/ Vernon, L. P.: Acta Chemica Scandinavica 15 1639, 1651/1961/

29/ Hanaki, A., Ishidate, M.: Biochim. Biophys. Acta 57223/1962/

30/ Kaufman, H.J.: J.Am. Chem. Soc. 73 4311/1951/

31/ Udenfriend, S., Clarc, S.T., Axelrod, J., Brodie, B.B.: J. Biol. Chem. 208 731/1954/

32/ Brodie, B.B., Axelrod, J., Shore, P.A., Udenfriend, S.: J.Biol. Chem. 208 741/1954/

33/ Maume, G.M., Horning, E.C.: Tetrahedron Letters 5 343/1969/

34/ Fendler, J.H., Gasowski, G.L.: J.Org.Chem. 33 1865, 2755/1968/

35/ Gräsalin, D., Merger, F., Schulte, D., Volkert, O.: Chem.Ber. 100 3077/1967/

36/ Merger, F., Grüsslin, D.: Angewandte Chemie 76 752/1964/

37/ Johnson, G.R.A., Stein, G., Weiss, J.: J.Chem. Soc. 3275/1951/

38/ Wheeler, D.A., Montalvo, K.: Internat. J.of Appl. Rad. and Isotopes. 18 127/1969/

39/ Keller, M., Weis, J.: J. Chem. Soc. 2704/1950/

40/ Keller, M., Weis, J.: J. Chem. Soc. 25/1951/

41/ Stein, G., Weiss, J.: J.Chem. Soc. 3245, 3254/1949/

42/ Arnow, L.E.I.: J.Biol.Chem. 110 43/1935/

43/ Holtz, P., Credner, K.: Arch. Exp. Pathol. Pharmacologie 202 150/1943/

44/ Arnow, L.E.: J.Biol. Chem. 120 151/1937/

45/ Arnow, L.E.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49 578/1942/

46/ Susutani, E.: Nagasaki Igakkai Zasshi 33 507/1958/

47/ Matsuda, G., Maekowa, T., Ohkowa, I., Yamada, M.: Nagasaki Igakkai Zasshi 29 10/1954/

48/ Bates, H.G.C., Evans, M.G., Uri, N.: Nature 166 869/1950/

49/ Baxendale, J.H., Magee, J.: Trans Faraday Soc. 51 205/1954/

50/ Bates, H.G.C., Uri, N.: J.Am. Chem. Soc. 75 2754/1953/

51/ Boyland, E., Sims, P.: J.Chem. Soc. 2967/1953/

52/ Halfpeenny, E., Robinson, P.L.: J.Chem. Soc. 928, 939/1952/

53/ Yamasaki, H., Cvetanovic, K.J.: J.Chem. Phys. 41 3703/1964/

54/ Fenton, H.J.H.: J.Chem. Soc. 65 899/1894/

55/ Eich, E., Rochelmeyer, H.: Pharmaceutica Acta Helvetiae 41 1 09/1966/

56/ Loebl, H., Stein, G., Weis, J.: J.Chem. Soc. 2074/1949/

57/ Albrecht, W.: "Oxydations Reaktionen mit Feriin und Fentons Reagens", Dissertation, Tütingen, 1968.

58/ Breslow, R., Lukens, L.: J.Biol. Chem. 235 292/1968/

59/ Nofre, C., Cier, A., Michou-Saucet, L., Parnet, J.: C. R. Acad. Sci. 251 811/1960/

60/ "Biological and Chemical Aspects of Oxygenases" Proc. of Japan Symposium on Oxygenases Ed. Bloch, K., Hayaishi, O., Tokyo p.235.

61/ Kartasheva, L., Pikaev, A.K.: Proceeding of the second Tihany Symposium on Radiation Chemistry, 1967. Bp. p.399.

62/ Huber, F., Weiss, J.: Proc. Roy. Soc. A 147 332/1934/

63/ Williams, G.H.: Homolytic Aromatic Substitution 1960. Pergamon Press, N.Y.

