

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ANTIOXIDÁNS ÉS SEJTVÉDŐ HATÁSÚ VEGYÜLETEK
AZONOSÍTÁSA NAGY ÁTERESZTŐKÉPESSÉGŰ
MÓDSZEREKKEL ÉS VIZSGÁLATUK EMLŐS
SEJTMODELLEKBEN**

Dr. Gergely Szabolcs

Témavezető: Dr. Virág László, az MTA doktora



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2015**

**ANTIOXIDÁNS ÉS SEJTVÉDŐ HATÁSÚ VEGYÜLETEK
AZONOSÍTÁSA NAGY ÁTERESZTŐKÉPESSÉGŰ MÓDSZERREL
ÉS VIZSGÁLATUK EMLŐS SEJTMODELLEKBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Gergely Szabolcs

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

Témavezető: Dr. Virág László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok:	Dr. Szentmiklósi József, PhD
	Dr. Csont Tamás, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014. március 13.

Az értekezés bírálói:	Dr. Radák Zsolt, az MTA doktora
	Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. Balla József, az MTA doktora
tagok:	Dr. Jeney Viktória, PhD
	Dr. Sirokmány Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2015. november 5. 13 óra DE ÁOK
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. BEVEZETÉS

Molekulakönyvtárak szűrése sejtalapú nagy áteresztőképességű módszerekkel (cell-based high throughput screening: HTS) olyan hatékony eljárás, melynek során nagyszámú molekula vizsgálatát („szűrését”) valósítják meg sejtés vagy különböző betegségeket is reprezentáló modellekben. Az eljárás során pl. sejtvédő (citoprotektív) molekulák kerülnek azonosításra. A szűrési eljárásban azonosított sejtvédő molekulák alkalmasak egyes élettani vagy patofiziológiai folyamatok vizsgálatára az alap kutatásban is.

A szervezetben a szabadgyököknek fontos élettani szerepük van a redox szabályozásban. Fokozottan képződnek szabadgyökök különböző gyógyszerek, antibiotikumok, tumorellenes szerek (pl. doxorubicin), az UV sugárzás, a dohányzás, toxinok, xenobiotikumok hatására. Bonyolult védekező rendszer biztosítja, hogy a szabadgyökös reakciók egy bizonyos határig a sejtalkotók károsítása nélkül játszódjanak le. Kémiaileg eltérő szerkezetű molekulák lehetnek antioxidánsok, közös sajátosságuk, hogy jelentősen késleltetik vagy gátolják a szubsztrátok oxidációját. Az antioxidáns hatásukat a sejten belül (intracelluláris) vagy a sejtmembránban vagy a sejtek közötti térben (extracelluláris) fejthetik ki.

Az oxidatív stressz a reaktív oxigén és/vagy nitrogén eredetű szabadgyökök (ROS és RNS) keletkezése és az antioxidáns védő rendszerek közötti egyensúly megbomlása, a sejtek redox állapotának megváltozása során lép fel. Az ATP keletkezése során számos oxidációs-redukciós lépés történik, amikor redukáló ágens (hidrogén) szállítódik az oxigénre. A ROS kontrollálatlan keletkezése vagy az antioxidáns rendszer működésének csökkenése vezet az oxidatív stressz kialakulásához. Szinte nincs olyan betegség, ahol a szabadgyökök károsító hatását ne mutatták volna ki, vagy a

szabadgyökök túltermelődése vagy az antioxidáns rendszer károsodása miatt. A szabadgyökök képesek arra, hogy az antioxidáns rendszerek működését gátolják, pl. úgy, hogy elfogyasztják a rendelkezésre álló antioxidánsokat, így pozitív visszacsatolós kör alakul ki. A sejtek egy másodlagos oxidatív károsodásra érzékenyebbek lesznek. Az önrontó kör folytatódik, és a sejt károsodása tovább nő egészen akár a sejthalálig.

A sejtpusztulás stressz-indukált ion-deregulációját vagy szabadgyökös folyamatait, amelyet fizikai, kémiai és biológiai változások idéznek elő, el kell választani az apoptózistól, a programozott sejthaláltól, a genetikailag determinált öngyilkos folyamattól, melyek során a szabadgyökös mechanizmusok fontos szerepet játszanak.

Az oxidatív stressz szerepét több mint 100 betegségben, számos kórfolyamatban feltételezik. Ezek közül említjük az atherosclerosist, a diabetes mellitus kardiovaszkuláris hatásait, a reperfüziós károsodást és a xenobiotikumok, illetve toxinok károsító hatását. Az oxidatív stresszt vizsgálhatjuk közvetett módon, a védelem oldaláról, az antioxidáns hatású komponensek mérésével vagy a támadás oldaláról közvetlenül az oxidált metabolitok mérése révén, vagy a két módszer kombinációjával.

A poli(ADP-ribóz)polimeráz-1 (PARP-1) a DNS kötő enzimek PARP családjának tagja, más PARP izoenzimekkel együtt, a sejtmagban és a mitokondriumban helyezkedik el számos sejt típusban, a szívizomsejteket is beleértve. A PARP ADP-ribózt polimerizál a sejtmagban lévő fehérjékre, hisztonokra, transzkripció faktorokra és önmagára a PARP-1 enzimre is. Fiziológias állapotokban a poli(ADP-ribolizáció) szerepet játszik a DNS hibajavításban, a genom stabilitásának megőrzésében, a sejt túlélésében, a sejtsztódásban és differenciálódásban is.

Az oxidatív stressz által kiváltott sejt és szöveti sérülésekben nemcsak a makromolekulák károsodnak, hanem - mint láttuk - a különböző jelátviteli útvonalak is. Ezek között említhetjük a MAP kinázokat, apoptózis-szabályozott kinázokat, és PARP-1 fehérjét. A sejtmagban található PARP-1 enzimet DNS törések aktiválják. Az aktivált PARP a javító (repair) fehérjét a sérült DNS-szakaszhoz irányítja poli(ADP-ribóz) egységekkel, elősegítve a DNS javítását. Súlyos oxidatív stresszben a PARP-1 kimeríti a sejt NAD^+ -készletét és ennek következtében az ATP tartalékot is, nekrotikus sejthalált okozva.

A PARP inhibitorok alkalmazásával és a PARP génhiányos egerek vizsgálatával kimutatták, hogy a PARP túlműködése számos oxidatív stressz által közvetített kórfolyamatban részt vesz: szívizom iszkémia-reperfúziós károsodás, gyulladás, diabetes mellitus, diabetes okozta kardiovaszkuláris betegségek, keringési shock, stroke, szívizomhipertófia, szívelégtelenség, traumás központi idegrendszeri károsodás, arthritis, colitis, allergiás encefalomyelitis és a gyulladások más formáiban.

Oxidatív stressz és sejtvédő (citoprotektív) anyagok

A jelátviteli (szignál transzdukciós) folyamatokban a sejtek külső jelekre válaszolnak és egymással is kommunikálnak. A jelátvitel a sejt különböző válaszdó fehérjeiben változásokat indít el, elsősorban hormonok, növekedési faktorok, citokinek és neurotranszmitterek hatására.

A ROS nemcsak sejtkárosító hatású, hanem fontos élettani szerepet játszik a jelátvitelben és annak szabályozásában. A sejtek ismert sajátossága, hogy folyamatosan termelnek ROS-t, amelyek a szignál transzdukciós mechanizmusok segítségével módosítják pl. a sejtek osztódását vagy differenciálódását. Számos sejttípus gyors ROS

képződéssel válaszol, amikor citokinek (pl. interleukin-1 β , 6 vagy 3, tumor nekrozis faktor: TNF- α), növekedési faktorok (pl. PDGF, NGF, FGF, GM-CSF) és hormonok (pl. inzulin, angiotenzin II) stimulálják. Nagyszámú kísérleti megfigyelés alakította ki azt az elképzelést, hogy az intracellulárisan képződő ROS hatása élettanilag is jelentős a jelátvitelben, a ROS molekulák „másodlagos hírvivőnek” is tekinthetők.

Számos citokintről és növekedési faktorról igazolták, hogy kötődnek különböző jelátviteli receptorokhoz nem-fagocitáló sejtekben. A növekedési hormonreceptor tirozin kinázok kiemelkedő szerepet játszanak az intracelluláris jel továbbításában a citoplazma és sejtmag felé, az információ a receptorokról az intracelluláris MAPK jelátviteli útra terelődik. Számos tanulmány igazolja, hogy a MAPK enzimsalád tagjainak aktivitását a ROS szabályozza. Ezek az extracelluláris-jel regulált ERK enzimek, a c-Jun-N-terminális kináz (JNK), p38 MAPK és BMAPK („big” MAPK). Erről a jelentős enzimsoportról mutatták ki, hogy módosító hatásaival közreműködik a sejtosztódás, a differenciálódás vagy a sejthalál (apoptózis) szabályozásában.

Az oxidatív stressz-indukált sejthalál szerepét számos súlyos betegségben igazolták: neurodegeneratív betegségek, miokardiális infarktus, stroke, iszkémiás reperfüziós sérülések. Különböző kísérleti rendszerekkel és eljárásokkal próbálkoznak a betegségek kezelésében, mindegyikben azonos a cél, vagyis a sejtek, szervek integritásának megőrzése. Ilyenek az antioxidáns tulajdonságú sejtvédő anyagok, PARP inhibitorok, JNK inhibitorok, káliumcsatorna nyitó vegyületek. Ezekről sikerült igazolni, hogy hatásosan védik a szöveteket az oxidatív sérülésektől. Bár biztató eredmények vannak és folytatnak klinikai vizsgálatokat is, újabb kezelések bevezetése elősegítheti a súlyos kórképek kezelését. Munkánk egyik célja

olyan új sejtvédő molekulák azonosítása, amelyek kedvező terápiás lehetőségekkel rendelkeznek.

A doxorubicin kardiotoxikus mellékhatásai

A doxorubicin antraciklin antibiotikumok közé tartozó kemoterápiás készítmény. A klinikumban nagy népszerűsége tett szert a rendkívül lipofil, a szervezetben hosszú félélettíddel rendelkező gyógyszer. A doxorubicint a rosszindulatú daganatok számos változatának kezelésére alkalmazzák: akut leukémia, Wilms-tumor, neuroblasztóma, mellrák, Hodgkin és non-Hodgkin limfómák, hepatómák, pajzsmirigydaganatok, petefészekrák a doxorubicin adásának indikációs körébe tartoznak. Ezen kívül gyomor-, nyaki-, here-, endometrium és méhnyakrákoknál, valamint mielómában is alkalmazható.

A doxorubicin hatásmechanizmusa teljes mértékben máig felderítetlen, azonban a szakirodalom nagy része úgy véli, hogy a daganatellenes hatást a doxorubicin molekula kromofór planáris rész DNS-szálak közötti beékelődésének köszönheti, míg az aminocukor rész a DNS kis árkában, a beékelődési hely közvetlen szomszédságban lévő bázisokkal lép kölcsönhatásba, s ezáltal a topoizomeráz-2-t gátolja.

Klinikai felhasználhatóságának azonban gátat szab kardiotoxikus mellékhatása: irreverzibilis kardiomiopátia és súlyos szívelégtelenség alakulhat ki. Ezek a szövödmények szoros összefüggést mutatnak a doxorubicin alkalmazott dózisával. Doxorubicin kardiotoxikus hatása komplex, de szoros kapcsolatot mutat a ROS mennyiségével. A ROS jelátviteli rendszer és a doxorubicin okozta szívelégtelenség közti kapcsolatra számos állatkísérlet is felhívta a figyelmet.

A nagyszámú, mellékhatásokat csökkentő gyógyszer, illetve kezelési stratégia került megismerésre és kidolgozásra a doxorubicin több mint négy évtizedes terápiás alkalmazásával párhuzamosan, hogy csökkentsék a doxorubicin káros mellékhatásait. További protokollok bevezetéséhez újabb molekulák megismerése és élettani hatásuk felderítése elengedhetetlen, ezzel a klinikum további lehetőséget kaphat a doxorubicin tumorelles kezelését kísérő mellékhatások kivédésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Molekulakönyvtárak szűrése sejthalapú nagy áteresztőképességű módszerekkel az egyik leghatékonyabb eljárás. Az értekezés célja egyetemi-kutatói háttérrel, sejtes modelleken végzett molekulakönyvtárak szűrési eljárásának bemutatása, azon célból, hogy sejtvédő molekulákat azonosítsunk és/vagy a védőhatással rendelkező vegyületek hatásmechanizmusát vizsgáljuk.

A specifikus céljaink a következők voltak:

1. Olyan élősejtes modelleket használni, amelyek alkalmasak nagyszámú vegyület antioxidáns és/vagy sejtvédő hatásának gyors vizsgálatára.
2. HTS szűrésre alkalmas mérési módszerek beállítása és az eredmények validálása.
3. A molekulakönyvtárak tesztelését végezve a sejtvédő/antioxidáns hatású vegyületek kiválasztása.
4. A HTS szűrési eljárással nyert sejtvédő ágensek hatásmechanizmusainak felderítése, egyes molekulatípusok jobb megismerése.
5. Az eredmények megerősítése más módszerekkel és különböző sejtvonalakban.
6. A doxorubicin kardiotoxikus hatásának kivédhetősége újabb molekulákkal sejtes rendszerekben.
7. A kiválasztott vegyületek kardioprotektív hatásának igazolása primer kardiomiocitákban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Molekulakönyvtárak

DiverSet 10.000 compound library (molekulakönyvtár) a Chembridge (San Diego, CA, USA) összeállítása. A vegyületek válogatása eltérő molekulaszerkezet alapján történik, ezért változatos farmakológiai hatásokkal rendelkeznek a könyvtárban található összesen 9680 vegyület. A könyvtár összeállításáról bővebb információkkal szolgáló internetes forrás: http://www.chembridge.com/screening_libraries/diversity_libraries/diverset/

A **Debreceni Egyetem molekulakönyvtárát (UDM)** a Szerves Kémia Tanszék hozta létre, és tartja fenn. A könyvtár kb. 2600 nagy tisztaságú (> 95%) vegyületet tartalmaz, emellett nagyszámú oxigén-heterociklusos vegyületet, valamint azok prekursorait. A vegyületeket hagyományos szintetikus módszerekkel állították elő, és azok nagymértékű változatosságot mutatnak.

Sejtvonalak

Jurkat sejtek immortalizált humán T limfociták, míg az A549 humán alveoláris epitélisejt eredetű adenokarcinoma sejtek. A H9C2 patkány embrionális szív/miokardium eredetű, míg a SAOS-2 humán oszteoszarkoma. Az összes sejtvonalat ATTC (UK) szereztük be.

A Jurkat sejtvonalat és az A549 sejtvonalat RPMI 1640-es médiumban tenyésztettük, amihez 10 % FBS-t és 2 mM glutamint adtunk. A H9C2 sejtvonalat és a primer patkány kardiomiocitákat DMEM (10 % FBS – 2 mM glutamin - 5g/L glükóz) médiumban tenyésztettük, ill.

tartottuk. Az SAOS-2 sejtvonalat a fentivel azonos DMEM médiumban tenyésztettük, azonban a közeg csak 1 g/L glükózt tartalmazott.

Primer neonatális patkány kardiomiocita

1-3 napos Wistar patkányokból állítottuk elő a primer kardiomiocita kultúrát. Az állatok gerincének átvágása után a szíveket eltávolítottuk, és jéghideg PBS oldattal öblítettük. A billentyűket kivettük és 0,25 % tripszinnel emésztettük. A kardiomioblaszt mennyiségének növelése érdekében 90 percig 10 % FBS tartalmú DMEM oldatban tartottuk. A sejteket 96-lyukú sejtkultúra plate-ekbe helyeztük ($1,5 \times 10^4$ sejt/lyuk) és 10 % FBS DMEM oldatban (kiegészítve 1 % glutaminnal és antibiotikum/antimikotikum eleggyel) tartottuk az inkubátorban (37°C , 5 % CO_2), 24 óra után a közeget 1 % FBS DMEM oldatra cseréltük elősegítve a kardiomioblasztok differenciálódását.

Nagy áteresztőképességű mérések (HTS)

A Tecan Freedom EVO robotjával végeztük. A Tecan robot kiépítése lehetővé tette a 96 vagy 384-lyukú plate használatát is. A minták adagolása, reagensek hozzáadása, keverése, inkubálása, valamint a megfelelő HTS mérés elvégzése teljesen automatizált volt. Ezért az általunk használt kétféle molekulakönyvtár HTS-szűrése megfelelő pontossággal volt kivitelezhető, és a nagyszámú adat számítógépes értékelése lehetővé tette a hatékony vegyületek kiválasztását.

Sejtek életképességének meghatározása

A sejtek életképességét egyrészt reszazurin-redukción alapuló méréssel végeztük. A sejtvédő hatást következőképpen számoltunk. T:

kontroll sejtek életképessége, H: hidrogén-peroxiddal kezelt sejtek életképessége, M: a kezelt mintánk sejtjeinek életképessége. Ez alapján a sejtvédő hatás %-os értéke az alábbi formában adható meg: $(M-H)/(T-H) \times 100$. A 30%-nál nagyobb hatékonyságú vegyületeket tekintettük sejtvédő hatásúnak.

A sejtek életképességét laktát-dehidrogenáz aktivitás meghatározásával is jellemeztük, valamint kalcein-AM fluoreszcenciás festék felvételén alapuló módszerrel. A kalcein-AM csak élő sejtekben alakul át zölden fluoreszkáló vegyületté.

Az MTT-teszt a sejtek életképességének, illetve proliferációjának vizsgálatára szolgáló módszer. A metabolikusan aktív sejtek endocitózissal felveszik a tetrazólium-bromid festékmolekulát, és elsősorban a NAD(P)H-függő oxidoreduktáz enzimek hatására formazán-kristályokká alakítják át, amelyek lila színűek. A keletkezett kristályokat oldjuk, a kapott oldat színintenzitása arányos a sejtek életképességével, illetve a rendszerben lévő sejtek mennyiségével.

Sejtmorfológián alapuló citotoxicitás meghatározása

A sejteket (7×10^3 sejt/lyuk) 96-lyukú plate-re helyeztük a kezelés előtt 1 nappal. A sejtekhez a megfelelő vegyületek oldatát adtuk $12 \mu\text{M}$ végkoncentrációban. 30 perc 37°C inkubálást követően a sejteket, illetve a kontroll mintákat doxorubicinnel (300 ng/mL végkoncentráció) kezeltük 24 órán át 37°C -on. A sejtenyészítő folyadékot lecseréltük 0,1 % Coomassie festékkoldattal, mostuk, majd szárítottuk. A felvételeket Leica mikroszkópra szerelt kamerával készítettük 5x nagyítással. A képanalízist TScratch software segítségével értékeltük, meghatározva a sejttel borított területeket.

Gyökfogó/antioxidáns hatás meghatározása

ABTS szintelenítési teszt. Az ABTS oldat alap abszorbanációját 1,2-re állítottuk, a fotometriás mérés lineáris tartományának megtartása céljából. A robot 8-csatornás pipettázófejének segítségével 20 μ l ABTS oldatot mértünk 384-lyukú plate-ek lyukaiba. A tesztvegyületeket a „PIN TOOL” egység segítségével adagoltuk (20 nl/minta) 20 μ M végkoncentrációban. A mintákat szobahőmérsékleten, 30 percig inkubáltuk. A dekolorizáció/szintelenedés mértékét Victor V3 mikroplate olvasóval határoztuk meg 405 nm hullámhosszon. A minták antioxidáns hatását a kontroll (DMSO-val kezelt) minták esetében kapott jel százalékában fejeztük ki. Azokat a vegyületeket tekintettük antioxidánsnak, melyek legalább 30 % dekolorizációt okoztak.

A réz(II)ion redukálásán alapuló antioxidáns-kapacitás mérése (CUPRAC). A módszer a réz(II)ion redukálásán alapul, a képződött réz(I)ion kolorimetriás meghatározásával. Az antioxidáns-kapacitások meghatározásánál 60 μ M trolox oldatot használtunk standardként, a mérésekhez 96 lyukú plateket használtunk.

Amplex® Red – hidrogén-peroxid meghatározása. Az Amplex Red reagens szintelen és 1:1 sztöchiometriával reagál a hidrogén-peroxiddal. A képződött floreszcens termékre jellemző excitációs/emissziós maximum: 570/585 nm. Az Amplex Red reakcióval már 10 pikomol H_2O_2 meghatározható 100 μ l térfogatban, ezért legalább tízszer érzékenyebb, mint az általánosan használt hidrogén-peroxid meghatározások.

Hidrogén-peroxid eltávolító (scavenger) aktivitás. A hidrogén-peroxid scavenger aktivitást sejtmentes rendszerben Ampliflu red (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazin) segítségével mértük. 12 μ M EODB vagy 10 μ M aszkorbinsav oldatát inkubáltuk 0,1 μ M H_2O_2 , 50 mM Ampliflu Red és 0,1

E/ml torna-peroxidáz jelenlétében foszfát-NaCl pufferben 5 percig szobahőmérsékleten. A peroxidáz hatására az Ampliflu Red sztöchiometrikusan reagál vörös fluoreszkáló molekulává, reszorufinná. A fluoreszcenciát 530 nm excitációs és 590 nm emissziós hullámhosszon határoztuk meg.

Kaspáz-3 aktivitásának meghatározása

A kaspáz-3 aktivitást amido-metil-kumarinnal konjugált tetrapeptid kaspáz szubsztráttal végeztük. A keletkezett amido-metil-kumarin fluoreszcenciáját fluoriméteren detektáltuk (excitációs hullámhossz: 390 nm, emissziós hullámhossz: 460 nm).

Laktát-dehidrogenáz felszabadulás meghatározása

A laktát-dehidrogenáz enzim (LDH) a piruvát laktáttá való átalakítását katalizálja. A folyamat során a NADH oxidálódik NAD^+ -dá. A NADH fogyása arányos az LDH aktivitással, ami fotometriásan mérhető. Az LDH a sejtek citoplazmájában található, sejt sérülés vagy sejthalál esetén bekerül a felülszóba, meghatározása mértéke lehet a sejtek lízisének.

PARP aktivitás meghatározása

A vegyületek PARP-gátló aktivitását DELFIA (Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay) kísérlettel vizsgáltuk. A 96-lyukú polisztirol plate-eket 0,1 % tisztított hisztonfehérjével vontuk be, majd egy éjszakára 4°C-ra helyeztük őket. A PARP DELFIA kísérletet a gyártók utasításai szerint hajtottuk végre, pozitív kontrollként a PJ34 nevű anyagot használtuk. Az eredmények kiértékelését Perkin Elmer Victor V3 multilabel olvasóval végeztük.

Western blot

A MAP-kinázok (ERK 1/2 és foszfo ERK 1/2; p38 és foszfo-p38; JNK és foszfo-JNK) azonosítása és aktivált (foszforilált) formáinak meghatározása Western blot módszerrel történt. A kezelések elvégzése után homogenizáltuk a sejteket, majd gélelektroforézist végeztünk. Ezt követően a gélben lévő mintáinkat nitrocellulóz membránra transzferáltunk. A membrán aspecifikus kötőhelyeit blokkoltuk. Az elválasztott fehérjéket poliklonális nyúl antitestekkel (ERK 1/2 és foszfo ERK 1/2; p38 és foszfo-p38; JNK és foszfo-JNK), majd torma-peroxidázzal jelölt szekunder antitesttel (anti-nyúl-IgG) kezeltük. Az eredményeinket kemilumineszcencia előhívó oldattal röntgenfilmen tettük láthatóvá.

Statisztikai analízis

Minden kísérletet legalább három alkalommal végeztünk el, különböző napokon. A statisztikai eltérések megállapítására a Debreceni Egyetem molekulakönyvtár (UDM) vizsgálatánál a Bonferroni-tesztet alkalmaztuk és szignifikanciát: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) jelöléssel a szokásos módon adtuk meg. A Chembridge Diverset Library eredményeinek statisztikai analízisét Tukey-tesztel végeztük: * ($p < 0,05$) értékeket tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

Molekulakönyvtárakban - különösen a célzottan, kémiai szerkezet és kombinatorikus kémiai eljárásokkal módosított vegyületekből összeállított könyvtárakban - található molekulák vizsgálata nagy áteresztőképességű (HTS) módszerekkel az egyik leghatékonyabb eljárás új kémiai szerkezetek biológiai hatásosságának felismerésére. Az értekezés célja molekulakönyvtárak szűrési eljárásának bemutatása sejtes modellekben azon célból, hogy sejtvédő molekulákat azonosítsunk és/vagy a védőhatással rendelkező vegyületek hatásmechanizmusát vizsgáljuk.

4.1. Sejtvédő vegyületek antioxidáns hatásának vizsgálata

A Debreceni Egyetem molekulakönyvtárát (UDM) a Szerves Kémia Tanszék hozta létre és tartja fenn. A könyvtár kb. 2600 nagy tisztaságú vegyületet tartalmaz, szerkezetileg eltérő típusokat. A molekulakönyvtár nagy áteresztőképességű (HTS) szűrésével 29 sejtvédő és 123 antioxidáns vegyületet találtunk, utóbbiakat ABTS szabadgyök kimutatási módszerrel azonosítottuk. Az UDM molekulakönyvtár vegyületei közül 11 molekula bizonyult mind sejtvédő, mind antioxidáns hatásúnak.

Az oxidatív stressz által indukált sejthalálban a PARP-1 aktivitásának jelentős fokozódását figyelték meg a vizsgált sejtes rendszerek szinte mindegyikében, ezért tanulmányoztuk a HTS szűréssel sejtvédő hatásúnak bizonyult vegyületeket a PARP-1 aktivitására. Két vegyület: 863 (flavanon-származék) és 1862 (kinolin-származék) rendelkezett kiemelkedő PARP-1 aktivitás gátlással 20 μM koncentrációban hidrogén-peroxid kezelt Jurkat sejtekben is.

A két hatásos vegyület PARP-1 aktivitást gátló hatásának igazolására Jurkat és A549 sejtvonalakat használtunk. A sejteket 30 percig kezeltük a vegyületekkel, majd hidrogén-peroxid hozzáadásával stimuláltuk a PARP aktivitását, a PAR termék szintézisét. Az oxidatív stressz (hidrogén-peroxid kezelés) jelentős PARP aktiválódást okozott, amelyet a Western-blot PAR-polimerjének intenzív festése igazol. A denzitometriás kiértékelés alapján a 863-as vegyület hasonló védő hatást fejtett ki, mint a széleskörűen alkalmazott PJ34. A másik vegyület nem bizonyult védő hatásúnak.

4.2. Dibenzoil-metán származékok azonosítása: nagy áteresztőképességű szűrések eredményeinek értékelése

A sejtvédő vegyületeket közül azokat választottuk ki, amelyek nem bizonyultak antioxidánsnak és a PARP aktivitását sem gátolták. Számos szerkezetileg hasonló indolszármazékot ismertünk fel, amelyek rendelkeznek a fenti tulajdonságokkal. Tömegspektrometriás módszerrel együttműködő partnereink (Prof. Patonay Tamás és munkatársai, Debreceni Egyetem, TTK Szerves Kémiai Tanszék) kimutatták, hogy ezekben a mintákban az eredeti vegyületek azonos bomlásterméke az izatin (1H-indol-2,3-dion) található jelentős mennyiségben. Kimutattuk, hogy a HTS szűrésekben (reszazurin-redukció) felismert „sejtvédő” hatás döntően izatinnak tulajdonítható. A HTS szűrés adatait nem tudtuk igazolni más módszerekkel: pl. izatin nem gátolta a kaszpáz-3 aktivitását, az LDH felszabadulását és a PI felvételét és nem rendelkezett citoprotektív hatással az MTT-tesztben sem. Ezért az izatin bomlásterméket tartalmazó vegyületeket nem vizsgáltuk tovább. Adataink arra is felhívják a figyelmet, hogy a HTS-módszerek közt nagy népszerűségnek örvendő reszazurin-

redukció óvatossággal értékelendő és csak megfelelő kontrollok alkalmazásával lehet kiszűrni a hibás pozitív eredményeket, illetve párhuzamosan más módszert is kell alkalmazni.

A vegyületek újabb szűrésével (MTT életképességi meghatározás, CUPRAC és Amplex Red mérések) a dibenzoil-metán (DBM) származékok bizonyultak sejtvédő hatásúnak. A DBM származékok különböznek az antioxidáns tulajdonságú vegyületektől, ugyanis nem védik a hidrogén-peroxiddal kezelt Jurkat sejteket a kaspáz-mediált apoptotikus sejthaláltól, és nem befolyásolják a hidrogén-peroxid által kiváltott mitokondriális membránpolarizációt. Valójában a nekrotikus sejthalál útvonulat módosítják, mert szignifikánsan csökkentik a propidium-jodid felvételét hidrogén-peroxid kezelés során, ami arra utal, hogy a plazmamembrán megőrizte integritását.

4.3. Dibenzoil-metán származékok hatása a mitogén-aktivált kinázok aktivitására

A DBM vegyületek antinekrotikus hatásának lehetséges célfehérjei az ERK1/2 kinázok, aktivitásuk gátlása elősegíti a sejtek túlélését. Tanulmányoztuk a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) közé tartozó ERK 1 és 2 (ERK 1/2), p38 és JNK (c-Jun N-terminális protein kináz) aktivitások, illetve foszforilációs állapotok változását DBM származékok jelenlétében.

Western blot módszerrel kimutattuk, hogy hidrogén-peroxid jelenlétében az ERK 1/2 és p38 enzimek aktiválódtak, a JNK nem. A DBM származékok hatékonyan csökkentették az ERK 1/2 aktiválódását (foszfo-ERK 1/2 képződését), nem befolyásolták viszont a p38 foszfo-formájának a

mennyiségét. Adataink arra utalnak, hogy a DBM-származékok elsődleges célpontjai az ERK 1/2 enzimek lehetnek a nekrotikus sejthalál útvonalon.

Az ERK fehérjéről korábban kimutatták, hogy részt vesznek a hidrogén-peroxid által kiváltott nekrotikus sejthalálban, ezért kísérleti megfigyelésünk molekuláris magyarázatát is jelenthetik. A DBM vegyületek antinekrotikus hatása értékes, mivel a nekrotikus sejthalál a legáltalánosabb és legveszélyesebb sejtpusztulás pl. stroke vagy miokardiális iszkémia-reperfüziós kórképekben.

4.4. A dibenzoil-metán származékok sejtélettani szerepe

Felismerték, hogy a DBM jótékony hatású az iszkémiás kórképekben, mivel stabilizálja a sejt adaptív hypoxiáért felelős „master” génjét a hypoxia-indukáló faktort: HIF-1fehérjét. Az általunk igazolt sejtvédő effektus további megerősítését jelenti a DBM származékok kedvező felhasználásának iszkémiás betegségekben, mivel ezeknek a vegyületeknek toxikus hatása elenyésző.

A dibenzoil-metán molekulának két tautomer formája van és a keto $\leftrightarrow$ enol egyensúly jelentős mértékben az enol irányába tolódik el. A DBM és származékainak fotostabilitását a hidrogénhíd-kötés biztosítja, ezért több származékot (pl. Avobenzon®) napvédő készítményekben, mint kémiai szűrőket alkalmazták.

Eredményeink több DBM származék új, sejtvédő hatásának felismeréséhez vezetett és igazoltuk, hogy a sejtvédő hatás csak részben tulajdonítható antioxidáns képességüknek. Megállapítottuk, hogy DBM származékok a hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stresszben elsősorban a nekrotikus sejthalál útvonalat befolyásolják, az apoptózist alig.

4.5. A doxorubicin kardiotoxikus hatása

A doxorubicin széleskörűen használt gyógyszer a tumorterápiában. A vegyület citotoxikus, ezért alkalmazása a kemoterápiában nagy elővigyázatosságot igényel. A kemoterápiás gyógyszerek közül többnek is van olyan mellékhatása, ami a szívsejtekben diszfunkciót és sejthalált okoz. ROS és RNS képződik antraciklinvázat tartalmazó kemoterápiás gyógyszerek intracelluláris redox folyamatában, amelyek a kérdéses gyógyszer toxikus mellékhatásának kiváltói. Szuperoxidgyök-anion, hidrogén-peroxid, hidroxilgyök és peroxinitrit képződése okozza elsősorban a doxorubicin kardiotoxikus hatását. A redox-stressz által indukált jelátviteli útvonalak is szerepet játszanak, mint pl. p38 MAP kinázok, PARP-1, polimeráz-1, mátrix metalloproteinázok és anyagcsere-változások is hozzájárulhatnak a doxorubicin kardiotoxicitásához.

A HTS szűréseket elsősorban olyan farmakológiai jelentős targetek vizsgálatában alkalmazzák, amelyekben nagy populációkat érintő betegségcsoportok patomechanizmusát kívánják jobban megérteni és eredményes gyógyszerjelölt fejlesztést elindítani. Ismereteink szerint a doxorubicin káros mellékhatását kivédő kardioprotektív vegyületek azonosítására még nem használtak HTS módszert.

4.6. Kardioprotektív vegyületek szűrése doxorubicin toxicitás ellen

Az értekezésben bemutatott vizsgálatainkban HTS módszerrel kívántunk kiválasztani olyan molekulákat, amelyek megvédik a szívsejteket a doxorubicin toxicitásától. A DiverSet 10.000 molekulakönyvtár (Chembridge, USA) változatos szerkezetű, ezért feltehetően eltérő farmakológiai hatásokkal rendelkező vegyületeket tartalmaz. A 9680 molekula kardioprotektív hatását elsődlegesen a doxorubicin

citotoxicitására vizsgáltuk életképességet mérő MTT-teszttel HTS módszerként alkalmazva. Ebben a tesztben 15 molekula bizonyult hatásosnak.

Szem előtt tartva, hogy a citoprotektív hatás felismerése, különösen doxorubicin-indukált kardiotoxicitásban nem egyértelműen igazolja a vegyületek hatékonyságát, ezért a kiválasztott molekulákat újabb, morfológiai vizsgálatokkal elemeztük. A H9C2 sejtekkel borított felület nagyságának meghatározásával egyetlen vegyület az EODB (kémiai elnevezése: 3-[2-(4-etil-fenil)-2-oxoetil]-1,2-dimetil-1H-3,1-benzimidazol-3-ium-bromid) rendelkezett.

4.7. Az EODB védi a H9C2 sejteket az apoptotikus és nekrotikus sejthaláltól

Életképességi és morfológiai vizsgálataink nem szolgáltatottak információt azzal kapcsolatban, hogy a doxorubicin milyen típusú sejthalált okoz a H9C2 sejtekben. Tanulmányoztuk a doxorubicin hatását a sejtek apoptotikus és nekrotikus paramétereire EODB jelenlétében is. Mértük a kaspáz-3 enzim aktivitását (apoptotikus paraméter), valamint a sejtek felülúszójából meghatároztuk a nekrotikus sejthalálra jellemző laktát-dehidrogenáz aktivitást. Az EODB előkezelés mindkét enzim aktivitását csökkentette, védelmet nyújtva az apoptózis és nekrosis ellen.

4.8. Az EODB kardioprotektív hatása primer kardiomiocitákon

Az immortalizált sejtvonalak a legtöbb esetben jó modelljei a szöveti eredetüknek megfelelő sejtípusnak, nagyrészt megőrzik annak tulajdonságait. A nagy áteresztőképességű mérésekhez is praktikusán használhatóak, hiszen korlátlanul szaporodnak, jól reprodukálható

eredményeket szolgáltatnak. Viszont néhány esetben különböző kezelésekre adott válaszuk, illetve érzékenységük a primer sejtektől eltér. Ezért tanulmányoztuk az EODB hatását doxorubicinnel kezelt, újszülött patkányok szívéből izolált sejtekben, melynek során 12 μ M EODB szignifikáns (18 %) védelmet nyújtott a toxicitással szemben.

Az EODB valószínűleg nem hat közvetlenül a ROS vagy RNS különböző fajtáira, mivel sem az ABTS szintelenítési tesztben, sem a CUPRAC módszerben nem bizonyult antioxidáns hatásának. Nagyon valószínű, hogy az EODB kardioprotektív hatása közvetett: a sejt sérülésekre érzékeny jelátviteli útvonalakat befolyásolja.

A doxorubicin kardiotoxicitását kivédő modellekben az antioxidáns hatás hiánya nem kivételes, mivel PARP, topoizomáz és angiotenzin-II receptor inhibitorok sem rendelkeznek antioxidáns tulajdonsággal. Kimutattuk, hogy az EODB mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejthaláltól véd, feltehetőleg a doxorubicin citotoxikus hatás kialakulásának egyik kezdeti lépését befolyásolja és nem valamelyik sejthalálhoz vezető jelátviteli folyamatot. Az EODB "közvetett" hatása klinikai szempontból jelentősebb lehet, mint a közvetlen szabadgyök koncentráció csökkentése, mert az antioxidáns szerek (pl. N-acetil-cisztein, vagy Fe-komplexek) nem bizonyultak hatásosnak preklinikai és klinikai vizsgálatokban.

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy nagy áteresztőképességű szűrési módszeren alapuló vegyület-kiválasztás alkalmas a doxorubicin kardiotoxikus hatása elleni molekulák azonosítására. H9C2 sejtvonalban és primer patkány kardiomiocitákban az EODB kivédte a doxorubicin kardiotoxikus hatását anélkül, hogy csökkentette volna a kemoterápiás szer tumorelles hatékonyságát. Az EODB alkalmasnak tűnik további kémiai szerkezet módosításokra, ún. "vezér molekula" (lead molecule) kialakítására

gyógyszerfejlesztési kísérletekben. További vizsgálatok szükségesek ígéretes gyógyszerjelölt meghatározásához, ami segítséget nyújthat a doxorubicin mellékhatásainak kiküszöbölésére.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A Debreceni Egyetem kutatói által létrehozott molekulakönyvtár vegyületei közül 29 védett a hidrogén-peroxid által indukált citotoxicitás ellen Jurkat sejtekben. Ezen vegyületek közül 11 antioxidáns aktivitással is rendelkezett, és kettőt találtunk hatékony PARP gátlónak. Négy sejtvédő dibenzoil-metán (DBM) származékot részletesen is tanulmányoztunk, mert nem védtek a hidrogén-peroxid indukált citotoxicitás ellen, és nem gátolták a PARP enzim aktivitását.

A két DBM származék védelmet nyújtott a nekrotikus sejthalállal szemben, míg nem befolyásolta az apoptotikus útvonalra jellemző kaszpáz aktivitását. A hidrogén-peroxid fokozta az extracelluláris jellel szabályozott kinázok közül az ERK 1/2 és p38 MAP kinázok foszforilált formájának mennyiségét, de nem módosította a c-Jun kináz hatását. A DBM származékok csak a hidrogén-peroxid által fokozott foszfo-ERK 1/2 mennyiségét csökkentették.

A vegyületek sejtvédő hatását A549 tüdő epitélsejtekben is igazoltuk bizonyítva, hogy hatásuk nem sejtspecifikus. Az általunk felismert, új típusú DBM vegyületek a sejtvédő anyagok új osztályát alkotják, mert gátolják az ERK 1/2 kinázt és védenek a nekrotikus sejthaláltól anélkül, hogy módosítanák a PARP aktivitását.

Az antraciklinek hatékony tumorelles szerek, az egyik legáltalánosabban használt antraciklin a doxorubicin, amit sikeresen alkalmaznak a legkülönbözőbb szervek tumorelles kemoterápiájában. A

gyógyszer alkalmazásának egyik hátránya súlyos kardiotoxikus hatása, mert a doxorubicin kezelés a beteg teljes életében kumulálódik. A doxorubicin tumorelles hatása és kardiotoxicitása eltérő molekuláris mechanizmusokat használ, ezért lehetőség van arra, hogy a súlyos mellékhatás kiküszöbölésével érintetlenül hagyjuk tumorelles hatását.

A Chembridge Diverset molekula könyvtár 9680 vegyületét vizsgáltuk H9C2 patkány kardiomiocitákban a doxorubicin kezeléssel kiváltott sejthalálban. Életképességi és sejtmorfológián alapuló módszerekkel választottuk ki a vegyületeket. A leghatékonyabb molekula jelentősen csökkentette a doxorubicin által kiváltott apoptotikus és nekrotikus sejthalált, ugyanakkor nem rendelkezett szabadgyökfogó képességgel, és nem befolyásolta a doxorubicin tumorelles hatását. A benzimidazolt tartalmazó vegyületünk – további kémiai szerkezet optimalizálással – alkalmasnak tűnik gyógyszerjelölt fejlesztésre, ami a szívizom doxorubicin által okozott sérüléseit kivédheti.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó munkák elvégzésében, szakmai és baráti tanácsaikra mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Virág László** professzor Úrnak a támogatásért tudományos munkámban; mint témavezető a kutatásban szerzett kimagasló tudását nagylelkűen megosztotta velem. Kutatómunkám irányítása mellett, segített az eredmények diszkussziójában, az értekezés végső formájának kialakításában.

Külön köszönöm **Dr. Hegedűs Csaba** adjunktus Úrnak, aki önzetlen segítséggel támogatott munkámban és széles metodikai és kísérleti tapasztalatait megosztotta velem. Külön is köszönöm folyamatos támogatását és értékes segítségét az értekezés összeállításában.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Patonay Tamás** professzor Úrnak és munkatársainak (Szerves Kémia Tanszék) a szintetizált vegyületekért és az UDM kémiai könyvtár biztosításáért.

Ezúton is szeretném megköszönni **Dr. Édes István** professzor Úrnak sokoldalú támogatását, segítségét tudományos munkám végzésében a klinikai feladatok mellett.

Külön köszönet **Herbály Mihályné** és **Gelenczi-Finta László** laboratóriumi asszisztenseknek, akikre mindig számíthattam munkámban.

Köszönettel tartozok az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának, hogy amikor segítségre volt szükségem mindenki önzetlenül segített.

Végezetül köszönöm feleségem (**Dr. Juhász Mária**) támogatását, bátorítását és kislányunk **Borbála** önzetlen szeretetét, ami nélkül nem készülhetett volna el ez a munka.



Nyilvántartási szám: DEENK/123/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gergely Szabolcs
Neptun kód: GTQG81
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gergely, S.**, Hegedűs, C., Lakatos, P., Kovács, K., Gáspár, R., Csont, T., Virág, L.: High throughput screening identifies a novel compound protecting cardiomyocytes from doxorubicin-induced damage.
Oxid. Med. Cell. Longev. "Accepted by Publisher" (2015)
IF:3.363 (2013)
2. Hegedűs, C., Lakatos, P., Kiss-Szikszai, A., Patonay, T., **Gergely, S.**, Gregus, A., Bai, P., Haskó, G., Szabó, É., Virág, L.: Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death.
Pharmacol. Res. 72, 25-34, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2013.03.002>
IF:3.976





További Közlemények

3. Brunyánszki, A., Hegedűs, C., Szántó, M., Erdélyi, K., Kovács, K., Schreiber, V., **Gergely, S.**, Kiss, B., Szabó, É., Virág, L., Bai, P.: Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress.
J. Invest. Dermatol. 130 (11), 2629-2637, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.190>
IF: 6.27
4. Bai, P., Hegedűs, C., Szabó, É., Gyüre, L., Bakondi, E., Brunyánszki, A., **Gergely, S.**, Szabó, C., Virág, L.: Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity.
J. Invest. Dermatol. 129 (1), 234-238, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.196>
IF: 5.543
5. Hegedűs, C., Lakatos, P., Oláh, G., Tóth, I.B., **Gergely, S.**, Szabó, É., Bíró, T., Szabó, C., Virág, L.: Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1.
FEBS Lett. 582 (12), 1672-1678, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.023>
IF: 3.264
6. Bai, P., Hegedűs, C., Erdélyi, K., Szabó, É., Bakondi, E., **Gergely, S.**, Szabó, C., Virág, L.: Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in N-methyl-N-nitrosoguanidine-treated thymocytes: Implication for cytotoxicity.
Toxicol. Lett. 170 (3), 203-213, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.03.007>
IF: 2.826

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,242

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,339

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor-lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.06.05.