

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***ANTIHIPERGLIKAEMIÁS SZEREK TERVEZÉSE ÉS
VIZSGÁLATA A GLIKOGÉN FOSZFORILÁZRA HATÓ
INHIBITOROKKAL***

Docsa Tibor

Témavezető: Dr. Gergely Pál, akadémikus



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2011

Antihyperglycaemic agents: design and evaluation of glykogen phosphorylase inhibitors

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Docsa Tibor okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Gergely Pál, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Buday László, az MTA doktora
Dr. Gyémánt Gyöngyi, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. január 25.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Buday László, az MTA doktora
Dr. Gyémánt Gyöngyi, Ph.D.
Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. január 25. 13:00

DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

A cukorbetegség (*diabetes mellitus*) genetikai és környezeti tényezők együttes hatására alakulhat ki anyagcserezavarok és érrendszeri szövődmények képében. Az anyagcserezavart a hiperglikaemia okozza, ami együtt jár a fehérje- és zsíryanycsere, valamint a só-víz és sav-bázis háztartás zavaraiival. A magas vércukorszintet az inzulin hiánya vagy a meglévő inzulin hatástalansága okozza, aminek a következtében a glükóz nem képes belépni a szövetekbe. A szöveti glükózhány következményeként felgyorsulnak a glükoneogenetikus folyamatok. A kialakult hiperglikaemia a csökkent glükóz felhasználás és a fokozódó glükoneogenezis együttes eredménye. A diabétesz további tünete a poliuria, polydipszia, tömegvesztés, emelkedett szérumsírsav-szint és ketoacidózis.

A cukorbetegség és szövődményei Európában és Észak-Amerikában a népesség több mint 3 %-át, világszerte mintegy 285 millió embert érintenek, melynek előfordulását 2030-ra 400-500 millióra prognosztizálják. Az Egészségügyi Világszervezet (1985) osztályozásának ajánlása alapján a diabétesznek 2 fő típusát különböztetjük meg: az *inzulin-függő diabetes mellitust* és a *nem inzulin-függő diabetes mellitust*.

Az I. típusú diabétesz: inzulin-függő diabetes mellitus (IDDM) a β -sejtek autoimmun eredetű szelektív és progresszív sejtpusztulása, a folyamat mindaddig tart, amíg a β -sejtek teljesen el nem pusztulnak és az inzulinszekréció megszűnésével kialakul az inzulinhiány. Megjelenése a fiatalkorra jellemző. Szerepe lehet meghatározott HLA-antigén típus meglétének. A statisztikai adatok szerint a HLA-DR3 és a HLA-DR4 típusú hisztokompatibilitási antigének jelenléte esetén gyakoribb a diabétesz. Kialakulásában szerepe lehet egyes vírusfertőzéseknek is (pl. mumpsz, influenza, Coxsackie 4B, CMV). A vírusok lehetnek direkt β -sejt károsító hatásúak, vagy megváltoztathatják a sejtek antigén struktúráját, ami neoantigénként aktiválja az immunrendszert. Terápiája a naponta többszöri inzulininjekcióval, testmozgással és szigorú diétával lehetséges.

A II. típusú diabétesz: nem inzulin-függő diabetes mellitus (NIDDM) lényege, hogy a hiperglikaemia részben az inzulin szekréció csökkent voltának és/vagy a

perifériás sejtekben az inzulinhatás csökkenésének (inzulinrezisztencia és/vagy inzulinantagonisták) eredője. Zsírsejtekben, a májban és az izomban már a betegség korai szakaszában inzulinrezisztencia mutatható ki, melynek eredményeként fokozódik az inzulintermelés. A korán jelentkező inzulinhiány először kompenzatórikus hiperinzulinaemiát, majd csökkent hormontermelést idéz elő. A kórkép kialakulásában örökletes és környezeti tényezők játszanak szerepet. Az életmód változtatáson alapuló terápia (diéta, testsúly csökkentése, rendszeres testmozgás) a betegség kezdeti szakaszában igen hatásosan befolyásolja a vércukorszintet. Amikor a vércukorszint ily módon már nem állítható be, orális antidiabetikumok alkalmazása válik szükségessé, illetve az újabb terápiákban a betegséget hipoglikaemiás gyógyszerek mellett orális hipolipidaemiás gyógyszerek együttes adásával kezelik. A betegség nem-inzulinfüggő formája (II. típusú diabétesz) a betegek ~75 %-ában jelenik meg. Ezekben az esetekben az inzulin nem fejt ki szokásos hatásait, azaz a glükóztermelés csökkentését a májban, illetve a glikogénszintézis serkentését az izmokban. Egyes felmérések szerint az Egyesült Államokban a diabétesz a 2000 után születettek kb. harmadát fogja érinteni és megközelítően 90% tekinthető II. típusú diabéteszes betegnek. Ha a betegséget elhanyagolják, diabetikus komplikációk léphetnek fel. Akut szövődményként hipoglikaemia, ketoacidotikus kóma, tejsavacidózis alakulhat ki. Késői szövődmény a neuropátia, a diabéteszes mikroangiopátia és szervi károsodások.

Mivel a diabétesz legjellemzőbb tünete a vércukor rendellenesen magas szintje, a terápia legfontosabb célja a vérplazma glükóz-koncentrációjának megfelelő szinten tartása.

A hiperglikaemia orális antidiabetikumokkal kezelendő. A kezeléshez feltétlenül biztonságosabb és hatékonyabb terápiák bevezetése szükséges. A glikogén foszforiláz (GF) a II. típusú diabétesz gyógyításában az egyik, nemrég felismert lehetséges célmolekula, mivel az enzim alapvető szerepet játszik a máj glikogénanyagcserében és így a vércukorszint szabályozásában. Az értekezésben a foszforilázhoz specifikusan kapcsolódó új glükózszármazékok gátlóképességét vizsgálva *in vitro* és *in vivo* rendszerekben tanulmányozzuk a hatékony inhibitorok antihyperglikaemiás hatását. Az egyik inhibitorvegyületet vizsgáljuk a glikogén metabolizmusra fiziológiai körülmények között is a diabétesz kezelésére való potenciális alkalmazhatóság feltérképezésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A hiperglikaemia a II. típusú cukorbetegségben szenvedőknél elsősorban orális hipoglikaemiás szerek adásával befolyásolható. A máj glükóztermelését komplex enzimrendszer szabályozza, amelynek egyik legfontosabb enzime a GF. A glikogén metabolizmusban betöltött központi szerepe miatt a GF-re ható molekulák a gyógyszertervezésben jelentős figyelmet kapnak. Az enzim térszerkezete ismeretében a fehérje–ligandum kölcsönhatás sajátosságai jól vizsgálhatóak, ami elősegíti hatékony antihiperglikaemiás szerek kifejlesztését. A molekulák tervezésekor ismert GF-inhibitor komplexek röntgen-kristallográfiával nyert, finomított szerkezetét vettük alapul.

Az értekezésben bemutatott vizsgálatok egyik célja az alábbiakban fogalmazható meg.

- Ismert szerkezetű glükózszármazékok hatása a GF katalitikus aktivitására. Az újonnan szintetizált vegyületek gátlóképességének meghatározása tisztított nyúl vázizom és máj foszforiláz enzimekkel. A gátlási adatok összehasonlítása az enzim aktív (GFa) és inaktív (GFb) formáira.
- A gátlási adatok kinetikai analízise: K_i , és/vagy IC_{50} meghatározása.
- A glükózszármazékok szerkezetének és gátlóképességének összehasonlítása.

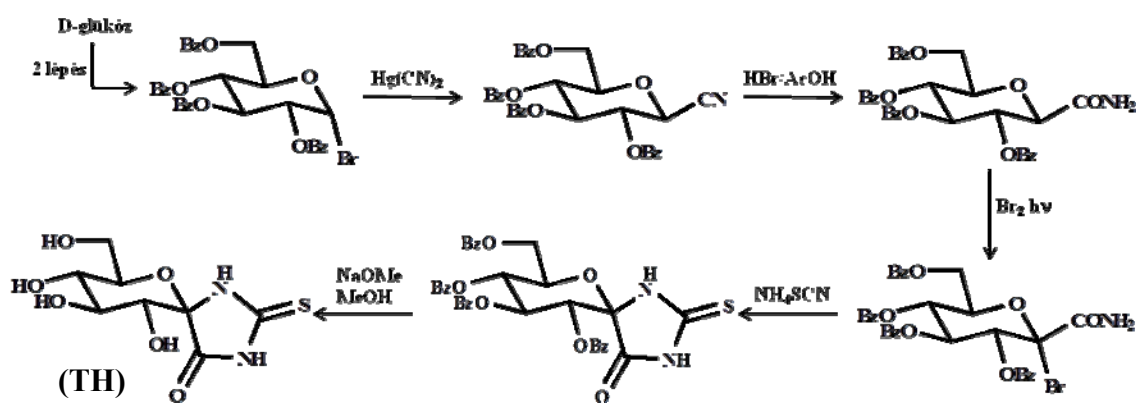
A viszonylag jelentős mennyiségben előállítható és jó gátlási tulajdonságokkal rendelkező vegyülettel állatkísérletek végzése a molekula antihiperglikaemiás tulajdonságainak megismeréséhez.

- Wistar patkányok májában a glikogénanyagcsere tanulmányozása vércukorszint, májglikogén-koncentráció meghatározása; GF és glikogén szintetáz (GS) enzimek aktivitásának mérése, a két enzim defoszforilációjában bekövetkező latencia tanulmányozása a vegyület jelenlétében.
- Diabétesz modellek (sztreptozotocin-indukált és spontán diabéteszes Zucker patkányok) alkalmazása a vegyület vizsgálatában.
- A TH hatásának a vizsgálata diabéteszes állatokban a plazma inzulinszintjére és az állatok inzulinszenzitivitására.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH)

Az első jó gátlási állandóval ($K_i < 10 \mu\text{m}$) rendelkező glükózalapú GF gátlószer a glükopiranozilidén-spiro-hidantoin. Somsák László és munkacsoportja a vegyületben egy O atom S atomra cserélésével az előzőhöz hasonló gátlási állandóval rendelkező molekulát szintetizált. Ennek a tioszármazéknak az előnye, hogy a szintézise egyszerű és sztereoszelektív, hét lépésen keresztül történik szabad cukorból (1. ábra).



1. ábra. A tiohidantoin kémiai szintézise

Glikogén foszforiláz gátlószer vizsgálat: K_i és IC_{50} meghatározása

A vizsgált vegyületek (lehetséges GF inhibitorok) gátlási állandóinak meghatározásához a Lineweaver-Burk féle ábrázolást és a belőle származtatott másodlagos ábrát használtuk. A feltevésünk az volt, hogy a glükózból szintetizált molekulák a GF-hez kötődnek követve a Michaelis-Menten kinetikát. A Michaelis-Menten egyenlet egy hiperbola, amelyből az enzimek reakció maximális sebessége (V_{max}) és a Michaelis-Menten (K_m) állandó meghatározható. Az állandók grafikus meghatározásának egyik lehetősége az eredeti egyenlet linearizálása, az úgynevezett Lineweaver-Burk ábrázolás. Ha az enzimek reakció sebességét több különböző inhibitor- és szubsztrátkoncentrációnál is megmértük, akkor a linearizált Lineweaver-Burk ábrázolásnál is több egyenest kapunk a gátlószer többféle koncentrációjának megfelelően. Az így kapott egyenesek meredekségét a hozzájuk tartozó

inhibitor-koncentráció függvényében ábrázolva egy új görbét kapunk, amelynek az x-tengely metszete adja a gátlási állandót (K_i). A mérési adatok számítógépes kiértékelésével (GraphPad Prism) határoztuk meg a gátlási állandókat.

Olyan vegyületek esetén, amelyek még nagy koncentrációban sem gátolják jól a GF enzimet a maximálisan elérhető gátlás 50 %-ának (IC_{50}) a meghatározása az elterjedt módszer. A mérés lényege azonos a K_i meghatározásával, a különbség annyi, hogy az IC_{50} meghatározásához egyetlen szubsztrátkoncentráció mellett változtatjuk az inhibitor koncentrációját és az 50 %-os reakciósebességhez szükséges gátlószer koncentrációját nevezzük IC_{50} -nek.

Enzim-ligand kölcsönhatás vizsgálata röntgenkristallográfiával

A nyúl vázizom natív T-állapotú GFb kristályokat együttműködő partnerünk kutatócsoportja (National Hellenic Research Center, Athén, Görögország) állította elő. A GFb-inhibitor komplex létrehozásához egy vékony falú kapilláris csőben a GFb kristályokat 100 mM koncentrációjú inhibitor tartalmú pufferben áztatták 1,5-3,5 óráig. A GFb-inhibitor komplex röntgenkristallográfiás adatait Hamburgban X-31 sugárnyaláb használatával gyűjtötték ($\lambda = 1,05-1,97 \text{ \AA}$). A módszer lehetővé tette, hogy a maximális felbontás elérje a 2,26 \AA értéket is. Az így kapott adatokat a SYBYL (Tripos Associates Inc., St Louis, MO, USA) program segítségével értékelték ki. Munkacsoportunk megkapta az elektrondenzitás adatokat, valamint a fehérjeszerkezet és a gátló ligand térbeli koordinátáit is. Az enzim-ligand kölcsönhatásokat közösen értékeltük.

Állatkísérleti módszerek

220-250 g súlyú hím Wistar patkányokat (Charles River Magyarország Kft.) kontrollált körülmények között tartottunk (26°C, 50–70 % páratartalom, 12 óras világos/sötét ciklus, víz-étel állandóan elérhető volt számukra) az Élettudományi Épület állatházában. A különböző vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottságának engedélyével rendelkezünk (29/2007 DE MÁB).

Hím Wistar patkányokban a diabéteszt egyszeri intravénás sztreptozotocin (50 mg/kg testsúly) izoozmotikus koncentrációjú injekcióval váltottuk ki.

24 tetszőlegesen kiválasztott állatot sztreptozotocinnal kezelve STZ-indukált diabéteszt hoztunk létre. Tíz hét elteltével a csoportot két részre osztottuk, az egyik állatcsoport egyedeibe inzulin implantátumot (Linplant[®], LinShin Inc. Kanada) ültettünk az altatott állatok nyakának hátsó részébe a bőr alá.

A ZDF/Gmi-fa-fa (ZDF) állatokban a születés utáni 7-10. hétben alakulnak ki a diabétesz tünetei. Ellentétben más diabéteszes modellekkel a ZDF állatok kevésbé elhízottak, de inzulinra érzékenyebbek.

Májselet minták feldolgoása

A feldolgozás minden műveletét 0-4°C között végeztük. A májszeleteket jéghideg fiziológiás sóoldattal (0,9% NaCl-oldat, pH= 7,4) leöblítettük, megmértük és 2 térfogat 40 mM Tris-HCl (pH= 7,4), 0,1% β -merkaptotanol, 250 mM szacharóz, pufferral teflon Potter-Elvehjem csőben homogenizáltuk. A homogenizátumokat centrifugáltuk (10000xg, 5 perc) és a felülúszót üvegyapoton átszűrtük. A szűrletből GF és GS aktivitást határoztunk meg.