64/ Cier, A., Nofre, C.: Bull. Soc. Chim. France 1523/1959/

65/ Chvapil, M., Hurych, J.: Nature, 184 1145/1959/

66/ Cier, A., Nofre, C., Reval, A.: C.R. Acad.Sci. 274 542/1958/

67/ Keston, A., Carsiotis, R.: Arch. Biochem. 52 282/1954/

68/ Matkovics, B., Göndös, Gy.: Biol. Közl. 15 23/1967/

69/ Hanaki, A., Ischidate, H.: J.Biol. Chem. 50 519/1961/

70/ Hamilton, G.A., Friedman, J.P., Campbell, P.M.: J.Am. Chem. Soc. 88 5266/1966/

71/ Hamilton, G.A., Hanifin, J.W., Friedman, J.P.: J.Am.Chem. Soc. 88 5269/1966/

72/ Hamilton. G.A., Giacin, J.R.: J. Am. Chem. Soc. 88 1584/1966/

73/ Euler, H., Hasselquist, H.: Z.Physiol.Chem. 303176/1956/

74/ Hamilton, G.A., Workman, R.J., Woo, L.: J.Am.Chem.Soc. 86 3390/1964/

75/ Hamilton, G.A.: J. Am. Chem. Soc. 86 3392/1964/

76/ Norman, R.O.C., Radda, G.K.: Proc. Chem.Soc. 138/1962/

77/ Norman, R.O.C., Smith, J.R.L.: "Oxidases and Related Redox Systems" Ed.King, T., Mason, H.S., Morrison, M.: Wiley N.Y./1965/

78/ Staudinger, H., Ullrich, V.: Zeitschr. f. Naturforsch. 19b 877/1964/

79/ Kimura,T: ld.60. irod., p. 179

80/ Suruki, K., Kimura, T.: Biochem, Biophys. Res. Commun 19 340/1965/ és 20 373/1965/

81/ Omura, T., Sato, R.: J.Biol.Chem. 239 2370/1964/

82/ Sato, R.: ld. 60. irod., p. 195.

83/ Miyake, Y., Mason, H.S., Landrof, W.: ld. 60. irod., p. 227.

84/ Smith, J.N., Williams, R.T.: Biochem, J.: 42 538/1948/

85/ Omura, T., Sato, J.: J. Biol. Chem. 237 PC 1375/1962/

86/ Staudinger, H.: Fourth International Congress of Biochemistry Vol. IV. Biochemistry of Steroids.

87/ Koritz, S.B., Péron, F.G.: Biosynthesis of Steroid Hormones, Session VIII. No. 353/1960/

88/ Mc.Donald, P.C., Chapdelaine, A., Gonsales, O., Gurpide, E., Vande Wiele, R.L., Lieberman, J.: J.Clin. Endocrinol. Metab. 25 1557/1965/

89/ Baulieu, E.E.: J.Clin. Endocr. Metab. 22 501/1962/

90/ Baulieu, E.E.; Recent Progr. Hormone Res.Discussion 19 306/1963/

91/ Klein, G.P., Giroud, C.J.P.: Steroids 5 765/1965/ és 9 113/1967/

92/ Wallace, E.J., Lieberman, S.: J.Clin. Endocr. 23 90/1963/

93/ Roy, A.B.: Biochem. J.63 294/1956/

94/ Nose, Y., Lipman, F.: J. Biol. Chem. 233 1348/1958/

95/ Mc Kenna, J., Rippon, A.E.: Biochem. J. 95 107/1965/

96/ Kornel, L.: Biochemistry 4/3 444/1965/

97/ Ryan, K.: J. Biol. Chem. 234 268/1959/

98/ Warren, J.C.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 22 1148/1962/

99/ Payne, A.H., Mason, M.: Steroids, 13/2 213/1969/

100/ Jacobsohn, G.M., Levenberg, D.: Steroids 4/1 849/1964/

101/ Lieberman, S., Calvin, H.I., Vande Wiele, R.L.: Biochem. 2 648/1963/

102/ Nose, Y., Lipman, F.: J. Biol. Chem. 233 1348/1958/

103/ Chu, T.M., Slounwhite, W.R.Jr.: Steroids 12/3 311/1968/

104/ Levitz, M.: Steroids 1 117/1963/

105/ Mumma, R.O., Hoiberg, C.P., Weber, W. W.: Steroids 14/1 67/1969/

106/ Dusza, J.P., Joseph, J.P., Bernstein, S.: Steroids 12 49/1968/

107/ Sobel, A.E., Spoerri, P.E.: J.Am.Chem.Soc. 63 1259/1941/

108/ Kornel, L., Kleber, J.W., Conine, J.W.: Steroids.4/1 67/1964/

109/ Baulieu, E.E., Emiliozzi, R.: Bull. Soc. Shim. Biol. 44 823/1962/

110/ Butenandt, A., Hofstetter, H.: Z. Physiol. Chim. 259 222/1939/

111/ Kirdani, R.Y.: Steroids 6/6 845/1965/

112/ Lieberman, F., Dobriner, K.: Recent. Progr. in Hormone Research 3 71/1948/

113/ Migeon, C. J., Plager, J.E.: J. Biol. Chem. 209 767/1954/ és J.Clin. Endocrinol. Metab. 15 702/1955/

