

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Sipos Ádám

**A glikogén-foszforiláz inhibitorok új alkalmazása:
nátrium-glükóz kotranszport gátlása vesében**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A glikogén-foszforiláz inhibitorok új alkalmazása: nátrium-glükóz kotranszport gátlása vesében

Dr. Sipos Ádám

Témavezető: Dr. Docsa Tibor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	6
1. BEVEZETÉS	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. A cukorbetegség	9
2.1.1. A cukorbetegség fajtái	10
2.1.1.1 Az 1-es típusú cukorbetegség	10
2.1.1.2 A 2-es típusú cukorbetegség	11
2.1.1.3 Terhesség alatti diabétesz	12
2.1.1.4 Más típusú cukorbetegségek	12
2.1.2. A cukorbetegség gyógyszeres kezelése	13
2.2. Glikogénanyagcsere	13
2.2.1. Glikogénszintézis	16
2.2.2. Glikogenolízis és glikogén-foszforiláz	16
2.2.3. Glikogén-foszforiláz inhibitorai	18
2.2.3.1. Aktív centrum gátlószerei	18
2.2.3.2. AMP kötőhely	19
2.2.3.3. Nukleotid kötőhely	19
2.2.3.4. Indol kötőhely	19
2.2.3.5. Glikogén kötőhely	19
2.3. Glükóz-transzporterek	20
2.3.1. GLUT1	20
2.3.2. GLUT2	21
2.3.3. GLUT3	21
2.3.4. GLUT4	22
2.3.5. GLUT5	24
2.3.6. Nátrium-glükóz kotranszporter (Sodium-Glucose Cotransporter, SGLT)	24
2.3.6.1. Nátrium-glükóz kotranszporter 1 (SGLT1)	27
2.3.6.2. Nátrium-glükóz kotranszporter 2 (SGLT2)	28
2.3.6.3. SGLT1 és 2 funkciója a vesében	28

2.4. SGLT2 inhibitorok	31
2.5. Célkitűzések	37
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38
3.1. Anyagok	38
3.2. Pufferek, Reagensek	39
3.3. Vázizom glikogén-foszforiláz b enzim preparátum nyúl vázizomból	40
3.4. Enzimaktivitás meghatározások	40
3.4.1. Tisztított izom glikogén-foszforiláz aktivitásának meghatározása	40
3.4.2. Glikogén-foszforiláz gátlószerek vizsgálata: K_i és IC_{50} meghatározása	40
3.5. Sejtkultúra	41
3.5.1 Lentivirális transzfekció	41
3.6. Western-blot	41
3.7. Fehérjemérés	42
3.8. Glükózfelvétel-mérés	42
3.8.1. SGLT1 és SGLT2 IC_{50} számítás	43
3.9. Citotoxicitás meghatározása	43
3.10. Mérési adatok kiértékelése	43
4. EREDMÉNYEK	44
4.1. Lehetséges glikogén-foszforiláz inhibitorok számítógépes tervezése	44
4.2. Glükózanalog inhibitorok kinetikai vizsgálata	48
4.3. SGLT 1 és 2 gátlószerek IC_{50} értékének meghatározása	54
4.3.1. SGLT1 és SGLT2 fehérjéket stabilan expresszáló sejtek létrehozása és a transzfekció hatékonyságának ellenőrzése	54
4.3.2. Vizsgált vegyületek citotoxicitás vizsgálata	57
4.3.3. IC_{50} meghatározás	58
5. MEGBESZÉLÉS	66
5.1. C- β -D-glükopiranozil-azol vegyületek szerkezet – gátlás vizsgálata	66
5.2. SGLT 1 és 2 IC_{50} meghatározás	67

6. ÖSSZEFOGLALÁS	72
7. SUMMARY	74
8. IRODALOMJEGYZÉK	76
9. TÁRGYSZAVAK	91
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	92
11. FÜGGELÉK	93

Rövidítések:

2-NBDG:	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose
AC:	adenilát-cikláz
ADP	adenozin-difoszfát
AMP:	adenozin-monofoszfát
ATP:	adenozin-trifoszfát
$\alpha 2$:	$\alpha 2$ adrenoreceptor
cAMP:	ciklikus adenzin-monofoszfát
BSA:	szarvasmarha szérum albumin
DPP:	dipeptidil-peptid-4
EMA:	Európai Gyógyszerügynökség
FK:	foszforiláz-kináz
F-6-P:	fruktóz-6-foszfát;
F-1,6-P2:	fruktóz-1,6-biszfoszfát
F-1,6-bP-áz:	fruktóz-1,6-biszfoszfátáz
FDA:	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Felügyelet (Federal Drug Administration)
G:	Glükóz
G-1-P:	glükóz-1-foszfát
G-6-P:	glükóz-6-foszfát
GFa:	glikogén-foszforiláz a (aktív, foszforilált forma)
GFb:	glikogén-foszforiláz b (inaktív)
GLP-1:	glükagon-szerű peptid 1
GLUT:	glükóz transzporter
GK:	glükokináz
GKRP:	glükokináz regulátor fehérje
GR:	glükagon receptor;
GRA:	glükagon receptor antagonist
Gs:	aktivált G-fehérje
GSa:	glikogén szintetáz a (aktív, defoszforilált forma)
GSb:	glikogén szintetáz b (inaktív, foszforilált forma)
G-6-Páz:	glükóz-6-foszfátáz
HbA1c:	hemoglobin A1c
IMP:	inozitol-monofoszfát

KO:	knock out
mAch:	muszkarinos acetil-kolin receptor
mRNS:	hírvívő (messenger) ribonukleinsav
ob/ob:	egértörzs – leptin mutációval
OGTT:	orális glükóztolerancia-teszt
PEP:	foszfoenol-piruvát
Pi:	foszfátanion (anorganikus foszfát)
PK:	protein-kináz
PP1:	protein-foszfatáz-1
SGLT1:	nátrium-glükóz kotranszporter 1 (sodium-dependent glucose cotransporter 1)
SGLT2:	nátrium-glükóz kotranszporter 2 (sodium-dependent glucose cotransporter 2)
SLC:	SoLute Carrier – klasszikus transzporter gének
SR:	szarkoplazmatikus retikulum
STZ:	sztreptozotocin
ZDF:	Zucker Diabetic Fatty rats (2-s típusú diabétesz állatmodell)

1. BEVEZETÉS

A cukorbetegség (diabétesz mellitusz) az egyik legjobban elterjedt betegség a földön. 2000-ben a becslések szerint a cukorbetegségben szenvedő felnőttek száma közel 151 millió volt, ez a szám 2009-re 88%-kal 285 millióra nőtt. Felmérések alapján jelenleg a 20–79 éves felnőttek 9,3%-a (463 millió ember) szenved diabéteszben, valamint további 1,1 millió 20 év alatti gyermek és serdülő szenved 1-es cukorbetegségben. Az International Diabetes Federation (IDF) becslése szerint 2030-ra 578 millió és 2045-re 700 millió fölött lesz cukorbetegnek száma [1]. 2010-ben egy globális előrejelzés 2025-re 438 millió főre becsülte a cukorbetegnek számát. Bár ebből a jóslatból még 3 év hátra van, de ezt az előrejelzést már 25 millióval túlhaladta az emberiség [1]. A cukorbetegséggel élő felnőttek száma az elmúlt 20 évben több mint háromszorosára nőtt, ezért a diabétesz a 21. század egyik leggyorsabban növekvő egészségügyi kihívása. A cukorbetegnek számának növekedését társadalmi-gazdasági, demográfiai, környezeti és genetikai tényezők együttes kölcsönhatása segíti elő. A folyamatos emelkedés nagyrészt a 2-es típusú cukorbetegség, és a kapcsolódó kockázati tényezők fellendülésének köszönhető, amelyek magukban foglalják a különböző mértékű elhízást, az egészségtelen táplálkozást és a csökkent fizikai aktivitást. Emellett a gyermekkorban fellépő 1-es típusú cukorbetegnek száma is növekszik. A növekvő urbanizáció, és a megváltozott életmód (pl. magasabb kalória-bevitel, feldolgozott élelmiszerek megnövekedett fogyasztása, ülő életmód) társadalmi szinten járulnak hozzá a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegek számának növekedéséhez. Ezt igazolja, hogy a városi területeken 10,8%, vidéki területeken alacsonyabb 7,2% a diabétesz prevalenciája, de előrejelzések alapján ez a különbség a közeljövőben csökkenni fog [1].

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A cukorbetegség

A cukorbetegség egy olyan súlyos, hosszú távú (krónikus) állapot, amely akkor fordul elő, ha a vérben emelkedett a glükóz koncentrációja. Ennek oka lehet, hogy a szervezetünk nem képes elegendő mennyiségű inzulint előállítani, vagy az előállított inzulin nem tudja hatékonyan kifejteni a hatását. Az inzulin a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben lévő béta-sejtek által termelt peptid hormon, amely lehetővé teszi a véráramban keringő glükóz bejutását a test sejtjeibe, ahol a glükóz energiává alakul [2]. Az inzulin elengedhetetlen a sejtekben a fehérje és a zsír anyagcseréjéhez. Az inzulin hiánya, vagy a sejtek által adott csökkent válasz eredménye a magas vércukorszint (hiperglikémia), amely a cukorbetegség klinikai indikátora. A cukorbetegség diagnosztizálására szolgáló küszöbértékeket az 1. táblázat mutatja. Az inzulinhiány, ha hosszú távon kezeletlen marad, több szervi károsodást, életveszélyes egészségügyi komplikációkat okozhat, ilyen a retinopátia, vakság, veseelégtelenség, szív- és érrendszeri betegségek, neuropátia, stroke, valamint az ujj, lábfej vagy láb amputációja [3]. Amennyiben sikerül a cukorbetegséget megfelelően kezelni, akkor ezek a súlyos szövődmények késleltethetőek, vagy teljes mértékben megelőzhetőek [4].

1. táblázat. Cukorbetegség diagnosztikai kritériumai:

	Cukorbetegség ha egy vagy több az alábbi kritériumok közül teljesül	Csökkent glükóztolerancia ha minden alábbi kritérium teljesül	Emelkedett éhomi vércukorszint első vagy mindkét alábbi kritérium teljesül
éhomi ^a vércukorszint	$\geq 7,0 \text{ mmol/dm}^3$	$< 7,0 \text{ mmol/dm}^3$	$6,1-6,9 \text{ mmol/dm}^3$
két órás vércukorszint 75 g orális glükóz terhelés után (orális glükóztolerancia-teszt, OGTT)	$\geq 11,1 \text{ mmol/dm}^3$	$\geq 7,8 \text{ és } < 11,1 \text{ mmol/dm}^3$	$< 7,8 \text{ mmol/dm}^3$
HbA1c ^b	$\geq 48 \text{ mmol/mol}$ egyenlő 6,5% -kal		
Random vércukorszint hiperglikémia tünetei mellett	$> 11,1 \text{ mmol/dm}^3$		

^aLegalább 8 órán keresztül a vizsgálat előtt nincs kalóriabevitel/étkezés.

^ba diabétesz diagnosztizálására alkalmas paraméter, hemoglobin része, mely glükózt képes megkötni. A vörösvértestek átlagos élettartama 2 hónap a vérmintában, így erre az időszakra ad felvilágosítást a HbA1c érték.

2.1.1. A cukorbetegség fajtái

2.1.1.1 Az 1-es típusú cukorbetegség

Az 1-es típusú cukorbetegséget autoimmun reakció okozza, amely során az immunrendszer megtámadja a hasnyálmirigy inzulintermelő béta-sejtjeit. Ennek eredményeként nem vagy nagyon kevés inzulin termelődik [5]. Ennek a folyamatnak az okait nem teljesen ismerjük, de a legvalószínűbb tényezők között a genetikai fogékonyság és a környezeti hatások (pl. toxinok, vírusfertőzés) kombinációja váltja ki az autoimmun reakciót [6]. A betegség bármely életkorban kialakulhat, de az 1-es típusú cukorbetegség leggyakrabban gyermekeknél, és fiataloknál fordul elő [7].

Az 1-es típusú cukorbetegségben szenvedő embereknek napi inzulin injekciókra van szükségük a megfelelő vércukorszint fenntartásához. A megfelelő napi inzulinkezelés, a vércukorszint rendszeres ellenőrzése, támogatás, oktatás révén egészséges életet élhetnek a páciensek, és megelőzhetik vagy késleltethetik a cukorbetegséggel járó szövődményeket. A betegség kezelés protokolljának betartása nem egyszerű feladat, különösen gyermekkorban, és a szegényebb országokban. Így a nem megfelelően kezelt betegeknél diabéteszes ketoacidózis, és hipoglikémia is kialakulhat. Előbbi esetében a szervezetben felhalmozódó ketontestek súlyos fogyatékossgot, és korai halált okozhatnak, míg utóbbi ájulást, és szervek károsodását okozhatja [8].

Az 1-es típusú cukorbetegség számos tipikus tünettel rendelkezik. Ezek közül néhány a túlzott szomjúság (polidipszia), gyakori vizeles (poliuria), fáradtság, állandó éhség, hirtelen súlyvesztés, ágyba vizeles, és homályos látás [8]. Az 1-es típusú cukorbetegséget megnövekedett vércukorszint által diagnosztizálják, és a jellemző tünetek némelyike, vagy ritkán az összes jelenléte által (*1. táblázat*).

2.1.1.2 A 2-es típusú cukorbetegség

A 2-es típusú cukorbetegséget is hiperglikémia jellemzi. A test sejtjei nem képesek teljes mértékben reagálni az inzulinra, így több glükóz marad a vérben, melyet inzulin rezisztenciának is nevezünk [9]. Ebben az állapotban a hormon hatása csökken, vagy teljesen hatástalan, és ezért fokozódik a hasnyálmirigyben az inzulintermelés. Idővel a hasnyálmirigy béta-sejtjei nem tudnak lépést tartani a kereslettel, és elégtelen inzulintermelés alakul ki. Emellett a 2-es típusú cukorbetegséget a máj fokozott glükóz kibocsátása is okozhatja [10], [11]. A 2-es típusú cukorbetegséget leggyakrabban az idősebb felnőtteknél tapasztaljuk, de növekvő elhízás, testi inaktivitás, és nem megfelelő étrend miatt egyre inkább gyermekeknél és fiatalabb felnőtteknél is megfigyelhető. A 2-es típusú diabétesznek hasonlóak a tünetei, mint az 1-es típusú cukorbetegségnek, de a megjelenése kevésbé drámai, gyakran tünetmentes is lehet. Ezért a 2-es típusú cukorbetegség kezdetének pontos idejét általában lehetetlen meghatározni, és hosszabb idő diagnosztizálni a betegséget. Amennyiben hosszabb idő eltelik, amíg a betegséget felismerik, akkor olyan komplikációk lehetnek jelen a diagnózis felállításakor, mint például retinopátia, vagy az alsó végtagi fekély, amely nehezen gyógyul [12], [13]. A 2-es típusú cukorbetegség oka nem teljesen tisztázott, ám szoros kapcsolat van a túlsúly, az elhízás, a növekvő életkor, valamint az etnikai hovatartozás, és a családi kórtörténet között. Az 1-es típusú cukorbetegséghez hasonlóan a 2-es típusú cukorbetegség is a genetikai és a környezeti kiváltó okok kombinációjából származik [14].

A 2-es típusú cukorbetegség kezelésének fontos része az egészséges életmód, mely magába foglalja a rendszeres testmozgást, az egészséges étrendet, a dohányzás abbahagyását, és az egészséges testsúly fenntartását. Ha az életmód megváltoztatásának kísérletei nem elegendők a vércukorszint szabályozásához, orális gyógyszeres kezelés szükséges. Amennyiben az orális antidiabetikumok nem képesek megfelelően szabályozni a vércukorszintet, szükség lehet az inzulin pótlására is. A megemelkedett vércukorszint ellenőrzése mellett elengedhetetlen a vérnyomás, a vér lipidszint, és az anyagcsere rendszeres ellenőrzése (legalább évente). Ez lehetővé teszi a veseproblémák, a retinopátia, a neuropátia, a perifériás artériás betegség, és a lábfekély kialakulásának megelőzését [15], [16]. Rendszeres ellenőrzésekkel, és helyes életmóddal, és ha szükséges gyógyszeres kezeléssel, a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedők hosszú és egészséges életet élhetnek.

Globális szinten a 2-es típusú cukorbetegségek száma nagyon magas, és minden régióban növekszik. Ezt a növekedést a népesség előregedése, a gazdasági fejlődés, és a növekvő urbanizáció segíti elő. A betegségnek ez a formája a cukorbeteg 90%-át érinti, így komoly

közegészségügyi probléma, főként a szövődmények miatt. 2-es típusú diabétesz kezelésének a legfontosabb része a magas vércukorszint csökkentése, és diabéteszes szövődmények kialakulásának késleltetése, és megakadályozása [17].

2.1.1.3 Terhesség alatti diabétesz

A WHO és a nemzetközi nőgyógyászati és szülész szövetség szerint 2 féle hiperglikémiát különböztetünk meg a terhesség ideje alatt [18]. Egyik a gesztációs diabétesz (GDM), melynél a terhesség ideje alatt diagnosztizálják először a hiperglikémiát. A cukorbetegségnek e fajtája a terhesség alatt bármikor előfordulhat, de leggyakoribb a 24. hét után [19], és a terhesség után általában eltűnik. Másik fajtája a terhességi cukorbetegség (DIP), mely a terhesség előtt is jelen volt, vagy a terhesség alatt diagnosztizálják először, de a diagnosztizálás során megfelel a cukorbetegség diagnosztizálására szolgáló küszöbértékeknek (*1. táblázat*). A DIP előfordulhat a terhesség alatt bármikor, beleértve az első trimesztert is [20]. Becslések szerint terhesség alatt a hiperglikémia oka 75–90%-ban a gesztációs diabétesz [21]. A hiperglikémia egyértelmű tünetei a terhesség alatt ritkák, ezért nehéz megkülönböztetni a terhesség normál tüneteitől. A gesztációs diabétesz szűrésére orális glükóz toleranciateszt ajánlott a terhesség 24. és 28. hete között, de a magas kockázatú nők esetében a szűrést a terhesség alatt korábban kell elvégezni [22].

2.1.1.4 Más típusú cukorbetegségek

A WHO osztályozása szerint a cukorbetegségnek egyéb fajtái is vannak, ilyen például a monogén és másodlagos diabétesz [23]. Monogén diabétesz kialakulása csak egy gén eredménye, nem pedig a több gén, és környezeti tényezők kombinációja. A monogén cukorbetegség ritkán fordul elő, az összes eset kb 1,5–2%-a. Gyakran tévesen diagnosztizálják 1-es vagy 2-es típusú cukorbetegségként [24]. Habár ritkák, de ezek a betegek „emberi knock-out modelleként” szolgálhatnak, amelyek betekintést nyújtanak a cukorbetegség patogenezésébe [25]. Az utóbbi években a teljes genom genetikai vizsgálatainak növekedésével egyre több monogén cukorbetegség-formát fedeztek fel, így ezeknek a típusoknak a valódi gyakoriságát alábecsülhetjük [26]. Napjainkban már több mint 20 genetikai okát ismerjük, melyek közül a leggyakoribbak a következő gének mutációi: KCNJ11, ABCC8, 6q24, INS, GATA6 [27].

2.1.2. A cukorbetegség gyógyszeres kezelése

A cukorbetegség kezelésének első lépése az életmód-terápia (rendszeres testmozgás, egészséges étrend, dohányzás abbahagyása, egészséges testsúly fenntartása), és ha szükséges, akkor gyógyszeres kezelés [16]. A gyógyszeres terápia lehet orális antidiabetikus szer, és súlyosabb esetben az antidiabetikum mellé inzulinkezelés is szükséges. Antidiabetikus szerek közül általában metforminnal [26], mint első vonalbeli gyógyszerrel kezdik meg a kezelést. Jelenlegi hiperglikémiás szerek a diabétesz patofiziológiai hibáit, étvágy szabályozást, tápanyagok felszívódását és kiválasztását célozzák meg. A hiperglikémiás szerek a következő mechanizmusokkal csökkentik a vércukor szintet: a metformin gátolja a máj glükoneogenezisét; a szulfonilkarbamid-származékok és a glukagon-szerű peptid 1 (GLP-1) analógok és dipeptidil-peptid 4 (DPP) inhibitorok növelik a hasnyálmirigyben az inzulin szekrécióját; és a tiazolidindionok fokozzák az inzulinérzékenységet [16]. Azonban, a vércukorszintet orális antidiabetikus szerekkel gyakran nehéz optimális tartományon belül tartani. Ha egyetlen szer alkalmazásával nem sikerül megfelelő eredményt elérni, akkor kombinált terápia ajánlott, többféle, különböző hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszerek felhasználásával [28]. A forgalomban lévő számos gyógyszer ellenére a cukorbetegeknek továbbra is problémát jelent a glikémiás kontroll, ezért új gyógyszerek kifejlesztésére van szükség a morbiditás, a szövődmények csökkentéséhez, és az életminőség javításához.

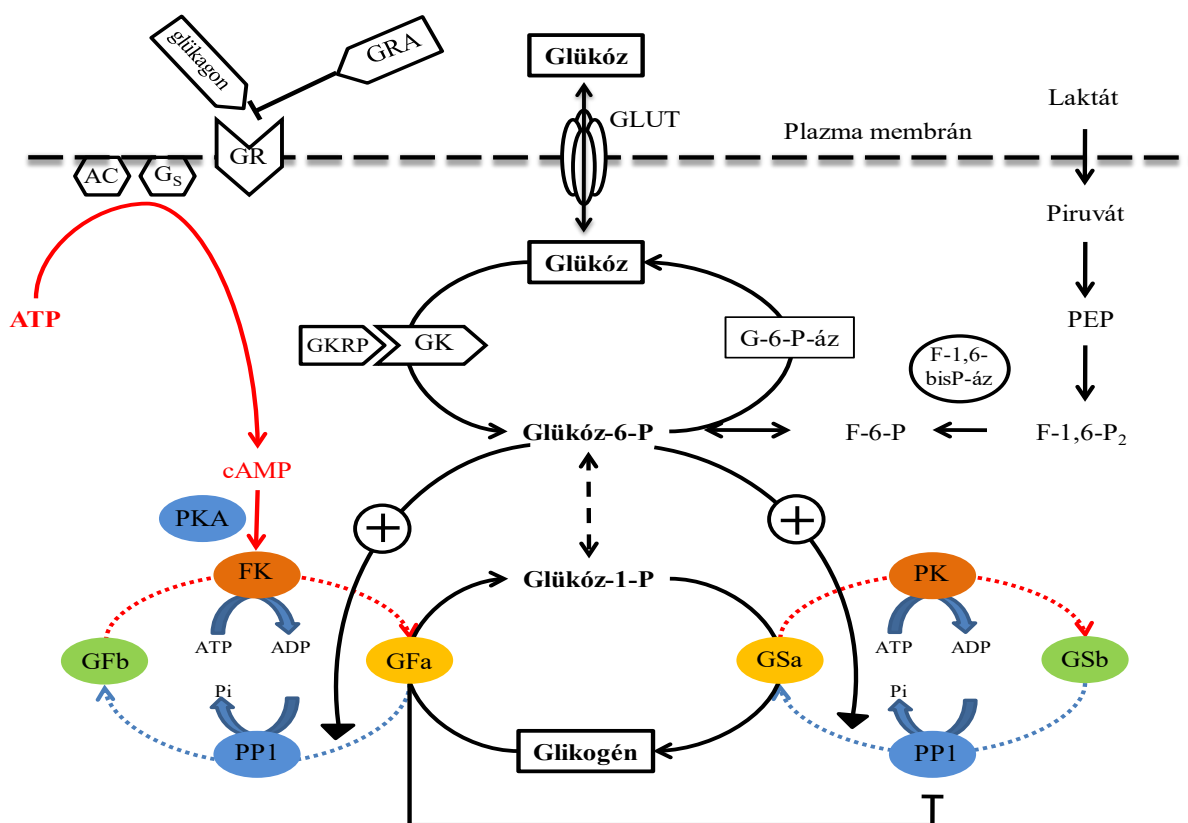
2.2. Glikogénanyagcsere

A glikogén olyan elágazó láncú glükóz polimer, amelyet a láncban α -(1,4)- és az elágazásoknál α -(1,6)-glikozidos kötések kötnek össze. Testünk glükózt nyerhet közvetlenül az étrendből vagy aminosavakból, és laktátból a glükoneogenezisen keresztül. Ebből a két elsődleges forrásból nyert glükóz vagy a véráramban kering, vagy a szervezet homopolimer formában, glikogénként tárolja.

Sejtekben a glikogén glikoszómában, fehérje és glikogén komplexében található. A glikoszómán belül a glikogén szerkezete három formában található meg, nevezetesen α -granulum, β -granulum és γ -részecske. Az α -granulumok elsősorban a májban találhatók, és több β -granulumból állnak. A β -granulum a gyors glükóz-forrásnak, az α -granulum lassabb energiaforrásnak tekinthető [29].

A máj az egyetlen olyan szövet, amely képes a glikogénből felszabadított glükózt a véráramba juttatni, így szabályozva a vércukorszintet. Ez alapján így a máj glikogén-raktára tekinthető a vércukorszint fő pufferének. Más szövetek is képesek szintetizálni, és lebontani a

glikogént, de ezt a glükózt a sejtek csak saját energiaigényeik fedezésére használják. A máj rendelkezik legnagyobb fajlagos glikogén-tartalommal, amely a tömegének 10%-a is lehet. Emellett két szövet tárol még jelentős mennyiségű glikogént, mint saját energiaforrás, a vázizom és az agy, de ezek mellett a vese, a szív és a zsírszövet is képes a glikogén raktározására. Izomban sokkal alacsonyabb glikogénmennyiség van a szövet tömegére vonatkoztatva (1% –2%), de mivel az izom teljes tömege sokkal nagyobb, mint a májé, a vázizmokban tárolt összes glikogén mennyisége akár ötszöröse is lehet a májban tárolt glikogén mennyiségének [30]. Agyban a glikogén mennyisége a teljes szövet tömegéhez viszonyítva kb 0,1%. Izomban, agyban valamint más, nem a májszövetekben tárolt, glikogénben található glükóz a hexokináz enzim jelenléte miatt elérhetetlen más szövetek számára, mert az enzim affinitása nagyon magas a glükózhoz, ezáltal a glükóz gyorsan foszforilálódik, és glükóz-6-foszfát hiányában nem alakul vissza. Emiatt glükóz-6-foszfát nem juthat ki a sejtből, így vagy glikogén szintetizálódik belőle, vagy az energiatermelésben vesz részt (*1. ábra*).



1. ábra. Glükóz anyagcsere szabályozása [31]

AC: adenilát-cikláz; G_s: aktivált G fehérje; GRA: glükagon-receptor antagonist; GR: glükagon-receptor; GKR: glükokináz regulátorfehérje; GK: glükokináz; PKA: cAMP-függő protein kináz; FK: foszforiláz kináz; GfB: glikogén-foszforiláz b (inaktív, defoszforilált forma); GFa: glikogén-foszforiláz a (aktív, foszforilált forma); GSb: glikogén-szintáz b (inaktív, foszforilált forma); GSa: glikogén-szintáz (aktív, defoszforilált forma); PK: protein kinázok; PP1: protein-foszfataz-1; F-6-P: fruktóz-6-foszfát; G-6-Páz: glükóz-6-foszfataz; F-1,6-P₂: fruktóz-1,6 biszfoszfát; PEP: foszfoenol-piruvát; F-1,6-bPáz: fruktóz-1,6-biszfoszfataz. A pontozott vonalak a reverzibilis foszforilációt jelölik.

A glikogén homeosztázis magában foglalja a glikogén szintézisének (glikogenezis), és a glikogén lebomlásának (glikogenolízis) összehangolt szabályozását. A két folyamat reciprok szabályozással működik. A glikogenolízist serkentő hormonok (glükagon, kortizol, adrenalin, noradrenalin) egyidejűleg gátolják a glikogenezist, ezzel szemben az inzulin stimulálja a glikogenezist miközben gátolja a glikogenolízist.

2.2.1. Glikogénszintézis

A glikogénszintézis kulcsenzime a glikogén-szintetáz (GS), amely egy 85000 dalton molekula tömegű enzim. A glükóz molekulák közötti α -1,4 kötések kialakítására képes, ehhez aktivált glükózt használ szubsztrátként. Két különböző izoformája létezik az emberi szervezetben. Az egyik izoforma a vázizomban fordul elő nagy mennyiségben, a másik pedig a májban. Az enzim májspecifikus izoformája hét foszforilációs helyet tartalmaz [32]. Regulációja az enzim szintézisével, foszforilációval, defoszforilációval, és allosztérikus szabályozás útján történhet. Szervezetünkben a fő regulátora a glükóz-6-foszfát [33].

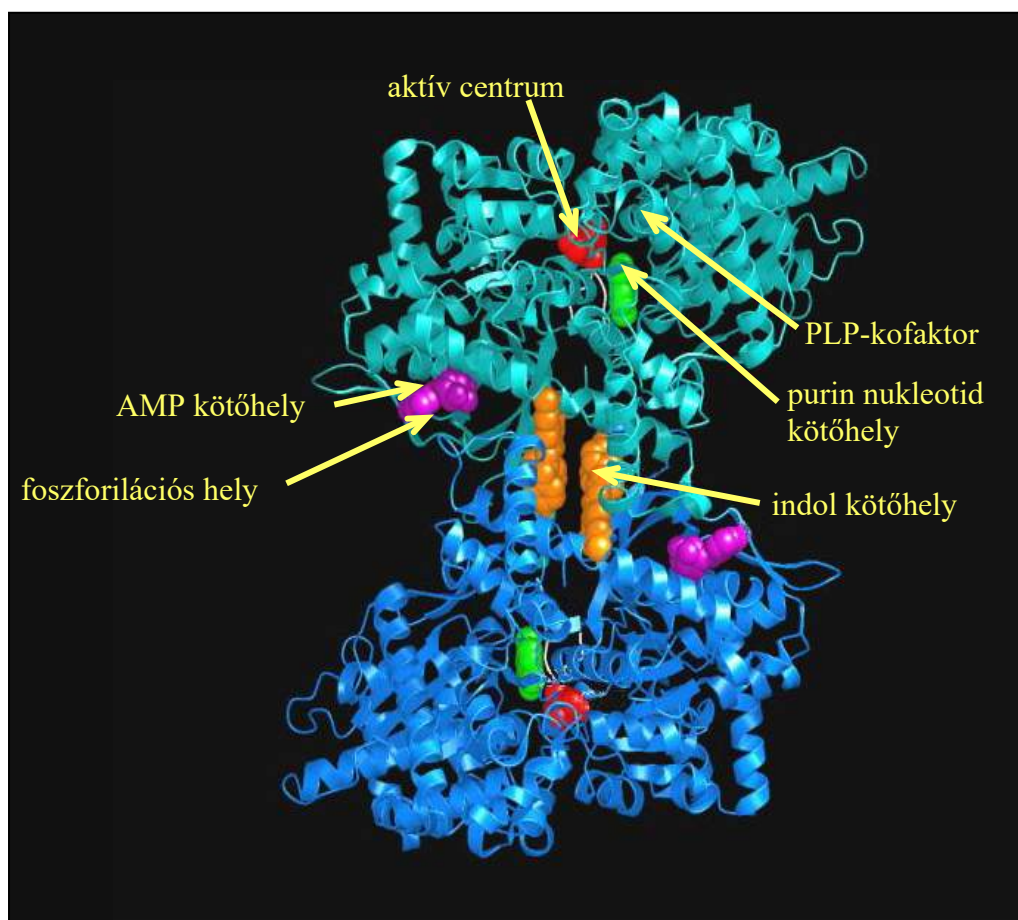
A GS szabályozása ellentétes a glikogén-foszforilázhoz (GF) képest. Defoszforilált állapotban a GS aktív (GSa), foszforilált állapotban inaktív (GSb). In vitro számos kináz képes foszforilálni: PKC, cAMP függő PK, kazein kináz 1 és 2 [34]. A foszforiláció csökkenti az enzim szubsztrát iránti érzékenységet, azonban az aktivitás allosztérikusan növelhető, glükóz-6-foszfáttal, amely hatására olyan konformációváltozás alakul ki az enzim aktív centrumában, amely beindítja a glikogén szintézisét [33], és emellett olyan konformáció változás is létrejön, amely elősegíti a foszforilált enzim defoszforilációját. Ezt az allosztérikus aktiváló hatást a glikogén lebontását elősegítő hormonok (glükagon, adrenalin) gátolják [35], [36].

2.2.2. Glikogenolízis és glikogén-foszforiláz

A glikogén lebomlása alapvetően a citoszolban történik. A citoszolikus út egyik legfontosabb enzime a glikogén-foszforiláz (GF). A citoszolban, különösen a vázizomban, a glikogén-foszforiláz kb. 40%-a a szarkoplazmatikus retikulum (SR, az izomsejt endoplazmatikus retikulum) membránjaihoz kapcsolódik. Glikogén-foszforiláz katalitikus aktivitását az enzim foszforilációs állapota szabályozza. Az enzim foszforilációját a foszforiláz-kináz (glikogén-foszforiláz kináz) enzim katalizálja. A foszforiláz-kináz aktivitását a foszforiláció és egy Ca^{2+} -kötő alegység, a kalmodulin szabályozza. A glikogén-foszforiláz és a foszforiláz-kináz asszociációja az SR membránján lehetővé teszi az SR-ben tárolt Ca^{2+} felszabadulását, és a gyors glikogenolízist az izomsejtek aktiválására.

Emlősökben a glikogén-foszforiláznak 3 izoformája található meg: máj, izom, és agy specifikus enzimek [37]. A különböző GF izoformák funkciói azonosak, de szabályozásuk bizonyos hasonlóságok mellett szövet specifikus tulajdonságokat is tartalmaz. Legtöbb tudásunk a nyúl vázizom GF vizsgálatán alapul. Normál körülmények között dimer szerkezetű, egy alegység 97500 molekulatömegű. A dimer forma alegységeit főként másodlagos kémiai kötések tartják össze. In vitro tetramer formában is előfordulhat (magas enzimkoncentrációnál,

AMP jelenlétében, vagy alacsony hőmérsékleten). A koffein, a hőmérséklet-emelkedés, a magas glükóz, glikogén és só koncentráció a dimer forma kialakulásának kedvez. A biológiailag aktív glikogén-foszforiláz homodimerként létezik. Mindkét alegységben található egy piridoxál-foszfát prosztetikus csoport, és egy foszforilációs hely, amely az aktivitásért felelős (Ser-14) [38]. A piridoxál-foszfát a katalízis szempontjából esszenciális. Emellett röntgenkristallográfiás vizsgálatokkal megállapították, hogy az enzim 5 ligandum-kötőhelyet is tartalmaz: az aktív centrum, a nukleotid kötőhely, az AMP kötőhely, az indol kötőhely és a glikogén kötőhely [39] (2. ábra).



2. ábra. A dimer glikogén-foszforiláz szerkezete és kötőhelyei [40]

A GF foszforiláltsága alapján három egymásba alakítható formában létezhet. Foszforiláz kináz foszforilálja a GF N-terminális alegységének Ser-14 aminosavját ATP felhasználásával. A *b* forma nem foszforilált, önmagában nincs katalitikus aktivitása, csak AMP vagy IMP jelenlétében aktív. Amennyiben a dimer enzim egyik alegysége foszforilálódik, *ab* forma keletkezik, amely részben önmagában is aktív, és az előbb felsorolt aktivátorokkal tovább

fokozható az aktivitása. Teljes aktivitást a mindkét alegységén foszforilált forma (GFa) mutatja [41], [42].

A GF feladata foszforolitikusan lebontani a glükózt a glikogén α -(1,4) kötéseinek hasításával. A reakció terméke a glükóz-1-foszfát, és egy glükózzal rövidebb glikogén molekula.



A foszforolitikus hasításnak több előnye is van. A glikogénből eltávolított glükóz aktivált állapotba kerül, azaz foszforilálva van, és ez ATP felhasználása nélkül megy végbe. Az anorganikus foszfát (P_i) koncentrációja elég magas a sejtben ahhoz, hogy a reakció egyensúlyát glikogén lebontás irányba tolja el.

A keletkezett glükóz-1-foszfát nem képes kидiffundálni a sejtéből, így a glikolízis szubsztrátjává válik (például izomsejtekben). A GF hatására keletkező glükóz-1-foszfátot foszfo-glukomutáz alakítja át glükóz-6-foszfáttá [43]. A glükóz-6-foszfát glükózzá történő átalakulása csak májban, vesében és bélben megy végbe glükóz-6-foszfátáz segítségével, mivel a glükóz-6-foszfátáz enzim nem fordul elő más glikogént szintetizáló szövetekben (pl. vázizom és agy). A vázizomban és agyban a glikogénből felszabaduló glükóz glikolitikus úton oxidálódik. A májban a glükóz-6-foszfátáz legfontosabb szerepe, hogy szabad glükózt hoz létre a vércukorszint állandó szinten tartása érdekében [43].

2.2.3. Glikogén-foszforiláz inhibitorai

A glikogén lebontás első lépésének enzime a GF, mely fontos szerepet tölt be a vércukor szint szabályozásában. Emiatt több kutatócsoport tervezett vegyületeket, melyek az enzim gátlásán keresztül csökkenthetik a vércukorszintet. Az enzimen 5 ligandum-kötőhely található, melyeken keresztül a specifikusan tervezett molekulák gátolhatják az enzim aktivitását [44].

2.2.3.1. Aktív centrum gátlószerei

Az enzim aktív centrumához kapcsolódnak a szubsztrátok, itt zajlik a katalízis. Ezért a kutatók az enzim szubsztrátjának szerkezetét vették alapul, és hasonló szerkezetű molekulákat terveztek, és szintetizáltak. Az enzim természetes inhibitora az aktív centrumon keresztül kapcsolódó glükóz (α -D-glükóz $K_i=1,7$ mM, β -D-glükóz $K_i=7,4$ mM) [45]. Kutatók a glükóz szerkezetét is felhasználva jobb gátlási állandóval rendelkező glükóz-származékokat

szintetizáltak, így fedeztek fel egy tiohidantoin-származékot, melynek gátlási állandója alacsony μM -os tartományba esik [46].

2.2.3.2. AMP kötőhely

Az AMP az enzim allosztérikus aktivátora, kötődésével az enzim inaktív formájában konformáció változás jön létre, amely megnyitja az aktív centrumot [47]. GFa-hoz is kapcsolódhat az AMP, tovább növelve annak aktivitását. Azok a vegyületek, amelyek az AMP kötőhelyhez kapcsolódnak, leszorítják az AMP-t, így gátolják az enzim működését. A kutatók két dihidro-piridin származékot is találtak, amelyek az AMP kötőhelyen keresztül gátolják az enzim működését. Mindkét vegyület gátolta a glükóz felszabadulást patkány májból izolált primer májsejteken glükagon hatására [48], [49].

2.2.3.3. Nukleotid kötőhely

Nukleotid kötőhelyhez kapcsolódó molekulák is allosztérikusan fejtik ki a hatásukat. Legismertebb kapcsolódó molekula a koffein, melynek glükóz jelenlétében 1 mM a gátlási állandója [50]. Egy másik vegyület mely ide kötődik a flavopiridol, mindkét vegyület az enzim apoláris csoportjaihoz kapcsolódik saját apoláris aromás csoportjaik segítségével [51].

2.2.3.4. Indol kötőhely

2000-ben azonosítottak egy új kötőhelyet a GF enzimén, melyhez egy már korábban azonosított indolszármazék kapcsolódott erősen gátolva az enzimet. Az indol kötőhelyhez heterociklusos, hosszabb oldalláncot tartalmazó vegyületek kapcsolódhatnak [52]. A Pfizer cég több vegyületet is azonosított, melyek ezen a kötőhelyen keresztül gátolják az enzim aktivitását. A vegyületeket vizsgálták, mint orális antidiabetikus szereket. A klinikai vizsgálatok során a vegyületek 3 óra alatt dózis függően csökkentették a vércukorszintet, és növelték a glikogén szintézist [53], ennek ellenére nem vált belőlük klinikumban alkalmazott gyógyszer.

2.2.3.5. Glikogén kötőhely

Glikogén kötőhelyen keresztül kapcsolódik a GF a glikogén-granulátumokhoz. Ehhez a kötőhelyhez kapcsolódó molekulák, alacsony gátlási állandóval rendelkeznek. Ilyen vegyület például a maltoheptaóz ($K_i = 1 \text{ mM}$) és a γ -ciklodextrin ($K_i = 7,4 \text{ mM}$) [54], [55].

2.3. Glükóz-transzporterek

Már 1948-ban LeFevre [56] feltételezte, hogy a glükóz a lipid kettősrétegen való átjutásához egy specifikus komponensre van szükség a sejtmembránban. 1950-es évek elején Widdas [57] vivő, szállító által segített mechanizmust javasolt a juh placentán keresztüli glükóztranszport kinetikájának magyarázatára, de csak az 1970-es években bizonyították be, hogy a glükóztranszportot egy a vörösvérsejt plazmamembránjába ágyazott fehérje végzi. Emlős sejtekben a glükóz transzportját a sejtmembránban található glükóz transzporterek biztosítják. A transzportereket szerkezetileg és funkcionálisan 2 típusra oszthatjuk: glükóz transzporterek (GLUT), melyek facilitált diffúzióval működnek [58], és a nátrium-glükóz ko-transzporterek (SGLT), amelyek aktív transzporttal működnek, de nem ATP-t használnak energiaforrásként, hanem a koncentráció-gradiens ellenében nátriummal kötötten szállítják a glükózt [59].

A GLUT fehérjék legfőbb facilitátor fehérjék családjához (major facilitator superfamily, MFS) tartoznak [60]. Jelenleg jóval több, mint 5000 tagot azonosítottak ebben a szupercsaládban. A GLUT fehérjecsalád 13 rokon tagját azonosították human genomban [61]. A GLUT-ok megközelítőleg 500 aminosavból, 12 transzmembránon átívelő alfa-hélix szegmensből, és egyetlen N-kapcsolt oligoszacharidból állnak. Három különböző osztályba sorolhatók szekvencia-hasonlóságaik alapján [62]. Testünk minden sejtjében megtalálhatóak. Megkönnyítik a „glükózenergia” független bejutását a sejtekbe, és közel azonos glükóz koncentrációt hoznak létre a sejteken kívül és belül.

2.3.1. GLUT1

A GLUT1 az egyik legintenzívebben vizsgált membrán transzport fehérje. Ezen fehérjén keresztül történő transzport mechanizmusáról, és kinetikájáról az elmúlt évtizedekben sok száz tanulmány született [63]. Egy uniporter fehérje, amelyet a SLC2A1 gén kódol [64]. A gén 54,1 kDa méretű fehérjét kódol, amely 492 aminosavból áll [65]. A GLUT1 megkönnyíti a glükóz transzportját az emlős sejtek plazmamembránjain keresztül [66]. Szinte minden szövetben előfordul, az expresszió mértéke általában korrelál a sejt glükóz metabolizmusának sebességével. Ez a fehérje az emlős vér-agy gát egyik fő glükóz transzportere, elsősorban a sejtmembránban és a sejtfelszínen található [61]. Nagy mennyiségben fordul elő vörösvérsejtek membránjában, és a benne lévő fehérjék kb. két százalékát teszi ki. A glükóz GLUT1 által megkönnyített diffúzióval jut a sejtbe, körülbelül 50000-szer nagyobb sebességgel, mint a katalizálatlan transzmembrán diffúzióval. A GLUT1 részletes felépítése még nem ismert, de az

egyik elfogadható modell azt sugallja, hogy fehérje szerkezete egy hidrofíl csoportokkal bélelt transzmembrán csatornát eredményez, amely hidrogén-kötéssel képes kötni a glükózt, miközben az a csatornán halad keresztül [67]. A GLUT1 gén mutációi felelősek a GLUT1 hiányért, és ebből kialakuló betegségért, amely ritka autoszomális domináns rendellenességek [68], melyeket a cerebroszpinális folyadékban alacsony glükóz koncentráció (hypoglycorrachia) jellemez, amely egyfajta neuroglükopénia, amely a vér-agy gáton történő glükóz transzport károsodásából származik.

2.3.2. GLUT2

A GLUT2 fehérjét az SLC2A2 gén kódolja [69]. A GLUT2-nek egyedülállóan magas a K_M -értéke glükózra nézve (17 mM), és nagyon magas szinten expresszálódik a hasnyálmirigy béta-sejtjeiben, valamint a bél- és vese hámsejtjeinek bazolaterális membránjaiban és a hepatocitákban [70]. A vércukorszint növekedése váltja ki a hasnyálmirigy béta-sejtjeiben az inzulin szekréciót, a hepatocitákban pedig a glikolitikus és lipogén gének expresszióját. A GLUT2 hiánya megakadályozza a glükóz által stimulált béta-sejtek inzulinszekrécióját, és a hepatocitákban a glükózszenzitív gén expresszió szabályozását. A génmódosított egerekkel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a GLUT2-re a hepatoportális véna területén, és a központi idegrendszerben jelenlévő glükóz-szenzorok működéséhez is szükség van. Ezek a szenzorok szabályozzák a glükagon és inzulin szekrécióját, az étkezési magatartást, és a perifériás szövetek glükózfelvételét [71].

2.3.3. GLUT3

A GLUT3 [72] a fő neuronális glükóz transzporter, jelen van mind a dendritekben, mind az axonokban és az SLC2A3 gén kódolja. Expressziós szintje az agy különböző régióiban korrelál az adott terület glükóz felhasználásával. A GLUT3 magas affinitással rendelkezik a glükózra nézve ($K_M=1,5$ mM). A GLUT3 magasabb affinitással rendelkezik a glükózhoz, mint a GLUT1, 2 vagy 4, és legalább ötször nagyobb szállítási kapacitással rendelkezik, mint a GLUT1 és a GLUT4, ami különösen jelentős az idegsejtek glükóz transzportjában játszott szerepe szempontjából, ahol az idegsejteket körülvevő környezeti glükózsztint 1-2 mM, ami körülbelül ötször alacsonyabb, mint a szérumban, ahol a glükózsztint 5-6 mM [72]. A GLUT3 limfocitákban, monocitákban/makrofágokban és vérlemezkékben is expresszálódik. Ezekben a sejtekben az intracelluláris vezikulákban van jelen, amelyek a sejtek aktiválásakor

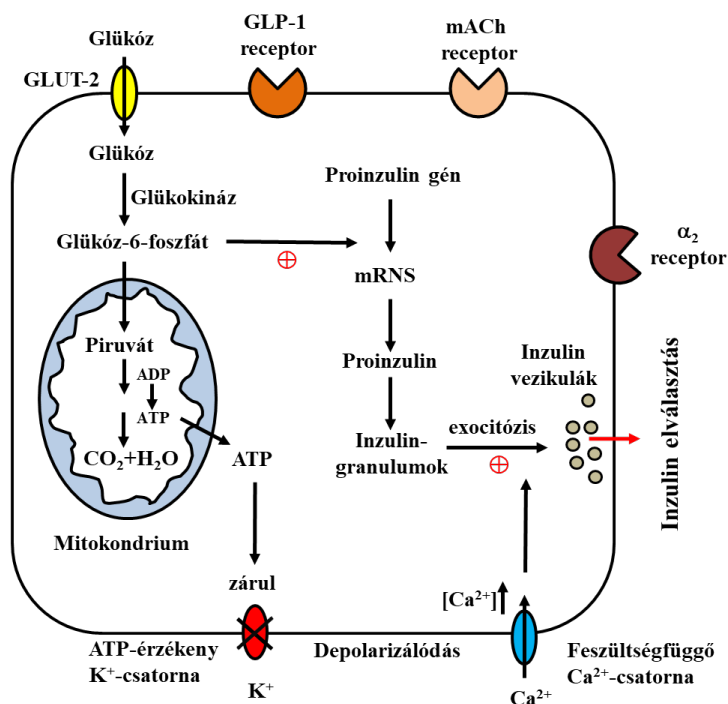
transzlokálódhatnak, és fúzionálnak a plazmamembránnal a fokozott glükózfelvétel és anyagcsere biztosításának érdekében.

2.3.4. GLUT4

SLC2A4 gén által kódolt fehérje. A GLUT4 egy inzulin által szabályozott glükóz transzporter, amely elsősorban a zsírszövetekben és a harántcsíkolt izmokban (váz és szív) található meg. Az első bizonyítékot erre a különálló glükóztranszport fehérjére David James szolgáltatta 1988-ban [73]. A sejtfelszínen lévő GLUT4 lehetővé teszi a keringő glükóz könnyebb bejutását a koncentráció gradiens segítségével az izom- és zsírsejtekbe. A sejtekbe jutó glükózt a májban a glükokináz, míg más szövetekben a hexokináz gyorsan foszforilálja, hogy glükóz-6-foszfátot képezzen, amelyből ezután glikogénné szintetizálódik, vagy bekerül a glikolízisbe. A glükóz-6-foszfát nem diffundálhat vissza a sejtekből, ami a glükóz koncentráció-gradiensének fenntartását is szolgálja. GLUT4 mennyisége vázizomsejtekben testmozgás vagy izomösszehúzódás következtében is megnőhet [74]. A GLUT4-et hordozó vezikulák transzferrin pozitívak vagy negatívak, és különböző ingerek serkentik a kialakulásukat. A transzferrin-pozitív GLUT4 vezikulák izomösszehúzódással, míg a transzferrin negatív vezikulák inzulin stimulációval és testmozgással aktiválódnak [75], [76]. A szívizom kissé eltér a vázizomtól, erre egyik példa, hogy nyugalmi állapotban inkább zsírsavakat használ energiaforrásként. Amint a szívizom aktivitása növekszik, és gyorsabban kezd pumpálni, a sejtekben nő a glükóz oxidációjának a sebessége [77]. A szívizomban a GLUT1 és GLUT4 mRNS-szintjének vizsgálata azt mutatja, hogy a GLUT1 nagyobb szerepet játszik a szívizomokban, mint a vázizomokban [78], de a GLUT4 azonban továbbra is a glükóz elsődleges szállítója a szívizomban [79].

A zsírszövet egy energiaraktár az anyagcsere homeosztázisának megőrzése érdekében. Testünk glükóz formájában veszi fel az energiát, melynek egy részét felhasználja, a maradékot pedig glikogénként (elsősorban a májban, az izomsejtekben) vagy trigliceridként a zsírszövetben tárolja [80]. Kimutatták, hogy a glükózbevitel és az energiafelhasználás egyensúlyának megbomlása a zsírsejtek hipertrófiájához, és az elhízáshoz vezető hiperpláziához vezet [81]. Ezenkívül az adipocitákban található GLUT4-et kódoló gén mutációi szintén megnövekedett GLUT4 expresszióhoz vezethetnek a zsírsejtekben, ami lehetővé teszi a megnövekedett glükóz felvételt, és ebből kialakuló zsírszintézist. Amennyiben a GLUT4 nagy mennyiségben expresszálódik, akkor megváltoztathatja a tápanyagok eloszlását, és a felesleges glükózt eljuttatja a zsírszövetbe, növelve a zsírszövet tömegét [81].

A GLUT4 transzportereket alacsony vércukorszint mellett a sejtek vezikulákban tárolják a citoplazmában, amelyek inzulin hatására helyeződnek ki a sejtmembránba. Az inzulin a hasnyálmirigy béta sejtjeiben termelődik, és raktározódik, amíg megnövekedett vércukorkoncentráció hatására véráramba nem kerül (3. ábra). A vérben lévő glükóz GLUT segítségével bejut a béta-sejtbe, melyet a glükokináz foszforilál, és a glikolízis eredményeként piruvát képződik belőle. Ez a citromsav-ciklus aktivitásának növekedéséhez vezet a mitokondriumokban, amelynek révén az adenzin-difoszfát (ADP) átalakul adenzin-trifoszfáttá (ATP), mely az ATP-érzékeny káliumcsatornák záródását, a membrán depolarizációs hullámát, és a feszültségtől függő kalciumcsatornák ezt követő aktiválódását okozza [82]. A kalcium bejutását a sejtekbe vezikulák membránfúziója követi, amelynek eredményeként a sejtekben a vezikulákban tárolt inzulin felszabadul a véráramba [83]. Más tényezők is szerepet játszanak az inzulin elválasztásban, az adrenalin (α_2) gátló, a glukagonszerű peptid 1 (GLP-1) és az acetilkolin (mACh) serkentő hatású. [82]. A megnövekedett inzulinszint hatására a vezikulákban tárolt GLUT4 gyorsan beépül a zsír és a harántcsíkolt izom sejtek membránjába, ezáltal megnövelve a glükózfelvételt a sejtekben. Alacsony vércukorszint elérése után a GLUT4 endocitózissal újra vezikulákba zárva visszakerül a citoplazmába, így a vérben lévő glükóz azon sejtek rendelkezésére fog állni, amelyeknek nagyobb szükségük van rá [80].



3. ábra. Inzulin felszabadulása a β -sejtekben [82]

2.3.5. GLUT5

A GLUT5 egy fruktóz transzporter, amelyet SLC2A5 gén kódol [84]. Az enterociták apikális határán expresszálódik a vékonybélben [61]. A GLUT5 lehetővé teszi a fruktóz bejutását a bél lumenből az enterocitákba, megkönnyítve a diffúziót, mivel a fruktóz magas koncentrációban van jelen a bél lumenében. A GLUT5 expresszálódik még a vázizomban [85], a herében, a vesében, a zsírszövetben és az agyban is [86].

2.3.6. Nátrium-glükóz kotranszporter (Sodium-Glucose Cotransporter, SGLT)

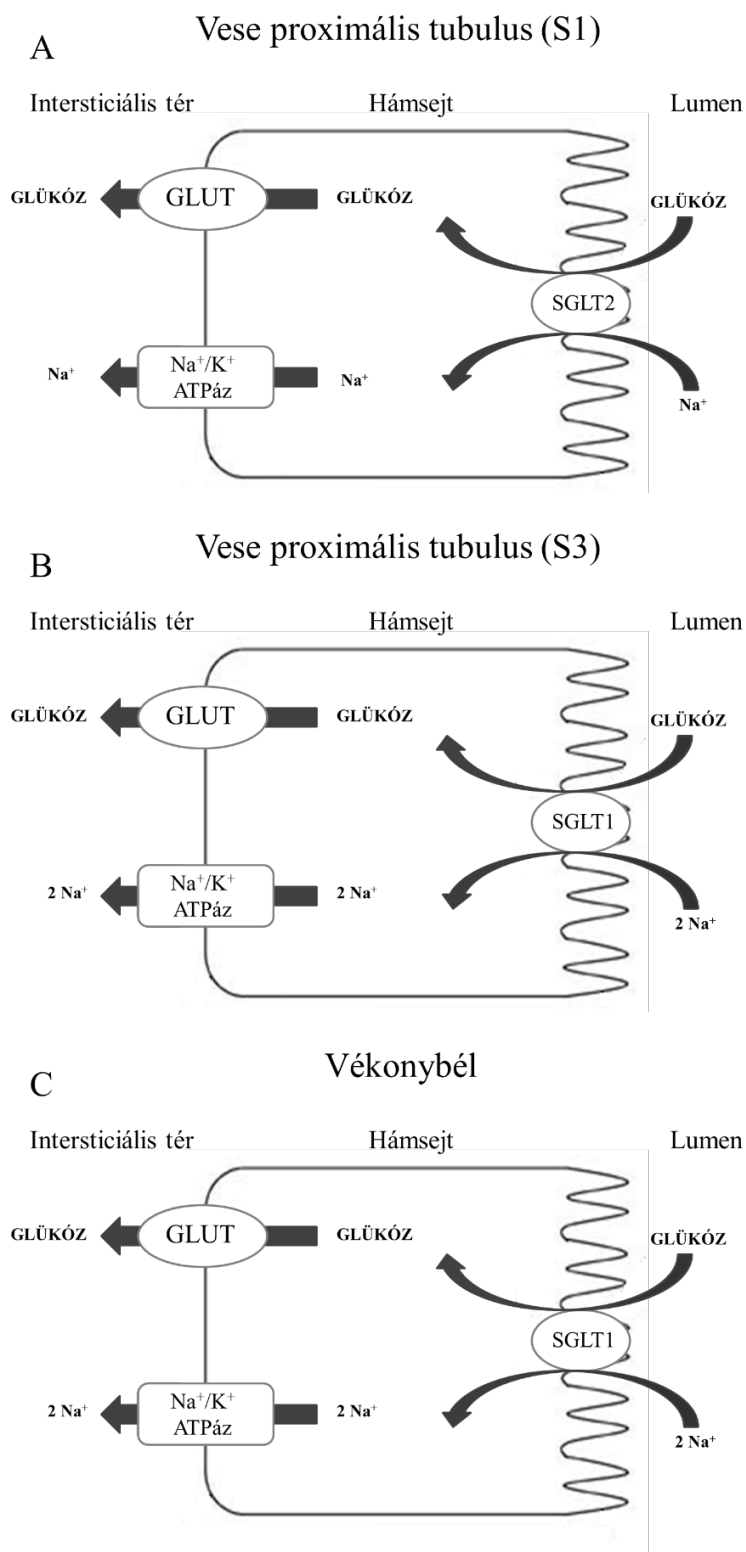
SGLT-k a membránfehérjék egyik nagy családját alkotják, amelynek glükóz, aminosavak, vitaminok, és egyes különféle ionok transzportja a feladata az apikális membránon keresztül a sejtekbe. Az SGLT-knek hat humán izoformáját különböztetjük meg (2. táblázat) [87].

2. táblázat. Az SGLT1 és az SGLT2 szöveti expressziója és biokémiai tulajdonságai:

	Előfordulás	Funkció
SGLT1	bél, légcső, vese, szív, agy, here, prosztata	glükóz / galaktóz transzporter
SGLT2	vese, máj, pajzsmirigy, izom, szív	glükóz transzporter
SGLT3	bél, here, méh, tüdő, agy, pajzsmirigy	glükóz szenzor
SGLT4	bél, vese, máj, agy, légcső, tüdő, méh, hasnyálmirigy	mannóz /1,5-anhidro-D-glicitol / fruktóz transzporter [88]
SGLT5	vese, agykéreg	fruktóz transzporter [89]
SGLT6	gerincvelő, vese, agy	mio-inozitol / glükóz transzportere [90]

Ezek a transzporterek a glükózt és a nátriumot együttesen szállítják a sejtekbe nátrium koncentráció-gradiens ellenében [91]. Közülük az SGLT 1 (gén neve: SLC5A1) és az SGLT2 (gén neve: SLC5A2) a legjobban ismert, mivel kulcsszerepet játszanak a glükóz és a nátrium transzportjában a bél és vese hámsejtjeinek membránján keresztül [92]. A vékonybélben a glükóz beáramlását a hámsejtbe az apikális membránban elhelyezkedő SGLT1 segíti, majd a glükóz a bazolaterális membránban található GLUT2 útján a keringésbe áramlik. Ezen kívül a GLUT és az SGLT a vese tubuláris sejtjeiben is együtt működik. SGLT szállítja a glükózt az

apikális membránon keresztül a tubuláris sejtekbe, majd a GLUT juttatja a bazolaterális membránon át a vérkeringésbe (4. ábra) [93].



4. ábra. SGLT1, és SGLT2 legfontosabb előfordulása az emberi szervezetben

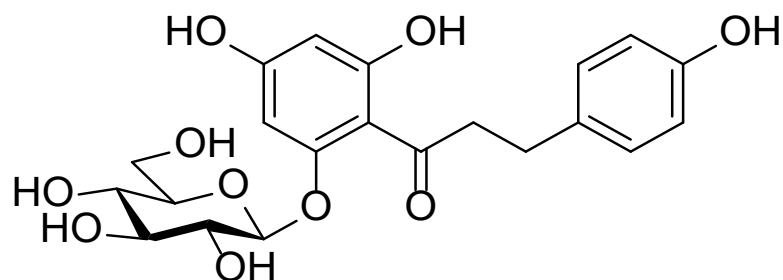
A: Vese proximális tubulus S1 szegmens; B: Vese proximális tubulus S3 szegmens; C: Vékonybél

Amíg a GLUT-ok azonossá teszik a plazmamembrán mindkét oldalának a glükóz koncentrációját, mivel a glükóz gradiens a hajtóerejük, azonban az SGLT-k képesek két különböző glükóz koncentrációt létrehozni a membrán két oldala között, mert a nátrium gradiens a hajtóereje a glükóz felvételének [59]. Az SGLT1 a vékonybélben glükóz felszívódásáért, míg az SGLT2 a vesében glükóz reabszorpciójáért felelős (3. táblázat).

3. táblázat. Az SGLT1 és az SGLT2 szöveti expressziója és biokémiai tulajdonságai:

	SGLT1	SGLT2
Előfordulás	leginkább a vékonybélben kis részben vese, szív, agy	főként vesében
Elhelyezkedés a vesében	proximális tubulus S3 szegmense	proximális tubulus S1 és S2 szegmense
Monoszacharid szelektivitás	glükóz = galaktóz	glükóz > galaktóz
Nátrium/glükóz sztöchiometria	1:2	1:1
Glükóz affinitás	magas (0,5 mM)	alacsony (2 mM)
Glükóz transzport kapacitás	alacsony	magas

Figyelembe véve az SGLT1 és az SGLT2 élettani funkcióit, ésszerűen a gyógyszerkutatások célpontjai lettek. 1987-ben arról számoltak be, hogy a florizin (5. ábra), mely SGLT1 és SGLT2 természetben előforduló inhibitora, egy tanulmány szerint enyhíti a cukorbetegség tüneteit hasnyálmirigy eltávolításon átesett patkányokban [94]. A florizin egy fitokémiai anyag, amely a polifenolok osztályába tartozik. Természetes forrásokban előfordulhat más polifenolokkal, például kvercetin, katechin, epikatechin, procianidinek és rutin. A florizin elsősorban éretlen almában [95], illetve nyomokban eperben is megtalálható [96]. A florizin az alma vegetatív szöveteiben (például levelekben és kéregben), és magvaiban található meg a legnagyobb mennyiségben. Florizin szájon át történő adagolása során a tápcsatornánkban található glükózidáz enzimek hatására elhidrolizál, aglikonná és floretinné [97]. Emiatt a kutatók a florizin szerkezetét is alapul véve olyan molekulákat kezdtek el szintetizálni, amelyek jó gátlószerei az SGLT2 fehérjének, és nem hidrolizálnak el a tápcsatornában. A kutatások eredményeként több vegyületet is szintetizáltak, amelyek már forgalomban is vannak, mint SGLT2 inhibitorok (4. táblázat) [98].



5. ábra. A florizin szerkezete [99]

A többi SGLT-hez hasonlóan az SGLT3 (génnev: SLC5A4), is megtalálható a bélben, lépben, májban, vesében, vázizomban és kolinerg neuronokban, de nem funkcionális nátrium-glükóz transzporter, hanem glükóz-szenzorként működik a kolinerg idegsejtek membránjában [100].

Az SGLT4, 5, 6-ról jelenleg csak kevés információ áll rendelkezésünkre. SGLT4 (génnev: SLC5A9) a vékonybélben, a vesékben, a májban, a tüdőben, az agyban, a légcsőben, a méhben és a hasnyálmirigyben, az SGLT5 (gén név: SLC5A10) főleg a vesékben expresszálódik, és az SGLT6-t (génnev: SLC5A11) alacsony affinitású D-glükóz transzporternek tekintik a vékonybélben. Ezen SGLT-k fiziológiai szerepe még kevésbé ismert [101].

2.3.6.1. Nátrium-glükóz kotranszporter 1 (SGLT1)

A fehérjét 1987-ben expressziós klónozással fedezték fel [102]. Az SGLT1 fehérje 662 aminosavból épül fel, 14 alfa-hélixből áll, és mind az N-, mind a C-terminális vége a plazmamembrán extracelluláris oldalán helyezkedik el [103]. Az SGLT1 fehérje részt vesz a glükóz és galaktóz facilitált szállításában az eukarióta és a prokarióta sejtekben. Az SGLT1 feladata a glükóz és a galaktóz felszívása a vékonybélben [104], emellett a glükóz és a nátriumionok reabszorpciója a nefron tubulusából [105]. Kis mennyiségben még a szívben és az agyban is előfordul (3. táblázat).

Egyes feltételezések szerint a fehérje tartalmaz protein kináz A (PKA) és protein kináz C (PKC) foszforilációs helyeket, amelyek foszforilációval szabályozzák a működését [106]. Emellett *Xenopus* petesejteken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az SGLT1 által közvetített glükóz transzportot a szérum és a glükokortikoidok által indukálható kináz 1 (SGK1) fokozza [107]. Egy másik tanulmány szerint az AMP-aktivált protein-kináz (AMPK) aktiválása növeli az SGLT1 membrán expresszióját és aktivitását [108].

2.3.6.2. Nátrium-glükóz kotranszporter 2 (SGLT2)

A fehérjét 1994-ben homológ szkríneléssel (homology screening) azonosították [109]. Az SGLT2 fehérje 672 aminosavból áll, N- és C-terminális vége extracelluláris [110]. Humán SGLT2 K_M -értékei glükózra 2 mM, és nátriumra 25 mM, emellett az SGLT1-től eltérően az SGLT2 alacsony affinitású, nagy kapacitású glükóz transzporter [111]. Az SGLT2 főként rágcslók és emberek veséjében expresszálódik, de kis sgtalálható [112]. Ezen kívül az SGLT2 expresszálódik még a hasnyálmirigy α -sejtjeiben, és részt vesz a glükagon szekréciójában [113]. Az SGLT2 az emberek és rágcslók veséjének proximális tubulusainak S1 és S2 szegmensének lumenális membránjában lokalizálódik (4. ábra), míg az SGLT1 az S3 szegmens lumenális membránjában helyezkedik el [114]. Az SGLT2 elsődleges feladata a glükóz-reabszorpciója a nefronokban [115].

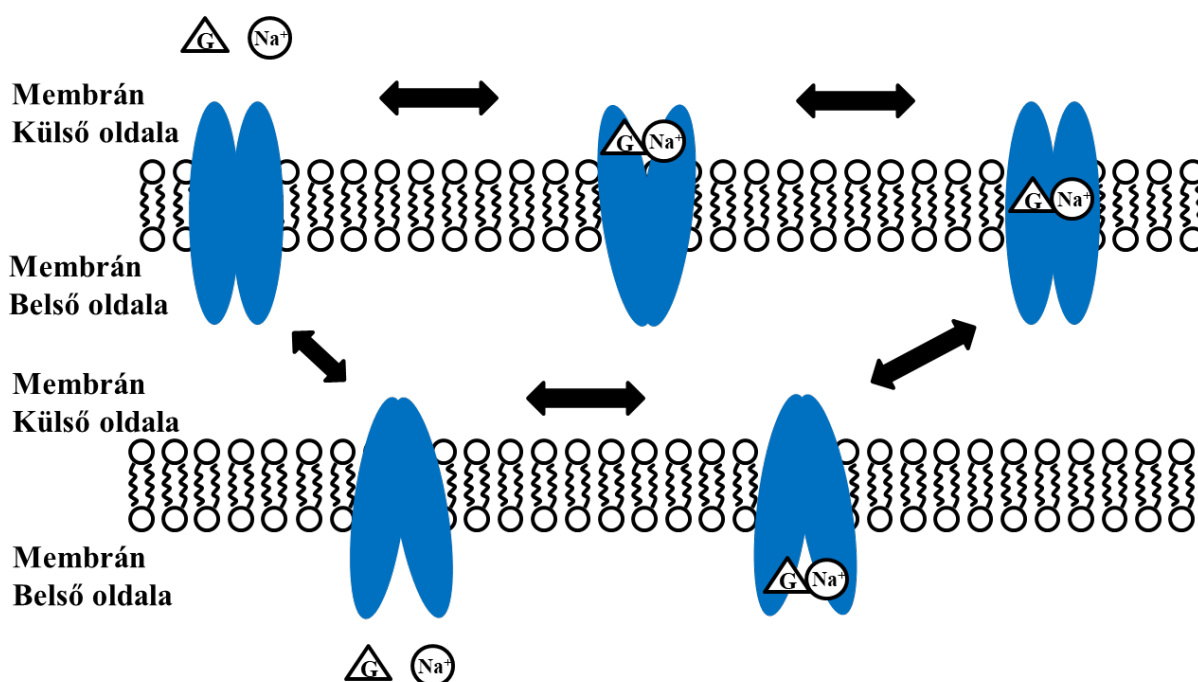
Az SGLT2 által végzett transzportra számos molekuláris szabályozás, beleértve a protein kinázokat, fejt ki hatását. Egy tanulmány szerint protein-kináz A (PKA) aktiváció 225%-kal, illetve a protein-kináz C (PKC) 150%-kal növelte a glükózfelvételt az SGLT2-t expresszáló humán embrionális vesesejtekben [115]. A PKA-mediált hatás összefügghet a membránban megnövekedett vezikula-fúzió sebességgel, azonban a PKC-közvetített hatásra még nem találtak mechanizmust. Renális sertés sejt vonalban az interleukin 6, és tumor nekrosis faktor fokozta az SGLT2 transzkripcióját, és fehérje expresszióját [116]. Hasonlóképpen, a transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ foszforilációja (transforming growth factor $\beta 1$) és asmad3 transzkripció faktor downstream szabályozása megemelte az SGLT2 szintjét humán vese proximális tubulus sejtekben [117].

2.3.6.3. SGLT1 és 2 funkciója a vesében

Vesében az SGLT1 és az SGLT2 továbbítja a proximális kanyarulat csatorna apikális membránján keresztül a glükózt a sejtek belsejébe, majd a glükóz a GLUT1 és GLUT2 transzporterekén keresztül távozik a bazolaterális membránon át [118]. Euglikémia (artériás vércukor koncentráció $5,5 \pm 0,5$ mmol/l) esetén a filtrált glükóz visszaszívását 80% vagy annál magasabb arányban az SGLT2 végzi, míg az SGLT1 a fennmaradó glükóz reabszorpciójáért felelős [119]. Előbbiek mellett, a glükóz és a nátrium aránya is különbözik a két transzporter között: az SGLT2 1:1 arányban, míg az SGLT1 1:2 arányban szállítja a glükózt és a nátriumiont (3. táblázat) [111].

A transzport mechanizmusa (6. ábra) a következő: az SGLT alapállapotban a membrán külső oldala felé néző konformációval rendelkezik nyitott receptorokkal, előkészítve a

nátriumion(ok) és glükóz egyidejű megkötését. Bekötődés után a transzporter konformációja megváltozik, ami megakadályozza a nátriumionok és a glükóz disszociációját [120]. A fehérje szerkezete még egyszer megváltozik a sejt belseje felé forduló konformációvá, amely lehetővé teszi a nátriumion(ok) és glükóz disszociációját. Disszociáció után a fehérje visszatér a kifelé néző konformációs állapotba, és készen áll újabb nátriumion(ok) és glükóz megkötésére [120].



6. ábra. SGLT fehérjék transzportmechanizmusa [121]

G: Glükóz, Na^+ ; Nátriumion(ok);

SGLT1 esetében 2 nátriumion, SGLT2 esetében 1 nátriumion vesz részt 1 transzport ciklus alatt.

Amikor az SGLT2 farmakológiai gátlását idézzük elő, a glükóz mennyisége megnő a proximális tubulus disztális részében, és ekkor az SGLT1 próbálja kompenzálni a glükóz reabszorpcióját. Ezért az SGLT2 gátlókkal kezelt euglikémiás emberek frakcionált glükóz-reabszorpciója csak 40-50%-ra csökken [122], és euglikémiás SGLT2 knock-out egerekben a frakcionált glükóz reabszorpció átlagos értéke 36% [123]. Vad típusú egerekben az SGLT2 inhibitor, empagliflozin (4. táblázat), dózis függően növelte a vizelettel kiválasztott glükóz mennyiségét, miközben a dózis-válasz görbe balra tolódott, és knock-out egerekben maximális válasz megduplázódott [119]. Az SGLT1 kompenzáló hatását SGLT2 inhibitorral kezelt vad típusú egerekben, és kettős K.O. egereket kontrollként használva vizsgálták [124]. SGLT1 K.O. egerekkel végzett vizsgálatok is igazolták [119]. A tartós hiperglikémia az SGLT2 transzport kapacitásának túllépését idézi elő, így nő a glükóz-koncentráció a proximális tubulus disztális

részében, és fokozódik az SGLT1 által közvetített glükóz reabszorpciója. Az SGLT1 glükóz reabszorpció fenntartó képessége, és kompenzáló hatása figyelemre méltó fiziológiai funkció szempontjából. 1-es és 2-es típusú diabéteszes állati modellekben a vese SGLT2 szintje megemelkedett [125], míg a vesében található SGLT1 szintekre az eredmények ellentmondásosak. Sztreptozotocinnal (STZ) indukált diabéteszes patkányokban megnövekedett SGLT1 mRNS- és fehérjeszintézist mutattak ki a vesekéregben [126]. Emellett növekedett a renális SGLT1 mRNS expresszió a ZDF patkányokban [127]. Ob/ob egerekben a renális membránban az SGLT1 fehérje szintje megemelkedett [128]. Euglikémiás állapotban az SGLT1 és SGLT2 tulajdonságai a vese glükóz reabszorpciójára vonatkozóan jól ismertek; de diabéteszes állapotban a tulajdonságaik továbbra sem tisztázottak. Ezért különösen a vese SGLT1 szabályozásának teljes megértése a jövő szempontjából kulcsfontosságú.

2.4. SGLT2 inhibitorok

A jelenlegi anti-hiperglikémiás szerek a 2-es típusú diabétesz patofiziológiai rendellenességeit célozzák meg, ideértve az étvágy szabályozást, a tápanyagok felszívódását és kiválasztását. Számos jól ismert mechanizmussal rendelkező hipoglikémiás szer áll rendelkezésre. Ha egyetlen szer alkalmazásával nem érhető el megfelelő eredmény, akkor kombinált terápia ajánlott többféle hatásmechanizmusú gyógyszer alkalmazásával [129]. A hipoglikémiás gyógyszerek használatának ellenére a cukorbetegéknél a glikémiás kontroll továbbra is problémát okoz, ezért új gyógyszerek kifejlesztésére van szükség a halálozások, a szövődmények csökkentése és az életminőség javítása érdekében. A kombinált terápiákon túl a gyógyszertervezés új megközelítése a kettős vagy több célpontú vegyületek keresése, amelyek több biológiai makromolekulára is hathatnak. A 2-es típusú diabétesz összefüggésében nemrégiben felülvizsgálták az ilyen többcélú gyógyszerek kifejlesztését [130].

A forgalomban lévő a legújabb antidiabetikus gyógyszerek a nátrium-függő glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) inhibitorok, amelyeket összefoglaló néven gliflozinoknak hívnak [131], [132]. A gliflozinok csökkentik a glükóz renális felszívódását, növelik a glükóz koncentrációját a kiürített vizeletben, ezáltal csökkentik a vércukorszintet [133], [134]. A gliflozinokat a florizin természetben előforduló, régóta ismert hipoglikémiás hatásai alapján fejlesztették ki [99]. Jelenleg hét forgalomban lévő SGLT2 gátló áll rendelkezésre orális antidiabetikumokként a 2-es típusú cukorbetegségben való alkalmazásra [135], amelyeket a 4. táblázat tartalmaz:

4. táblázat. Forgalomban lévő és klinikai vizsgálat alatt álló SGLT1 és 2 inhibitorok

Képlet:	Vegyület név:	Készítmény név:	Engedélyezés éve	IC ₅₀ értékek ^a [136])	SGLT1/SGLT2 Szelektivitás [136]
	dapagliflozin	Farxiga	2014	SGLT1: 1300 nM SGLT2: 1,1 nM	1200
	empagliflozin	Jardiance	2014	SGLT1: 700-1000 nM SGLT2: 3,1 nM	2500
	kanagliflozin	Invokana	2013	SGLT1: 906,4 nM SGLT2: 2,2 nM	413
	ipragliflozin	Suglat	2014	SGLT1: 18,796 µM SGLT2: 7,4 nM	254
	luseogliflozin	Lusefi	2017	SGLT1: 3990 nM SGLT2: 2,3 nM	1650
	ertugliflozin	Steglatro	2017	SGLT1: 1960 nM SGLT2: 0,877 nM	2000
	tofogliflozin	Apleway, Deberza	2014	SGLT1: 8444 nM SGLT2: 2,9 nM	2900
	szotagliflozin	Zynquista	III. fázis	SGLT1: 1,8 nM SGLT2: 36 nM	20
	mizagliflozin (KWA 0711)		II. fázis	SGLT1: 27 nM SGLT2: 8181 nM	0,0033
	KGA-2727		-	SGLT1: 97,4 nM SGLT2: 13636 nM	0,00714

^a azon inhibitor koncentráció, amely 50%-kal gátolja az enzim aktivitását

A gliflozinokat önmagában, vagy más orális antidiabetikus gyógyszerekkel kombinálva alkalmazzák. A gliflozinok eltérő SGLT2 szelektivitással rendelkeznek, hiszen az SGLT1-et is gátolják. Az SGLT1/SGLT2 szelektivitás 1000-szeres vagy annál magasabb a dapagliflozin, az empagliflozin, a luseogliflozin, ertugliflozin és a tofogliflozin esetében, míg a kanagliflozin és az ipragliflozin szelektivitása alacsonyabb, 410- és 250-szeres [137].

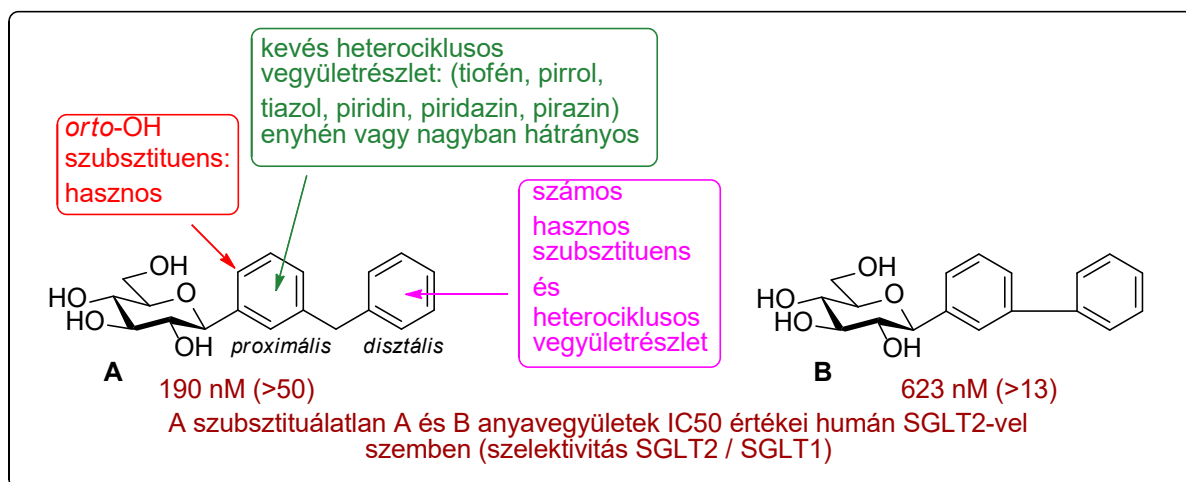
Mizagliflozin, és a KGA-2727 (4. táblázat) az SGLT1 szelektív gátlószerei SGLT2/SGLT1 szelektivitásuk 303, és 140-szeres. A mizagliflozin nem mint lehetséges antidiabetikum, hanem a székrekedéssel járó problémák enyhítésére alkalmazott gyógyszer jutott el a klinikai tesztek 2. fázisáig. Ez valószínűleg a vékonybél traktusaiban található nagy mennyiségű SGLT1 gátlására vezethető vissza, mivel a vegyület az egyik nagyon hatásos szelektív SGLT1 inhibitor. A mizagliflozin orális adagolása megnövelte a széklet nedves tömegét loperamid által kiváltott székrekedés kutyamodellben, és alacsony rosttartalmú étrend okozta székrekedés patkány modelljében [138]. A KGA-2727 antidiabetikus hatékonyságát tanulmányozták rágszáló modellekben. Normál patkányokkal végzett abszorpciós tesztben a KGA-2727 gátolta a glükóz felszívódását, míg a fruktózt nem. Sztreptozotocinnal indukált diabéteszes patkányokkal végzett orális glükóz tolerancia teszt során a KGA-2727 csökkentette a plazmában a glükózszint emelkedését a glükóz adagolása után [139]. ZDF patkányokon KGA-2727-tel végzett 48 napos kezelés csökkentette a plazma glükóz és glükózilált hemoglobin szintjét. Továbbá a KGA-2727 megőrizte a glükóz által stimulált inzulin szekréciót, és csökkentette a vizelet glükóz kiválasztását a hasnyálmirigy-szigetek és a vese disztális tubulusainak morfológiai változásainak javulásával ZDF patkányokban vizsgálva. Ezenkívül a KGA-2727 krónikus alkalmazása növelte a portális vénában a glukagon-szerű peptid-1 szintjét [139].

A szotagliflozint, az SGLT2 és az SGLT1 kettős inhibitorát az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) jóváhagyta, az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Felügyelet (FDA) azonban még nem engedélyezte, mint az inzulin kiegészítője az 1-es típusú cukorbetegség kezelésében [140]. A gyógyszer kettős hatása, tompítja és késlelteti a glükóz felszívódását a gyomor-bél traktusból, és a glükóz visszaszívódását a vese proximális tubulusában. Az 1-es típusú diabéteszben szenvedő betegek kettős klinikai vizsgálati programjának III. fázisában a szotagliflozin optimalizált inzulinkezelés kiegészítéseként klinikailag jelentősen csökkentette a HbA1c szintet, de a diabéteszes ketoacidózis gyakrabban előfordult, mint a kontroll csoportban.

Preklinikai vizsgálatokban, diabéteszes állatmodellekben az SGLT2-inhibitorok csökkentették az éhomi és nem éhomi vércukorszintet, a HbA1c szintet, a vérnyomást és

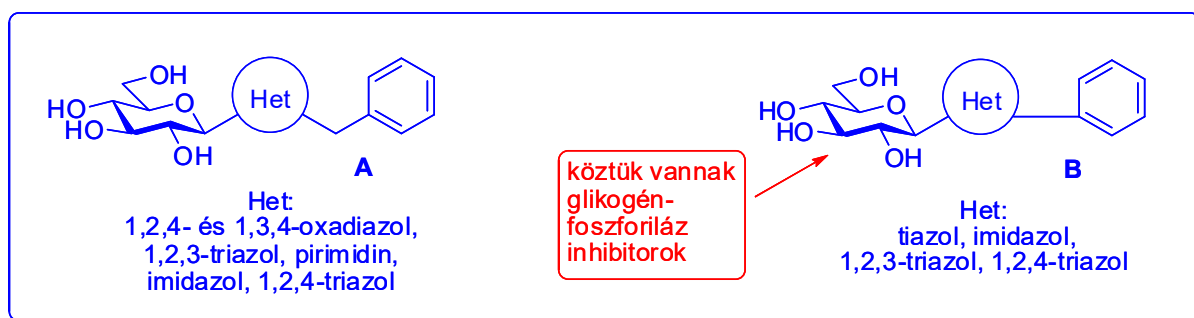
javították a glükóz toleranciát [141], [142]. Az SGLT2 gátlószerekkel [143]–[145] végzett metaanalízisek kimutatták, hogy a gliflozinokkal kezelt 2-es típusú diabétesssel, szív- és érrendszeri betegséggel rendelkezők körében csökkent a halálozás, a kórházi ápolás ideje és bármilyen más okból bekövetkezett halálesetek száma, abban az esetben, amikor a vizsgálati gyógyszerrel kiegészítették a megszokott rutin ellátást [146]. A legfrissebb tanulmányok arról számoltak be, hogy az SGLT2 inhibitorok vesevédő hatással rendelkeznek diabéteszes nefropátiás állat modellekben [147], és ezt a vesevédő hatását klinikai vizsgálatokban is igazolták [148]. Ennek az lehet a hatásmechanizmusa, hogy az SGLT2 gátlás növeli a disztális tubulusban a nátriumion mennyiségét, mert gátolja a nátriumion felszívódását a proximális tubulusban. Ennek eredményeként aktiválódik a tubuloglomerularis visszacsatolás a macula densa-n keresztül, és ez lehetővé teszi az afferens arteriola összehúzódását, így normalizálja a glomeruláris szűrési sebességet [148]. Azonban, súlyos szövődménye a cukorbetegségnek az alacsony inzulinszint okozta diabéteszes ketoacidózis, amely életveszélyes is lehet. Ketoacidózis ritkán előfordulhat azoknál a betegeknél is, akik valamilyen gliflozin kezelést kaptak a magas vércukorszintjük csökkentésére. Ezen esetek egy részében úgy alakult ki a ketoacidózis, hogy a betegek vércukorszintje nem volt olyan magas, mint várták [149]. Az EMA és az FDA ajánlásokat tett közzé a diabéteszes ketoacidózis kockázatának minimalizálása érdekében SGLT2 inhibitorokkal kezelt betegeknél.

Kémiailag a már engedélyezett gliflozinok kémiai szerkezetüket tekintve C-glükopiranozil-arilmetil-(het)arének. A florizin farmakodinamikai és farmakokinetikai tulajdonságainak javítása érdekében, számos szerkezet-aktivitás összefüggést vizsgáltak a vegyület alapvázának módosításaival. Ennek eredménye lett számos O- és N-glikozid vegyület, melyek közül végül C-glikozil szerkezet lett a legmegfelelőbb [133], [150], [151]. Miután véletlenül felfedezték a glikozil- és benzil-csoportok rendkívül előnyös meta elhelyezkedését a proximális aromás gyűrűn [152], ez az alapváz vált a további szerkezet-aktivitás összefüggést vizsgáló kísérletek vezető struktúrájává, melyen a cukorrész, az aromás gyűrűk, és közöttük levő metilén-híd cseréjével, módosításával vizsgálták az újonnan szintetizált molekulák hatását [133], [153], [154].



7. Ábra. Szerkezet-hatás összefüggés vizsgálat célcsoportjai A és B anyavegyületeken [144]

Míg a disztális aromás csoport cseréjét kiterjedten vizsgálták [134], [153], [154], amelynek eredménye a már forgalmazott kanagliflozin és ipragliflozin lett. Kevesebb tanulmány foglalkozott a proximális benzol egység heterociklusos vegyülettel történő helyettesítésével (7. ábra) [134]. Az ismert szerkezetek közé tartoznak a tiofén [155]–[157], a pirrol [155], a tiazol [158], a piridin [155], a piridazin [158] és a pirazin [155] gyűrűk, amelyek IC₅₀ értékeik alacsony nM-tól alacsony μ M tartományig megtalálhatóak. Az IC₅₀ értékek erősen függenek a heterociklusos csoporttól. A fenolos OH-csoport bevezetése a proximális gyűrű orto-helyzetében több esetben is előnyösnek bizonyult, kiemelve a hidrogénkötés-kötést alkotó csoport lehetséges szerepét ebben a régióban [155], [159]–[163].



8. Ábra. Szerkezet-hatás összefüggés vizsgálat célvegyületei

Tervezték a proximális benzolgyűrű további cseréjét, mivel a heterociklus lényeges hatással lehet a molekulák hatékonyságára (8. ábra A és B célvegyületek). Előreláthatólag az imidazol- és 1,2,4-triazolszármazékok H-kötéseket képezhetnek az előbbi fenolos OH-csoport helyzetéhez közel. Figyelembe véve, hogy a glikozil-bifenil-származék (7. ábra B vegyület)

gátolja mind az SGLT1 és 2 aktivitását [152], így a heteroaromás gyűrűt tartalmazó vegyületeknek (8. ábra B vegyületek) a tanulmányozását is tervbe vették. Emellett sok a „B” szerkezethez hasonló származék glikogén-foszforiláz hatékony gátlószere is lehet [134], [164], melyeket korábban a 2-es típusú cukorbetegség elleni küzdelem másik célpontjaként azonosítottak. Ezek a vegyületek rendelkezhetnek SGLT és GF kettős gátló hatással, melyet korábban még nem vizsgáltak.

2.5. Célkitűzések

A diabétesz az egyik legelterjedtebb betegség világon, és a betegek száma a mai napig növekszik. A cukorbetegség leggyakoribb tünete a hiperglikémia, amelynek csökkentése a betegség kezelésének egyik legfontosabb része. Az orális hipoglikémiás gyógyszerek körében található néhány új gyógyszer, amelyek csökkentik a magas vércukorszintet, ilyen a nátrium-glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) inhibitorok. Az SGLT2 inhibitorok gátolják a glükóz visszaszívódását a vesében a szűrletből, ezáltal növelik a vizelettel ürített cukor mennyiségét. Általános szerkezetük, Sebastian Vidal összefoglaló cikke [165] alapján, tartalmaz egy glükopiranoz gyűrűt, melyhez C-glikozid kötéssel kapcsolódik egy benzolgyűrű, emellett még egy aromás csoportot, melyet metilén híd köt a benzol gyűrűhöz.

Kutatócsoportunk több mint 20 éve azonosít glikogén-foszforiláz gátlószereket, de ezek a vegyületek nem váltak klinikumban alkalmazott gyógyszerekké. Dr. Somsák László munkacsoportja számos glükózanalóg inhibítort szintetizált, melyek glikogén-foszforilázra vonatkozó gátlási állandóját munkacsoportunk határozta meg. Ezek a molekulák hasonló szerkezettel rendelkeznek, mint a forgalomban kapható SGLT2 inhibitorok, de az első aromás gyűrű helyett heteroatomás gyűrűt, pirimidint, oxadiazolt és triazolt tartalmaznak.

Ezért munkám során a következő célokat fogalmaztam meg:

- Az újonnan szintetizált lehetséges glikogén-foszforiláz-gátlószerek azonosítása és tesztelése;
- Új sejtvonalak létrehozása, amelyek stabilan, a vad típusú sejteknél nagyobb mennyiségben termelik az SGLT1 és 2 fehérjéket, ezáltal alkalmasak a lehetséges SGLT1 és 2 gátlószerek azonosítására és gátlási állandójuk meghatározására;
- Minél több potenciális SGLT1 és 2 gátlószert azonosítani a sejtes rendszerek segítségével és gátlási állandójuk meghatározása;
- Felülvizsgálni a korábban már azonosított GF inhibitor vegyületeket, melyeknek a szerkezete hasonlóságokat mutat az SGLT inhibitorok általános szerkezetével, meghatározni ezen vegyületek gátlási adatait az SGLT1 és 2 fehérjékre sejtes rendszerben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

A kísérletek során analitikai minőségű vegyszereket használtam, amelyeket a következő cégek termékei voltak.

Merck: α -D-glükóz-1-foszfát (G-1-P), glikogén, adenzin-5'-foszfát (AMP), ditiotritol (DTT), glükóz-6-foszfát, vas(II)-szulfát, tris-hidroxil-aminometán (TRIS), triklór-ecetsav (TCA), dimetil-szulfoxid (DMSO), Triton-X, Phlorizin, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose, and no glucose, Fetal Bovin Serum (FBS), L-glutamin, poli-L-lizin;

Bio-Rad: SDS-PAGE gradiens gél

Reanal: etilén-diammin-tetraacetát (EDTA), o-fenantrolin-klorid, trietanol-amin, digitonin;

Merck: 2-merkaptóetanol (ME), benzamidin-klorid, fenilmetil-szulfonil-fluorid (PMSF),

Pharmacia: Sephadex G-25, DEAE Sephacel;

Serva: bovine-serum-albumin (BSA), Norrit A;

Cayman Chemical Company: 2-NBDG;

Origene: SLC5A1, és SLC5A2 gént tartalmazó lentivírus (lentivirális vektor); anti-SGLT1 (anti-SLC5A1 TA324226)

Gibco: Puromycin;

Carbosynth Ltd: Dapagliflozin;

Invitrogen: CyQUANT™ sejtproliferáció mérő assay Kit;

Thermo Scientific: Pierce™ BCA Protein Assay Kit;

VWR: Metanol

Abcam: anti-SGLT2 (ab137207)

EMD Millipore: anti-GAPDH (ABS16)

3.2. Pufferek, Reagensek

TEA puffer: 50 mM Trietanol-amin, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 100 mM KCl, 30 mM imidazol

P-reagens: 5 g $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 ml 10 (m/V) % ammónium-molibdenát tömény kénsav elegye, 100 ml-re kiegészítve desztillált vízzel

TET Lízis puffer: 0,02 M Tris, 0,005 M EDTA, 1% Triton-X, pH= 7,4

KH_2PO_4 lízis puffer: 0,1 M KH_2PO_4 + 1% Triton-X, pH = 11

Foszfát puffer (PBS): 0,01 M foszfát, 0,0027 M KCl, 0,14 M NaCl, pH 7,4

Mintapuffer (Western blothoz): 10% glicin, 5% merkaptotanol, 2% SDS, 1 spatulányi brómfenolkék, 0,0625 M Tris, (50 ml-re) pH:6,8

10X ELFO puffer: 1,92 M glicin, 250 mM Tris HCl, 35 mM SDS

1X ELFO puffer: 100 ml 10X-es ELFO puffer+ 900 ml Desztillált víz, pH: 8,3

5X Transzfer puffer: 0,96 M glicin, 128 mM Tris HCl

1X Transzfer puffer: 200 ml 5X Transzfer puffer, 200 ml metanol, 600 ml desztillált víz

5%-os BSA oldat: 5g BSA 100 ml TBST oldatban

TBS oldat: 0,136 M NaCl, 2,682 mM KCl, 25 mM Tris pH 7,4

TBST oldat: 0,136 M NaCl, 2,682 mM KCl, 25 mM Tris, 0,1 % TWEEN 20 pH 7,4

TEM puffer: 40 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM ME, pH= 6,8

3.3. Vázizom glikogén-foszforiláz b enzim preparátum nyúl vázizomból

Homogén GFb-t nyúl vázizomból Fischer és Krebs szerint [166] tisztítottuk, háromszor átkristályosítottuk, és a kristályokat TEM pufferben oldottuk. A nukleotidokat (elsősorban AMP-t) Norit A cellulóz kezeléssel távolítottuk el. A preparátumok specifikus enzimaktivitása 48-55 E/mg volt 16 mM G-1-P és 1 mM AMP jelenlétében. A homogenitást SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük, és egyetlen kb. 95 kDa molekulatömegű fehérje festődését észleltük.

3.4. Enzimaktivitás meghatározások

3.4.1. Tisztított izom glikogén-foszforiláz aktivitásának meghatározása

A tisztított glikogén-foszforilázokkal végzett kinetikai méréseket az irodalomból ismert módszer alapján végeztük [167]. Az enzim aktivitását a glikogénszintézis irányába (az *in vivo* folyamattal ellentétesen) mértük. A vázizom és máj GFa aktivitását különböző koncentrációjú (2-16 mM) G-1-P, és állandó koncentrációjú (1 %) glikogén jelenlétében határoztuk meg 50 mM trietanol-amin, 100 mM KCl, 1 mM EDTA (pH=6,8) puffer jelenlétében. Vázizom GFb esetében 1 mM AMP-t (mint aktivátort) is tartalmazott az inkubációs elegy. Az aktivitást 30°C-on határoztuk meg, és az inkubációs időt úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátnak (G-1-P) legfeljebb 20 %-a alakuljon át. Egységnyinek tekintettük a GF azon mennyiségét, amely egy perc alatt 1 μ mol foszfát átalakulását katalizálja 30°C-on.

3.4.2. Glikogén-foszforiláz gátlószerek vizsgálata: K_i és IC_{50} meghatározása

A vizsgált vegyületek (lehetséges GF inhibitorok) gátlási állandóinak meghatározásához a Dixon-féle ábrázolást 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 enzimreakció 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. Ez a linearizálás azon alapul, hogy az eredeti egyenlet reciprokát vesszük, az így kapott egyenes tengelymetszeteiből már pontosabban határozható meg az enzimreakció állandói. Ha az enzimreakció sebességét több különböző inhibitor- és szubsztrátkoncentrációnál is megmértük, akkor a linerizált 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, aminek 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 aktivitás 50 %-os gátlásához szükséges inhibitor-koncentráció (IC_{50}) meghatározása az elterjedt módszer. A mérés lényege azonos a K_i meghatározásával, a különbség annyi, hogy az IC_{50} meghatározásához egyetlen szubsztrát-koncentráció mellett változtatjuk az inhibitor koncentrációját, és az 50 %-os reakciósebességhez szükséges gátlószer koncentrációját nevezzük IC_{50} -nek.

3.5. Sejtkultúra

TSA201 (humán embrionális vese) sejteket 25 mM glükóz tartalmú tápoldatban tartottuk, mely tartalmazott 10 % FBS-t, és 1,5 % L-glutamint. Az overexpresszióval létrehozott sejtvonalak tápoldata tartalmazott még 10 μ g/ml puromycint. A sejteket T-75-ös sejtenyészítő flakóban tartottuk 37 °C-on 5% CO_2 tartalmazó inkubátorban. Passzálás során tripszint használtunk, és foszfátpufferrel mostuk a sejteket.

3.5.1 Lentivirális transzfekció

100 ezer sejtet raktunk ki 24 lyukú plate lyukaiba, és 24 óráig inkubátorban tartottuk 37 °C-on. Következő napon lecseréltük a sejtek tápoldatát frissre, mely 8 μ g/ml hexadimetrin bromidot, és a megfelelő lyukakban a lentivirális vektort tartalmazott. 24 óra múlva lecseréltük a sejtek tápoldatát friss médiumra. 3 nap múlva a sejteket összegyűjtöttük, és T-25 tenyésztő flakóba helyeztük át. Az 5. napon 10 μ g/ml puromycint adtunk hozzá a sejtek tápoldatához, melyet a továbbiakban minden alkalommal hozzáadtunk a sejtek friss médiumához. Ezt követően 2 naponta friss médiumra cseréltük a sejtek tápoldatát, amíg a szelekció teljesen végbe nem ment a kontroll sejtekhez viszonyítva.

3.6. Western-blot

A sejteket 60 mm-es petri csészében tenyésztettük. A sejtek összegyűjtése előtt foszfát pufferrel mostuk, majd jégen 100 μ l TET lízis pufferrel összegyűjtöttük. A lizátumot 45 percig inkubáltuk jégen, és háromszor vortexeltük, majd -80 °C-on tároltuk. A lizátumok kiolvasztása után megmértük a fehérjetartalmukat, mintapuffert hozzáadva főztük a mintákat 10 percig

96°C-on. A mintában található fehérjéket SDS-PAGE (nátrium dodecil szulfát - poliakrilamid gélelektroforézis) módszerrel választottuk el. 4-16%-os gradiens gélre vittük fel a mintákat. Az elektroforézis 80 volton ELFO pufferben futott. A gélelektroforézis után a gélről a fehérjéket PVDF (polivinilidén fluorid) membránra transzferáltuk át, melyhez transzfer puffert használtunk 60 percig konstans 0,35 A erősséggel. Blottolás után a nem specifikus antitest kötődések megelőzése érdekében 5%-os BSA oldattal blokkoltuk a membránt 1 órán keresztül. Blokkolás után elkészítettük a SGLT1, SGLT2, GAPDH antitestek oldatait 1 %-os BSA oldatban, és a membrán megfelelő részleteit belehelyeztük a megfelelő oldatokba. Egy éjszakán át inkubáltuk a membrán részleteket 4 °C-on. Másnap a membrán darabokat háromszor TBST oldattal mostuk, majd TBST oldatban oldva a megfelelő másodlagos antitestben inkubáltuk 1 órán keresztül. Inkubáció után kétszer mostuk TBST oldattal, majd egyszer TBS oldattal. A másodlagos antitestek tormaperoxidáz kapcsoltak, ezért kemilumineszcens szubsztrát tartalmú oldattal detektáltuk a vizsgált fehérjéket. Az eredményeket ChemiDoc Touch Imaging System segítségével hívtuk elő. Az adatokat Image Lab szoftverrel analizáltuk.

3.7. Fehérjemérés

Fehérje koncentráció meghatározására BCA módszert használtunk. 96 lyukú plate-ben végeztük a kísérleteket. Egy lyukba 25 µl mintát mértünk, melyhez 100 µl BCA reagenst adtunk, 30 percig 37 °C-on inkubáltuk, ezt követően fotométerben 562 nm-en mértük az abszorbancia értékeket.

3.8. Glükózfelvétel-mérés

25-25 ezer overexpresszió nélküli és SGLT1/2 overexpressziót tartalmazó TSA201 sejtet raktunk poli-L-lizinnel előkezelt 96 lyukú platekbe. Következő nap a sejtek médiumát glükózmentes médiumra cseréltük, mely tartalmazott FBS-t, L-glutamint, és a tesztelni kívánt vegyületet. Éheztetés után a sejtek médiumához 100 µM 2-NBDG-t adtunk, és fél óráig inkubáltuk. Inkubáció után eltávolítottuk a felülúszót, 2-szer mostuk foszfát pufferrel, és KH₂PO₄ lízis puffert adtunk hozzá, és -20 °C-on tároltuk a mintákat. Kiolvastás után a mintákat szuszpendáltuk, és fluoriméter segítségével mértük a fluoreszcens jelet (gerjesztési hullámhossz: 485 nm, emissziós hullámhossz: 538 nm). Ez követően meghatároztuk a minták fehérjetartalmát, amellyel normalizáltuk a sejtek glükózfelvételét.

3.8.1. SGLT1 és SGLT2 IC₅₀ számítás

A vegyületek IC₅₀ értékének azonosításához először kiválasztottuk az optimális koncentráció tartományt, amelynél a gátlás 20-80% -a közötti tartományba esett. Miután kiválasztottuk az optimális koncentráció tartományt, mindegyik vegyületet teszteltük legalább 4 különböző koncentrációval (0,1, 1, 10, 100 vagy 1, 10, 100, 1000 µM). Overexpresszió nélküli sejtvonal glükóz felvétel értékeit kivontuk az overexpresszált sejtvonal értékeiből, tehát az overexpresszált kontrollból kivonva az eredeti kontrollt kapjuk a 100 %-ot. Minden számításhoz a GraphPad Prism szoftvert használtuk. Az adatokat logaritmikus skálán ábrázoltuk inhibitor koncentráció függvényében. Az IC₅₀ értékeket nem lineáris regresszió analízissel számítottuk szigmoidális dózis-válasz görbékből.

3.9. Citotoxicitás meghatározása

TSA201 sejteket használtunk, melyeknek az életképességét fluoreszcens CyQUANT assay segítségével mértünk. 25 ezer sejtet raktunk a 96 lyukú plate lyukaiba. Következő nap eltávolítottuk a sejtek felülúszóját, és friss teljes médiumra cseréltük, mely tartalmazta a vizsgálni kívánt molekulát (1 mM) és a doxorubicint (2 ng/ml) negatív kontrollként. Pozitív kontroll csak 0,4% DMSO-t tartalmazott. 4 óra inkubáció után eltávolítottuk a felülúszót, és mostuk a sejteket foszfátpufferrel, majd lefagyasztottuk a plateket a hatékonyabb sejtlízis érdekében. Következő nap kiolvastottuk a plateket, és 200 µl CyQUANT reagenst adtunk a lyukakhoz. Fénytől védve 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után fluoriméterrel mértük a fluoreszcens jelet, mely egyenesen arányos volt a sejtek proloferációjával (gerjesztési hullámhossz: 480 nm, emissziós hullámhossz: 520 nm). A kapott értékeket a kontrollhoz viszonyítva ábrázoltuk.

3.10. Mérési adatok kiértékelése

A GF gátlási vizsgálatoknál minden mérési ponthoz legalább 3 párhuzamos aktivitás mérést végeztünk. A gátlást az átlag értékkel adtuk meg, ahol csak az átlagot tüntettük fel, abban az esetben a szórás maximum $\pm 10\%$ volt. A különböző kísérleti csoportok adatait a t-próba varianciaanalízisével végeztük. Adataink normáeloszlását is ellenőriztük. A többi kísérlet eredményeit legalább három független kísérletből számoltuk ki. Minden kísérlet négy párhuzamos mintát tartalmazott, amelyeket átlagoltunk. A szórásokat a független kísérletek átlagértékei alapján számoltuk.

4. EREDMÉNYEK

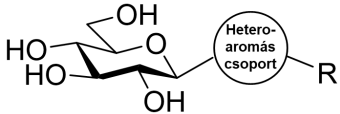
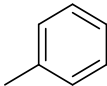
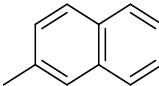
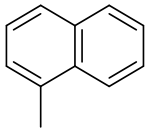
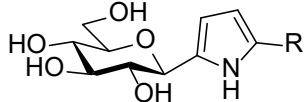
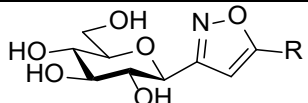
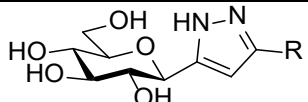
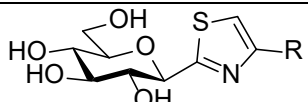
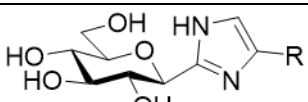
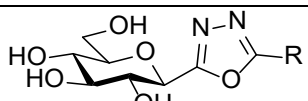
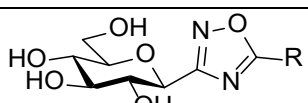
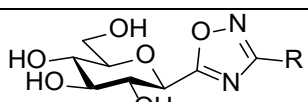
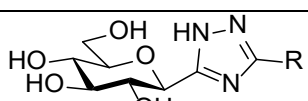
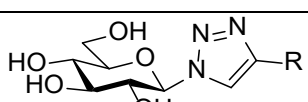
4.1. Lehetséges glikogén-foszforiláz inhibitorok számítógépes tervezése

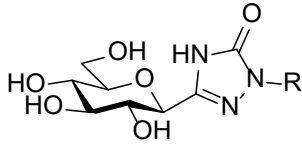
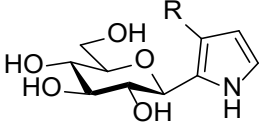
A szerkezet alapú tervezés alapkövét, a „kulcs-zár” elméletet Paul Erlich és Emil Fischer írta le több mint 100 évvel ezelőtt [168]. Az utóbbi évtizedben a molekuláris, szerkezeti biológia és a számítástechnika gyors fejlődése megteremtette a lehetőségét, hogy a kutatók ismert szerkezetű célmolekulához kötődni képes molekulákat tervezzenek. A szerkezet alapú tervezés elve azon alapszik, hogy a célmolekula kötőhelyének háromdimenziós szerkezetét ismerve a potenciális ligandumok kötési módja és erőssége kiszámolható. A célmolekula háromdimenziós szerkezetét vagy kísérletileg határozzák meg (röntgen-kristallográfia vagy NMR), vagy homológia modellezéssel (homology modelling) számolják ki [168]. A ligandum alapú tervezés nem a target molekula, hanem az azon ható molekulák szerkezetén alapszik. A hatékony vegyületek közötti szerkezeti összefüggések, hasonlóságok ismeretével következtetnek a modellezés során az új molekulák hatékonyságára. A célmolekula háromdimenziós szerkezetére ebben az esetben nincs szükség. A ligandum alapú tervezés egyik előnye a szerkezet alapú tervezéssel szemben, hogy a szerkezet alapú tervezés során makromolekulákkal kell foglalkozni, ezért ezek az eljárások több számítási időt igényelnek.

Az utóbbi években számos kutatócsoport foglalkozott glikogén-foszforiláz inhibitorok vizsgálatával, melynek eredményeként több szerkezetileg különböző osztályát sikerült azonosítani ezeknek a gátlószereknek [169]. A legtöbb tanulmány az egyik legígéretesebb csoportot a glükózanalog vegyületeket vizsgálta, melyek az enzim aktív centrumhoz kötődve reverzibilis, kompetitív módon képesek gátolni az enzimet [170], [171]. Ebben az osztályba tartozó C- β -D-glükopiranozil-azolok (5. táblázat, 1–9, 14-16) az egyik leghatékonyabb GF inhibitorok [134].

5. táblázat. A számítógépes szimuláció validálásához használt teljes ligandumkészlet, valamint a nyúl vázizom glikogén-foszforiláz b-vel szembeni gátlási állandóik (K_i értékek μM -ban)

A K_i értékek 3-5 mérés átlagát jelentik, a szórás maximum $\pm 10\%$ volt.

		Aromás R csoportok		
				
		a	b	c
1		625 μM nem gátol [172].	625 μM nem gátol [172].	-
2		625 μM nem gátol [173].	625 μM nem gátol [173].	-
3		400 [173]	-	-
4		310 [173]	158 [173]	-
5		0,28 [173]	0,031 [173]	-
6		10% gátlás 625 μM -nál [174].	10% gátlás 625 μM -nál [174].	10% gátlás 625 μM -nál [174].
7		10% gátlás 625 μM -nál [174].	38 [174]	625 μM nem gátol [174].
8		64 [174]	11,6 [174]	19 [174]
9		7 [175]	0,41 [175]	- ^a
14		151 [176]	16 [176]	136 [176]

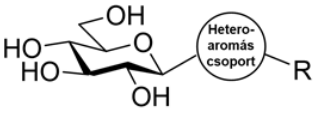
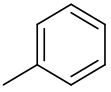
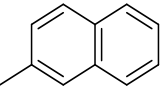
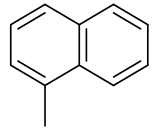
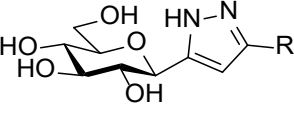
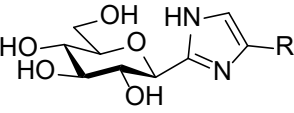
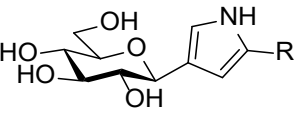
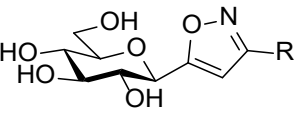
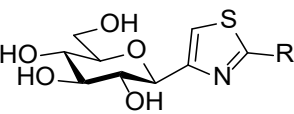
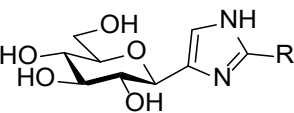
15		191 [177]	80 [177]	-
16		625 μ M nem gátol [172].	625 μ M nem gátol [172].	-

^aKésőbbiekben 11,50 μ M-t azonosítottak [178], nem része a validált csoportnak.

Aromás R-csoportjaik, különösen a 2-naftil, kedvező konformációt kialakítva fokozzák az aktív centrum β -részében az inhibitor hatékonyságát [170], [171]. Különösen érdekes, hogy az imidazolok **5** [134] és az 1,2,4-triazolok **9** [134] között olyan inhibitorok is vannak, mint az **5a**, az **5b** és a **9b**, melyek K_i értékei nanomol tartományba esnek. Az **5b** vegyület a leghatékonyabb aktív centrumban gátló inhibitor, amelyet eddig azonosítottak.

Joseph M. Hayes és munkatársai számítógépes szimulációval szűrést végeztek új C- β -D-glükopiranozil-azolok **10-13**, valamint a **3b**, **3c** és **5c** vegyületek (6. táblázat) esetében, amelyeket korábban még nem szintetizáltak, és nem vizsgáltak GF inhibitorokként (6. táblázat). A szimulációt 27 vegyületből álló ligandumkészletre validálták (5. táblázat). A vegyületeket rangsorolták kötődési erősségük alapján MM-GBSA [179] módszerrel (molecular mechanics-generalized Born surface area method). A szűrés eredménye alapján rangsorolták a vegyületeket kötődési erősségük alapján, amely a gátlóképességük erősségére utal.

6. táblázat. A célvegyületek szimulációs kötődési értékei ($\Delta G'_{\text{kötődési}}$) az MM-GBSA modell használatával.

		Aromás R csoportok		
				
		a	b	c
3		-54,5 ^a	-56,7(14)	-53,3(15)
5		-82,0 ^a	-87,9 ^a	-85,2(1)
10		-66,2(8)	-69,5(5)	-64,6(9)
11		-66,3(7)	-68,6(6)	-64,3(10)
12		-58,3(12)	-58,7(11)	-57,0(13)
13		-72,4(4)	-78,5(3)	-79,5(2)

$\Delta G'_{\text{kötődési}}$: Számítógépes szimulációval kapott értékek. Az új ligandumok potenciális erősségének sorrendje zárójelben.

^aA ligandumkészlet értékei összehasonlítás céljából.

Ezek közül hét molekulát választottak ki munkatársaim, 4 különböző 2-aryl-4(5)-(β-D-glükopiranozil)-imidazolt, és 3 különböző 2-aryl-4-(β-D-glükopiranozil)-tiazolt tartalmazó vegyületet, amelyeket a Debreceni Egyetem Szerves Kémia tanszékén Dr. Somsák László és munkatársai szintetizáltak. A mi feladatunk ezeknek a vegyületeknek nyúl vázizom glikogén-foszforiláz *b*-n végzett kinetikai vizsgálata, és elemzése volt. A kísérlet célja, hogy a számítógépes szimuláció eredményeként kapott legígéretesebb, eddig még nem szintetizált molekulák glikogén-foszforiláz gátló képességét *in vitro* kísérleti körülmények között ellenőrizzük, és bizonyítsuk, hogy a számítógépes modellezéssel kapott eredmények megfelelnek az *in vitro* mérési eredményeknek.

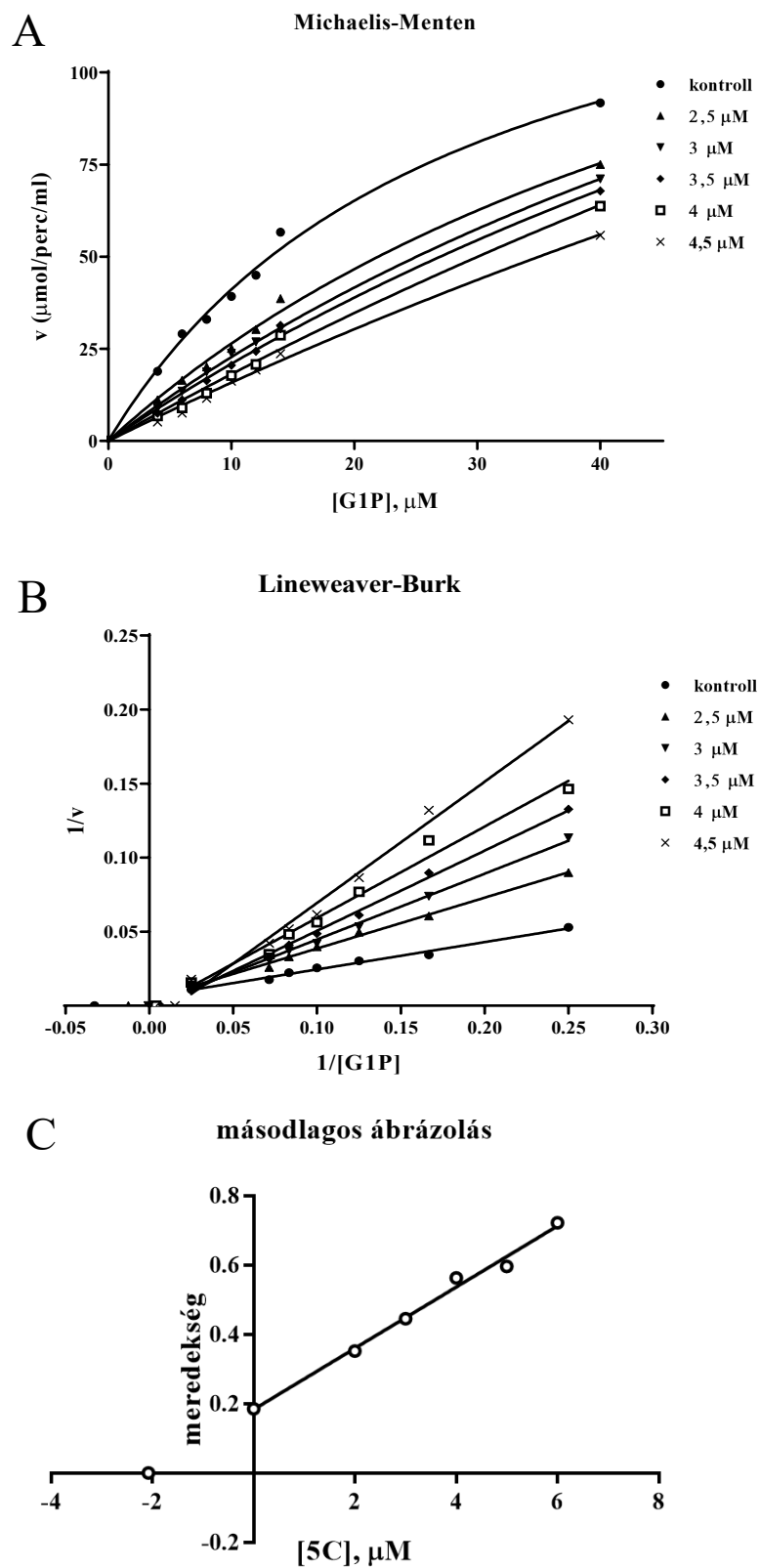
4.2. Glükózanalog inhibitorok kinetikai vizsgálata

Munkánk első részében a vegyületek gátlási állandóit határoztuk meg nyúl vázizomból preparált glikogén-foszforiláz inaktív formájára. Több ok miatt is használjuk a nyúl vázizom glikogén foszforilázt. Több mint 50 évvel ezelőtt a világon mindenhol az enzim nyúl vázizomból preparált inaktív formáját tudták nagy mennyiségben, tisztán, és enzimatikusan aktív formában kinyerni. Ezen kívül kollaborációs partnerünk, Nikos G. Oikonomakos és munkatársai több mint 20 évvel ezelőtt erre az enzimre állította be röntgen krisztallográfiás szerkezeti vizsgálatait, az enzim jól kristályosítható tulajdonságai miatt. A máj izoformát laboratóriumunk patkányok májából izolálta, de sajnos kis mennyiségben tudtuk előállítani, valamint a kristályosítása is gondot okozott. Ezen kívül a foszforiláció miatt a legtöbb esetben egy aktív/inaktív keveréket kaptunk.

Egy másik fontos adat, amiért a nyúl vázizom glikogén foszforiláz alkalmas ezen vizsgálatok elvégzésére, hogy az enzim aminosav szinten 96%-os azonosságot mutat a humán izoformával [180].

A kinetikai vizsgálatoknál különböző inhibitor- és szubsztrátkoncentráció jelenlétében meghatároztuk az enzimreakció sebességét (lásd Anyagok és Módszerek 3.4.2.). A kapott eredményekből számítógépes program segítségével (GraphPad Prism szoftver) megszerkesztettük a Michaelis-Menten kinetikához tartozó sebességi görbét (8. ábra A). Az enzimaktivitások reciprokát szintén számítógépes program segítségével ábrázolva a szubsztrátkoncentráció reciprokának a függvényében kaptuk a Lineweaver-Burk szerinti ábrázolást (8. ábra B). A gátlási állandó meghatározásához szintén számítógépes program segítségével megszerkesztettük a Dixon-görbét (másodlagos ábrázolás) (8. ábra C) a Lineweaver-Burk

szerinti ábrázolás egyeneseinek meredekségét ábrázolva az inhibitor koncentrációjának függvényében [181].



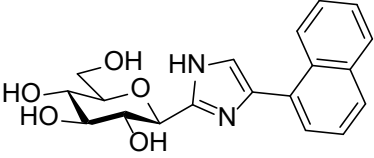
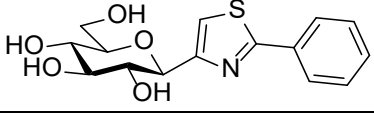
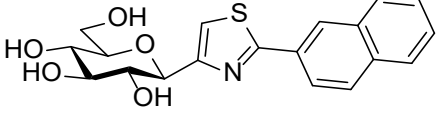
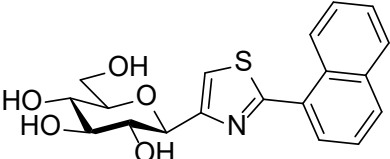
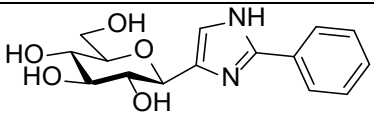
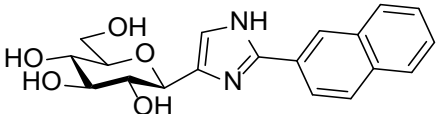
8. ábra. Gátlási állandó meghatározása 5c vegyület példáján bemutatva

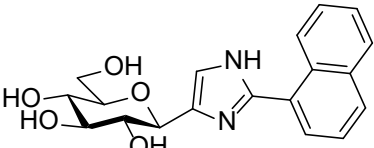
A nyúl vázizom GFb enzim aktivitását ábrázoltuk a szubsztrát (G-1-P) koncentráció függvényében (**A**). A kettős-reciprok Lineweaver-Burk diagram (**B**) egyeneseinek meredekségét az inhibitor-koncentráció függvényében ábrázolva kapjuk a Dixon másodlagos görbét (**C**), amelynek tengelymetszetéből kiszámítható a gátlási állandó (K_i) [181].

Az új vegyületek a gátlási állandóit a 7. táblázat foglalja össze. Összhangban az eddig vizsgált glükopiranoz gyűrűt tartalmazó inhibitorokkal, a gátlási adatok eredményeiből készített Dixon-görbék arra utalnak, hogy az újonnan szintetizált vegyületek is kompetitív módon gátolják az enzim katalitikus aktivitását. A kompetitív gátlásra a Dixon ábrázolásban az egyenesek metszéspontja utal, mivel a különböző inhibitor és szubsztrát koncentrációhoz tartozó egyenesek a koordináta rendszer negatív régiójában metszik egymást (9. ábra). A **12b** és a **13a** vegyületek egy másodlagos helyen is megköthetnek, viszont ezt az állításunkat nem lehet megerősíteni vagy teljesen elvetni a Dixon-diagramokból.

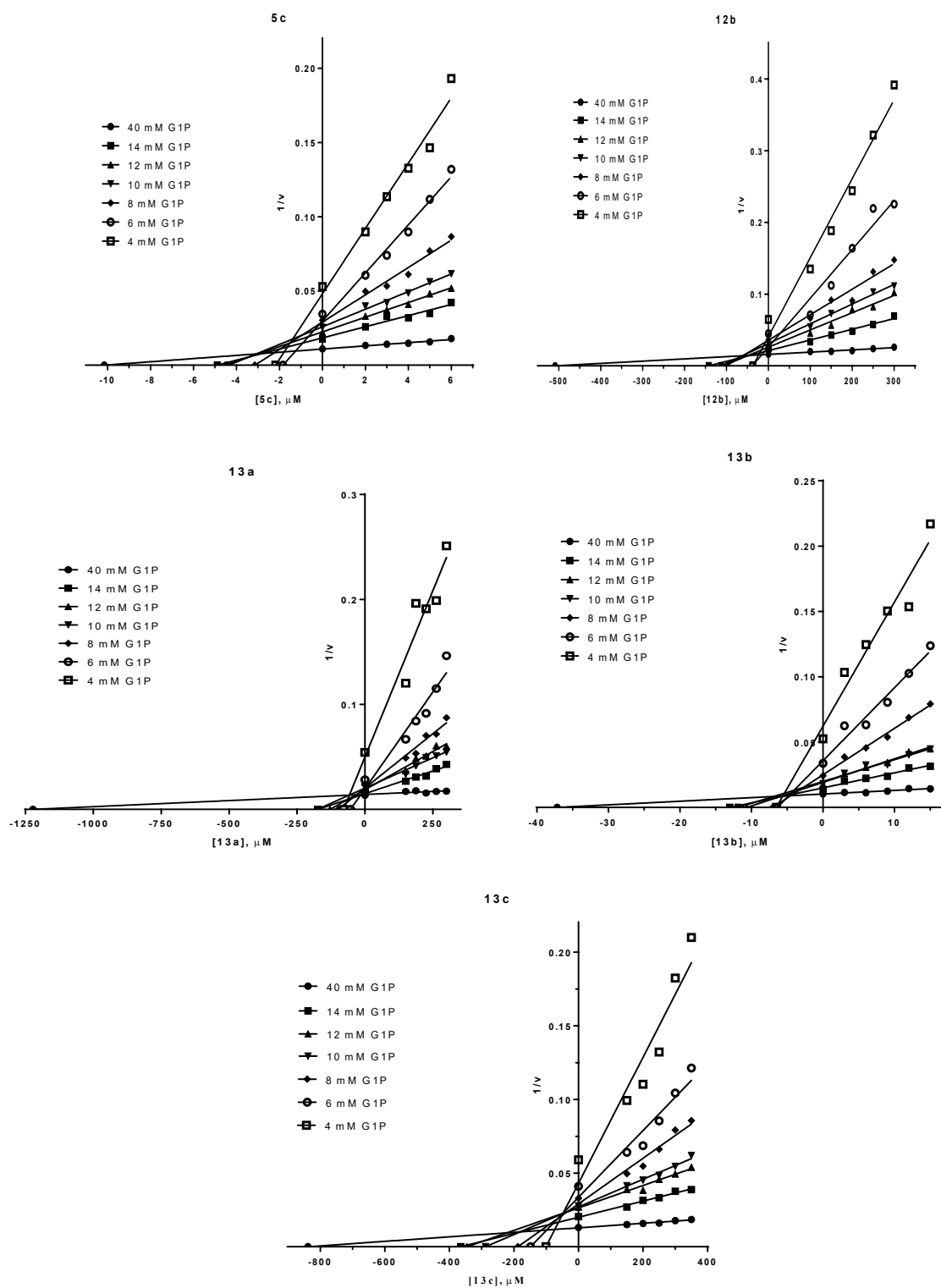
7. táblázat. Az új C- β -D-glükopiranozil-heterociklusok gátló hatása a nyúl izom glikogén-foszforiláz b-vel szemben

A mérések a glikogén szintézis irányában történtek. Az K_i értékek standard hibáinak átlaga kevesebb, mint 10%.

kód	Szerkezet	K_i (μM)	kötődési értékek ($\Delta G'_{\text{kötődési}}$)
5c		1,97	-85,2
12a		326 ^a	-58,3
12b		26,2	-58,7
12c		540 ^a	-57,0
13a		68,8	-72,4
13b		4,58	-78,5

13c		71,1	-79,5
-----	---	------	-------

^aAz IC₅₀ érték webalapú eszközzel kiszámítva [182].



9. ábra. A vizsgált vegyületek Dixon diagramjai

A vizsgált vegyületek mérése során használt koncentrációk: 5c: 2, 3, 4, 5, 6 μM ; 12b: 100, 150, 200, 250, 300 μM ; 13a: 150, 187,5, 225, 262,5, 300 μM ; 13b: 3, 6, 9, 12, 15 μM ; 13c: 150, 200, 250, 300, 350 μM .

Kísérletileg a legjobb gátlószernak jóslott **5c** vegyület volt a legalacsonyabb K_i -vel ($K_i = 1,97 \mu\text{M}$, kötődési érték = -85,2) rendelkező vegyület, bár nem annyira hatásos, mint a korábban közölt analógok (**5a** ($K_i = 0,28 \mu\text{M}$, kötődési érték = -82,0) és **5b** ($K_i = 0,031 \mu\text{M}$, kötődési érték = -87,9)). A **13b** imidazolszármazék ($K_i = 4,58 \mu\text{M}$, kötődési érték = -78,5) erőssége megfelelt a jóslatokkal szemben támasztott elvárásoknak, alacsony mikromol koncentrációban képes gátolni. Azonban a **13a** ($K_i = 68,6 \mu\text{M}$, kötődési érték = -72,4) és a **13c** ($K_i = 71,1 \mu\text{M}$, kötődési érték = -79,5) a szimuláció után várt értékhez képest elmarad. Az 1-naftil-analóg származékok gátló képességének túlbecsülése talán azért figyelhető meg, mert kevés ilyen származék volt jelen a modell validációs ligandumkészletében (5. táblázat). A tiazolszármazék **12b** ($K_i = 26,2 \mu\text{M}$, kötődési érték = -58,7) értéke hasonló volt az előre jóslt adathoz viszonyítva, míg fenilszármazék **12a** ($K_i = 326 \mu\text{M}$, kötődési érték = -58,3) és 1-naftil-származék **12c** ($K_i = 540 \mu\text{M}$, kötődési érték = -57,0) vegyületek sokkal gyengébb inhibitorok, mint azt a szimuláció után vártuk.

A tanulmány jól mutatja, hogy hiába követel egyre nagyobb teret magának a modern számítógépes molekulatervezés, az *in vitro* és *in vivo* kísérletek nem kerülhetők meg még a legprecízebb beállítások mellett sem. Ezek a számítógépes szimulációk nagyon időigényesek, és többnyire a molekula kötődési erejét vizsgálják, amelyből nem derül ki a szimuláció során, hogy a hatóanyag gátol, serkent vagy a kötődés ellenére nem rendelkezik hatással. *In vitro* és *in vivo* rendszerekben a molekulák, makromolekulák szerkezetét nagymértékben befolyásolja a környezetük, ilyen komplex hatásokat nem lehet teljes mértékben lemodellezni, ezért gyakran egyszerűsített rendszert modelleznek. Egyértelmű, azonban, hogy a molekulatervezés gyorsíthatja a potenciális vegyületek azonosítását, de valós eredményeket csak *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel kaphatunk.

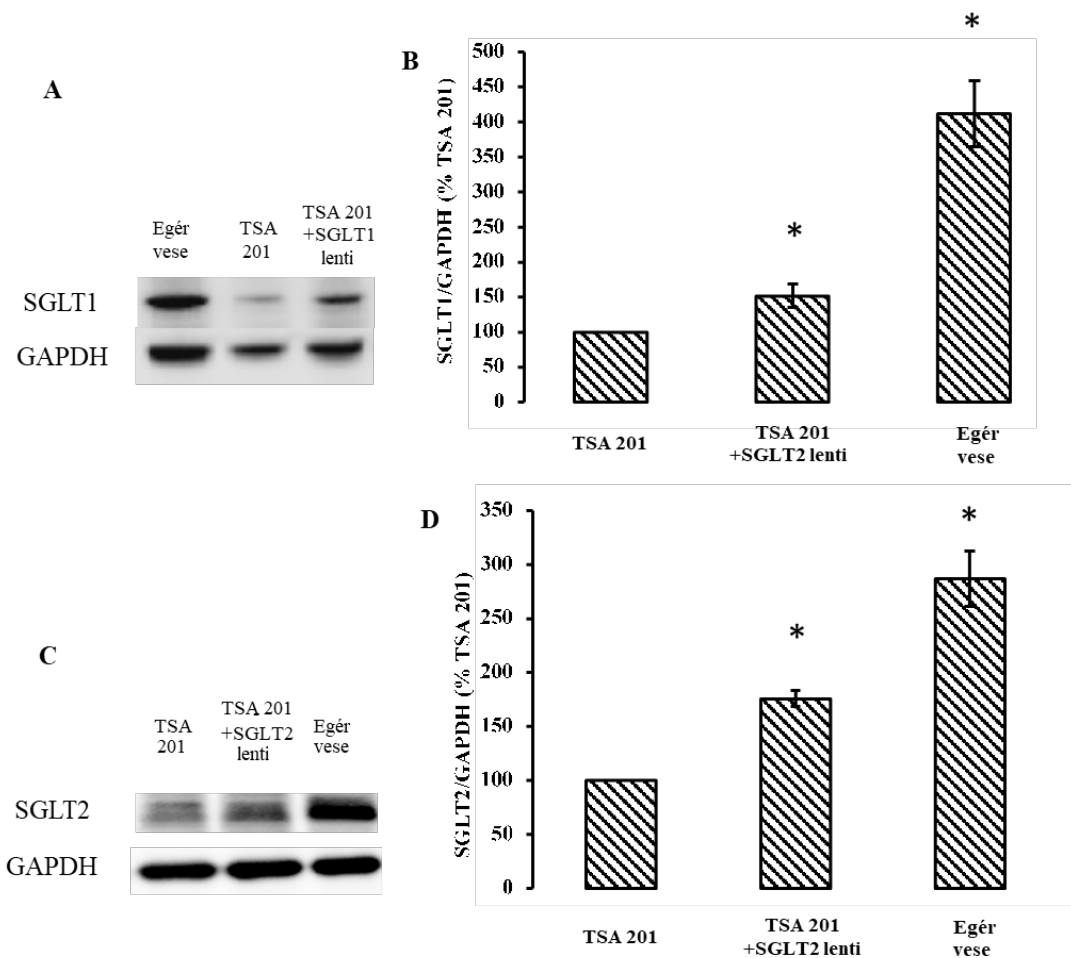
4.3. SGLT 1 és 2 gátlók IC₅₀ értékének meghatározása

4.3.1. SGLT1 és SGLT2 fehérjéket stabilan expresszáló sejtek létrehozása és a transzfekció hatékonyságának ellenőrzése

Munkacsoportom több mint 20 éve azonosít glikogén-foszforiláz inhibitorokat, sajnos ezekből a vegyületekből nem született a klinikumban alkalmazott gyógyszer. Egy korábban megjelent összefoglaló közleményben Sebastian Vidal [165] írta le, hogy a már forgalomban lévő SGLT2 inhibitorok általános szerkezete tartalmaz egy glükopiranoz gyűrűt, melyhez C-glikozid kötéssel kapcsolódik egy benzolgyűrű, emellett még egy aromás csoportot, melyet metilén-híd köt a benzolgyűrűhöz. Munkatársaim számos glükózanalog vegyületet szintetizáltak és azonosítottak, mint glikogén-foszforiláz inhibitorok, amelyek hasonló szerkezettel rendelkeznek, mint a forgalomban kapható SGLT2 inhibitorok, de az első aromás gyűrű helyett heteroatomos gyűrűt, pirimidint, oxadiazolt és triazolt, tartalmaz a molekula. Ezek a már korábban szintetizált molekulák új lehetőséget teremtettek a duális hatással rendelkező glikogén-foszforiláz inhibitoroknak, hogy klinikumban alkalmazott gyógyszerekké válhassanak.

SGLT1 és SGLT2 fehérjék szerkezetéről még nem áll rendelkezésünkre röntgen-krisztallográfiás felvétel, így csak a ligandumalapú tervezés alkalmazható új lehetséges gátlók modellezésére. Azonban így, csak leszűkíthető a potenciális molekulák halmaza, nem kerülhető meg semmilyen körülmények között az *in vitro* és *in vivo* kísérletek. Ezért célul tűztük ki, hogy az eddig glikogén-foszforiláz inhibitorokként azonosított, de az SGLT gátlók általános szerkezetét mutató vegyületek SGLT1 és 2 fehérjékre kifejtett hatását megvizsgáljuk sejtes modell rendszerben.

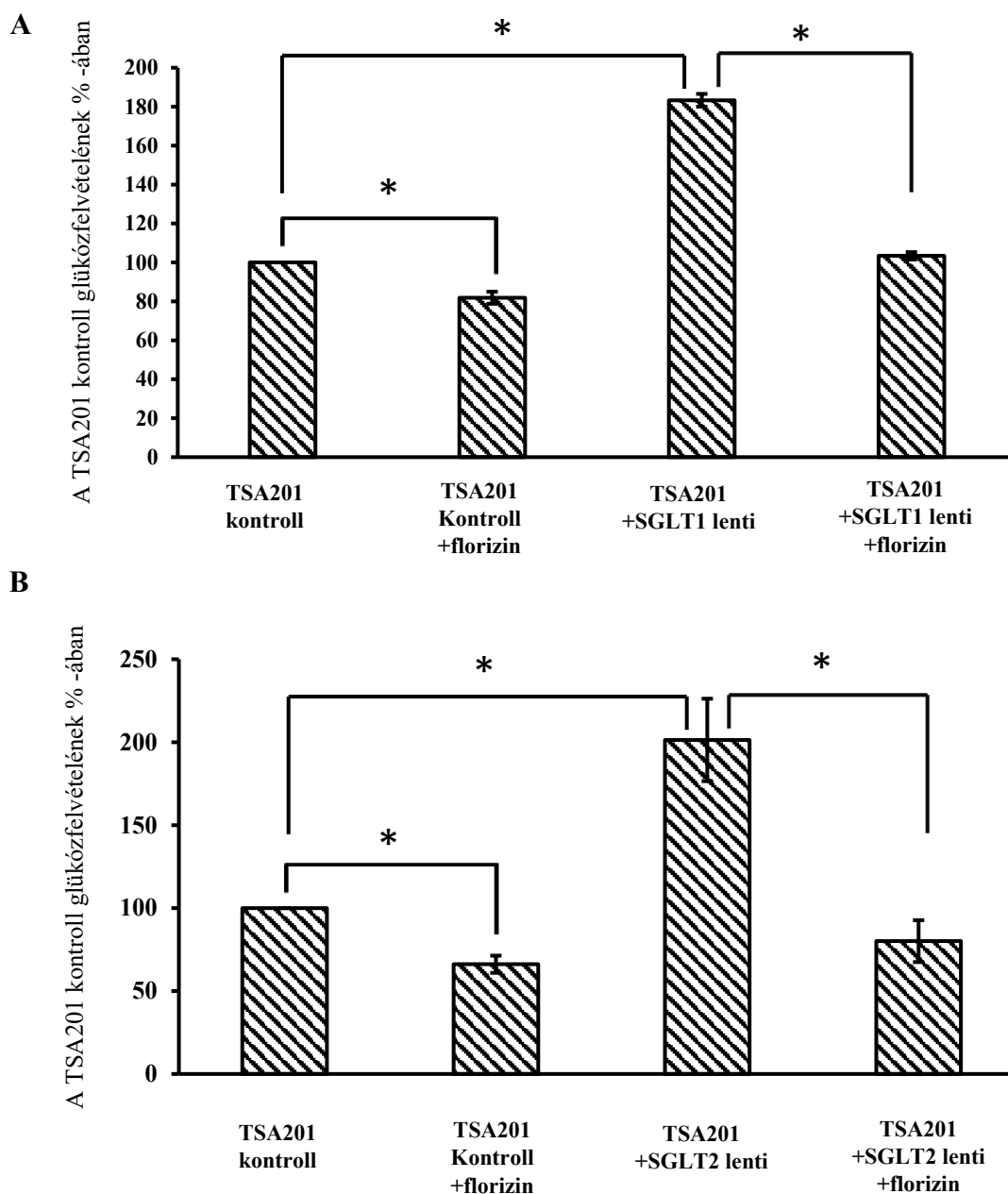
A kísérleteinkhez felhasznált glükózszármazékokat Dr. Somsák László kutatócsoportja biztosította számunkra. A vegyületek egy részét korábbi tanulmányok számára, míg másik csoportját speciálisan a kísérlethez szintetizálták. A vegyületek gátló hatásainak vizsgálatához lentivirális rendszer segítségével új sejtvonalakat hoztunk létre, melyek stabilan, a kontroll sejtekhez képest, nagyobb mennyiségben fejezik ki az SGLT1 és 2 fehérjéket. A transzfekció eredményét Western blot technika segítségével ellenőriztük. A 10. ábrán látható (A és C) az SGLT1 és 2 mennyisége megnövekedett a lentivirális transzfekció után. A számszerűsített eredményeket az ábra B és D része mutatja.



10. ábra. Az SGLT1 (A és B) és az SGLT2 (C és D) expressziója transzfektált TSA201 sejtekben és egér vesében (pozitív kontroll az antitest ellenőrzésére) Western blot technikával.

A fehérje mennyiség normalizálására GAPDH-t (EMD Millipore, ABS16) használtunk. Az eredményeket a BIORAD Image Lab 5.2.1 szoftverrel számszerűsítettük. (*, $p < 0,05$ vs. TSA 201, $n = 3$ független kísérlet csoportonként)

A sejtek glükózfelvételében történt változásokat is megvizsgáltuk a transzfekció után. A 11. ábra azt mutatja, hogy a glükózfelvétel szignifikánsan megnövekedett az SGLT1-et (Origene, TA324226) és 2-t (Abcam, ab137207) nagyobb mennyiségben expresszáló TSA201 sejtekben a nem transzfektált sejtekhez képest.



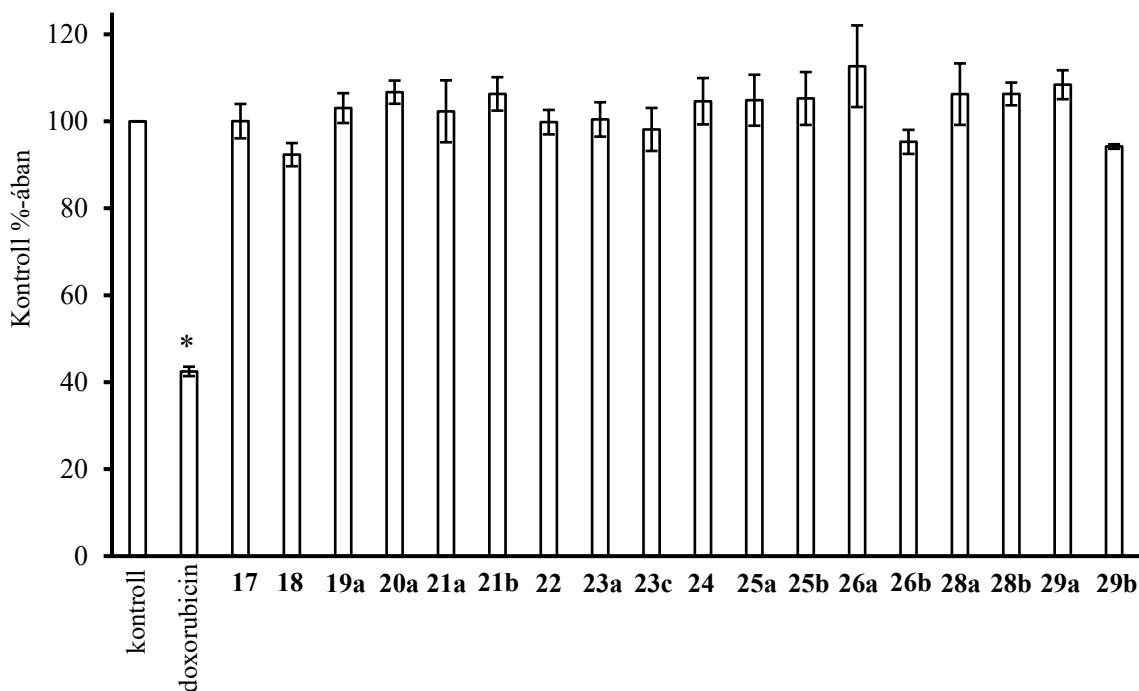
11. ábra. A kontroll és az SGLT1 (A) és az SGLT2 (B) transzfektált TSA201 sejtek glükózfelvételének vizsgálata.

A sejteket 2-NBDG-vel (2-dezoxi-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) amino] -D-glükóz) kezeltük florizin jelenlétében vagy hiányában. (n = 3 csoportonként; *, p < 0,05)

Az új sejtvonalak SGLT1 és 2 inhibitorok vizsgálatára való alkalmasságát egy jól ismert SGLT1 és 2 inhibitor, a florizin (5. ábra) sejtek glükózfelvételére kifejtett hatásával vizsgáltuk. A florizin adatait a 11. ábra mutatja. A florizin szignifikánsan csökkentette a glükózfelvételt mind a kontroll, mind az SGLT1 és SGLT2 transzfektált sejtekben, bizonyítva a vizsgálat specifikitását.

4.3.2. Vizsgált vegyületek citotoxicitás vizsgálata

Megvizsgáltuk a lehetséges SGLT1 és 2 inhibitorok citotoxicitását az általunk vizsgált sejtvonalra. A vizsgált molekulákat 1 mM, a doxorubicint 2 ng/ml koncentrációban alkalmaztuk 4 óra inkubáció mellett. A 12. ábrán láthatóak azon vegyületek citotoxicitási adatai, amelyek jól mérhető gátlási állandóval rendelkeznek. A kapott adatok alapján kijelenthetjük, hogy az általunk vizsgált vegyületek nem rendelkeznek citotoxikus tulajdonságokkal az általunk használt sejtvonalakon.



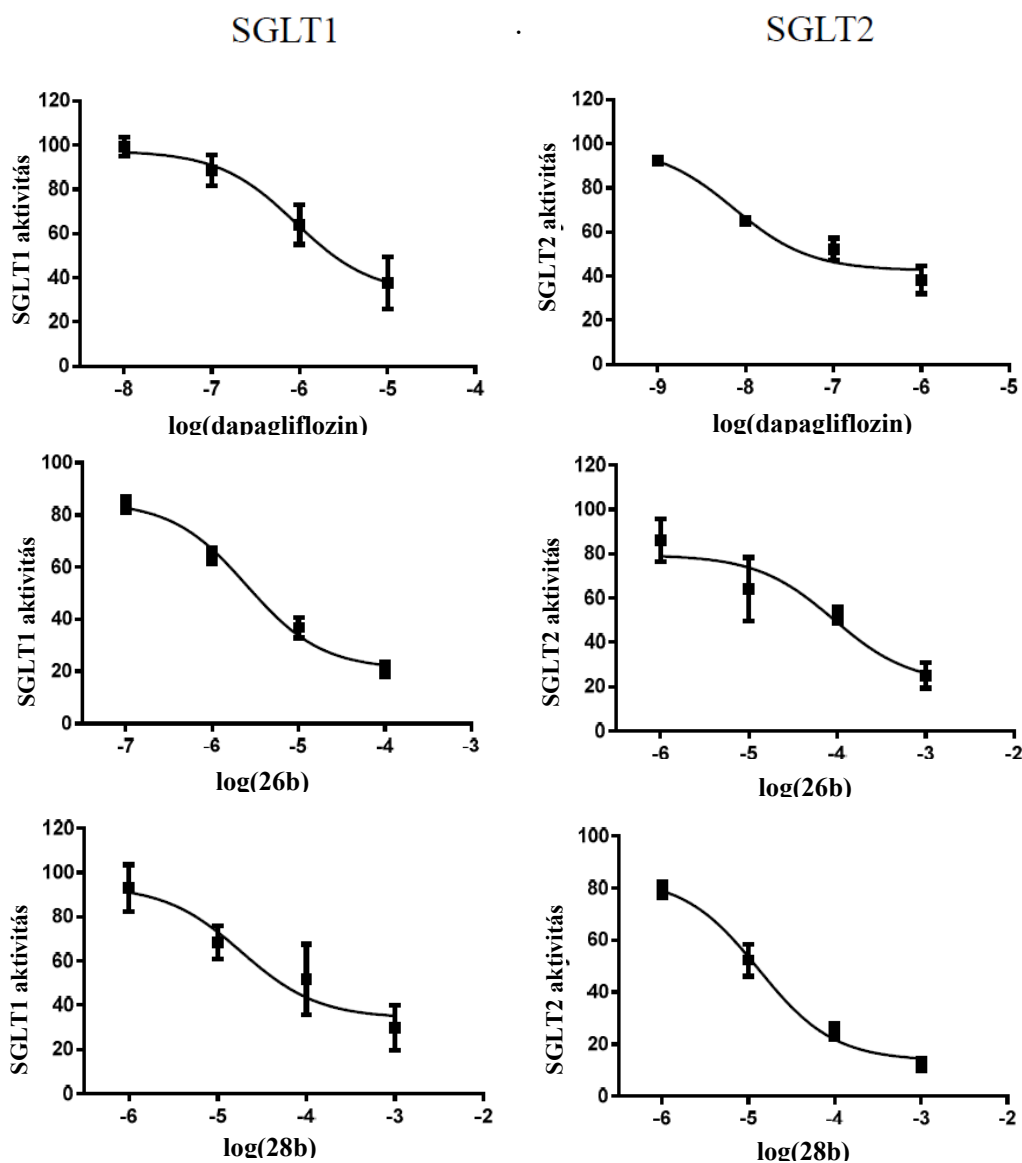
12. ábra. A vizsgált vegyületek citotoxicitása

A sejtek túlélését CyQUANT teszt segítségével határoztuk meg. Az adatokat kontroll sejtekre normalizáltuk, melyeket a csak vivőanyaggal (DMSO) kezeltünk. Doxorubicint (2 ng / ml) használtunk pozitív kontrollként (*, $p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva; $n = 3$ csoportonként).

A molekulák szerkezete a 8. és a 9. táblázatban van feltüntetve.

4.3.3. IC₅₀ meghatározás

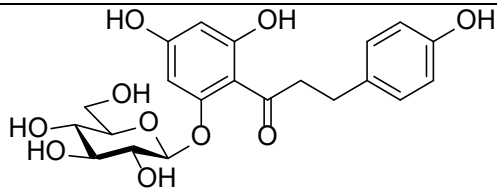
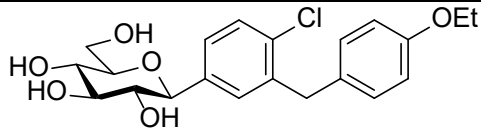
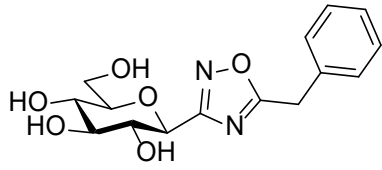
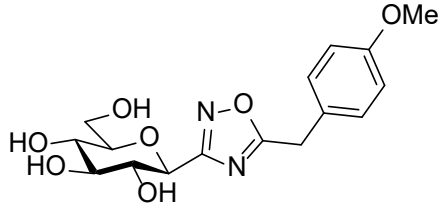
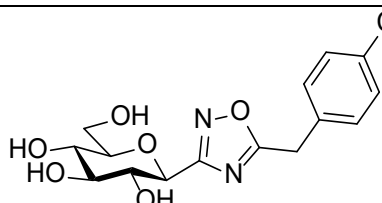
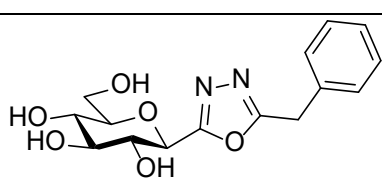
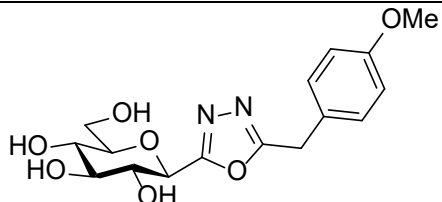
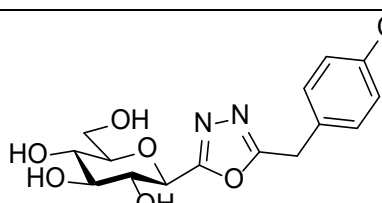
A vegyületek IC₅₀ értékének meghatározásához egy előzetes mérés és egy koncentráció sor segítségével kiválasztottuk az optimális koncentráció tartományt, amelynél a glükózfelvétel gátlása a 20-80% közötti tartományba esett. Az optimális tartomány kiválasztása után az egyes vegyületeket négy különböző koncentrációban teszteltük. Az előkísérletek eredményeinek függvényében 0,1, 1, 10, 100 vagy 1, 10, 100, 1000 µM koncentrációkban alkalmaztunk a lehetséges gátlószereket. Ezeket az adatokat dózis-hatásgörbék előállításához használtuk fel a 8. és 9. táblázatban bemutatott IC₅₀ értékek kiszámításához. Overexpresszió nélküli sejtvonal glükóz felvétel értékeit kivontuk az overexpresszált sejtvonal értékeiből. Minden számításhoz a GraphPad Prism szoftvert használtuk. Az adatokat logaritmikus skálán ábráztuk az inhibitor koncentráció függvényében. Az IC₅₀ értékeket nem lineáris regresszió analízissel számítottuk szigmoidális dózis-válasz görbékéből. A sejtvonalak validálásához a korábban említett dapagliflozint használtuk. Példaként a dapagliflozin, és 2 random kiválasztott vegyület, a **26b** és a **28b** dózis-hatás görbáját a 13. ábra mutatja.

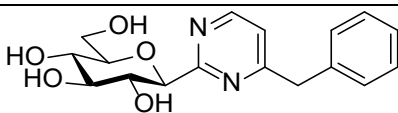
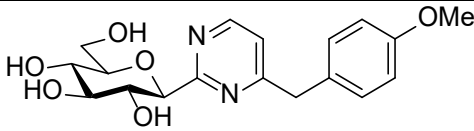
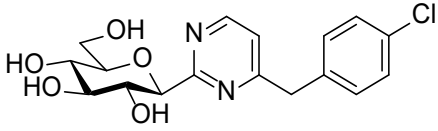
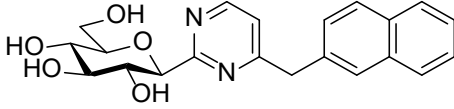
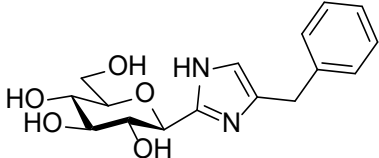
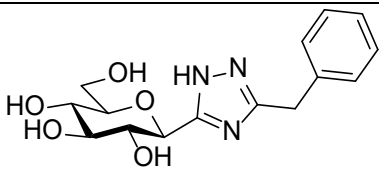
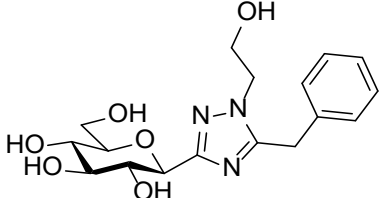
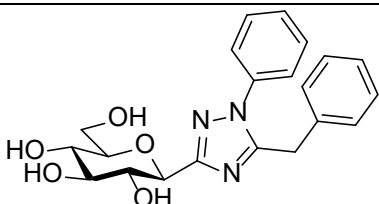
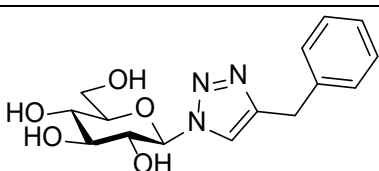


13.ábra. Dapagliflozin, a 26b és a 28b vegyületek SGLT1 és 2 dózis-hatás görbéi

Kísérleteink során meghatároztuk számos újonnan és korábban szintetizált glükózszármazék gátlási állandóját SGLT1 és 2 fehérjékre az általunk előállított sejtvonalak segítségével. Méréseink során azonosítottunk néhány olyan vegyületet, amelyek IC_{50} értékei mikromol tartományba estek. Ezeket a vegyületeket 8. táblázat tartalmazza. Habár az általunk vizsgált vegyületek között azonosított legjobb inhibitorok (**19a**, **20a**, **22** és **23c**) gyengébb gátló hatást mutattak az SGLT1 és 2 fehérjék glükóz áteresztő képességére, mint az ismert C-glükozil-arén típusú inhibitorok **18**, azonban gátló hatásuk meghaladja a florizinét, **17**. Emellett tanulmányunk megerősíti azokat a korábbi megfigyeléseket a C-glükozil(het)arén típusú SGLT2 inhibitorokról, hogy a proximális aromás gyűrű heterociklusokkal történő helyettesítése csökkent gátló hatékonysághoz vezet, amely erősen függ a heteroaromás gyűrű szerkezetétől [134].

8. táblázat: Néhány új és korábban előállított vegyület SGLT1, SGLT2 és nyúl vázizom glikogén-foszforiláz-b (GFb) gátló hatékonysága (IC₅₀ [μM^a]).

	Szerkezet	SGLT2	SGLT1	GFb
17		6,40±1,12 ^b	131,17±24,56 ^b	450 (IC ₅₀)
18		0,00748± 0,00182 ^b	0,83±0,26 ^b	NI ^d
19a		3,68±0,59	20,72±7,66	NI ^d
19b		NI ^c	NI ^c	NI ^d
19c		NI ^c	NI ^c	NI ^d
20a		2,21±0,58	23,72±6,14	NI ^d
20b		NI ^c	NI ^c	NI ^d
20c		NI ^c	NI ^c	NI ^d

	Szerkezet	SGLT2	SGLT1	GFb
21a		17,05±3,16	17,98±3,92	NI ^d
21b		11,59±3,19	NI ^c	NI ^d
21c		NI ^c	NI ^c	NI ^d
21d		NI ^c	NI ^c	NI ^d
22		3,57±0,42	11,7±2,48	12 % 625 μM-nál
23a [183]		71,67± 10,64	19,59±7,26	NI ^d
23b [183]		NI ^c	NI ^c	NI ^d
23c [183]		2,44±0,85	35,50±9,56	NI ^d
24 [184]		23,21±1,86	101,45±23,46	600 μM (IC ₅₀) [184]

^aAz SGLT1 és SGLT2 gátlását TSA-201 sejtekben mértük.

^bAz 17. és 18. vegyületek IC₅₀ értékeit kontrollként használtuk saját rendszerünk ellenőrzésére.

^cNI:nincs gátlás 1000 μM-on.

^dNI:nincs gátlás 625 μM-on.

A benzilszubsztituált oxadiazol vegyületek SGLT2 gátlási állandói azt mutatják, hogy az oxadiazol gyűrű jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan a vegyületek gátló hatását (8. táblázat, **19a** és **20a**). A heterociklusos oxadiazol oxigén atomjának H-kötésre képes NH csoporttal történő cseréje, (megfelelő 1,2,4-triazolt eredményezve) a gátlás kb. 20-30-szoros gyengüléséhez vezetett (**23a** vs. **19a** és **20a**). Egy fenilcsoport hozzáadása az 1,2,4-triazol N1-atomjára jelentős hatékonyság javulást eredményezett (**23c** vs. **23a**), míg egy hidroxietil-csoport azonos helyzetbe kapcsolása a gátlás teljes elvesztését okozta (**23a** vs. **23b**). A **22** (imidazol) a **23a** molekulával (1,2,4-triazol) összehasonlítva, amely szintén tartalmaz NH-csoportot, kb. 20-szor hatékonyabbnak bizonyult.

Az NH csoport szerepe ellentmondásosnak tűnik, mivel a **22**-es vegyület jobb, míg a **23a** gyengébb inhibitor. Feltételezzük, hogy ez, az **23a** vegyületben az 1,2,4-triazol gyűrű három lehetséges tautomer formájának eredménye lehet, amelyek közül csak egy kötődhet a fehérjéhez, míg a **22** vegyület imidazol gyűrűjének esetében a formálisan létező tautomerek lényegében megegyeznek egy lehetséges protonáció következtében a biológiai közegben [303].

Az SGLT2 inhibitorok más osztályaihoz hasonlóan a gátlás nagymértékben függ az aglikon disztális aromás gyűrűjének szubsztitúciójától. Az 1,2,4- és 1,3,4-oxadiazolok esetében csak a szubsztituátlan származékok (**19a** és **20a**) mutattak gátló hatást, míg egy metoxi- vagy klór-csoport ráhelyezése a benzolgyűrű para-helyzetébe, például a **19b**, **20b**, illetve **19c** és **20c** esetében, a gátlás teljes elvesztéséhez vezetett.

A pirimidin-sorozatban nemcsak a (**21a**) benzil-, hanem a 4-metoxi-benzil (**21b**) származék is gátló aktivitást mutatott a mikromol tartományban. Ezzel szemben a **21c** vegyület, amely 4-klór-benzilszármazék, inaktív maradt. A disztális benzolgyűrű 2-naftilcsoporttal történő helyettesítése is egy gátolni nem képes (**21d**) molekulát eredményezett.

A 8. táblázatban felsorolt vegyületek egyikének sem volt figyelemre méltó gátló hatása a nyúl vázizom GFb enzimmel szemben a vizsgált koncentrációban, továbbá a 9. táblázatban (**25-29**) munkacsoportunk által korábban vizsgált [184]–[186], ismert GF-inhibitorok csoportjának SGLT1/2 gátló hatásának eredményei láthatóak. A vegyületeket a nem gátló anyagoktól az alacsony nanomol tartományban gátolni képes GF inhibitorokig választottuk ki szerkezeti hasonlóságok alapján.

Korábbi GF-gátlási vizsgálatok rámutattak a glükóz egység és a disztális aromás csoport közötti heterociklusos csoport kulcsfontosságú szerepére [310-312]. Ez a disztális aromás csoport tekintetében a 2-naftil **25b** – **29b** és fenilcsoporttal **25a** – **29a** szubsztituált vegyületek. Az SGLT1 és 2 gátlás vizsgálatának az eredménye azt mutatja, hogy néhány vegyület alacsony mikromol koncentrációban képes gátolni az SGLT1 és 2 fehérjéket. A **27** tiazolok mindkét

vizsgált transzporterrel szemben hatástalannak bizonyultak a vizsgált koncentrációban. A többi vegyületnek változó volt gátlóképessége, ami erősen jelezte a heterociklusos csoport jelentőségének szerepét a biomolekuláris interakcióban.

9. táblázat. Aril-szubsztituált glükopiranoz-azol típusú glikogén-foszforiláz-inhibitorok SGLT2 és SGLT1 gátló hatékonysága (IC₅₀ [μM]^a).

	Szerkezet	SGLT2	SGLT1	GFb ^b (K _i [μM])
25a		67,28±10,90	167,07±63,50	151 [187] 162 [184]
25b		10,34±2,18	126,90±21,55	16 [187] 36 [184]
26a		9,10±2,94	242,13±37,91	NI ^d [188]
26b		111,31±27,56	23,77±5,72	NI ^d [188]
27a		NI ^c	NI ^c	310 [189]
27b		NI ^c	NI ^c	158 [189]
28a		91,04±0,56	244,60±42,02	0,28 [189]
28b		3,50±0,88	11,89±2,61	0,031 [189]
29a		15,01±2,74	124,56±46,51	7 [190]
29b		17,72±2,32	12,98±2,88	0,41 [190]

^aAz SGLT1 és SGLT2 gátlását TSA-201 sejtekben mértük.

^b GFb: Nyúl vázizom glikogén-foszforiláz b

^c NI:nincs gátlás 1000 μM-on.

^d NI:nincs gátlás 625 μM-on.

A 9. táblázatban szereplő vegyületek többsége az SGLT2-t jobban gátolta, mint az SGLT1-et 2–27 szelektivitási tartományban. Két kivétel volt, a **26b** és a **29b** vegyületek, mindkettő 2-naftil szubsztituált, jobban gátolták az SGLT1-et. Két összehasonlításban, a **25a** – **25b** és a **28a** – **28b**, a 2-naftil-származékok megközelítőleg 7, illetve 26-szor erősebb gátolták az SGLT2-t.

A 2-(-D-glükopiranozil)4(5)-(2-naftil)-imidazol **28b** vegyület, 3,5 μM SGLT2 IC_{50} értékével, a legjobb inhibitornak bizonyult, figyelembe véve a GF már nanomol koncentrációban kifejtett gátlását, a **28b** vegyület egy több célpontú vegyület, amely kiindulópontja lehet további antidiabetikus vizsgálatokban. Az SGLT inhibitorok nagyon érzékenyek az aglikon szubsztituáltságára, másrészt a glükózil-heterociklusokban a GF gátlására gyakorolt szubsztituens hatások részben ismeretlenek [312]. További kiterjedt számítási és szintetikus munkára lesz szükség a kettős cél hatékonyságának optimalizálásához.

5. MEGBESZÉLÉS

A cukorbetegség kezelésének egyik legmodernebb gyógyszerei az SGLT2 inhibitorok. Vércukorszint homeosztázisában jelentős szerepet játszik a vese, amelyben kétféle nátrium-függő glükóz kotranszporter (SGLT1 és 2) felelős a glükóz reabszorpciójáért. Az SGLT2 a vesében a glükóz reabszorpciójáért felel, míg az SGLT1 a vékonybélben a glükóz felszívódásáért, és részben a vese glükóz visszaszívásáért felelős. A vesében az SGLT2 közvetíti a glükóz visszaszívás 90% -át normoglikémiás körülmények között. Figyelembe véve az SGLT1 és az SGLT2 élettani funkcióit, ésszerű volt ezt a fehérje családot választani új gyógyszerkutatások célpontjává. Az SGLT-gátlók blokkolják a glükóz visszaszívódását, ezáltal csökkentik a vércukorszintet, és növelik a glükóz vizelettel történő kiválasztását.

A jelenleg forgalomban kapható SGLT2 inhibitorok szerkezete tartalmaz egy glükopiranoz gyűrűt, melyhez C-glikozid kötéssel kapcsolódik egy benzolgyűrű, emellett még egy aromás csoportot, melyet metilén híd köt a benzol gyűrűhöz. Munkatársaim számos glükózanalog inhibitort szintetizáltak, amelyek a forgalomban kapható SGLT2 inhibitorokhoz hasonló szerkezettel rendelkeznek, de az első aromás gyűrű helyett heteroatomás gyűrűt, pirimidint, oxadiazolt, imidazolt, tiazolt és triazolt tartalmaznak. Ezért elsődleges célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, ezen szerkezeti rokon vegyületek gátolhatják-e az SGLT1-et és 2-t a sejt rendszerben.

Az optimális vércukorszint fenntartásának másik meghatározó szerve a máj. Májban két útvonalon keletkezhet glükóz: *de novo* glükózsintézissel (glükoneogenezissel), és a glikogén lebontásával (glikogenolízissel), így a máj nagymértékben szabályozza a vércukorszintet. A glikogén lebontás egyik kulcs enzime a glikogén-foszforiláz, amelynek kristályszerkezete ismert, így könnyen tervezhetők olyan molekulák, amelyek képesek lehetnek gátolni az enzim aktivitását, így csökkentve a vércukorszintet.

5.1. C-β-D-glükopiranozil-azol vegyületek szerkezet – gátlás vizsgálata

Hasonlóan a korábban vizsgált glükóz származék inhibitorokhoz, a kapott mérési adatok alapján az újonnan szintetizált és általunk megvizsgált vegyületek is kompetitív gátlószereknek bizonyultak, amelyet a vegyületek Dixon-diagramjai bizonyítanak (9. ábra). A Dixon görbék esetében amennyiben a kinetikai mérések során kapott egyenesek metszéspontja az x tengely negatív tartományában található kompetitív gátlásról beszélünk.

A modellezés alapján leghatékonyabbnak jósolt **5c** vegyület gátlási állandója bizonyult a legkisebbnek, ($K_i = 1,97 \mu\text{M}$), vagyis ez a molekula a legerősebb újonnan szintetizált inhibitor,

de gátlási állandója így is jelentősen elmaradt a korábban vizsgált vegyületek nanomólos gátlási értékeitől. A **13b** imidazol-származék ($K_i = 4,58 \mu\text{M}$) gátló képessége a számításoknak megfelelően alakult, azonban a **13a** ($K_i = 68,6 \mu\text{M}$) és a **13c** ($K_i = 71,1 \mu\text{M}$) számolt értékei elmaradtak a mért értékekhez képest, utóbbi eltéréseknek az oka a szimuláció modell készletének beállításaiban keresendő. A tiazol származékok közül a **12b** molekula esetén mért gátlási állandó értéke ($K_i = 26,2 \mu\text{M}$) hasonló a szimulációs értékhez képest, de **12a** fenil-származék ($K_i = 326 \mu\text{M}$) és **12c** 1-naftil-származék ($K_i = 540 \mu\text{M}$) vegyületek sokkal gyengébben képesek gátolni a GFb-t, a vártnál.

A szimuláció és a kinetikai mérések eredményeit összehasonlítva megállapítható, hogy a szimuláció jelentős segítség a gyógyszer molekulák kutatásában és a lehetséges szerkezetek kiválasztásában, de a pontos eredmények érdekében és a további esetleges klinikai kísérletek bevezetése előtt nem lehet kihagyni az *in vitro* biokémiai kísérleteket.

5.2. SGLT 1 és 2 IC_{50} meghatározás

Bár a 2000-es évektől kezdve napjainkig számos publikáció jelent meg új lehetséges glikogén-foszforiláz inhibitorokkal kapcsolatban sajnos ezek a vegyületek nem jutottak el a klinikai tesztelési fázisig, és nem készült belőlük a klinikumban alkalmazott gyógyszer. Sebastian Vidal összefoglaló cikke volt az első, amely leírta, hogy a már forgalomban lévő SGLT2 inhibitorok általános szerkezete, amely tartalmaz egy glükopiranóz gyűrűt, melyhez C-glikozid kötéssel kapcsolódik egy benzolgyűrű, emellett még egy aromás csoportot, melyet metilén híd köt a benzol gyűrűhöz, nagy hasonlóságot mutat számos korábban szintetizált és publikált GF inhibitor szerkezetével. Munkatársaink a Debreceni Egyetem Szerves Kémia Tanszékén számos glükózanalog inhibitorot szintetizáltak, amelyek hasonló szerkezettel rendelkeznek, mint a forgalomban kapható SGLT2 inhibitorok, de az első aromás gyűrű helyett heteroaromás gyűrűt, pirimidint, oxadiazolt és triazolt, tartalmaz a molekula. Így új lehetőséget teremtve a duális hatással rendelkező glikogén-foszforiláz inhibitoroknak, hogy klinikumban alkalmazott gyógyszerekké válhassanak.

Vesében az SGLT1 és az SGLT2 továbbítja a proximális kanyarulat csatorna apikális membránján keresztül a glükózt a sejtek belsejébe. Az SGLT2 emberekben és a rágcsálókban a proximális tubulus felső részében (S1 és S2 szegmensben), míg az SGLT1 a proximális tubulus alsó részében (S3 szegmensben) expresszálódik. SGLT2 inhibitorok csökkentik a visszaszívott glükóz mennyiségét, növelik a vizelet glükóztartalmát, ezáltal csökkentik a vércukorszintet.

A ligandum alapú tervezés felfedezése új területeket nyitott a molekulatervezés terén, hiszen nem szükséges a célmolekula háromdimenziós szerkezete, így nem okoz gondot, hogy az SGLT1 és 2 fehérjék röntgenkristallográfiás szerkezete jelenleg még nem ismert. A már korábban engedélyezett glükóz-származék SGLT 2 inhibitorok szerkezetéből kiindulva, olyan molekulák, mint lehetséges SGLT inhibitorok, vizsgálatát tűztem ki célul, amelyek benzol gyűrű helyett heteroaromás csoportot tartalmaznak.

A vegyületek SGLT gátló hatásának vizsgálatára lentivirális vektor segítségével két új stabil sejtvonalat hoztunk létre, melyek relatíve nagy mennyiségben expresszálják az SGLT1 és SGLT2 fehérjét. A transzfekció eredményét western blot technikával ellenőriztük és az eredményeket kiértékelve jól láthatjuk, hogy a vizsgálni kívánt fehérje mennyisége közel a kétszeresére emelkedett.

Emellett vizsgáltuk a transzfekció után a sejtek glükózfelvételét is. A sejteket, mint a későbbiekben is 2-NBDG-vel kezeltük. A felvett glükóz mennyisége közel duplájára nőtt mind a két sejtvonal esetében. Továbbá megvizsgáltuk a florizin, SGLT 1 és 2 inhibitor hatását. A kezelt csoport glükózfelvétele jelentősen lecsökkent a kezeletlen csoport által felvett glükóz mennyiségéhez képest.

A kísérleteinkhez felhasznált glükóz-származékokat professzor Dr. Somsák László és kutatócsoportja biztosította számunkra. A vegyületek egy részét korábban, mint lehetséges glikogén-foszforiláz gátlószereket, míg másik csoportját speciálisan, mint lehetséges SGLT1 és 2 gátlószerek szintetizálták. Az összes vizsgált vegyületnek, megvizsgáltuk a citotoxicitását az általunk használt sejtvonalra, és ezek közül csak azon vegyületek citotoxicitási adatait mutattuk be, amelyek gátolták az SGLT1 és 2 fehérjék működését. A citotoxicitási vizsgálatokat a kísérletek során használt legmagasabb, 1000 μ M-os koncentrációban vizsgáltuk 4 órás inkubáció ideje alatt. Az eredményeink arra utalnak, hogy a hatásos vegyületek még ebben a relatíve magas koncentrációban sem mutattak citotoxikus hatást az általunk használt sejtvonalra.

A vegyületek IC_{50} értékének meghatározásához minden esetben előzetes kísérletek alapján kiválasztottunk egy optimális koncentráció tartományt. Ebben a tartományban 4 különböző koncentrációt használtunk a vizsgálat során. Ezek alapján ábrázoltuk a dózis hatás-görbéket. A vegyületek SGLT1-re vagy 2-re gyakorolt specifikus hatásainak meghatározásához az overexpresszió nélküli sejtek által felvett glükóz mennyiségét kivontuk az overexpresszált sejtvonalon mért értékekből, tehát az overexpresszált kontrollból kivonva az eredeti kontrollt kapjuk a 100 %-ot. Minden számításhoz a GraphPad Prism szoftvert használtuk, és az adatokat logaritmikus skálán ábrázoltuk inhibitor koncentráció függvényében. Az IC_{50} értékeket nem

lineáris regresszió analízissel, a szoftver segítségével számoltuk szigmoidális dózis-válasz görbékből. A tesztelt vegyületek között néhány újonnan szintetizált és néhány korábban előállított glükózszármazék is jelen volt, amelyek közül azonosítottunk mikromol tartományban gátolni képes vegyületeket (**19a**, **20a**, **22** és **23c**). Ezen vegyületek gyengébb gátló hatást mutattak, mint az irodalomból már ismert C-glükozil-arén típusú inhibitor, a dapagliflozin (**18**), de aktivitásuk meghaladta az egyik első ismert inhibitorét a florizinét (**17**). Emellett megerősítést kaptunk azon korábbi megfigyelések iránt, hogy a C-glükozil(het)arén típusú SGLT2 inhibitorok proximális aromás gyűrűjének heterociklusokkal történő helyettesítése csökkenti a gátló hatékonyságot, amelynek mértéke erősen függ a heteroaromás gyűrű szerkezetétől.

A benzil szubsztituált oxadiazol vegyületekben az oxadiazol gyűrű jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan a gátló hatást (**19a** és **20a**). A heterociklusos oxadiazol oxigén atomjának H-kötésre képes NH csoporttal történő cseréje, (megfelelő 1,2,4-triazolt eredményezve) a gátlás 20-30-szoros gyengüléséhez vezetett (**23a** vs. **19a** és **20a**). Egy fenil gyűrű bejuttatása az 1,2,4-triazol N1-atomjára jelentősen növelte hatékonyságot (**23c** vs. **23a**), míg egy hidroxietil csoport azonos helyzetbe való bejuttatása a gátlás teljes elvesztését okozta (**23a** vs. **23b**). A **22** (imidazol) vegyületet a **23a**-val (1,2,4-triazol) összehasonlítva, amely szintén tartalmaz NH csoportot, az imidazol származék kb. 20-szor hatékonyabbnak bizonyult.

Az NH csoport szerepe ellentmondásosnak tűnik, mivel a **22**-es vegyület erősebb, a **23a** azonban gyengébb inhibitor. Feltételezzük, hogy ez az **23a**, 1,2,4-triazol három lehetséges tautomer formájának eredménye lehet, amelyek közül csak egy kötődhet a fehérjéhez, míg a **22**, imidazol esetében a formálisan létező tautomerek lényegében megegyeznek egy lehetséges protonáció következtében a biológiai közegben.

A gátló hatás emellett nagymértékben függ az inhibitor molekula disztális aromás gyűrűjének szubsztitúciójától. Az 1,2,4- és 1,3,4-oxadiazolok esetében csak a szubsztituátlan származékok (**19a**. és **20a**.) képesek gátolni, míg egy metoxi- vagy klór-csoport bevezetése a benzolgyűrű para-helyzetébe, például a **19b**, **20b**, illetve **19c** és **20c** esetében, a gátlás teljes elvesztéséhez vezetett.

A pirimidin gyűrűt tartalmazó vegyület csoportban a (**21a**) benzil származék mellett a 4-metoxi-benzil (**21b**) származék is gátló hatással rendelkezik mikromol tartományban. Azonban a **21c** vegyület, amely 4-klór-benzil származék, gátló hatással nem rendelkezik. A disztális benzolgyűrű 2-naftilcsoporttal történő helyettesítése is egy gátlással nem rendelkező (**21d**) molekulát eredményezett.

Az eddig tárgyalt vegyületek (**17-24**) nem rendelkeznek jelentős nyúl vázizom GFb enzim gátló hatással, azonban a **25-29**-ös vegyületek munkacsoportunk által korábban vizsgált, ismert GF-inhibitorok csoportja. A vegyületeket a nem gátló anyagoktól az alacsony nanomól tartományban gátolni képes GF inhibitorokig választottuk ki. Ezeknek a vegyületeknek is megvizsgáltuk az SGLT1 és 2 gátló hatását. **25-29** vegyületek molekulái disztális aromás csoportként 2-naftil (**25b – 29b**) és fenil-csoportot (**25a – 29a**) tartalmaztak. Az eredményekből látszik, hogy a tiazolok (**27**) mindkét vizsgált transzporterrel szemben hatástalannak bizonyultak. A többi vegyületnek változó volt a gátlóképessége, amely a heterociklusos csoport fontosságának szerepét jelzi.

A vizsgált vegyületek nagy része (**2-27**) az SGLT2 fehérje működését nagyobb szelektivitással gátolta, mint az SGLT1 fehérjét. Két kivétel volt, a **26b** és a **29b** vegyületek, mindkettő 2-naftil szubsztituált származék, amelyek erősebben gátolták az SGLT1 működését. Két összehasonlításban, a **25a – 25b** és a **28a – 28b**, a 2-naftil-származékok kb. hétszer, illetve 26-szor erősebben gátolták az SGLT2-t, mint az SGLT1-et.

A 2-(-D-glükopiranozil)4(5)-(2-naftil)-imidazol **28b** vegyület, 3,5 μ M SGLT2 IC₅₀ értékével, a legjobb inhibitornak bizonyult, figyelembe véve a GF nanomól koncentrációban bekövetkező gátlását, a **28b** vegyület egy több célpontú vegyület, amely kiindulópontja lehet egy több fehérjén hatni képes antidiabetikus gyógyszernek. További kiterjedt számítási és szintetikus munkára lesz szükség a kettős cél hatékonyságának optimalizálásához.

Az inhibitortervezés számításon megvalósítása a glikogén foszforiláz esetében eddig többnyire kevés sikerrel járt. Annak ellenére, hogy a kötőhelyek szerkezete adott inhibitorokkal ismert, a számítások nem tudják jól előre jelezni az enzim (különösen a katalitikus hely) konformációváltozását az inhibitor molekulával történő kölcsönhatás során. Ez ahhoz vezet, hogy egymástól jelentősen különböző szerkezetű vegyületek is hasonló gátlást mutathatnak, amit jól példáz, hogy a három legjobb glükózalapú inhibitor-csoport (glükopiranozilidén-spiro-heterociklusok [191], N-acil-N'-glükopiranozil-karbamidok [11] és C-glükopiranozil-heterociklusok [177]) csak marginális szerkezeti hasonlóságot mutat.

Ezen vegyületek képletéből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a β -D-glükóz jelenléte elengedhetetlen, ezen kívül ehhez kapcsolt csoportok lehetőleg tartalmazzanak egy nitrogén atomot esetleg atomokat, amelyek a H-kötés kialakításában vesznek részt. Ezen kívül egy nagyobb méretű aromás végcsoport jelenléte is fontos a szorosabb illeszkedésben. Tapasztalatok alapján a gátlószer és az enzim katalitikus centruma között fellépő hidrofób kölcsönhatás nagyobb szerepet játszik a kölcsönhatás kialakításában, mint a korábban említett H-kötés, viszont ha mindkét kölcsönhatás egyszerre teljesül a gátlási állandó értéke jelentősen

csökken, vagyis hatékonyabb inhibitorról beszélünk. Ilyen vegyület a disszertációmban említett **28b** molekula.

Mindkét tanulmány jól mutatja, hogy hiába hódít egyre nagyobb teret magának a modern számítógépes molekulatervezés, az *in vitro* és *in vivo* kísérletek nem kerülhetők meg még a legprecízebb beállítások mellett sem. *In vitro* és *in vivo* rendszerekben a molekulák, makromolekulák szerkezetét nagymértékben befolyásolja a környezetük, ilyen komplex hatásokat nem lehet teljes mértékben lemodellezni, ezért gyakran egyszerűsített rendszert modelleznek. A molekulatervezés gyorsíthat a potenciális vegyületek azonosításában, de valós eredményeket csak biokémiai kísérletekkel kaphatunk. Emellett mindkét tanulmány bizonyítja, hogy a számítógépes molekulatervezést önmagában nem elég új gyógyszer molekulák kifejlesztésére, az *in vitro* kísérletek nem kerülhetők meg.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A helyes vércukorszint fenntartásában jelentős szerepet játszik a máj, mely glükoneogenezis, és a glikogén szintézis / lebontás útján képes szabályozni a vércukorszintet. A glikogén lebontásának egyik kulcsenzime a glikogén-foszforiláz, mely a lebontás első lépését katalizálja. Az enzimen 5 ligand kötőhely található, melyeken keresztül a specifikusan tervezett molekulák gátolhatják az enzim aktivitását.

Megfelelő vércukorszint fenntartásának másik fontos szerve a vese. A vese proximális tubulusában kétféle nátrium-függő glükóz kotranszporter (SGLT1 és 2) található, melyek a glükóz reabszorpciójáért felelősek. Figyelembe véve az SGLT1 és az SGLT2 élettani funkcióit, a 2000-es években ésszerűen a gyógyszerkutatások célpontjai lettek, és jelenleg több klinikumban használt gyógyszer is született. Ezek az SGLT2-gátlók gátolják a glükóz visszaszívódását, ezáltal csökkentik a vércukorszintet, és növelik a glükóz vizelettel történő kiválasztását.

Az utóbbi évtizedben a tudomány gyors fejlődése megteremtette a lehetőséget, hogy a kutatók *in vitro* és *in vivo* kísérletek nélkül számítógép segítségével gátlószereket tervezzenek. Joseph M. Hayes és munkatársai ilyen számítógépes szűrést végeztek, hogy lehetséges aktív centrumon keresztül gátolni képes glikogén-foszforiláz inhibitor molekulákat azonosítsanak. A vizsgált vegyületek közül a 7 legígéretesebb molekula ki lett választva, melyeket professzor Dr. Somsák László és munkacsoportja megszintetizált. Jelen munkám egyik célja, hogy elvégezzük a kiválasztott vegyületek kinetikai méréseit, és összehasonlítsuk a számítógéppel kapott eredményeket az *in vitro* kísérletek során kapott eredményekkel. A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a mért K_i -vel rendelkező vegyületek kompetitív módon gátolják az enzim aktív centrumát. A szimuláció által legjobb gátlószernak jósolt **5c** vegyület rendelkezett a legalacsonyabb mért K_i -vel ($1,97 \mu\text{M}$), de a számítógépes számítások előrejelzéseitől elmaradt. A **13b** ($K_i = 4,58 \mu\text{M}$) **12b** ($K_i = 26,2 \mu\text{M}$) erőssége megfelelt a jósolatokkal szemben támasztott elvárásoknak. azonban a **13a** ($K_i = 68,6 \mu\text{M}$) és a **13c** ($K_i = 71,1 \mu\text{M}$) a várt értéktől elmarad. A **12a** ($K_i = 326 \mu\text{M}$) **12c** ($K_i = 540 \mu\text{M}$) vegyületek sokkal gyengébb inhibitoroknak bizonyultak, mint azt a számításoktól után vártuk.

Munkám másik részében glükóz analóg inhibitor vegyületek SGLT1 és 2 gátlóképességét vizsgáltam. A vizsgált vegyületek kiválasztásánál figyelembe vettük Sebastian Vidal összefoglaló cikkét, melyben azt áll, hogy a klinikumban használt SGLT2 inhibitorok szerkezetéhez hasonló glikogén-foszforiláz inhibitorok is képesek lehetnek gátolni az SGLT2 fehérjét. A már forgalomban lévő SGLT2 inhibitorok általános szerkezete tartalmaz egy

glükopiranoz gyűrűt, melyhez C-glikozid kötéssel kapcsolódik egy benzolgyűrű, emellett még egy aromás csoportot, melyet metilén híd köt a benzol gyűrűhez. Munkatársaim számos glükózanalog inhibitort szintetizáltak, amelyek hasonló szerkezettel rendelkeznek, mint a forgalomban kapható SGLT2 inhibitorok, de az első aromás gyűrű helyett heteroatomás gyűrűt, pirimidint, oxadiazolt, imidazolt, tiazolt és triazolt, tartalmaz a molekula. A vizsgálat elvégzéséhez lentivirális transzfekcióval létre hoztunk SGLT1 és SGLT2-t fehérjét overexpresszáló stabil sejtvonalakat. A transzfekció sikerességét Western blot, és 2-NBDG felvétel segítségével bizonyítottuk. Továbbá a sejtvonalakat dapagliflozin segítségével validáltuk. A tesztelt vegyületek nem mutattak citotoxicitást. A vizsgált vegyületeket 2 csoportra osztottuk, egyik csoport tagjai újonnan szintetizált vegyületek, a másik csoport korábban glikogén-foszforiláz gátlásra vizsgált vegyületek.

Az első csoport tagjai között néhány új SGLT-inhibitort azonosítottunk, amelyek IC_{50} értékei mikromol tartományban volt, de elmaradtak az ismert C-glükozil-arén típusú inhibitorok gátlóképességéhez képest. A proximális aromás csoport, oxadiazol triazolra történő cseréje a gátlás 20-30-szoros gyengüléséhez vezetett (**23a** vs. **19a** és **20a**). Egy fenil gyűrű bejuttatása az 1,2,4-triazol N1-atomjára jelentős hatékonyság javulást eredményezett (**23c** vs. **23a**), míg egy hidroxietil csoport azonos helyzetbe kapcsolása a gátlás teljes elvesztését okozta (**23a** vs. **23b**). A **22** (imidazol) a **23a**-val (1,2,4-triazol) összehasonlítva, amely szintén tartalmaz NH csoportot, kb. 20-szor hatékonyabbnak bizonyult.

Második csoportban a tiazolt tartalmazó vegyületek nem mutattak gátló hatást. A vegyületek többsége az SGLT2-t jobban gátolta, mint az SGLT1-et, kivétel a **26b** és a **29b** vegyületek, melyek az SGLT1-et gátolták jobban. Továbbá a **25a** – **25b** és a **28a** – **28b** összehasonlításban, a 2-naftil-származékok erősebb gátolták az SGLT2-t, mint az SGLT1-et. A **28b** vegyület, 3,5 μ M SGLT2 IC_{50} értékével, a legjobb inhibitornak bizonyult, és figyelembe véve a GF nanomol gátlását, a **28b** vegyület egy több célpontú vegyület, amely kiindulópontja lehet további antidiabetikus vizsgálatokban.

7. SUMMARY

The liver plays an important role in maintaining proper blood glucose levels by gluconeogenesis and glycogen synthesis/degradation. A key enzyme in glycogen degradation is glycogen phosphorylase, which catalyses the first step of degradation. The enzyme has 5 ligand binding sites through which specifically designed molecules can inhibit the activity of the enzyme.

Another important organ for maintaining adequate blood glucose levels is the kidneys. In the proximal tubule of the kidney, there are two types of sodium-dependent glucose cotransporters (SGLT1 and 2) responsible for glucose reabsorption. Considering the physiological functions of SGLT1 and SGLT2, they have become reasonable targets for drug discovery in the 2000s and several clinical drugs are currently being developed. These SGLT2 inhibitors inhibit glucose reabsorption, thereby reducing blood glucose levels and increasing urinary excretion of glucose.

In the last decade, rapid advances in science have made it possible for researchers to design inhibitors using computers without *in vitro* and *in vivo* experiments. Joseph M. Hayes and colleagues performed such computer screening to identify potential active site inhibitory glycogen phosphorylase inhibitor molecules. From the compounds screened, the 7 most promising molecules were selected and synthesized by Dr. László Somsák and his team. One of the aims of the present work is to perform kinetic measurements of the selected compounds and to compare the computer-generated results with those obtained in *in vitro* experiments. In our studies we found that compounds with measured K_i competitively inhibit the active site of the enzyme. Compound **5c**, which was predicted by simulation to be the best inhibitor, had the lowest measured K_i (1,97 μM), but fell short of the predictions of the computer calculations. The potency of compounds **13b** ($K_i = 4,58 \mu\text{M}$) and **12b** ($K_i = 26,2 \mu\text{M}$) met the predictions, but **13a** ($K_i = 68,6 \mu\text{M}$) and **13c** ($K_i = 71,1 \mu\text{M}$) fell short of the expected values. Compounds **12a** ($K_i = 326 \mu\text{M}$) and **12c** ($K_i = 540 \mu\text{M}$) proved to be much weaker inhibitors than expected from the calculations.

In the second part of my work, I investigated the SGLT1 and 2 inhibitory activity of glucose analogue inhibitor compounds. In the selection of the compounds tested, we took into account Sebastian Vidal's summary article, which states that glycogen phosphorylase inhibitors similar to the structure of SGLT2 inhibitors used in clinical practice may also be able to inhibit the SGLT2 protein. The general structure of the SGLT2 inhibitors already on the market includes a glycopyranose ring with a benzene ring linked by a C-glycoside bond, and an aromatic group linked to the benzene ring by a methylene bridge. My colleagues have synthesized a number of

glucose analogue inhibitors with a similar structure to commercially available SGLT2 inhibitors, but instead of the first aromatic ring, the molecule contains a heteroatomic ring, pyrimidine, oxadiazole, imidazole, thiazole and triazole. To perform this study, stable cell lines overexpressing SGLT1 and SGLT2 protein were generated by lentiviral transfection. The success of the transfection was demonstrated by Western blot and 2-NBDG uptake. Furthermore, the cell lines were validated using dapagliflozin. The tested compounds showed no cytotoxicity. They were divided into 2 groups, one group consisting of newly synthesized compounds and the other group of compounds previously tested for glycogen phosphorylase inhibition.

Among the members of the first group, we identified some new SGLT inhibitors with IC₅₀ values in the micromolar range, but lagging behind the inhibitory activity of known C-glucosyl-arene type inhibitors. Substitution of the proximal aromatic group, oxadiazole, for triazole led to a 20-30-fold attenuation of inhibition (**23a** vs. **19a** and **20a**). Insertion of a phenyl ring on the N1 atom of 1,2,4-triazole resulted in a significant efficiency improvement (**23c** vs. **23a**), while switching a hydroxyethyl group to the same position caused a complete loss of inhibition (**23a** vs. **23b**). Compared with **23a** (1,2,4-triazole), which also contains an NH group, **22** (imidazole) was found to be ~20-fold more effective.

In the second group, compounds containing thiazole showed no inhibitory effect. Most of the compounds inhibited SGLT2 more than SGLT1, except compounds **26b** and **29b**, which inhibited SGLT1 more. Furthermore, in the comparisons **25a** - **25b** and **28a** - **28b**, the 2-naphthyl derivatives inhibited SGLT2 more strongly than SGLT1. Compound **28b**, with an SGLT2 IC₅₀ of 3,5 μ M, was found to be the best inhibitor, and considering the nanomolar inhibition of GP, compound **28b** is a multi-target compound that could be a starting point for further antidiabetic studies.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] “IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition.” <https://diabetesatlas.org/> (accessed Nov. 24, 2021).
- [2] G. Da Silva Xavier, “The Cells of the Islets of Langerhans,” *J. Clin. Med.*, vol. 7, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.3390/JCM7030054.
- [3] E. Thomas, “Preventing amputation in adults with diabetes: identifying the risks,” *Nurs. Stand.*, vol. 29, no. 40, pp. 49–58, Jun. 2015, doi: 10.7748/NS.29.40.49.E9708.
- [4] “Prediabetes jelentése és hatása - Cukorbetegközpont.” <https://www.cukorbetegkozpont.hu/prediabetes> (accessed Nov. 24, 2021).
- [5] J. Ilonen, J. Lempainen, and R. Veijola, “The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 15, no. 11, pp. 635–650, Nov. 2019, doi: 10.1038/S41574-019-0254-Y.
- [6] M. A. Atkinson, G. S. Eisenbarth, and A. W. Michels, “Type 1 diabetes,” *Lancet (London, England)*, vol. 383, no. 9911, pp. 69–82, 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7.
- [7] M. E. Craig *et al.*, “Early-life factors contributing to type 1 diabetes,” *Diabetologia*, vol. 62, no. 10, pp. 1823–1834, Oct. 2019, doi: 10.1007/S00125-019-4942-X.
- [8] L. A. DiMeglio, C. Evans-Molina, and R. A. Oram, “Type 1 diabetes,” *Lancet (London, England)*, vol. 391, no. 10138, pp. 2449–2462, Jun. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.
- [9] H. Yaribeygi, F. R. Farrokhi, A. E. Butler, and A. Sahebkar, “Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 6, pp. 8152–8161, Jun. 2019, doi: 10.1002/JCP.27603.
- [10] S. A. Ross, E. A. Gulve, and M. Wang, “Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes,” *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 3, pp. 1255–1282, Mar. 2004, doi: 10.1021/CR0204653.
- [11] L. Nagy *et al.*, “Glycogen phosphorylase inhibitor N-(3,5-dimethyl-Benzoyl)-N’-(β-D-glucopyranosyl)urea improves glucose tolerance under normoglycemic and diabetic conditions and rearranges hepatic metabolism,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, Jul. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0069420.
- [12] E. W. Gregg *et al.*, “Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990–2010,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 16, pp. 1514–1523, Apr. 2014, doi: 10.1056/NEJMOA1310799.
- [13] P. King, I. Peacock, and R. Donnelly, “The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 48, no. 5, p. 643, 1999, doi: 10.1046/J.1365-2125.1999.00092.X.
- [14] “Genetics of Diabetes | ADA.” <https://www.diabetes.org/diabetes/genetics-diabetes> (accessed Nov. 24, 2021).
- [15] J. L. Schlienger, “[Type 2 diabetes complications],” *Presse Med.*, vol. 42, no. 5, pp. 839–848, May 2013, doi: 10.1016/J.LPM.2013.02.313.
- [16] “Type 2 diabetes - Diagnosis and treatment - Mayo Clinic.”

<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/type-2-diabetes/diagnosis-treatment/drc-20351199> (accessed Nov. 24, 2021).

- [17] M. Busch *et al.*, “Glycaemic control and antidiabetic therapy in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease - cross-sectional data from the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort,” *BMC Nephrol.*, vol. 17, no. 1, Jun. 2016, doi: 10.1186/S12882-016-0273-Z.
- [18] “Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 103, no. 3, pp. 341–363, 2014, doi: 10.1016/J.DIABRES.2013.10.012.
- [19] J. Immanuel and D. Simmons, “Screening and Treatment for Early-Onset Gestational Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-analysis,” *Curr. Diab. Rep.*, vol. 17, no. 11, Nov. 2017, doi: 10.1007/S11892-017-0943-7.
- [20] M. Hod *et al.*, “The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care,” *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, vol. 131 Suppl 3, pp. S173–S211, Oct. 2015, doi: 10.1016/S0020-7292(15)30033-3.
- [21] L. Guariguata, U. Linnenkamp, J. Beagley, D. R. Whiting, and N. H. Cho, “Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 103, no. 2, pp. 176–185, 2014, doi: 10.1016/J.DIABRES.2013.11.003.
- [22] A. D. Association, “Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,” *Diabetes Care*, vol. 37, no. Supplement 1, pp. S81–S90, Jan. 2014, doi: 10.2337/DC14-S081.
- [23] A. A. Kazi and L. Blonde, *Classification of diabetes mellitus*, vol. 21, no. 1. 2001.
- [24] R. Murphy, S. Ellard, and A. T. Hattersley, “Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes,” *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, vol. 4, no. 4, pp. 200–213, Apr. 2008, doi: 10.1038/NCPENDMET0778.
- [25] M. Cnop, S. Toivonen, M. Igoillo-Esteve, and P. Salpea, “Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells,” *Mol. Metab.*, vol. 6, no. 9, pp. 1024–1039, Sep. 2017, doi: 10.1016/J.MOLMET.2017.06.001.
- [26] “diabetes.hu • A 2-es típusú diabétesz gyógyszeres kezelése – I. rész.” <https://diabetes.hu/cikkek/diabetes/1903/a-2-es-tipusu-diabetesz-gyogyszeres-kezelese-1-resz> (accessed Nov. 24, 2021).
- [27] M. B. Lemelman, L. Letourneau, and S. A. W. Greeley, “Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management,” *Clin. Perinatol.*, vol. 45, no. 1, pp. 41–59, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.CLP.2017.10.006.
- [28] S. E. Inzucchi *et al.*, “Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD),” *Diabetes Care*, vol. 35, no. 6, pp. 1364–1379, Jun. 2012, doi: 10.2337/DC12-0413.
- [29] C. Prats, T. E. Graham, and J. Shearer, “The dynamic life of the glycogen granule,” *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 19, pp. 7089–7098, May 2018, doi: 10.1074/JBC.R117.802843.

- [30] J. Jensen, P. I. Rustad, A. J. Kolnes, and Y. C. Lai, "The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise," *Front. Physiol.*, vol. 2 DEC, p. 112, 2011, doi: 10.3389/FPHYS.2011.00112/BIBTEX.
- [31] L. Agius, "New hepatic targets for glycaemic control in diabetes," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 21, no. 4, pp. 587–605, Dec. 2007, doi: 10.1016/J.BEEM.2007.09.001.
- [32] S. Ros, M. García-Rocha, J. Domínguez, J. C. Ferrer, and J. J. Guinovart, "Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 10, pp. 6370–6378, Mar. 2009, doi: 10.1074/JBC.M808576200.
- [33] J. C. Ferrer *et al.*, "Control of glycogen deposition," *FEBS Lett.*, vol. 546, no. 1, pp. 127–132, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0014-5793(03)00565-9.
- [34] P. J. Roach, "Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation," *FASEB J.*, vol. 4, no. 12, pp. 2961–2968, Sep. 1990, doi: 10.1096/FASEBJ.4.12.2168324.
- [35] P. Gergely, B. Toth, I. Farkas, and G. Bot, "Effect of fructose 1-phosphate on the activation of liver glycogen synthase," *Biochem. J.*, vol. 232, no. 1, pp. 133–137, 1985, doi: 10.1042/BJ2320133.
- [36] M. J. Doherty, G. Moorhead, N. Morrice, P. Cohen, and P. T. W. Cohen, "Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen-binding (GL)-subunit of protein phosphatase-1," *FEBS Lett.*, vol. 375, no. 3, pp. 294–298, Nov. 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)01184-G.
- [37] C. H. Davis, L. H. Schliselfeld, D. P. Wolf, C. A. Leavitt, and E. G. Krebs, "Interrelationships among Glycogen Phosphorylase Isozymes," *J. Biol. Chem.*, vol. 242, no. 20, pp. 4824–4833, Oct. 1967, doi: 10.1016/S0021-9258(18)99530-X.
- [38] C. B. Newgard, P. K. Hwang, and R. J. Fletterick, "The family of glycogen phosphorylases: structure and function," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 69–99, 1989, doi: 10.3109/10409238909082552.
- [39] N. G. Oikonomakos *et al.*, "Binding of N-acetyl-N'-beta-D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'-beta-D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies," *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 6, pp. 1684–1696, 2002, doi: 10.1046/J.1432-1327.2002.02813.X.
- [40] N. G. Oikonomakos, V. T. Skamnaki, K. E. Tsitsanou, N. G. Gavalas, and L. N. Johnson, "A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions," *Structure*, vol. 8, no. 6, pp. 575–584, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0969-2126(00)00144-1.
- [41] G. Bot, E. F. Kovács, and P. Gergely, "Partial phosphorylation of muscle phosphorylase: I. Formation of a hybrid phosphorylase in vitro," *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.*, vol. 370, no. 1, pp. 70–77, Nov. 1974, doi: 10.1016/0005-2744(74)90032-1.
- [42] P. Gergely, G. Bot, and E. F. Kovács, "Partial phosphorylation of muscle phosphorylase: II. Formation of a hybrid phosphorylase in vivo," *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.*, vol. 370, no. 1, pp. 78–84, Nov. 1974, doi: 10.1016/0005-

- [43] M. M. Adeva-Andany, M. González-Lucán, C. Donapetry-García, C. Fernández-Fernández, and E. Ameneiros-Rodríguez, "Glycogen metabolism in humans," *BBA Clin.*, vol. 5, pp. 85–100, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.BBACLI.2016.02.001.
- [44] G. J. Browne, M. Delibegovic, S. Keppens, W. Stalmans, and P. T. W. Cohen, "The level of the glycogen targetting regulatory subunit R5 of protein phosphatase 1 is decreased in the livers of insulin-dependent diabetic rats and starved rats," *Biochem. J.*, vol. 360, no. Pt 2, pp. 449–459, Dec. 2001, doi: 10.1042/0264-6021:3600449.
- [45] N. G. Oikonomakos *et al.*, "The design of potential antidiabetic drugs: experimental investigation of a number of beta-D-glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase," *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 19, no. 3, pp. 185–192, Sep. 1994, doi: 10.1007/BF03188920.
- [46] L. Somsák, V. Nagy, T. Docsa, B. Tóth, and P. Gergely, "Gram-scale synthesis of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin and its effect on hepatic glycogen metabolism studied in vitro and in vivo," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 11, no. 2, pp. 405–408, 2000, Accessed: Nov. 24, 2021. [Online]. Available: https://www.academia.edu/14104641/Gram_scale_synthesis_of_a_glucopyranosylidene_spiro_thiohydantoin_and_its_effect_on_hepatic_glycogen_metabolism_studied_in_vitro_and_in_vivo.
- [47] L. Somsak *et al.*, "New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents," *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, no. 28, pp. 2933–2983, Dec. 2008, doi: 10.2174/092986708786848659.
- [48] N. Bergans, W. Stalmans, S. Goldmann, and F. Vanstapel, "Molecular mode of inhibition of glycogenolysis in rat liver by the dihydropyridine derivative, BAY R3401: inhibition and inactivation of glycogen phosphorylase by an activated metabolite," *Diabetes*, vol. 49, no. 9, pp. 1419–1426, 2000, doi: 10.2337/DIABETES.49.9.1419.
- [49] A. K. Ogawa *et al.*, "Glucose-lowering in a db/db mouse model by dihydropyridine diacid glycogen phosphorylase inhibitors," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 13, no. 20, pp. 3405–3408, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0960-894X(03)00798-4.
- [50] P. J. Kasvinsky, S. Shechosky, and R. J. Fletterick, "Synergistic regulation of phosphorylase a by glucose and caffeine.," *J. Biol. Chem.*, vol. 253, no. 24, pp. 9102–9106, Dec. 1978, doi: 10.1016/S0021-9258(17)34291-6.
- [51] N. G. Oikonomakos, J. B. Schnier, S. E. Zographos, V. T. Skamnaki, K. E. Tsitsanou, and L. N. Johnson, "Flavopiridol Inhibits Glycogen Phosphorylase by Binding at the Inhibitor Site *," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 44, pp. 34566–34573, Nov. 2000, doi: 10.1074/JBC.M004485200.
- [52] W. H. Martin *et al.*, "Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 4, pp. 1776–1781, Feb. 1998, doi: 10.1073/PNAS.95.4.1776.
- [53] D. J. Hoover *et al.*, "Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase," *J. Med. Chem.*, vol. 41, no. 16, pp. 2934–2938, Jul. 1998, doi: 10.1021/JM980264K.
- [54] P. J. Kasvinsky, N. B. Madsen, R. J. Fletterick, and J. Sygusch, "X ray crystallographic

- and kinetic studies of oligosaccharide binding to phosphorylase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 253, no. 4, pp. 1290–1296, 1978, doi: 10.1016/S0021-9258(17)38143-7.
- [55] N. Pinotsis, D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, N. G. Oikonomakos, and I. M. Mavridis, “The binding of β - and γ -cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies,” *Protein Sci.*, vol. 12, no. 9, p. 1914, Sep. 2003, doi: 10.1110/PS.03149503.
- [56] G. L. Kellett, E. Brot-Laroche, O. J. Mace, and A. Leturque, “Sugar absorption in the intestine: The role of GLUT2,” *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 28, pp. 35–54, 2008, doi: 10.1146/ANNUREV.NUTR.28.061807.155518.
- [57] W. F. Widdas, “Inability of diffusion to account for placental glucose transfer in the sheep and consideration of the kinetics of a possible carrier transfer,” *J. Physiol.*, vol. 118, no. 1, pp. 23–39, Sep. 1952, doi: 10.1113/JPHYSIOL.1952.SP004770.
- [58] M. MUECKLER, “Facilitative glucose transporters,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 219, no. 3, pp. 713–725, 1994, doi: 10.1111/J.1432-1033.1994.TB18550.X.
- [59] I. S. Wood and P. Trayhurn, “Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins,” *Br. J. Nutr.*, vol. 89, no. 1, pp. 3–9, Jan. 2003, doi: 10.1079/BJN2002763.
- [60] S. S. Pao, I. T. Paulsen, and M. H. Saier, “Major facilitator superfamily,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 1, pp. 1–34, Mar. 1998, doi: 10.1128/MMBR.62.1.1-34.1998.
- [61] M. Uldry and B. Thorens, “The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters,” *Pflugers Arch.*, vol. 447, no. 5, pp. 480–489, Feb. 2004, doi: 10.1007/S00424-003-1085-0.
- [62] H. G. Joost *et al.*, “Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 282, no. 4, 2002, doi: 10.1152/AJPENDO.00407.2001.
- [63] A. Carruthers, J. DeZutter, A. Ganguly, and S. U. Devaskar, “Will the original glucose transporter isoform please stand up!,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 297, no. 4, Oct. 2009, doi: 10.1152/AJPENDO.00496.2009.
- [64] M. Mueckler *et al.*, “Sequence and structure of a human glucose transporter,” *Science*, vol. 229, no. 4717, pp. 941–945, 1985, doi: 10.1126/SCIENCE.3839598.
- [65] “SLC2A1 - Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 - Homo sapiens (Human) - SLC2A1 gene & protein.” <https://www.uniprot.org/uniprot/P11166> (accessed Nov. 24, 2021).
- [66] A. L. Olson and J. E. Pessin, “Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family,” *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 16, pp. 235–256, 1996, doi: 10.1146/ANNUREV.NU.16.070196.001315.
- [67] R. Mintel and A. L. Lehninger, *Lehninger principles of biochemistry*, 5th ed., vol. 33, no. 8. New York: W.H. Freeman, 2008.
- [68] G. Seidner *et al.*, “GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier,” *Nat. Genet.* 1998 182, vol. 18, no. 2, pp. 188–191, 1998, doi: 10.1038/ng0298-188.

- [69] P. Froguel *et al.*, “CA repeat polymorphism in the glucose transporter GLUT 2 gene,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 19, no. 13, p. 3754, Jul. 1991, doi: 10.1093/NAR/19.13.3754-A.
- [70] B. Thorens, “Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter,” *Int. Rev. Cytol.*, vol. 137, pp. 209–238, Jan. 1992, doi: 10.1016/S0074-7696(08)62677-7.
- [71] N. Marty, M. Dallaporta, and B. Thorens, “Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis,” *Physiology (Bethesda)*, vol. 22, no. 4, pp. 241–251, Aug. 2007, doi: 10.1152/PHYSIOL.00010.2007.
- [72] I. A. Simpson, D. Dwyer, D. Malide, K. H. Moley, A. Travis, and S. J. Vannucci, “The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 295, no. 2, Aug. 2008, doi: 10.1152/AJPENDO.90388.2008.
- [73] D. E. James, R. Brown, J. Navarro, and P. F. Pilch, “Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein,” *Nature*, vol. 333, no. 6169, pp. 183–185, 1988, doi: 10.1038/333183A0.
- [74] R. T. Watson, M. Kanzaki, and J. E. Pessin, “Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes,” *Endocr. Rev.*, vol. 25, no. 2, pp. 177–204, Apr. 2004, doi: 10.1210/ER.2003-0011.
- [75] T. Ploug, B. Van Deurs, H. Ai, S. W. Cushman, and E. Ralston, “Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions,” *J. Cell Biol.*, vol. 142, no. 6, pp. 1429–1446, Sep. 1998, doi: 10.1083/JCB.142.6.1429.
- [76] H. P. M. M. Lauritzen, “Insulin- and contraction-induced glucose transporter 4 traffic in muscle: insights from a novel imaging approach,” *Exerc. Sport Sci. Rev.*, vol. 41, no. 2, pp. 77–86, Apr. 2013, doi: 10.1097/JES.0B013E318275574C.
- [77] H. E. Morgan, M. J. Henderson, D. M. Regen, and C. R. Park, “Regulation of glucose uptake in heart muscle from normal and alloxan-diabetic rats: the effects of insulin, growth hormone, cortisone, and anoxia,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 82, no. 2, pp. 387–402, 1959, doi: 10.1111/J.1749-6632.1959.TB44920.X.
- [78] D. Ross Laybutt, A. L. Thompson, G. J. Cooney, and E. W. Kraegen, “Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo,” *Am. J. Physiol.*, vol. 273, no. 3 Pt 2, 1997, doi: 10.1152/AJPHEART.1997.273.3.H1309.
- [79] K. Rett, M. Wicklmayr, G. J. Dietze, and H. U. Haring, “Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin,” *Diabetes*, vol. 45 Suppl 1, no. 1 SUPPL., 1996, doi: 10.2337/DIAB.45.1.S66.
- [80] F. Favaretto *et al.*, “GLUT4 defects in adipose tissue are early signs of metabolic alterations in Alms1^{GT/GT}, a mouse model for obesity and insulin resistance,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, Oct. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0109540.
- [81] P. R. Shepherd, L. Gnudi, E. Tozzo, H. Yang, F. Leach, and B. B. Kahn, “Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue,” *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 30, pp. 22243–22246, Oct.

- 1993, doi: 10.1016/S0021-9258(18)41516-5.
- [82] P. Rorsman and M. Braun, "Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, pp. 155–179, Feb. 2013, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-030212-183754.
 - [83] Z. Fu, E. R. Gilbert, and D. Liu, "Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes," *Curr. Diabetes Rev.*, vol. 9, no. 1, pp. 25–53, Dec. 2012, doi: 10.2174/157339913804143225.
 - [84] P. S. White *et al.*, "Physical mapping of the CA6, ENO1, and SLC2A5 (GLUT5) genes and reassignment of SLC2A5 to 1p36.2," *Cytogenet. Cell Genet.*, vol. 81, no. 1, pp. 60–64, 1998, doi: 10.1159/000014989.
 - [85] H. S. Hundal, F. Darakhshan, S. Kristiansen, S. J. Blakemore, and E. A. Richter, "GLUT5 expression and fructose transport in human skeletal muscle," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 441, pp. 35–45, 1998, doi: 10.1007/978-1-4899-1928-1_4.
 - [86] V. Douard and R. P. Ferraris, "Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 295, no. 2, Aug. 2008, doi: 10.1152/AJPENDO.90245.2008.
 - [87] N. Harada and N. Inagaki, "Role of sodium-glucose transporters in glucose uptake of the intestine and kidney," *J. Diabetes Investig.*, vol. 3, no. 4, p. 352, Aug. 2012, doi: 10.1111/J.2040-1124.2012.00227.X.
 - [88] S. Tazawa *et al.*, "SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose," *Life Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 1039–1050, Jan. 2005, doi: 10.1016/J.LFS.2004.10.016.
 - [89] T. Fukuzawa *et al.*, "SGLT5 reabsorbs fructose in the kidney but its deficiency paradoxically exacerbates hepatic steatosis induced by fructose," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, Feb. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0056681.
 - [90] T. Baader-Pagler, M. Eckhardt, F. Himmelsbach, A. Sauer, B. E. Stierstorfer, and B. S. Hamilton, "SGLT6 - A pharmacological target for the treatment of obesity?," *Adipocyte*, vol. 7, no. 4, p. 277, Oct. 2018, doi: 10.1080/21623945.2018.1516098.
 - [91] A. Scheepers, H. G. Joost, and A. Schürmann, "The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function," *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.*, vol. 28, no. 5, pp. 364–371, 2004, doi: 10.1177/0148607104028005364.
 - [92] B. A. Hirayama, H. C. Wong, C. D. Smith, B. A. Hagenbuch, M. A. Hediger, and E. M. Wright, "Intestinal and renal Na⁺/glucose cotransporters share common structures," *Am. J. Physiol.*, vol. 261, no. 2 Pt 1, 1991, doi: 10.1152/AJPCELL.1991.261.2.C296.
 - [93] P. Song, A. Onishi, H. Koepsell, and V. Vallon, "Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 20, no. 9, pp. 1109–1125, Sep. 2016, doi: 10.1517/14728222.2016.1168808.
 - [94] L. Rossetti, D. Smith, G. I. Shulman, D. Papachristou, and R. A. DeFronzo, "Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats," *J. Clin. Invest.*, vol. 79, no. 5, p. 1510, 1987, doi: 10.1172/JCI112981.
 - [95] E. Makarova *et al.*, "Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study," *J. Sci. Food Agric.*,

- vol. 95, no. 3, pp. 560–568, Jul. 2015, doi: 10.1002/JSFA.6779.
- [96] P. Hilt *et al.*, “Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 10, pp. 2896–2899, May 2003, doi: 10.1021/JF021115K.
 - [97] V. Crespy *et al.*, “Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats,” *J. Nutr.*, vol. 131, no. 12, pp. 3227–3230, Dec. 2001, doi: 10.1093/JN/131.12.3227.
 - [98] V. Vallon, “The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 66, pp. 255–270, Jan. 2015, doi: 10.1146/ANNUREV-MED-051013-110046.
 - [99] J. R. L. Ehrenkranz, N. G. Lewis, C. R. Kahn, and J. Roth, “Phlorizin: a review,” *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 31–38, Jan. 2005, doi: 10.1002/DMRR.532.
 - [100] A. Díez-Sampedro *et al.*, “A glucose sensor hiding in a family of transporters,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 20, pp. 11753–11758, Sep. 2003, doi: 10.1073/PNAS.1733027100.
 - [101] E. M. Wright, D. D. F. L. LOO, and B. A. Hirayama, “Biology of human sodium glucose transporters,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 733–794, Apr. 2011, doi: 10.1152/PHYSREV.00055.2009.
 - [102] M. A. Hediger, M. J. Coady, T. S. Ikeda, and E. M. Wright, “Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter,” *Nature*, vol. 330, no. 6146, pp. 379–381, 1987, doi: 10.1038/330379A0.
 - [103] M. Panayotova-Heiermann, S. Eskandari, E. Turk, G. A. Zampighi, and E. M. Wright, “Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na⁺/glucose cotransporter,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 33, pp. 20324–20327, Aug. 1997, doi: 10.1074/JBC.272.33.20324.
 - [104] E. M. Wright and E. Turk, “The sodium/glucose cotransport family SLC5,” *Pflügers Arch.* 2004 4475, vol. 447, no. 5, pp. 510–518, May 2003, doi: 10.1007/S00424-003-1063-6.
 - [105] K. L. Hamilton and A. G. Butt, “Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice,” *Am. J. Physiol. - Adv. Physiol. Educ.*, vol. 37, no. 4, pp. 415–426, Dec. 2013, doi: 10.1152/ADVAN.00017.2013/ASSET/IMAGES/LARGE/ZU10041328040005.JPEG.
 - [106] C. Avendaño and J. C. Menéndez, “Drugs That Inhibit Signaling Pathways for Tumor Cell Growth and Proliferation,” *Med. Chem. Anticancer Drugs*, pp. 391–491, 2015, doi: 10.1016/B978-0-444-62649-3.00010-7.
 - [107] M. Dieter *et al.*, “Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB,” *Obes. Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 862–870, 2004, doi: 10.1038/OBY.2004.104.
 - [108] M. Sopjani, S. K. Bhavsar, S. Fraser, B. E. Kemp, M. Flöler, and F. Lang, “Regulation of Na⁺-coupled glucose carrier SGLT1 by AMP-activated protein kinase,” *Mol. Membr. Biol.*, vol. 27, no. 2–3, pp. 137–144, Apr. 2010, doi: 10.3109/09687681003616870.

- [109] Y. Kanai, W. S. Lee, G. You, D. Brown, and M. A. Hediger, "The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose," *J. Clin. Invest.*, vol. 93, no. 1, pp. 397–404, 1994, doi: 10.1172/JCI116972.
- [110] E. Turk and E. M. Wright, "Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family," *J. Membr. Biol.*, vol. 159, no. 1, pp. 1–20, 1997, doi: 10.1007/S002329900264.
- [111] E. M. Wright, D. D. F. L. LOO, and B. A. Hirayama, "Biology of human sodium glucose transporters," *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 733–794, Apr. 2011, doi: 10.1152/PHYSREV.00055.2009.
- [112] I. Vrhovac *et al.*, "Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart," *Pflugers Arch.*, vol. 467, no. 9, pp. 1881–1898, Sep. 2015, doi: 10.1007/S00424-014-1619-7.
- [113] C. Bonner *et al.*, "Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 5, pp. 512–517, May 2015, doi: 10.1038/NM.3828.
- [114] I. Sabolić *et al.*, "Expression of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 302, no. 8, Apr. 2012, doi: 10.1152/AJPCCELL.00450.2011.
- [115] C. Ghezzi and E. M. Wright, "Regulation of the human Na⁺-dependent glucose cotransporter hSGLT2," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 303, no. 3, p. C348, Aug. 2012, doi: 10.1152/AJPCCELL.00115.2012.
- [116] M. I. Maldonado-Cervantes *et al.*, "Autocrine modulation of glucose transporter SGLT2 by IL-6 and TNF- α in LLC-PK(1) cells," *J. Physiol. Biochem.*, vol. 68, no. 3, pp. 411–420, Sep. 2012, doi: 10.1007/S13105-012-0153-3.
- [117] U. Panchapakesan *et al.*, "Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells--renoprotection in diabetic nephropathy?," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, Feb. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0054442.
- [118] V. Vallon and K. Sharma, "Sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 19, no. 5, pp. 425–431, Sep. 2010, doi: 10.1097/MNH.0B013E32833BEC06.
- [119] T. Rieg *et al.*, "Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 306, no. 2, Jan. 2014, doi: 10.1152/AJPRENAL.00518.2013.
- [120] E. M. Wright, C. Ghezzi, and D. D. F. Loo, "Novel and Unexpected Functions of SGLTs," *Physiology (Bethesda)*, vol. 32, no. 6, pp. 435–443, Oct. 2017, doi: 10.1152/PHYSIOL.00021.2017.
- [121] G. Gyimesi, J. Pujol-Giménez, Y. Kanai, and M. A. Hediger, "Sodium-coupled glucose transport, the SLC5 family, and therapeutically relevant inhibitors: from molecular discovery to clinical application," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 472, no. 9, pp. 1177–1206, Sep. 2020, doi: 10.1007/S00424-020-02433-X.

- [122] M. A. Abdul-Ghani, R. A. DeFronzo, and L. Norton, "Novel Hypothesis to Explain Why SGLT2 Inhibitors Inhibit Only 30–50% of Filtered Glucose Load in Humans," *Diabetes*, vol. 62, no. 10, p. 3324, Oct. 2013, doi: 10.2337/DB13-0604.
- [123] V. Vallon *et al.*, "SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 22, no. 1, pp. 104–112, Jan. 2011, doi: 10.1681/ASN.2010030246.
- [124] D. R. Powell *et al.*, "Improved glycemic control in mice lacking Sglt1 and Sglt2," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 304, no. 2, Jan. 2013, doi: 10.1152/AJPENDO.00439.2012.
- [125] V. Vallon and S. C. Thomson, "Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 74, pp. 351–375, 2012, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-020911-153333.
- [126] S. Vestri *et al.*, "Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat," *J. Membr. Biol.*, vol. 182, no. 2, pp. 105–112, Jul. 2001, doi: 10.1007/S00232-001-0036-Y.
- [127] N. M. Tabatabai, M. Sharma, S. S. Blumenthal, and D. H. Petering, "Enhanced expressions of sodium-glucose cotransporters in the kidneys of diabetic Zucker rats," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 83, no. 1, Jan. 2009, doi: 10.1016/J.DIABRES.2008.11.003.
- [128] F. Gembardt *et al.*, "The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob type 2 diabetic mice with and without hypertension," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 307, no. 3, 2014, doi: 10.1152/AJPRENAL.00145.2014.
- [129] Z. H. Israili, "Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus," *Am. J. Ther.*, vol. 18, no. 2, pp. 117–152, Mar. 2011, doi: 10.1097/MJT.0B013E3181AFBF51.
- [130] A. Artasensi, A. Pedretti, G. Vistoli, and L. Fumagalli, "Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs," *Molecules*, vol. 25, no. 8, Apr. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25081987.
- [131] L. H. Opie, "Sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: new among antidiabetic drugs," *Cardiovasc. drugs Ther.*, vol. 28, no. 4, pp. 331–334, Aug. 2014, doi: 10.1007/S10557-014-6522-0.
- [132] S. Mudaliar, D. Polidori, B. Zambrowicz, and R. R. Henry, "Sodium-Glucose Cotransporter Inhibitors: Effects on Renal and Intestinal Glucose Transport: From Bench to Bedside," *Diabetes Care*, vol. 38, no. 12, pp. 2344–2353, Dec. 2015, doi: 10.2337/DC15-0642.
- [133] Y. Zhang and Z.-P. Liu, "Recent Developments of C-Aryl Glucoside SGLT2 Inhibitors," *Curr. Med. Chem.*, vol. 23, no. 8, pp. 832–849, Feb. 2016, doi: 10.2174/0929867323666160210125747.
- [134] É. Bokor *et al.*, "C-Glycopyranosyl Arenes and Hetarenes: Synthetic Methods and Bioactivity Focused on Antidiabetic Potential," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 3, pp. 1687–1764, Feb. 2017, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.6B00475.
- [135] A. R. Aguilón *et al.*, "Synthetic Strategies toward SGLT2 Inhibitors," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 22, no. 4, pp. 467–488, Apr. 2018, doi: 10.1021/ACS.OPRD.8B00017.

- [136] “SGLT | Sodium-dependent Glucose Cotransporter.” <https://www.selleckchem.com/SGLT.html> (accessed Dec. 11, 2021).
- [137] H. Koepsell, “The Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 are targets for the treatment of diabetes and cancer,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 170, pp. 148–165, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2016.10.017.
- [138] T. Inoue *et al.*, “Mizagliflozin, a novel selective SGLT1 inhibitor, exhibits potential in the amelioration of chronic constipation,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 806, pp. 25–31, 2017, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2017.04.010.
- [139] T. Shibazaki *et al.*, “KGA-2727, a novel selective inhibitor of a high-affinity sodium glucose cotransporter (SGLT1), exhibits antidiabetic efficacy in rodent models,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 342, no. 2, pp. 288–296, Aug. 2012, doi: 10.1124/JPET.112.193045.
- [140] A. Markham and S. J. Keam, “Sotagliflozin: First Global Approval,” *Drugs*, vol. 79, no. 9, 2019, doi: 10.1007/S40265-019-01146-5.
- [141] A. Tahara *et al.*, “Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 715, no. 1–3, pp. 246–255, 2013, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2013.05.014.
- [142] M. C. Michel, E. Mayoux, and V. Vallon, “A comprehensive review of the pharmacodynamics of the SGLT2 inhibitor empagliflozin in animals and humans,” *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 388, no. 8, pp. 801–816, Aug. 2015, doi: 10.1007/S00210-015-1134-1.
- [143] B. L. Neuen *et al.*, “SGLT2 inhibitors for the prevention of kidney failure in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis,” *lancet. Diabetes Endocrinol.*, vol. 7, no. 11, pp. 845–854, Nov. 2019, doi: 10.1016/S2213-8587(19)30256-6.
- [144] S. C. Shao *et al.*, “Effects of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors on serum alanine aminotransferase levels in people with type 2 diabetes: A multi-institutional cohort study,” *Diabetes. Obes. Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 128–134, Jan. 2020, doi: 10.1111/DOM.13875.
- [145] Y. Xin, Y. Guo, Y. Li, Y. Ma, L. Li, and H. Jiang, “Effects of sodium glucose cotransporter-2 inhibitors on serum uric acid in type 2 diabetes mellitus: A systematic review with an indirect comparison meta-analysis,” *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 26, no. 2, pp. 421–426, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.SJBS.2018.11.013.
- [146] P. Ueda *et al.*, “Sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and risk of serious adverse events: Nationwide register based cohort study,” *BMJ*, vol. 363, 2018, doi: 10.1136/BMJ.K4365.
- [147] A. F. Abdel-Wahab *et al.*, “Renal protective effect of SGLT2 inhibitor dapagliflozin alone and in combination with irbesartan in a rat model of diabetic nephropathy,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 103, pp. 59–66, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2018.03.176.
- [148] V. Perkovic *et al.*, “Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, no. 24, pp. 2295–2306, Jun. 2019, doi:

10.1056/NEJMOA1811744.

- [149] O. Moser *et al.*, “Atypical blood glucose response to continuous and interval exercise in a person with type 1 diabetes: a case report,” *J. Med. Case Rep.*, vol. 11, no. 1, Jun. 2017, doi: 10.1186/S13256-017-1355-7.
- [150] A. L. Handlon, “Sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors as potential antidiabetic agents,” <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.15.11.1531>, vol. 15, no. 11, pp. 1531–1540, Nov. 2005, doi: 10.1517/13543776.15.11.1531.
- [151] S. Nomura, “Renal Sodium-Dependent Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitors for New Anti-Diabetic Agent,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 10, no. 4, pp. 411–418, Mar. 2010, doi: 10.2174/156802610790980567.
- [152] B. A. Ellsworth *et al.*, “Aglycone exploration of C-arylglucoside inhibitors of renal sodium-dependent glucose transporter SGLT2,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 17, pp. 4770–4773, Sep. 2008, doi: 10.1016/J.BMCL.2008.07.109.
- [153] K. Haider, A. Pathak, A. Rohilla, M. R. Haider, K. Ahmad, and M. S. Yar, “Synthetic strategy and SAR studies of C-glucoside heteroaryls as SGLT2 inhibitor: A review,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 184, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.EJMECH.2019.111773.
- [154] A. Manoj, S. Das, A. Kunnath Ramachandran, A. T. Alex, and A. Joseph, “SGLT2 inhibitors, an accomplished development in field of medicinal chemistry: an extensive review,” *Future Med. Chem.*, vol. 12, no. 21, pp. 1961–1990, Nov. 2020, doi: 10.4155/FMC-2020-0154.
- [155] M. Imamura *et al.*, “Discovery of Ipragliflozin (ASP1941): a novel C-glucoside with benzothiophene structure as a potent and selective sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 20, no. 10, pp. 3263–3279, May 2012, doi: 10.1016/J.BMC.2012.03.051.
- [156] S. H. Lee *et al.*, “Novel thiophenyl C-aryl glucoside SGLT2 inhibitors as potential antidiabetic agents,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 19, no. 19, pp. 5813–5832, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.BMC.2011.08.014.
- [157] S. Sakamaki *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of thiophene-C-glucosides as sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibitors,” *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 61, no. 10, pp. 1037–1043, Oct. 2013, doi: 10.1248/CPB.C13-00407.
- [158] J. Lee, S. Y. Kang, K. S. Song, J. Lee, and S. H. Lee, “Synthesis of pyridazine and thiazole analogs as SGLT2 inhibitors,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 16, pp. 6069–6079, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.BMC.2010.06.076.
- [159] X. Zhao *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of 6-hydroxyl C-aryl glucoside derivatives as novel sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 28, no. 12, pp. 2201–2205, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.BMCL.2018.04.070.
- [160] S. H. Lee, M. J. Kim, S. H. Lee, J. Kim, H. J. Park, and J. Lee, “Thiazolylmethyl ortho-substituted phenyl glucoside library as novel C-aryl glucoside SGLT2 inhibitors,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 7, pp. 2662–2675, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.EJMECH.2011.03.052.
- [161] K. Ikegai *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of C-glucosides with azulene rings as selective SGLT2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus:

- discovery of YM543,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 21, no. 13, pp. 3934–3948, Jul. 2013, doi: 10.1016/J.BMC.2013.03.067.
- [162] H. Kakinuma *et al.*, “(1S)-1,5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methylphenyl]-1-thio-D-glucitol (TS-071) is a potent, selective sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for type 2 diabetes treatment,” *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 8, pp. 3247–3261, Apr. 2010, doi: 10.1021/JM901893X.
- [163] G. H. Kuo *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of benzocyclobutane-C-glycosides as potent and orally active SGLT1/SGLT2 dual inhibitors,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 28, no. 7, pp. 1182–1187, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.BMCL.2018.02.057.
- [164] L. Somsák *et al.*, “New syntheses towards C-glycosyl type glycomimetics,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 91, no. 7, pp. 1159–1175, Jul. 2019, doi: 10.1515/PAC-2019-0208/PDF.
- [165] M. Donnier-Maréchal and S. Vidal, “Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2013 - 2015),” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 26, no. 2, pp. 199–212, Feb. 2016, doi: 10.1517/13543776.2016.1131268.
- [166] E. G. KREBS and E. H. FISCHER, “Molecular properties and transformations of glycogen phosphorylase in animal tissues,” *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, vol. 24, pp. 263–290, 1962, doi: 10.1002/9780470124888.CH5.
- [167] E. Osz *et al.*, “Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 9, no. 10, pp. 1385–1390, May 1999, doi: 10.1016/S0960-894X(99)00192-4.
- [168] “Kináz gátló molekulák szerkezet-hatás/tulajdonság összefüggéseinek vizsgálata számított és mért paraméterek alapján, és alkalmazásuk a gyógyszertervezésben és a gyógyszerfejlesztésben,” 2005.
- [169] D. Leonidas *et al.*, “Phytogetic Polyphenols as Glycogen Phosphorylase Inhibitors: The Potential of Triterpenes and Flavonoids for Glycaemic Control in Type 2 Diabetes,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 24, no. 4, pp. 384–403, Mar. 2017, doi: 10.2174/0929867324666161118122534.
- [170] J. M. Hayes, A. L. Kantsadi, and D. D. Leonidas, “Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: Potential treatment for type 2 diabetes,” *Phytochem. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 471–498, 2014, doi: 10.1007/S11101-014-9360-6.
- [171] L. Somsák, “Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase,” *Comptes Rendus Chim.*, vol. 14, no. 2–3, pp. 211–223, 2011, doi: 10.1016/J.CRCI.2010.09.004.
- [172] A. L. Kantsadi *et al.*, “Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-β-d-glucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 123, pp. 737–745, 2016, doi: 10.1016/J.EJMECH.2016.06.049.
- [173] É. Bokor, S. Kun, T. Docsa, P. Gergely, and L. Somsák, “4(5)-Aryl-2-C-glucopyranosyl-imidazoles as New Nanomolar Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 6, no. 12, pp. 1215–1219, Dec. 2015, doi: 10.1021/ACSMEDCHEMLETT.5B00361.
- [174] M. Tóth *et al.*, “Synthesis and structure-activity relationships of C-glycosylated

- oxadiazoles as inhibitors of glycogen phosphorylase,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 17, no. 13, pp. 4773–4785, Jul. 2009, doi: 10.1016/J.BMC.2009.04.036.
- [175] S. Kun *et al.*, “New synthesis of 3-(β -D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazoles, nanomolar inhibitors of glycogen phosphorylase,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 76, pp. 567–579, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.EJMECH.2014.02.041.
- [176] E. D. Chrysina *et al.*, “Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case,” *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 20, no. 6–8, pp. 733–740, May 2009, doi: 10.1016/J.TETASY.2009.03.021.
- [177] É. Bokor, Z. Széles, T. Docsa, P. Gergely, and L. Somsák, “C-Glucopyranosyl-1,2,4-triazol-5-ones: synthesis and inhibition of glycogen phosphorylase,” *Carbohydr. Res.*, vol. 429, pp. 128–134, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.CARRES.2015.12.005.
- [178] S. Kun *et al.*, “A multidisciplinary study of 3-(β -d-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazole derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors: Computation, synthesis, crystallography and kinetics reveal new potent inhibitors,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 147, pp. 266–278, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.EJMECH.2018.01.095.
- [179] J. M. and G. Archontis, “MM-GB(PB)SA Calculations of Protein-Ligand Binding Free Energies,” *Mol. Dyn. - Stud. Synth. Biol. Macromol.*, Apr. 2012, doi: 10.5772/37107.
- [180] P. K. HWANG, Y. P. SEE, A. M. VINCENTINI, M. A. POWERS, R. J. FLETTERICK, and M. M. CRERAR, “Comparative sequence analysis of rat, rabbit, and human muscle glycogen phosphorylase cDNAs,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 152, no. 2, pp. 267–274, 1985, doi: 10.1111/J.1432-1033.1985.TB09193.X.
- [181] D. Barr *et al.*, “Identification of C- β -D-Glucopyranosyl Azole-Type Inhibitors of Glycogen Phosphorylase That Reduce Glycogenolysis in Hepatocytes: In Silico Design, Synthesis, in Vitro Kinetics, and ex Vivo Studies,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 14, no. 7, pp. 1460–1470, Jul. 2019, doi: 10.1021/ACSCHEMBIO.9B00172/SUPPL_FILE/CB9B00172_SI_001.PDF.
- [182] R. Z. Cer, U. Mudunuri, R. Stephens, and F. J. Lebeda, “IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. Web Server issue, 2009, doi: 10.1093/NAR/GKP253.
- [183] G. H. Kuo *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of benzocyclobutane-C-glycosides as potent and orally active SGLT1/SGLT2 dual inhibitors,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 28, no. 7, pp. 1182–1187, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.BMCL.2018.02.057.
- [184] É. Bokor, T. Docsa, P. Gergely, and L. Somsák, “Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 3, pp. 1171–1180, Feb. 2010, doi: 10.1016/J.BMC.2009.12.043.
- [185] S. Kun, É. Bokor, Á. Sipos, T. Docsa, and L. Somsák, “Synthesis of New C- and N- β -d-Glucopyranosyl Derivatives of Imidazole, 1,2,3-Triazole and Tetrazole, and Their Evaluation as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase,” *Molecules*, vol. 23, no. 3, 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23030666.
- [186] É. Bokor, T. Docsa, P. Gergely, and L. Somsák, “C-Glucopyranosyl-1,2,4-triazoles As New Potent Inhibitors of Glycogen Phosphorylase,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 4, no.

- 7, p. 612, Jul. 2013, doi: 10.1021/ML4001529.
- [187] É. Bokor, “N- and C-Glycopyranosyl heterocycles as glycogen phosphorylase inhibitors,” *Recent Trends Carbohydr. Chem.*, pp. 253–300, 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-817467-8.00007-4.
- [188] M. Benlifa *et al.*, “In search of glycogen phosphorylase inhibitors: 5-Substituted 3-C-glucopyranosyl-1,2,4-oxadiazoles from β -D-Glucopyranosyl cyanides upon cyclization of O-acylamidoxime intermediates,” *European J. Org. Chem.*, no. 18, pp. 4242–4256, Sep. 2006, doi: 10.1002/EJOC.200600073.
- [189] S. Cecioni, O. A. Argintaru, T. Docsa, P. Gergely, J. P. Praly, and S. Vidal, “Probing multivalency for the inhibition of an enzyme: Glycogen phosphorylase as a case study,” *New J. Chem.*, vol. 33, no. 1, pp. 148–156, 2009, doi: 10.1039/B812540F.
- [190] Z. Hadady, M. Tóth, and L. Somsák, “C-(β -D-glucopyranosyl) heterocycles as potential glycogen phosphorylase inhibitors,” *Arkivoc*, vol. 2004, no. 7, pp. 140–149, 2004, doi: 10.3998/ARK.5550190.0005.711.
- [191] D. Goyard *et al.*, “Glucose-based spiro-oxathiazoles as in vivo anti-hyperglycemic agents through glycogen phosphorylase inhibition,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 18, no. 5, pp. 931–940, 2020, doi: 10.1039/C9OB01190K.

9. TÁRGYSZAVAK

diabetes mellitusz
glikogén foszforiláz
glikogén foszforiláz inhibitorok
glükóztranszport
2-NBDG
SGLT1
SGLT2

KEYWORDS

diabetes mellitus
glycogen phosphorylase
glycogen phosphorylase inhibitors
glucose transport
2-NBDG
SGLT1
SGLT2

10. 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. Docsa Tibor** egyetemi adjunktus Úrnak a támogatásért szakmai feladataimban, tudományos munkámban; mint témavezető a tudományos munkában szerzett kimagasló tudását nagylelkűen megosztotta velem.

Hálásan köszönöm **Dr. Gergely Pál** professzor Úrnak a szakmai támogatását és segítségét az eredmények megbeszélésében.

Köszönettel tartozom **Dr. Uray Karen** tudományos főmunkatárs Asszonynak szakmai támogatásáért és értékes segítségéért az eredmények publikálásában.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Somsák László** professzor Úrnak és munkatársainak (Szerves Kémia Tanszék) a szintetizált vegyületekért. Külön is köszönöm Dr. Somsák László professzor Úrnak és **Dr. Bokor Éva** adjunktus Asszonynak a folyamatos támogatást és értékes segítséget az eredmények diszkussziójában.

Külön köszönet **Varga Luca Annának**, akire mindig számíthattam és kísérletes munkámban nyújtott sokoldalú segítséget.

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

Végezetül köszönöm családom támogatását, bátorítását, ami nélkül nem készülhetett volna el ez a munka.

11. FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/342/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sipos Ádám

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

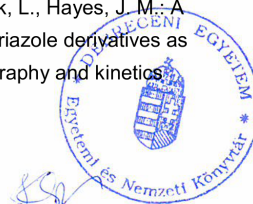
1. **Sipos, Á.**, Szennyey, E., Hajnal, É., Kun, S., Szabó, E. K., Uray, K., Somsák, L., Docsa, T., Bokor, É.: Dual-Target Compounds against Type 2 Diabetes Mellitus: proof of Concept for Sodium Dependent Glucose Transporter (SGLT) and Glycogen Phosphorylase (GP) Inhibitors. *Pharmaceuticals*. 14 (4), 1-27, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14040364>
IF: 5.863 (2020)
2. Barr, D., Szennyey, E., Bokor, É., Al-Oanzi, Z. H., Moffatt, C., Kun, S., Docsa, T., **Sipos, Á.**, Davies, M. P., Mathomes, R. T., Snape, T. J., Agius, L., Somsák, L., Hayes, J. M.: Identification of C-[béta]-d-Glucopyranosyl Azole-Type Inhibitors of Glycogen Phosphorylase That Reduce Glycogenolysis in Hepatocytes: in Silico Design, Synthesis, in Vitro Kinetics, and ex Vivo Studies. *ACS Chem. Biol.* 14 (7), 1460-1470, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.9b00172>
IF: 4.434





További közlemények

3. Docsa, T., Bhattarai, D., **Sipos, Á.**, Wade, C. E., Cox, C. S., Uray, K.: CXCL1 is upregulated during the development of ileus resulting in decreased intestinal contractile activity. *Neurogastroenterol. Motil.* 32 (3), 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/nmo.13757>
IF: 3.598
4. Kun, S., Kánya, N., Galó, N., Páhi, A., Mándi, A., Kurtán, T., Makleit, P., Veres, S., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Somsák, L.: Glucopyranosylidene-spiro-benzo[b][1,4]oxazinones and -benzo[b][1,4]thiazinones: Synthesis and Investigation of Their Effects on Glycogen Phosphorylase and Plant Growth Inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 67 (24), 6884-6891, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00443>
IF: 4.192
5. Szabó, E. K., Kyriakis, E., Psarra, A. M. G., Karra, A. G., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Stravodimos, G. A., Katsidou, E., Skamnaki, V. T., Liggri, P. G. V., Zographos, S. E., Mándi, A., Király, S. B., Kurtán, T., Leonidas, D. D., Somsák, L.: Glucopyranosylidene-spiro-imidazolinones, a New Ring System: Synthesis and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors by Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography. *J. Med. Chem.* 62 (13), 6116-6136, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00356>
IF: 6.205
6. Szennyés, E., Bokor, É., Docsa, T., **Sipos, Á.**, Somsák, L.: Synthesis of C-β-D-glucopyranosyl derivatives of some fused azoles for the inhibition of glycogen phosphorylase. *Carbohydr. Res.* 472, 33-41, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2018.11.003>
IF: 1.841
7. Kun, S., Begum, J., Kyriakis, E., Stamati, E. C. V., Barkas, T. A., Szennyés, E., Bokor, É., Szabó, E. K., Stravodimos, G. A., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Gergely, P., Moffatt, C., Patraskaki, M. S., Kokolaki, M. C., Gkerdi, A., Skamnaki, V. T., Leonidas, D. D., Somsák, L., Hayes, J. M.: A multidisciplinary study of 3-(β-D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazole derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors: computation, synthesis, crystallography and kinetics reveal new potent inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 147, 266-278, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.095>
IF: 4.833





8. Kun, S., Bokor, É., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Somsák, L.: Synthesis of New C- and N-β-d-Glucopyranosyl Derivatives of Imidazole, 1,2,3-Triazole and Tetrazole, and Their Evaluation as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase.
Molecules. 23 (3), 1-17, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23030666>
IF: 3.06
9. Szennyey, E., Bokor, É., Langer, P., Gyémánt, G., Docsa, T., **Sipos, Á.**, Somsák, L.: The first general synthesis of 2-C-(β-D-glucopyranosyl)pyrimidines and their evaluation as inhibitors of some glycoenzymes.
New J. Chem. 42 (21), 17439-17446, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C8NJ04035D>
IF: 3.069

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,095

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,297**

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, 2022.02.07.