Inzulinrezisztencia mérése glükóz-clamp módszerrel

A kísérletet a korábbiakban leírt állatcsoportokon végeztük. A vércukorszint és a plazma inzulinszint meghatározásához a szükséges vérmennyiséget a kísérlet előtt vettük le. Az állatoknak inzulininfúziót adagoltunk (Humulin R[®], Eli Lilly, Indianapolis, USA), az inzulinnal párhuzamosan 20 % glükózinfúziót adagoltunk úgy, hogy a normálglikaemiás vércukorszint ($5,5 \pm 0,5$ mM) fennmaradjon. A vérmintákat a szív artériájába preparált kanülön vettük a kísérlet első 80 percében 5 percenként, ezután 10 percenként. A plazma inzulinszint meghatározásához a vérmintát az inzulininfúzió adagolása előtt vettük le és a plazma preparálása után plazmát a későbbi inzulinkoncentráció meghatározásáig -70°C-on tároltuk. Az állandó vércukorszint fenntartásához szükséges glükózinfúzió sebességéből (mg glükóz/kg/perc) következtettünk az állat inzulinérzékenységére. A plazma inzulinszint mérése HTRF[®] Insulin Assay kit (Cisbio Bioassays, USA) segítségével történt, ami két monoklonális antitestet használ és kis inzulinkoncentrációk meghatározására is alkalmas.

Mérési adatok kiértékelése

A GF gátlási vizsgálatoknál minden mérési ponthoz legalább 3 párhuzamos aktivitásmérést végeztünk. A gátlást az átlag értékkel adtuk meg, ahol csak az átlagot tüntettük fel, abban az esetben a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. Az állatkísérleti módszereknél 3-5 mérési adatot használtunk fel a statisztikai adatok számításához, amelyhez Microsoft Excel programot alkalmaztunk. Az adatokat átlag \pm SD értékkel adjuk meg, a szignifikanciát *t*-próbával számolva. A különböző kísérleti csoportok adatait a *t*-próba varianciaanalízisével végeztük. Adataink normáloszlását is

ellenőriztük. A varianciaanalízisnél a rögzített faktor hatásvizsgálatára lefuttatott *f*-próba azonos volt a páros *t*-próba próbastatisztikájának elemzésével.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Glükózszármazék vegyületek szerkezet – gátlás vizsgálata

A GF aktív centrumára ható inhibitorok közül az egyik leghatékonyabbnak bizonyult a tiohidantoinhoz kapcsolt glükózszármazék a TH, amit sztereoszelektíven és nagy mennyiségben is sikerült előállítanunk. A röntgenkrisztallográfiás adatok alapján igazoltuk, hogy a TH a nyúl vázizom GFb aktív centrumához kötődik és ott számos intermolekuláris kölcsönhatás segítségével kapcsolódik és stabilizálódik a környezetében található aminosav-oldalláncokkal. Ezek a kölcsönhatások az enzim inaktív T állapotát, valamint harmadlagos szerkezetét csak kis mértékben befolyásolják. A TH összeségében 15 H-kötéssel és 67 van der Waals kölcsönhatás segítségével stabilizálódik az enzim aktív centrumában. A TH a GFb enzimhez kötődve az inaktív T-állapotot stabilizálja és megakadályozza, hogy a T→R átalakulás során a 280-as hurok megnyíljon és oda szubsztrát tudjon kötődni.

Az általunk vizsgált gátlószerek a szerkezetükből adódóan (glükózalapú molekulák) elsősorban a GF aktív centrumához („β-csatorna”) kötődnek és az ott található aminosavak (282-287) oldalláncaival alakítanak ki másodrendű kölcsönhatásokat. Az enzim inaktív T-állapotában a β-csatorna és a 280-as hurok részben blokkolva van térszerkezeti változások következtében. A GF inaktív T-állapotból aktív R-állapotba való alakulása során a β-csatorna szabaddá válik és így a szubsztrát (glikogén) által könnyen megközelíthetővé válik.

Azok a vegyületek, amelyek a hidantoinváz egyes elemeit tartalmazzák gátolják a vázizom GFb aktivitását. A metilcsoportokhoz képest a trifluoracetil-D-glükopiranozil-aminok anomer párjaiban csökkent a K_i értéke. Az aromás csoportot tartalmazó amidoldalláncok is gyengébb gátláshoz vezettek, de a naftilcsoport bevitelével igen jó gátlási állandókat kaptunk.

A molekulacsalád további tagjai, a N-(β-D-glükopiranozil)-N'-aróil-karbamidok, amelyek tulajdonképpen „nyíltláncú” hidantoin származékoknak is tekinthetőek, kinetikai és röntgenkrisztallográfiás adatok alapján igen érdekes eredményeket mutattak. A fenilcsoport egyik H-atomjának helyettesítésével kapott

származékok gátlási állandói is a mikromol tartományban vannak. A naftoil-karbamid származékok, pedig a legjobb GF gátlószereknek tekinthetők.

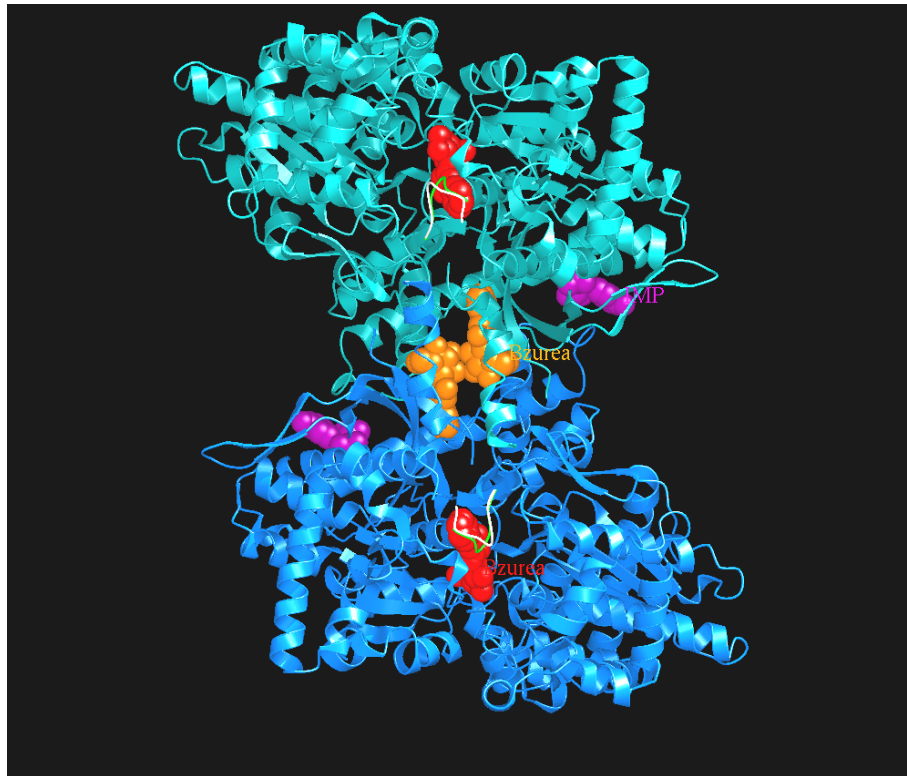
Részletesen vizsgáltuk a benzoil-karbamid (N-benzoil-N'- β -D-glükopiranozil-karbamid) kötődési lehetőségeit a GFb enzimhez. A molekula a nyúl vázizomból preparált GFb katalitikus centrumához kapcsolódik, ahol az inhibitor karbamid része és benzoil-csoportja kitölti az úgynevezett szubsztrátzsebet a His341 aminosav-oldallánchoz kapcsolódva.

Az inhibitor enzimhez való kötődését 21 H-kötés és 96 van der Waals kölcsönhatás (7 apoláris-apoláris, 16 poláris-poláris és 73 poláris-apoláris) stabilizálja. Az inhibitor kötődése az enzim katalitikus centrumához jelentős strukturális változást hoz létre a 280-as hurokban. Ez a konformációváltozás még szorosabb kötődést biztosít az enzim és a gátlószert között. A gátló hatás két konformációváltozással valósul meg. Az egyik az, hogy míg a natív GFb enzim His571 és Asp283 oldalláncai között H-kötés alakul ki, addig a benzoil-karbamid-GFb komplexben a His571 oldallánca 20°-kal elfordul és ez a H-kötés nem jöhet létre. A másik konformációváltozás pedig az, hogy az enzim inaktív T-állapotában a Phe285 és a Tyr613 oldalláncai apoláris kölcsönhatással kapcsolódnak egymáshoz, addig a benzoil-karbamid-GFb komplexben ez a kölcsönhatás úgy valósul meg, hogy az Asn284 oldallánca segítségével szendvicset képez a Phe285 és a Tyr613 oldalláncai között, „tönkretéve” ezzel az aktív centrumot és utánozva a T \rightarrow R állapot átalakulását.

A GF új allosztérikus helyét, az indol kötőhelyet, a dimer enzim központjában a monomerek kapcsolódási pontjánál azonosították. A benzoil-karbamid egy konformációváltozás következményeként, amikor az úgynevezett „s-transz” geometriát veszi fel, képes kötődni a GFb indol kötőhelyéhez. Az enzim-inhibitor komplexet 9 H-kötés és 80 Van der Waals kölcsönhatás stabilizálja. A benzoil-karbamid benzoil-csoportja 43 van der Waals kölcsönhatást, míg a karbamid „rész” 14 további másodrendű kölcsönhatást alakít ki a két monomer találkozásánál található kötőhely aminosav oldalláncaival. A molekula harmadik csoportja a glükopiranoz-gyűrű szintén másodrendű kölcsönhatásokkal stabilizálódik az új gátlóhelyen (19 másodrendű kölcsönhatás).

A benzoil-karbamid kötődése a GF indol kötőhelyéhez nem okoz konformációváltozást az enzim szerkezetében. Fontos hangsúlyozni, hogy a benzoil-karbamid kötődni képes a GF új, allosztérikus (indol) kötőhelyéhez is, ahová eddig

kizárólag indol-2-karboxamid típusú vegyületek kapcsolódtak. Ez a megfigyelés hasznos lehet a további potenciális antihyperglükémiás szerek kifejlesztésében is (2. ábra).



2. ábra. A benzoil-karbamid kötődése a GFb dimer molekulához

Egy dimer GFb molekulához négy benzoil-karbamid (N-benzoil-N'- β -D-glükopiranozil-karbamid) kötődhet: egy-egy a monomerek aktív centrumához (piros molekulák), míg egy-egy a monomerek kapcsolódásánál lévő indol kötőhelyhez (narancssárga molekulák). A nyíl vázizom GFb dimer molekulában feltüntettük az AMP kötőhelyhez kapcsolódó IMP molekulákat (lila) is.