114/ Burstein, S., Lieberman, S.: J.Biol. Chem. 233 331/1958/

115/ Kornel, L.: J.Clin.Endocr. Metab. 23/7 1192/1963/

116/ Kornel, L.: Biochemistry 4/3 444/1965/

117/ Mc Kenna, J., Norymbersky, J.K.: Biochem. J. 76 60p/1960/

118/ Eberlein, W.R.: J. Clin. Endocr. Metab. 22/7 963/1962/

119/ Roy, A.B.: Biochem. J. 62 41/1956/

120/ Notation, A.D., Hugar, F.: Steroids 14/2 151/1969/

121/ Lieberman, S., Hariton, L.B., Fukushima, D.K.: J. Am. Chem. Soc. 80 5235/1958/

122/ Lieberman, S., Dobriner, K.: Recent. Progr. in Hormone Res. 3 71/1948/ b/ Lieberman, S., Mond, B., Smyles, E.: Recent Progr. in Hormone Res. 9 113/1954/

123/ Bitman, J., Cohen, S.L: J. Biol. Chem. 179 455/1949/

124/ Grant, G.L. Beall, D.: Recent Progr. in Hormone Res. 5 307/1950/

125/ Cohen, S.L., Oneson, L.B.: J.Biol. Chem. 204 245/1953/

126/ Burstein, S., Lieberman, S.: J.Am. Chem. Soc. 80 5235/1958/

127/ Mc Kenna, J., Norymberski, J.K.: J.Chem. Soc. 3889/1957/

128/ Brauchaud, C., Schweitzer, M., Giraud, C.J.P.: Steroids. 14/2 179/1969/

129/ Bush, I.E.: Biochem, J. 50 370/1952/

130/ Baulieu, E.E.: J.Clin. Endocrin. 22 501/1962/

131/ Kornel, L.: J. Clin. Endocrin. Metab. 24 956/1964/

132/ Mickan, H., Dixon, R., Hochberg, R.B.: Steroids 13/4 477/1968/

133/ Hobkirk, P., Musey, P., Nilsen, M.: Steroids 14/2 191/1969/

134/ Laátikainen, L, Vihko, R.: Steroids 14/2 119/1969/

135/ Zimmermann, W.: Z. Physiol. Chem. 233 257/1935/

136/ Corker, G., Norymberski,J.K., Thow, R.: Biochem. J.83 583/1962/

137/ Porter, C.C., Silber, R.H.: J.Biol. Chem. 185 201/1950/

138/ Kornel, L.: Anal. Biochem. 7 345/1964/

139/ Stornes, W. R., Parthow, M.C., Grammer, M., Kornel, L., Hill, S.R.: Anal. Biochem. 6 82/1963/

141/ Barton, G., M., Evans, R.S., Gardner, J.A.S.; Nature 170 249/1952/

142/ Schneider, J.J., Lewbart, M.L.: J.Biol. Chem. 222 787/1956/

143/ Vlitos, A.J.: Contr. Boyce Thompson Inst. 17 127/1953/

144/ Sweat, M.: J.Am.Chem. Soc. 13 4056/1951/

145/ Tauber, H., Kleiner, I.S., Mishkind, A.: J.Biol.Chem. 110 211/1935/

146/ Horecker, B.L., Kornberg, A.: J. Biol. Chem. 175 385/1948/

147/ Stolt, L., Sourmound, B.C., Naute, W.Th.: Rew. Trav. Chimi. 71 509/1952/

148/ Sheehan, J. T.: J.Am.Chem. Soc. 70 1665/1948/

149/ Tomson, A.J., Horwitz, J.P.: J.Org. Chem. 24 2056/1959/

150/ Niederl, J.B., Vogel, H.J.: J. Am. Chem. Soc. 71 2566/1949/

151/ Matkovics, B., Marián, M.: Kisérletes Orvostudomány 21 52/1969/

152/ Marián, M.: IX. Biokémiai Vándorgyülés Kiadványa, 1968. Veszprém, 54. előadás.

153/ Matkovics, B., Marián, M.: X. Biokémiai Vándorgyülés Kiadványa, 1969. Esztergom, 26. előadás.