4.2. TH hatásának vizsgálata a máj glikogén anyagcseréjére

Ismeretes, hogy a máj GF enzim mellett a GS aktivitását is reverzibilis foszforiláció szabályozza. Míg a GF enzimet egyetlen kináz (a foszforiláz kináz) foszforilálja és ezáltal enzimatikusan aktiválja (GFa), addig a GS különböző kinázokkal (pl. PKA, GSK-3) foszforilálható többféle Ser oldalláncon. A GS defoszforilált formája a katalitikusan aktív (GSa), és foszforilációval inaktiválódik és alakul át GSb formává. A két enzim (GF és GS) defoszforilációja összehangolt szabályozással valósul meg a glikogénpartikulákhoz kötött protein foszfatáz-1 hatására: először a GFa

defoszforilálódik csak ezt követően indul be a GSa képződése, azaz latencia figyelhető meg az aktív GS képződésében. A GFa a GSb defoszforilációjában allostérikus inhibitornak tekinthető.

A TH máj glikogénanyagcserére kifejtett hatását először Wistar patkányokból preparált gélszűrt kivonatban vizsgáltuk. 50 μ M TH elősegítette a GF aktív és a GS inaktív formájának a defoszforilációját és csökkentette a GS aktiválódásában bekövetkező latenciát. A GFa aktivitásának a csökkenése, a foszfatáz aktivitás növekedése és a GS aktiválódása együttesen a glikogén lebontását gátolja, amely gátlás a vér glükóz-koncentrációjának a csökkenéséhez vezet. A mechanizmus, amely során a TH mintegy inaktiválja a GF-t és aktiválja a GS-t, összetett. Kinetikai és röntgenszerkezet vizsgálataink alapján nyilvánvaló, hogy a TH-GF komplex kialakulása okozza az enzim gátlását és indítja be a GS defoszforilációját anélkül, hogy a GFa koncentrációja jelentősen lecsökkenne, s ezáltal allostérikus inhibitor hatása megszűnhetne. Hasonló mechanizmussal megy végbe a glükóz latenciát csökkentő hatása is, bár ehhez nagyságrendekkel több ligandra van szükség (20 μ M TH, illetve 20 mM glükóz mutat közel azonos változást). Napjainkban az antihyperglykaemiás anyagok és inzulinszerű vegyületek vizsgálatára a sztreptozotocin-indukált kísérletes diabéteszes modell terjedt el. Kimutattuk, hogy a szérum glükózkoncentráció kb. négyszeresére növekedett a sztreptozotocin-indukált diabéteszes patkányokban, míg a májglikogén mennyisége több mint tizedére csökkent. TH hosszantartó kezeléssel (tíz alkalommal másnaponként) a vércukorszint szignifikánsan csökkent, ami a TH antihyperglykaemiás hatására utal. Szembetűnő az is, hogy a diabéteszes állatok májglikogén tartalma jelentősen javult, csaknem elérte a kontroll értéket. Feltételezzük, hogy a TH antihyperglykaemiás hatása elsősorban a GS latenciájának megszüntetésével magyarázható – hasonlóan a normál állatok gélszűrt májkivonatában megfigyelthez – és ezért növekszik jelentősen a májglikogén tartalma. A TH ugyanakkor nem tudja kellőképpen ellensúlyozni a sztreptozotocin jelenlétében kialakult magas glükagon koncentrációt, ami döntően hozzájárul a kezelt állatok magas vércukorszintjéhez.

A genetikailag módosított állatkísérleti modellek alkalmasabbak a II. típusú diabétesz tanulmányozására, mivel a magas vércukorszint és inzulinrezisztencia mellett az elhízás is megfigyelhető. A Zucker diabéteszes hím patkányokban is hatásos volt a TH kezelés, csökkent a GF aktív formájának mennyisége és a GS aktiválódása latencia nélkül következett be.

Adataink felvetették a vizsgált vegyület (TH) esetleges hatását normál és sztreptozotocin kezelt állatok vércukorszintjére és inzulinérzékenységére. Korszerű kísérleti módszerünkben – megegyezik a gyógyszerkipróbálásokra nemzetközileg elfogadott standarddal – sikerült kimutatnunk, hogy az egyszeri TH kezelés az inzulinérzékenységet helyreállítja. Hasonló eredményt értünk el inzulin implantátum beültetésével. A TH szignifikánsan csökkentette a vércukorszintet is a sztreptozotocin kezelt Wistar patkányokban.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy a máj GF jelentős célmolekulája lehet az antihyperglükemiás szerek további kutatásának. A glükózanalóg vegyületek és azok májglikogén metabolizmusra kifejtett hatása értékes alapkutatósi eredményeket tárt fel és a kezdeti állatkísérleti eredmények biztatóak.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A máj glikogén elsődleges feladata a glükóz raktározása, reverzibilis lebomlási és felépítési folyamataival hozzájárul a vércukorszint fenntartásához. Izomban és májban a glikogén szintézise és lebontása a GF és a GS enzimek szabályozásával történik. A GF a glikogén lebontásának első lépését katalizálja, az enzim aktivitása többek között gátlható glükózzal és glükózanalóg vegyületekkel. Feltételezhető, hogy a GF gátlószerei alkalmasak lehetnek a II. típusú diabétesz terápiás kezelésére, a máj enzimet, mint a gyógyszerkísérletek lehetséges célpontját azonosították.

Jelen munkánk egyik célja, hogy megvizsgáljuk az újonnan szintetizált glükózanalóg inhibitorok nyúl vázizomból és patkány májból tisztított GF-re kifejtett gátló hatását. Vizsgálataink során azonosítottunk egy spiro-tiohidantoin származékot, amelynek a GF-ra kifejtett gátlási állandója (K_i) a mikromólos tartományba esik. Több olyan szubsztituált karbamidszármazékot is azonosítottunk, amelyek a GF jó gátlószerei, röntgenkristallográfiás adatok alapján az enzim aktív centrumához és a nemrégiben felfedezett új allosztérikus gátlóhelyéhez kötődik az egyik ilyen vegyület.

A glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (TH) mind a vázizom, mind a máj GF enzimek hatékony gátlószere. Kimutattuk, hogy 50 μ M TH Wistar patkányok májából készített gélszűrt kivonatban felfüggesztette a GF és GS koordinált szabályozását, megszüntette a latenciát a GS aktiválásában. Sztreptozotocin-indukált diabéteszes állatokban a TH kezelés hatására jelentősen csökkent a vércukorszint és növekedett a máj glikogéntartalma. Elhízott Zucker diabéteszes patkányokat *i.v.* TH-val kezelve a

kontrollhoz képest jelentősen csökkent a máj GFa szintje és a GS aktiválódása is gyorsult.

Vizsgáltuk a TH hatását kontroll és sztreptozotocin indukált diabéteszes patkányok inzulinérzékenységére és vércukorszintjére. A TH fokozta az inzulinérzékenységet a kezelt állatokban elősegítve ezzel a vércukor-koncentrációjának helyreállítását.

6. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /306/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

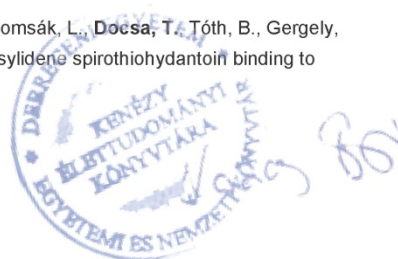
Jelölt: Docsa Tibor

Neptun kód: FI17ZV

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

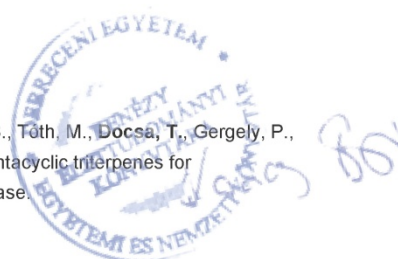
1. **Docsa, T.**, Czifrák, K., Hüse, C., Somsák, L., Gergely, P.: Effect of glucopyranosylidene-spirothiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats.
Mol. Med. Rep. 4 (3), 477-481, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2011.464>
IF:0.307 (2010)
2. Somsák, L., Nagy, V., Hadady, Z., Felföldi, N., **Docsa, T.**, Gergely, P.: Recent developments in the synthesis and evaluation of glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents.
In: *Frontiers in Medicinal Chemistry - Online*. Ed.: Allen B. Reitz, Atta-ur-Rahman, Bentham Science Publisher, Netherlands, 253-272, 2005.
3. Somsák, L., Nagy, V., Hadady, Z., **Docsa, T.**, Gergely, P.: Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: Recent developments.
Curr. Pharm. Des. 9 (15), 1177-1189, 2003.
IF:5.55
4. Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Ósz, E., Szilágyi, L., Somsák, L., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase B.
Bioorg. Med. Chem. 10 (2), 261-268, 2002.
IF:2.043



5. Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M.N., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák, L., Nagy, V., Praly, J., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Binding of N-acetyl-N'- β -D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'- β -D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies.
Eur. J. Biochem. 269 (6), 1684-1696, 2002.
IF:2.999
6. **Docsa, T.**, Tóth, B., Somsák, L., Gergely, P.: Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on the enzymes of hepatic glycogen metabolism in rats.
In: Protein Modules in Cellular Signalling. Ed.: by Ludwig Heilmeyer, Peter Friedrich, IOS Press, Amsterdam, 142-149, 2001.
7. Ósz, E., Somsák, L., Szilágyi, L., Kovács, L., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 (10), 1385-1390, 1999.
IF:1.759

További Közlemények

8. Kun, S., Nagy, G.Z., Tóth, M., Czece, L., Van Nhien, A.N., **Docsa, T.**, Gergely, P., Charavgi, M., Skourti, P.V., Chrysina, E.D., Patonay, T., Somsák, L.: Synthesis of variously coupled conjugates of d-glucose, 1,3,4-oxadiazole, and 1,2,3-triazole for inhibition of glycogen phosphorylase.
Carbohydr. Res. 346 (12), 1427-1438, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.004>
IF:1.898 (2010)
9. Bokor, É., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors.
Bioorg. Med. Chem. 18 (3), 1171-1180, 2010.
IF:2.978
10. Cheng, K., Liu, J., Sun, H., Bokor, É., Czifrák, K., Kónya, B., Tóth, M., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Tethered derivatives of D-glucose and pentacyclic terpenes for homo/heterobivalent inhibition of glycogen phosphorylase.
New J. Chem. 34, 1450-1464, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/b9nj00602h>
IF:2.631



11. Czakó, Z., **Docsa, T.**, Gergely, P., Juhász, L., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitor activity of functionalized 1,4-benzodioxanes.
Pharmazie. 65 (4), 235 - 238, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2010.9706>
IF:0.869

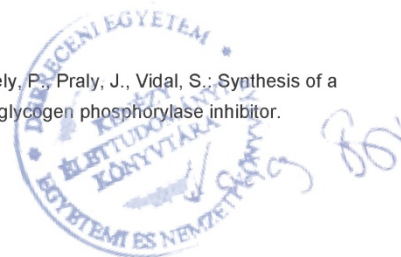
12. Cecioni, S., Argintaru, O., **Docsa, T.**, Gergely, P., Praly, J., Vidal, S.: Probing multivalency for the inhibition of an enzyme: Glycogen phosphorylase as a case study.
New J. Chem. 33 (1), 148-156, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/b812540f>
IF:3.006

13. Czakó, Z., Juhász, L., Kenéz, Á., Czifrák, K., Somsák, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitory activity of N-(beta-D-glucopyranosyl)amides possessing 1,4-benzodioxane moiety.
Bioorg. Med. Chem. 17 (18), 6738-6741, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.07.052>
IF:2.822

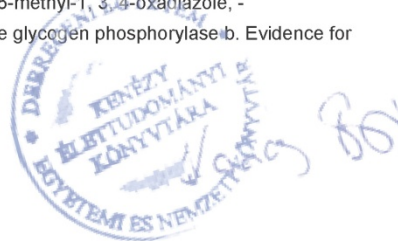
14. Nagy, V., Bentifa, M., Vidal, S., Berzsényi, E., Teilhet, C., Czifrák, K., Batta, G., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L., Praly, J.: Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase.
Bioorg. Med. Chem. 17 (15), 5696-5707, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.05.080>
IF:2.822

15. Tóth, M., Kun, S., Bokor, É., Bentifa, M., Tallec, G., Vidal, S., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L., Praly, J.: Synthesis and structure-activity relationships of C-glycosylated oxadiazoles as inhibitors of glycogen phosphorylase.
Bioorg. Med. Chem. 17 (13), 4773-4785, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.04.036>
IF:2.822

16. Bertus, P., Szymoniak, J., Jeanneau, E., **Docsa, T.**, Gergely, P., Praly, J., Vidal, S.: Synthesis of a C-glucosylated cyclopropylamide and evaluation as a glycogen phosphorylase inhibitor.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (17), 4774-4778, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.098>
IF:3.075



17. Juhász, L., **Docsa, T.**, Brunyánszki, A., Gergely, P., Antus, S.: Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitor activity of 2,3-dihydrobenzo[1,4]dioxin derivatives.
Bioorg. Med. Chem. 15 (12), 4048-4056, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.084>
IF:2.662
18. Anagnostou, E., Kosmopoulou, M.N., Chrysina, E.D., Leonidas, D.D., Hadjiloi, T., Tiraidis, C., Zographos, S.E., Györgydeák, Z., Somsák, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Kolisis, F.N., Oikonomakos, G.N.: Crystallographic studies on two bioisosteric analogues, N-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine and N-trifluoroacetyl-beta-D-glucopyranosylamine, potent inhibitors of muscle glycogen phosphorylase.
Bioorg. Med. Chem. 14 (1), 181-189, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.08.010>
IF:2.624
19. Bentlifa, M., Vidal, S., Fenet, B., Msaddek, M., Goekjian, P.G., Praly, J., Brunyánszki, A., **Docsa, T.**, Gergely, P.: In search of glycogen phosphorylase inhibitors:5-substituted 3-C-glucopyranosyl-1,2,4-oxadiazoles from beta-D-glucopyranosyl cyanides upon cyclization of O-acylamidoxime intermediates.
European J. Org. Chem. 2006 (18), 4242-4256, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.200600073>
IF:2.769
20. Czifrák, K., Hadady, Z., **Docsa, T.**, Gergely, P., Schmidt, J., Wessjohann, L.A., Somsák, L.: Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl) monoamides of dicarboxylic acids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase.
Carbohydr. Res. 341 (8), 947-956, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.002>
IF:1.703
21. Chrysina, E.D., Kosmopoulou, M.N., Tiraidis, C., Kardakaris, R., Bischler, N., Leonidas, D.D., Hadady, Z., Somsák, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Oikonomakos, N.G.: Kinetic and crystallographic studies on 2-(beta-D-glucopyranosyl)-5-methyl-1,3,4-oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site.
Protein Sci. 14 (4), 873-888, 2005.
IF:3.618



22. Györgydeák, Z., Hadady, Z., Felföldi, N., Krakomperger, A., Nagy, V., Tóth, M., Brunyánszki, A., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* 12 (18), 4861-4870, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.013>
IF:2.018
23. Chrysin, E.D., Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Kosmopoulou, M.N., Bischler, N., Leonidas, D.D., Kovács, L., **Docsa, T.**, Gergely, P., Somsák, L.: Crystallographic studies on β - and α -D-glucopyranosyl formamide analogues, inhibitors of glycogen phosphorylase. *Biocatal. Biotransform.* 21 (4-5), 233-242, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10242420310001614360>
IF:1.085
24. Somsák, L., Kovács, L., Tóth, M., Ósz, E., Szilágyi, L., Györgydeák, Z., Dinya, Z., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of D-Gluco- and D-Xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoin and N-(D-Glucopyranosyl) amides. *J. Med. Chem.* 44 (17), 2843-2848, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm010892t>
IF:4.139
25. Somsák, L., Nagy, V., **Docsa, T.**, Tóth, B., Gergely, P.: Gram-scale synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its effect on hepatic glycogen metabolism studied in vitro and in vivo. *Tetrahedron Asymmetry.* 11, 405-408, 2000.
IF:2.797

Összesített impakt faktor: 58,996

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 12,658

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.12.01