154/ Marián, M., Matkovics, M.: Magyar Farmakológiai Társaság Ülése, Kiadványa, 1969. Budapest, /nyomás alatt/

155/ Ek, A., Witkop, B.: J.Am. Chem. Soc. 76 5579/1954/

156/ Beer, J.S., Clarke, K., Khorana, H.G., Robertson, A.: J.Chem. Soc. 1605 /1949/

157/ Levitz,M.: Steroids 1 117/1963/

158/ Horning, E.C., Sweely, C.C., Dalgliesh, L.E., Kelly, W.: Biochim. Biophys. Acta. 32 566/1959/

159/ Ek, A., Kissman, H., Patrick, J.B., Witkop, B.: Experientia 8 36/1952/

160/ Loebl, H., Stein, G., Weiss, M.: J.Chem. Soc. 2074/1949/ és 2704/1950/

161/ Fodor, G.: Szerves kémia II., 1960. Tankönyvkiadó Bp. p. 1407

162/ Jaccaini,A., Jepson,J.B.: Specialia 15 29/1968/

163/ Cholson, R.K., Hankes, L.V., Henderson, L.M.: J.Biol.Chem. 235 132/1960/

164/ Kotake, Y., Shirai, Y.: Z.Physiol. Chem. 295 160/1953/

165/ Hagikara, F., Okazaki, Y.: J. Pharm.Soc., Japan, 76 362/1956/

166/ Kashiwamata, S.: Seikaguku 36 317/1964/

167/ Hatake, Y., Katakate, Y., Jr.:Biochim.Biophys. Acta 113 244/1966/

168/ Inoue, A.: Wakayama Med.Rept. 2 19/1951/

169/ Terui, G., Enatsu, T., Okazaki, G.: Hakko Kogaku Zasshi 39 736/1961/

170/ Taniuchi, H., Hatanaka, M., King, S.: J.Biol. Chem. 239 2204/1964/

171/ Nair, P.M., Vaidyanathon, C.S.: Biochim. Biophys. Acta 110 521/1965/

172/ Otani, M.: Wakayama, Med.Rept. 8 333/1957/

173/ Colás, A.: Biochem. J. 82 390/1962/

174/ Slaunwhite, W.R., Karsay, M.A., Hochner, A.: Steroids, Suppl. 2 211/1965/

175/ Sulcova, J., Stárka, L.: Experientia 19 632/1963/

176/ Heinrichs, W. R., Müchen, R.L., Colás, A.: Steroids 9/1 23/1967/

177/ Faredin, I., Fazekas, A., Kókai, K., Tóth, T., Julesz,M.: Eur. J. Steroids 2 223/1967/

178/ Nelson, D.H., Reich,H., Samuels, L.T.: Science 111 578/1950/

179/ Hechter, O., Jacobson, R.P., Jeanloz, R.: Arch. Biochem. 25457/1950/

180/ Ginty, D.A., Smith, C.M, Wilson, M.C., Worsel, C.S.: Science 112 506/1950/

181/ Swead, M.: J.Am.Chem. Soc. 13 4056/1951/

182/ Meyer, A.S.: Biochim, Biophys. Acta 24 1435/1955/

183/ Sharma, D.C., Forchielli, E., Dorfman, R.I.: J.Biol.Chem. 238 572/1963/

184/ Wheeler, D.A., Montalvo, R.: Internat. J.of. Appl. Rad. and Isotopes 18 127/1967/

185/ Keller, M., Weis, J.: J. Chem. Soc. 2704/1950/

186/ Keller, M., Weis, J.: J. Chem. Soc. 25/1951/

187/ Schwarz, J.C., P.: Fizikai Módszerek a szerves kémiában 1968. Műszaki Kiadó, Bp.

188/ Holly, S., Sohár, P.: Infravörös spektroszkópia, 1968. Műszaki Kiadó Bp.

189/ Roberts, G., Gallegher, B.S., Jones, R.N.: Infrared. Absorption Spectra of Steroids 1958. N.Y.

190/ Jones, R.N., Herling, F.: J.Org. Chem. 19 1252/1954/

191/ Savard, K.: Rec. Prog. Hormone Res. 9 185/1954/

T A R T A L O M

BEVEZETÉS	1
I.ELMÉLETI RÉSZ	2
1/Biológiai hidroxilációs folyamatok	2
2/In vitro hidroxiláló rendszerek	4
3/Szteroid-szulfátok	13
II.KISÉRLETI RÉSZ	23
A/Anyagok	23
B/A hidroxiláló rendszerek összeállitása	23
C/Összehasonlitó anyagok szintézise	26
D/A szteroidok szulfát észtereinek készitése	28
E/Kvantitativ módszer a szteroid-szulfátok mérésére	34
F/A Reichstein S-szulfát hidrolizis sebességének mérése	44
III.EREDMÉNYEK	46
1/Aromás vegyületek	46
2/Indolvázas vegyületek	47
3/Szteroidok	53
IV.AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	58
ÖSSZEFOGLALÁS	70
IRODALOM	73

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED