

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Gergely Szabolcs

Témavezető: Dr. Virág László egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések	6
1. Bevezetés	8
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. A szabadgyökök eredete	9
2.1.1 Endogén szabadgyök képződés	10
2.1.2. Exogén szabadgyökforrások	12
2.2. Antioxidáns rendszerek	12
2.3. Az oxidatív stressz	13
2.3.1. Az oxidatív stressz kimutatása	15
2.3.2. A poli (ADP-ribóz) polimeráz enzim szerepe az oxidatív stresszben	16
2.4. Szabadgyökök, antioxidánsok és jelátviteli folyamatok	19
2.5. Oxidatív stressz és sejtvédő (citoprotektív) anyagok	19
2.6. A doxorubicin kardiotoxikus mellékhatásai	20
3. Célkitűzések	23
4. Anyagok és módszerek	24
4.1. Anyagok és molekulakönyvtárak	24
4.1.1 Anyagok	24
4.1.2 Molekulakönyvtárak	24
4.2. Sejttenyészetek	25
4.2.1 Sejtvonalak	25
4.2.2 Primer neonatális patkány kardiomiocita	25
4.3. Tecan robot	26
4.4. Reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálat (HTS módszer)	26

4.5. Reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálat (kézi módszerrel)	27
4.6. MTT életképességi teszt	27
4.6.1. MTT-teszt (kézi módszerrel)	27
4.6.2. MTT-teszt (HTS változat)	28
4.7. Életképesség meghatározása egyéb módszerekkel (LDH kiszabadulás, kalcein-AM hidrolízis)	28
4.8. ABTS színtelenítési teszt	28
4.8.1. ABTS színtelenítési teszt (HTS változat)	28
4.8.2. ABTS színtelenítési teszt (kézi módszer)	29
4.9. A réz(II)ion redukálásán alapuló antioxidáns-kapacitás mérése (CUPRAC)	29
4.10. Amplex® Red – hidrogén-peroxid meghatározása	29
4.11. Hidrogén-peroxid eltávolító (scavenger) aktivitás	29
4.12. Citotoxicitás meghatározása (propidium-jodid felvétel)	30
4.13. Sejtmorfológián alapuló citotoxicitás meghatározása	30
4.14. Sejtproliferáció meghatározása	30
4.15. PARP aktivitás meghatározása (DELFI)	31
4.16. PAR kimutatása	31
4.17. A kaszpáz-3 aktivitásának meghatározása	31
4.18. MAP kinázok foszforilációs szintjének meghatározása Western blottal	32
4.19. Gázkromatográfia – tömegspektrometria mérések	32
4.20. Statisztikai analízis	33
5. Eredmények	34
5.1. Nagy áteresztőképességű szűrések és az eredmények validálása	34
5.2. A PARP aktivitását gátló sejtvédő-vegyületek azonosítása	37
5.3. Dibenzoil-metán származékok azonosítása: nagy áteresztőképességű szűrések eredményeinek értékelése	41
5.4. DBM vegyületek sejtvédő hatása	42

5.5. DBM vegyületek hatása a mitogén-aktivált kinázok aktivitására	45
5.6. HTS szűrés doxorubicin toxicitás ellen védő kardioprotektív vegyületek azonosítására	47
5.7. Kardioprotektív hatás megerősítése morfológiai vizsgálatokkal	48
5.8. Az EODB védi a H9C2 sejteket az apoptotikus és nekrotikus sejthaláltól	50
5.9. Az EODB kardioprotektív hatása primer kardiomiocitákon	51
5.10. Az EODB nem rendelkezik antioxidáns hatással, de gátolja a JNK aktivitását	52
5.11. Az EODB nem befolyásolja a doxorubicin tumorelles hatását	54
6. Megbeszélés	57
6.1. Sejtvédő vegyületek antioxidáns hatásának vizsgálata	57
6.2. Dibenzoil-metán származékok lehetséges sejttéletani szerepe	58
6.3. A DBM és a sejthalál kapcsolata	59
6.4. A doxorubicin citotoxikus hatása	60
6.5. A doxorubicin kardiotoxikus hatásának csökkentése	60
6.6. Az EODB kardioprotektív hatása	61
7. Összefoglalás	63
8. Felhasznált irodalom	65
9. Tárgyszavak	76
10. Köszönetnyilvánítás	77
11. Függelék	78

Rövidítések

A nehézkesen magyarra fordítható kifejezések a jegyzékben angolul szerepelnek

ABTS	2,2'-azino-bisz(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)
AFU	Arbitrary Fluorescence Unit
AIF	apoptózist indukáló faktor
CUPRAC	CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity : a rézion redukálásán alapuló antioxidáns kapacitás mérési módszer
CPM	percenkénti beütésszám
CREB3L1	cAMP Responsive Element Binding protein 3-Like-1 (transzkripciós faktor: szabályozza pl. a vazopresszin gént)
DBM	dibenzoil-metán
DELFA	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay
DEVD-AMC	kaspáz-3 szubsztrát: N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metil-kumarin [kémiai neve: N-acetil-L- α -aszpartil-L- α -glutamil-L-valil-N-(4-metil-2-oxo-2H-1-benzopirán-7-il)-L- α -aszparagin]
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium, sejttenyésztő folyadék
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDI	Explicit Diversity Index: a molekulakönyvtárak vegyületeinek szerkezeti sokféleségét vagy hasonlóságát jellemzi
EODB	3-[2-(4-etil-fenil)—2-oxoetil]-1,2-dimetil-1H-3,1-benzimidazol-3-ium bromid
ER	endoplazmatikus retikulum
ERK 1/2	extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1/2
FCS	fötális borjúsavó
FeTPPS	(Fe-porfirin komplex: 5,10,15,20-tetrakis(4-szulfonsav-fenil)porfirinát-vas(III)klorid)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
GM-CSF	granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
HIF-1	hipoxia-indukáló faktor ("master" gén)
HTS	High-Throughput Screening: nagy áteresztőképességű szűrés
JNK	MAP kinázok családjába tartozó enzimek (c-Jun N-terminális kinázok)
LDH	laktát-dehidrogenáz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz(ok)

MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidin
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid
NGF	neurális növekedési faktor
p38	MAP kinázokhoz tartozó enzimes család (p38 MAPK)
PAR	poli(ADP-ribóz)
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PARP-1	poli(ADP-ribóz) polimeráz-1
PBS	Phosphate Buffer Saline: 137 mM NaCl - 2,7 mM KCl - 10 mM Na ₂ HPO ₄ - 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
PDGF	trombocita-eredetű növekedési faktor
PI	propídium-jodid
ROS	reaktív oxigén gyökök (R eactive O xygen S pecies)
RNS	nitrogéntartalmú szabad gyökök (R eactive N itrogen S pecies)
RPMI 1640	Na-hidrogénkarbonát tartalmú tenyésztő folyadék (± L-glutamin)
SOD	szuperoxid-dizmutáz
TBST	Tris-puffer, NaCl és Tween 20 (Western blot)
TRAF/RIP	TNF Receptor Associated Factor , ill. Receptor Interacting Ser/Thr-Protein Kinase

1. Bevezetés

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

Az elmúlt két évtizedben a gyógyszerkutatás nélkülözhetetlen részévé vált a molekulakönyvtárak szűrése élősejtes modellekben gyógyszeripari, biotechnológiai és tudományos alap kutatási területeken egyaránt. Az eljárás különféle molekulakönyvtárakat használ, valamint nagyteljesítményű robotizált és automatizált eszközökkel dolgozik. Sejtvédő, meghatározott kémiai szerkezettel rendelkező „vezérmolekulák” (lead molecules) azonosítását követően kerül sor azok optimalizálására a szerkezet célzott módosításával. A leghatékonyabb vegyületek állatkísérleti, majd preklinikai-klinikai vizsgálatsorozatát végzik el, mielőtt új terápiás gyógyszerként jelennek meg a klinikai gyakorlatban.

Oxidatív stressz – a szervezetben található szabadgyökképződés és -bomlás egyensúlyának megváltozása – számos betegség hátterében kimutatható. A sejt sérülések a makromolekulák oxidációjával sejthalálhoz: pl. apoptózishoz vagy nekrozishoz vezetnek. Munkánk célja olyan sejtvédő vegyületek azonosítása, amelyek további fejlesztésekkel hozzájárulhatnak terápiás alkalmazásukhoz is.

2. Irodalmi áttekintés

A szabadgyök párosítatlan elektront vagy elektronokat tartalmazó származék, amely nagyon reakcióképes, bomlékony, a párosított elektronállapot visszaállítására törekedve kapcsolatba lép más molekulával, ionnal vagy gyökkel. Hiányzó elektronja pótlására a környező sejtalkotó anyagokból elektront von el, ezzel károsítja pl. a fehérjéket, a lipideket, a genetikai állományt. A szervezetben keletkezett szabadgyökök más szabadgyökökkel és nem gyökökkel reagálhatnak, további szabadgyökök képződhetnek és reakciósorozatok is kialakulhatnak. A szabadgyökök megsemmisülnek ezekben a reakciókban, de a célmolekulák szerkezetében maradandó változásokat alakítanak ki. Ezek közül a DNS-károsodások és a lipidperoxidáció patológiai jelentősége emelendő ki. Az utóbbi membránkárosodások révén hozzájárul pl. az atherosclerosis kialakulásához vagy az iszkémiás károsodások (stroke vagy miokardiális infarktus) patomechanizmusához (Valko et al., 2007).

2.1. A szabadgyökök eredete

A szabadgyökök az alapvető anyagcsere folyamatokban keletkeznek, elsősorban az aerob metabolizmusban speciális enzimek hatására vagy egyéb biokémiai reakciókban. A szabadgyököknek alapvetően két csoportja van, az oxigén eredetű (ROS - reactive oxygen species) és a nitrogén tartalmú szabadgyökök (RNS – reactive nitrogen species) (Valko et al., 2006).

Az oxigénből keletkező reaktív származékok közé tartozik a *szingulett oxigén* ($^1\text{O}_2$), amely molekuláris oxigénből keletkezik pl. UV-sugárzás hatására. A szingulett oxigén lazító molekulaorbitáljain két párosítatlan elektron helyezkedik el. Az egyik legjelentősebb ROS a *szuperoxid-aniongyök* vagy *szuperoxid-anion* ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ami enzimatis és nem-enzimatis spontán folyamatokban képződik. További oxigéntartalmú szabadgyök a peroxidanion (O_2^{2-}), ami nem tartalmaz ugyan párosítatlan elektront, de nagyon reakcióképes. Párosítatlan elektront tartalmaz az aktív hidroxilgyök (OH^{\bullet}), a hidroperoxilgyök (OH_2^{\bullet}), a peroxilgyök (RO_2^{\bullet}), az alkoxilgyök (RO^{\bullet}), az utóbbiak a sejtalkotó szerves vegyületek bomlástermékei (Cheeseman and Slater, 1993; Gutteridge, 1995).

A nitrogén eredetű szabadgyökök és reaktív intermedierek közül a legjelentősebbek a nitrogén-monoxid szabadgyök (NO^{\bullet}), a nitrogén dioxid (NO_2^{\bullet}) és a peroxinitrit-anion (ONOO^-), illetve az alkil-peroxinitritek (ROONO) (Gutteridge and Halliwell, 2000) ; (Halliwell and Whiteman, 2004).

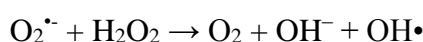
Vannak olyan molekulák is, amelyek ugyan nem rendelkeznek párosítatlan elektronnal mégis reakcióképesek, képesek kapcsolatba lépni más molekulákkal. Ilyen pl. a hidrogén-peroxid vagy a hipoklórossav (Halliwell and Gutteridge, 1990). A hipoklórossav (HOCl) elsődlegesen baktériumölő hatású, aktivált polimorfonukleáris sejtekben termelődik mieloperoxidáz hatására a hidrogén-peroxid és a kloridion reakciójában. A membránokon átjutva fémionok jelenlétében nagy reaktivitású hidroxilgyök képződéshez vezet. Részt vesz a lipidperoxidációban és a DNS károsításban (Schraufstatter et al., 1990). A hidrogén-peroxidról a 2.1.1. részben teszünk említést.

2.1.1 Endogén szabadgyök képződés

Szuperoxidgyök-anion elsősorban a sejtek mitokondriumában képződik, az elektrontranszport ATP-generáló folyamatában az elektronok 1-3 %-a kerül az oxigénre létrehozva a fenti szabadgyököt (Kovacic et al., 2005). Számos más enzimátikus reakcióban is képződhet: a NAD(P)H-oxidáz és a mitokondrium eredetű szuperoxid adja az érrendszerbe kerülő $O_2^{\cdot-}$ gyök anion legnagyobb hányadát (Harrison, 2003). Az ér simaizomsejtekben működő NAD(P)H-oxidáz szerkezete eltér a fagocitákban található enzimtől (Madamanchi et al., 2005b). Szuperoxid keletkezik a xantin-oxidáz működése során kóros körülmények között és az arachidonsav metabolizmusban a lipoxigenázok hatására (Droge, 2002). Jelentős mennyiségű képződik pl. a fagocita respirációs burst során (Decoursey and Ligeti, 2005), továbbá enzimátikusan a peroxidázok és a lipoxigenázok által katalizált hidrogén-peroxidot, hipokloritot vagy peroxinitritet felhasználó reakciókban.

A szuperoxid vizes közegben gyorsan átalakul: hidrogén-peroxid és víz keletkezik a dizmutációs reakcióban, amelyet a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim jelentősen felgyorsít (McCord, 1998).

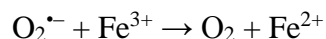
A hidrogén-peroxid (H_2O_2) fémionok jelenlétében hidroxilgyökké alakul. A hidroxilgyök ($OH\cdot$) nagyon reakcióképes, ezért az egyik legveszélyesebb szabadgyöknek tekinthető, sejten belül a fél-életideje kb. 1 nanoszekundum (Pastor et al., 2000). Hidroxilgyök képződik például a szuperoxidgyök-anion és hidrogén-peroxid Haber-Weiss reakciójában:



A biológiai rendszerekben a vas katalizálta Haber-Weiss reakció vagy Fenton-reakció zajlik le, melynek során szuperoxid aniongyök helyett vasion (Fe^{2+}) az elektron donor.



Fiziológias körülmények között a vastranszporterek meggátolják a vas felszabadulását és elérhetőségét a Haber-Weiss reakció katalizálására (Kehrer, 2000). A szuperoxid részt vesz a Haber-Weiss reakcióban és kapcsolódik a Fenton reakcióhoz, ami vas(II)ion és oxigénmolekula képződését eredményezi (Liochev and Fridovich, 2002):



A hidroxilgyök ellen közvetlen enzimes védekezés nincs. A sejtek úgy védekeznek a hidroxilgyökök ellen, hogy prekursorát, a hidrogén-peroxidot hatékonyan eltávolítják pl. kataláz és szeléntartalmú glutation-peroxidáz enzimekkel, ezáltal csökkentik a hidroxilgyök képződést (Lipinski, 2011).

A nitrogén-monoxid, helyesebben NO• gyök, mert párosítatlan elektront tartalmaz. Továbbiakban egyszerűsítve NO-val jelöljük, és nem használjuk az angolszász irodalomban elterjedt és hazánkban is népszerű *nitrogén-oxid* kifejezést. Az NO fél-életideje csak néhány másodperc vizes oldatokban. Jól oldódik vizes és apoláris közegekben, könnyen diffundál a plazmamembránban vagy a citoplazmában. Az extracelluláris térben az NO oxigénnel és vízzel reagálva nitrit- és nitrátionokat alkot. A reaktív nitrogéntartalmú anyagok (RNS) túlzott képződését nitrozatív stressznek tekintjük (Ridnour et al., 2004), ami számos fehérje nitrozilációját eredményezve gátolja a sejtek normális működését.

A nitrogén-monoxidot specifikus nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzimek termelik. A katalizált reakcióban az L-arginin citrullinné alakul át, miközben bonyolult reakciósorozatban NO képződik (Ghafourifar and Cadenas, 2005). Az NO jelentős szignálmolekula és nagyszámú, élettanilag eltérő folyamatot indít el, illetve vesz benne részt: vérnyomás szabályozás, simaizom relaxáció, neurotranszmisszió, immunfunkciók stb. (Koshland, 1990) ; (Bergendi et al., 1999).

Amennyiben az endotél eredetű eNOS enzim kofaktorai nem állnak megfelelő mennyiségben rendelkezésre, akkor az enzim szuperoxidot termel. Ennek következtében csökken az endotélium-függő érrelaxáció, mert az NO reagál a szuperoxidgyökkel, és peroxinitrit alakul ki (Madamanchi et al., 2005a). A peroxinitrit hatására lipidek peroxidációja, DNS törése, enzimek és ioncsatornák működésének gátlása, fehérjék oxidálása és nitrálása, a mitokondriális légzés gátlása alakul ki. A peroxinitrit alacsonyabb koncentrációban apoptózis trigger, magasabb koncentrációban nekrozist okoz (Szabo, 2003); (Virag et al., 2003).

2.1.2. Exogén szabadgyökforrások

Fokozottan képződnek szabadgyökök különböző gyógyszerek, antibiotikumok, tumorelles szerek [pl. doxorubicin (Bruynzeel et al., 2007)], metotrexát, penicillamin, fenilbutazon hatására. A szervezetet érő elektromágneses sugárzás [röntgen-, gamma-sugárzás (Soloviev et al., 2003)], az UV sugárzás; a dohányzás (Kovacs et al., 2012) és anorganikus részecskék (azbeszt, kvarc, szilícium-dioxid), gázok (ózon) belélegzése; valamint toxinok; xenobiotikumok (peszticidek, herbicidek, fémek, kémiai szennyező anyagok) szervezetbe jutása is jelentős szabadgyök képződést indíthat el (Stohs, 1995) és (Amacher, 2006).

2.2. Antioxidáns rendszerek

A szervezetben a szabadgyököknek fontos élettani szerepük van a redox szabályozásban. Bonyolult védekező rendszer biztosítja, hogy a szabadgyökös reakciók egy bizonyos határig a sejtalkotók károsítása nélkül játszódjanak le. Az antioxidánsok saját elektronjaikat adják át a szabadgyök-származékoknak. Kémiailag eltérő szerkezetű molekulák lehetnek antioxidánsok, közös sajátosságuk, hogy jelentősen késleltetik vagy gátolják a szubsztrátok oxidációját. Az antioxidáns hatásukat a sejten belül (intracelluláris) vagy a sejtmembránban vagy a sejtek közötti térben (extracelluláris) fejthetik ki (McCord, 1998).

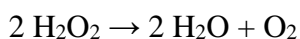
Az intracelluláris antioxidánsok a szabadgyököket enzimatis és nem-enzimatis úton távolíthatják el. A közvetlen enzim-katalizált reakciókra az antioxidáns enzimek jellemzőek: pl. a szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz, peroxidázok, glutation-S-transzferáz, reduktázok.

Minden aerob szövetben megtalálható a szuperoxid-dizmutáz, ami a szuperoxid-anion dizmutációját katalizálja hidrogén-peroxid és oxigén molekulákká (McCord and Fridovich, 1969):



Elsősorban Cu- és Zn-tartalmú SOD enzimek találhatóak a citoplazmában.

A kataláz elsősorban a májban, vesében és a vér alakos elemeiben fordul elő. Hemoprotein és elsősorban a peroxiszómák tartalmazzák. A hidrogén-peroxid bomlási sebessége az enzim jelenlétében közel 10 nagyságrenddel fokozódik:



A peroxidázok különösen jelentős mennyiségben találhatóak a vörösvértestekben, trombocitákban és leukocitákban. Az enzim által katalizált reakcióban a hidrogén-peroxid vagy lipid-peroxid vízzé redukálódik. Glutation-peroxidáz esetén az elektron/hidrogén donor a redukált glutation.

A sejtek hidrogén-peroxid szintjének szabályozásában fontos szerepet játszanak a peroxiredoxinok. Peroxiredoxinok általánosan előforduló enzimek: a cisztein-peroxidázoknak 6 génje található az emlős szervezetekben. Kiemelkedő szerepük van a sejtek antioxidáns védelmi mechanizmusában és a peroxid jelátvitelben (Perkins et al., 2015). Sokféle sejtfunkciót módosítanak, pl. sejtproliferáció, differenciálódás és sejthalál (Kang et al., 2005) (Poole and Nelson, 2008). Peroxidázok jelentős expresszióját figyelték meg tumoros sejtvonalakban, valamint besugárzott sejtekben is (Zhang et al., 2009).

Az enzimátikus védekezést kiegészítik a másodlagos antioxidánsok, amelyek gyököket kötnek meg, mielőtt azok beindítanák a láncreakciót, ami sejtkárosodáshoz, és további szabadgyökképződéshez vezet. Ilyenek az A, C és E-vitaminok, a glutation, az ubikinon, a flavonoidok stb. Az E-vitamin elsősorban a membránkomponensek védelmében jelentős antioxidáns.

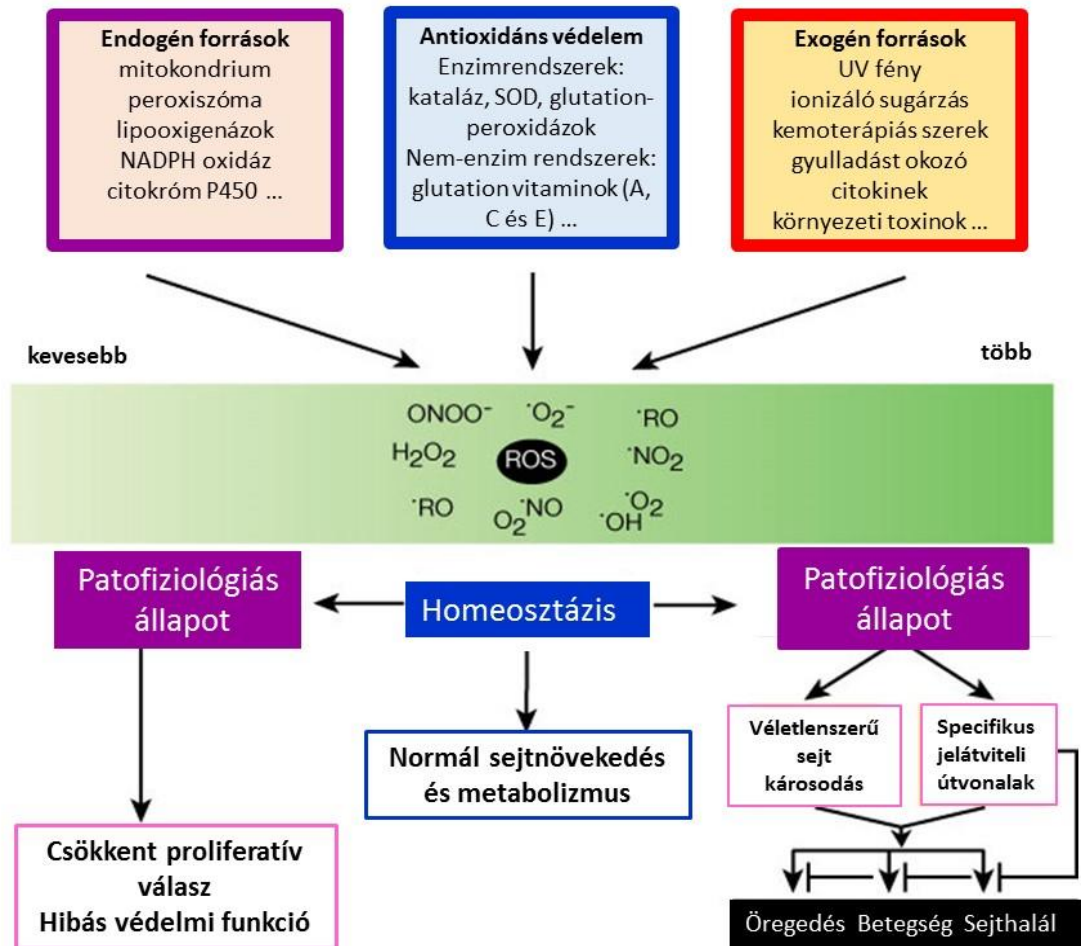
A plazmában az albumin az egyik legfontosabb extracelluláris antioxidáns, molekulánként egy szulfhidril csoportot tartalmaz, önmagában is megköti a szabadgyököket. Az albumin a vas- és a rézionok megkötésére is képes. Ezáltal a fémionok a Haber-Weiss reakció számára elérhetőek lesznek, a képződő hidroxilgyököt az albumin megköti. Az albumin károsodása ezen antioxidáns aktivitás közben kevésbé jelentős a fehérje nagy koncentrációja miatt, így a szabadgyököket azelőtt hatástalanítja, mielőtt azok más fehérjéket károsítanának (Roche et al., 2008).

Amennyiben a szabadgyökök mennyiségének jelentős csökkenése nem történik meg, úgy a károsodott makromolekulák *de novo* szintézise vagy eltávolítása is védhet a szekunder szabadgyök-képződéstől, ezáltal helyreállhat a sejtek, szövetek homeosztázisa. E harmadik védelmi vonal képviselői a károsodott fehérje- DNS- és lipidmolekulákat elimináló repair mechanizmusok (Gros et al., 2002).

2.3. Az oxidatív stressz

Az oxidatív stressz a reaktív oxigén és/vagy nitrogén eredetű szabadgyökök keletkezése és az antioxidáns védő rendszerek közötti egyensúly megbomlása, a sejtek redox

állapotának megváltozása során lép fel. Az ATP keletkezése során számos oxidációs-redukciós lépés történik, amikor redukáló ágens (hidrogén) szállítódik az oxigénre. A ROS kontrollálatlan keletkezése vagy az antioxidáns rendszer működésének csökkenése vezet az oxidatív stressz kialakulásához. Szinte nincs olyan betegség, ahol a szabadgyökök károsító hatását ne mutatták volna ki, vagy a szabadgyökök túltermelődése vagy az antioxidáns rendszer károsodása miatt. A szabadgyökök képesek arra, hogy az antioxidáns rendszerek működését gátolják, pl. úgy, hogy elfogyasztják a rendelkezésre álló antioxidánsokat, így pozitív visszacsatolós kör alakul ki. A sejtek egy másodlagos oxidatív károsodásra érzékenyebbek lesznek. Az önrontó kör folytatódik, és a sejt károsodása tovább nő egészen akár a sejthalálig (1. ábra).



1. ábra: Az oxidatív stressz fontosabb hatásai (Finkel and Holbrook, 2000)

Oxidáló anyagok folyamatosan képződnek elsősorban a mitokondriumokban és peroxiszómákban, továbbá számos citoszólban található enzimrendszer hatására. Külső források is fokozzák a ROS termelődést. Enzimatis (pl.: kataláz, SOD, glutation-peroxidázok) és nem-enzimatis (pl. glutation, egyes vitaminok) antioxidáns rendszerek

szabályozzák a ROS származékok mennyiségét kialakítva a fiziológiai homeosztázist. A csökkent ROS-koncentráció rontja az oxidáló anyagok fiziológiai hatását csökkent proliferációhoz, immunvédelemhez stb. vezethet. A ROS koncentrációjának növekedése sokféle patofiziológiás változást indíthat el: pl. sejthalál, öregedés, különböző betegségek. A megnövekedett ROS-koncentráció elsősorban a fehérje, lipid és DNS molekulákat károsítja, emellett stressz útvonalak is aktiválódnak, redox-érzékeny folyamatokat indítva el (Finkel and Holbrook, 2000).

A sejtpusztulás stressz-indukált ion-deregulációját vagy szabadgyökös folyamatait, amelyet fizikai, kémiai és biológiai változások idéznek elő, el kell választani az apoptózistól, a programozott sejthaláltól, a genetikailag determinált öngyilkos folyamattól, melyek során a szabadgyökös mechanizmusok fontos szerepet játszanak (Polyak et al., 1997).

Az oxidatív stressz szerepét több mint 100 betegségben, számos kórfolyamatban feltételezik. Ezek közül említjük az atherosclerosist (Harrison et al., 2003), a diabetes mellitus kardiális hatásait (Haidara et al., 2006), a reperfüziós károsodást (Marczin et al., 2003), az apoptózis folyamatát (Hare, 2001) és a xenobiotikumok, illetve toxinok károsító hatását (Amacher, 2006).

2.3.1. Az oxidatív stressz kimutatása

Az oxidatív stresszt vizsgálhatjuk közvetett módon, a védelem oldaláról, az antioxidáns hatású komponensek mérésével vagy a támadás oldaláról közvetlenül az oxidált metabolitok mérése révén, vagy a két módszer kombinációjával (Del Rio et al., 2002).

Számos *in vitro* meghatározás áll rendelkezésre a reaktív oxigén- vagy nitrogényökök kimutatására. ROS és RNS *in vitro* elektronspin-rezonanciával (ami a párosítatlan elektront detektálja) vagy kemilumineszcenciával mérhető. A szabadgyökök reaktívak, féléletidejük igen rövid, ezért rutin célból történő közvetlen mérésük általában nem végezhető a szövetekben, sejtekben és testfolyadékokban. A szabadgyökökkel történő reakció során átalakult molekulák számos esetben sokkal stabilabbak, mint maguk a szabadgyökök, így pl. a stabil metabolitjaik (nitrát, nitrit) vagy a károsított lipid, fehérje vagy nukleinsav termékek mutathatók ki nagyobb biztonsággal (Zweier et al., 1987).

A fehérjék kötik meg a képződött szabadgyökök jelentős részét és eközben biológiai funkciójuk károsodik: pl. az enzimaktivitásuk csökken, aggregálódnak, proteolízis indul el (de

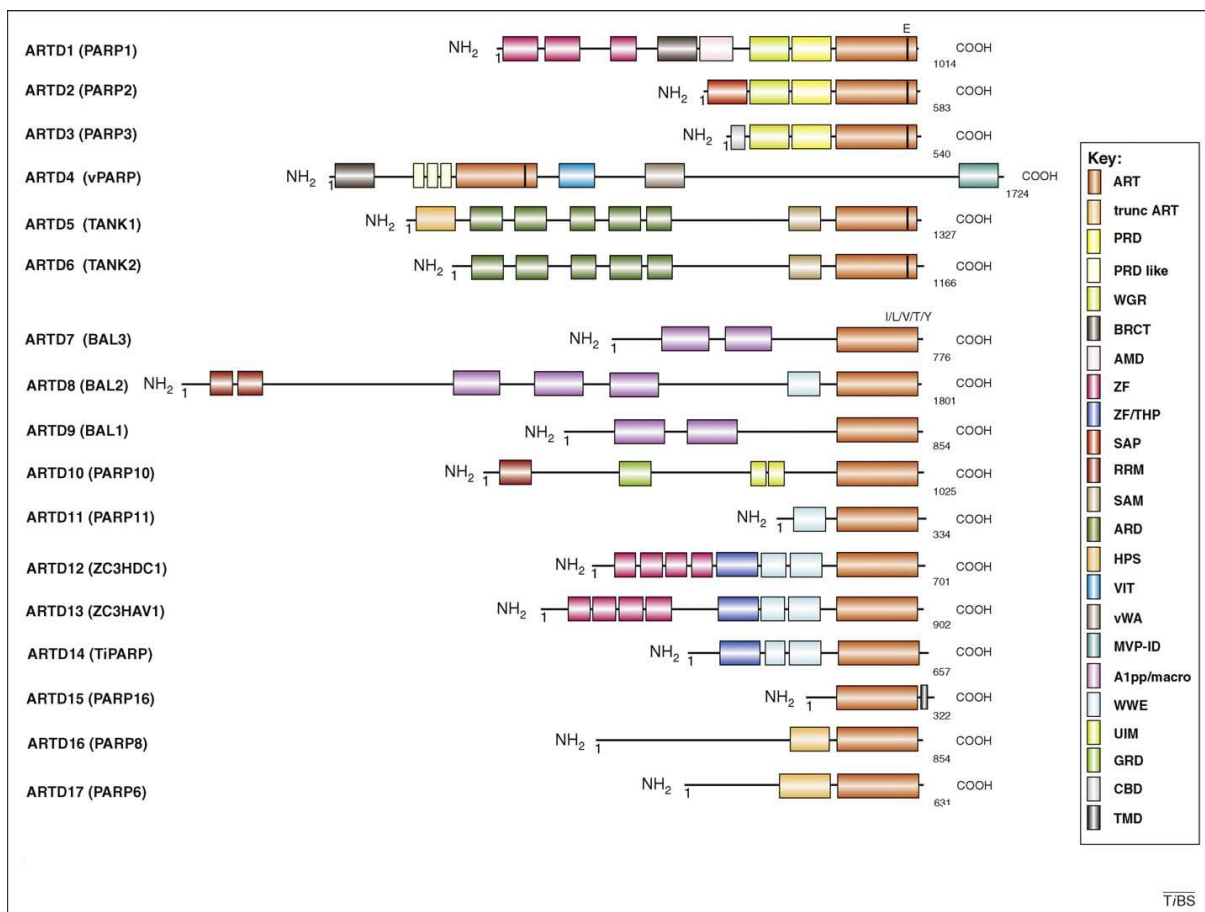
Zwart et al., 1999). Károsodnak más molekulák, többek között a genetikai állomány, ezért a DNS javító (repair) enzimek aktiválódnak (Dalle-Donne et al., 2006)).

Amikor a szabadgyökök DNS-hez kapcsolódnak, a DNS kettős hélix is sérül, a bázispárok hibás leolvasása jöhet létre. Mutagén, teratogén, karcinogén hatásuk van. DNS-fehérje keresztkötések alakulnak ki, a DNS láncban törés jön létre, a dezoxi-ribóz-foszfát rész, valamint a purin-pirimidin bázisok is károsodhatnak. Az oxidált nukleinsavszármazékokat számos módszerrel lehet kimutatni: pl. HPLC, gázkromatográfia, tömegspektrometria, folyadékkromatográfia, tandem tömegspektrometria (Del Rio et al., 2002).

2.3.2. A poli (ADP-ribóz) polimeráz enzim szerepe az oxidatív stresszben

A poli (ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) a DNS kötő enzimek PARP családjának tagja, más PARP izoenzimekkel együtt, a sejtmagban és a mitokondriumban helyezkedik el számos sejt típusban, a szívizomsejteket is beleértve. Az enzim által katalizált reakció alapján új nevezéktant is javasolnak: ADP-ribosil-transzferázok, ART enzimek (Hottiger et al., 2010). A szakirodalomban még nem terjedt el, a PARP 50 éves felfedezését méltató közleményben és az összeállított monográfiákban is a hagyományos PARP elnevezést használják (Virag, 2013).

A PARP ADP-ribózt polimerizál a sejtmagban lévő fehérjékre, hisztonokra, transzkripciós faktorokra és önmagára a PARP enzimre is. Fiziológias állapotokban a poli(ADP-ribosiláció) szerepet játszik a DNS helyreállításban, a genom stabilitásának megőrzésében, a sejt túlélésében, a sejtosztódásban és differenciálódásban is. A humán PARP (ART) enzimek doménszerkezetét a 2. ábra mutatja be.



2. ábra: A humán PARP (ART) enzimsalád doménszerkezetének összehasonlítása
(Hottiger et al., 2010)

Az ábrán szereplő rövidítések az alábbiak. ART: katalitikus hely; PRD: szabályozó domén. WGR domén a benne található konzervált W-G-R (Trp-Gly-Arg) motívumról kapta a nevét (a polimeráz A mellett számos ismertelen funkciójú fehérjében is megtalálható). BRCT domén: számos DNS javító és sejtosztódást ellenőrző fehérjének alkotóeleme. A SAM domén: sokféle jelátviteli és nukleáris fehérjére is jellemző, részt vesz az enzim homo- és heterodimerizációjában. Az ARD (ankirin-ismétlődési domén): fehérje-fehérje kölcsönhatásokat irányít számos fehérjében. VIT és vWA domének is a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban vesznek részt, hasonlóan a WWE doménhez. Az A1pp/macro domén: szerkezetileg a katalitikus hely része, jellemző az ADP-ribóz-1-foszfátot használó enzimekre. ZF: cink-ujj; TM: transzmembrán domének. SAP: DNS-kötő szerkezeti egység, míg az NLS a nukleáris lokalizációért felelős. GRD: glicinben-gazdag szerkezeti rész, HPS: His-Pro-Ser gazdag régió és az UIM felelős az ubikvitinálási folyamatért. CLS a centrioláris lokalizációt irányítja; míg az MVP-ID: a partikula kölcsönhatást. TPH: PARP homológ doménszerkezet.

A PARP enzimsalád 17 tagból áll. A PARP géncsalád elsőként felfedezett tagja a **PARP-1** [poli(ADP-ribóz) polimeráz-1] (EC 2.4.2.30). Ez az enzim az egyik legnagyobb mennyiségű sejtmagi fehérje, mely a nukleoplazmában fordul elő. Sejtosztódáskor a centroszómában és a

kromoszómákon lokalizálódik, mérete 116 kDa. A **PARP-2** mérete 62 kDa és 40% homológiát mutat a PARP-1-gyel. Hiányzik belőle az automodifikációs domén, azonban képes auto-poli-ADP-ribozilációra. A PARP alap és stimulált aktivitása a szövetekben csaknem kizárólag PARP-1 (85-90%) és PARP-2 enzimeknek tulajdonítható (Szanto et al., 2012), a többi PARP izomer hozzájárulása elenyésző.

A PARP által termelt poli(ADP-ribóz) PAR-polimerek metabolizmusa egy teljes szubsztrátciklust alkot. Az aktivációt követő polimerszintézis után, az automodifikáció következtében a PARP gátolt állapotba kerül. A polimereket a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG), az ADP-ribozil hidroláz 3 (ARH3) és az ADP-ribozil protein-liáz enzimek távolítják el.

A PARP enzimek (alapvetően a PARP-1) számos transzkripció faktor működését is befolyásolják, így a nukleáris faktor κ B (NF κ B)-mediált transzkripció elősegítésével, aminek központi szerepe van pl. a gyulladásoos citokinek, kemokinek, adhéziós molekulák, gyulladásoos mediátorok expressziójában (Virag and Szabo, 2002). A PARP túlzott aktivációja a sejt túlélését veszélyezteteti, mert a sejt NAD⁺ raktárait elfogyasztja. Mivel a NAD⁺ jelenléte a mitokondriális elektrontranszportoz elengedhetetlen, a NAD⁺ elhasználásával a következményes ATP hiány sejthalálhoz vezet. Az oxigén és nitrogén szabadgyökök (ROS és RNS), továbbá a sejtmagon belüli Ca²⁺ felhalmozódás fokozza a PARP aktivitását.

Az egyszálú és kétszálú DNS törések a PARP aktiváció legfőbb stimulusai. Elsősorban a peroxinitrit és az aktív hidroxilgyök felelős az egyszálú DNS törésekért. Környezeti toxikus anyagok, genotoxikus vagy citotoxikus szerek, az ionizáló sugárzás, valamint NO és szuperoxid keletkezésével járó folyamatok a kiváltói a DNS szál törésnek (Szabo, 2003).

PARP inhibitorok alkalmazásával és PARP génhiányos egerek vizsgálatával kimutatták, hogy a PARP túlműködése számos oxidatív stressz által közvetített kórfolyamatban részt vesz: szívizom iszkémia-reperfúziós károsodás, gyulladás, diabetes mellitus, diabetes okozta kardiovaszkuláris betegségek, keringési sokk, stroke, szívizomhipertófia, szívelégtelenség, traumás központi idegrendszeri károsodás, arthritis, colitis, kísérletes allergiás encefalomyelitis (a sclerosis multiplex állatmodellje) és a gyulladás számos más formája (Virag and Szabo, 2002).

Iszkémia-reperfúzióban patofiziológiás kaszkád indul el, gyulladásoos válasz alakul ki: a citokinek és a ROS termelődése fokozódik. Az iszkémiás prekondicionálás során a nitrozatív és oxidatív stressz szintje alacsonyabb lesz, ami a prekondicionálás ideje alatt egy kisebb mértékű PARP aktivációt hoz létre. A PARP autoribozilációja a PARP gátlását okozza, és ez

lehet az oka annak, hogy elmarad az iszkémia-reperfúzió során jelentkező nagymértékű PARP aktiváció, ami a nem prekondicionált szívben jelentkezik (Liaudet et al., 2001).

2.4. Szabadgyökök, antioxidánsok és jelátviteli folyamatok

A jelátviteli (szignál transzdukciós) folyamatokban a sejtek külső jelre/jelekre válaszolnak, és egymással is kommunikálnak (Poli et al., 2004). A jelátvitel során az információ a sejt különböző válaszadó fehérjében változásokat indít el: elsősorban hormonok, növekedési faktorok, citokinek és neurotranszmitterek hatására (Thannickal and Fanburg, 2000).

A ROS nemcsak sejtkárosító hatású, hanem fontos élettani szerepet játszik a jelátvitelben és annak szabályozásában (Droge, 2002). A sejtek ismert sajátossága, hogy folyamatosan termelnek ROS-t, amelyek a szignál transzdukciós mechanizmusok segítségével módosítják pl. a sejtek osztódását vagy differenciálódását. Számos sejtípus gyors ROS képződéssel válaszol, amikor citokinek (pl. interleukin-1 β , 6 vagy 3, tumor nekrozis faktor: TNF- α), növekedési faktorok (pl. PDGF, NGF, FGF, GM-CSF) és hormonok (pl. inzulin, angiotenzin II) stimulálják (Thannickal and Fanburg, 2000). Nagyszámú kísérleti megfigyelés alakította ki azt az elképzelést, hogy az intracellulárisan képződő ROS hatása élettanilag is jelentős a jelátvitelben, a ROS molekulák „másodlagos hírvivőnek” is tekinthetőek (Storz, 2005).

Számos citokinről és növekedési faktorról igazolták, hogy kötődnek különböző jelátviteli receptorokhoz nem-fagocitáló sejtekben. A növekedési hormonreceptor tirozin kinázok kiemelkedő szerepet játszanak az intracelluláris jel továbbításában a citoplazma és sejtmag felé (Neufeld et al., 1999). Az információ a receptorokról az intracelluláris MAPK jelátviteli útra terelődik (Mulder, 2000). Számos tanulmány igazolja, hogy a MAPK enzimsalád tagjainak aktivitását a ROS szabályozza. Ezek az extracelluláris-jel regulált ERK enzimek, a c-Jun-N-terminális kináz(ok) [JNK], p38 MAPK és a BMAPK („big” MAPK). Erről a négy jelentős enzimsoportról mutatták ki, hogy módosító hatásaikkal közreműködnek a sejtosztódás, a differenciálódás vagy a sejthalál (apoptózis) szabályozásában (Kyriakis, 2001).

2.5. Oxidatív stressz és sejtvédő (citoprotektív) anyagok

Az oxidatív stressz által kiváltott sejt és szöveti sérülésekben nemcsak a makromolekulák károsodnak, hanem - mint láttuk - a különböző jelátviteli útvonalak is. Ezek között említhetjük a MAP kinázokat [(Whisler et al., 1995) és (Roskoski, 2012)], apoptózis-szabályozott kinázokat (Jimenez et al., 1997), TRAF-RIP (Zhang et al., 2011) és PARP-1

fehérjéket [(Nosseri et al., 1994) és (Cuzzocrea, 2005)]. A sejtmagban található PARP-1 enzimet főleg DNS törések aktiválják (Dong et al., 1995). Az aktivált PARP a javító (repair) fehérjéket a sérült DNS-szakaszhoz irányítja NAD⁺-ból előállított poli(ADP-ribóz) polimerekkel, elősegítve a DNS javítását. Súlyos oxidatív stresszben a PARP-1 kimeríti a sejt NAD⁺-készletét, és ennek következtében az ATP tartalékot is, nekrotikus sejthalált okozva (Miesel et al., 1995). Bizonyos sejttípusokban aktiválódik a sejthalál útvonal az apoptózist-indukáló (AIF) faktor hatására (Yu et al., 2002). A PARP-1 aktivitás gátlása, az enzim csendesítése vagy PARP-1^{-/-} knock-out fenotípus egyaránt véd az oxidatív stressztől (Virag and Szabo, 2002), beleértve a hidrogén-peroxiddal kiváltott sejthalált (Virag et al., 1998).

Az oxidatív stressz által kiváltott sejthalál szerepét számos súlyos betegségben igazolták: neurodegeneratív betegségek (Bellia et al., 2011), miokardiális infarktus (Loeper et al., 1991b), stroke, iszkémiás reperfüziós sérülések (Loeper et al., 1991a). Különböző kísérleti rendszerekkel és eljárásokkal próbálkoznak a betegségek kezelésében, mindegyikben azonos a cél, vagyis a sejtek, szervek integritásának megőrzése. Ilyenek az antioxidáns tulajdonságú sejtvédő anyagok, PARP inhibitorok (Jagtap et al., 2002), JNK inhibitorok [(Kunduzova et al., 2002) (Assefa et al., 1999)], káliumcsatorna nyitó vegyületek (Wang et al., 2005). Ezekről sikerült igazolni, hogy hatásosan védik a szöveteket az oxidatív sérülésektől. Bár biztató eredmények vannak és folytatnak klinikai vizsgálatokat is, újabb kezelések bevezetése elősegítheti a súlyos kórképek kezelését. Munkánk egyik célja olyan új sejtvédő molekulák felismerése, amelyek kedvező terápiás lehetőségekkel rendelkeznek.

2.6. A doxorubicin kardiotoxikus mellékhatásai

A doxorubicin az antraciklin antibiotikumok közé tartozó kemoterápiás készítmény, a *Streptomyces verticillus* törzs termeli. A doxorubicin molekulájában a tetraciklusos gyűrű (vörös-pigment) naftacén-magjához glikozidkötésen keresztül daunózamin-aminocukor kapcsolódik. Hatásmechanizmusa teljes mértékben máig felderítetlen, azonban a szakirodalom nagy része úgy véli, hogy a daganatellenes hatást a doxorubicin molekula kromofór planáris rész DNS-szálak közötti beékelődésének köszönheti, míg az aminocukor rész a DNS kis árkában, a beékelődési hely közvetlen szomszédságban lévő bázisokkal lép kölcsönhatásba [(Frederick et al., 1990) (Pigram et al., 1972) (Champoux, 2001)], s ezáltal a topoizomeráz-2-t gátolja.

A doxorubicin kezelés hatására ROS képződés, a DNS molekulával való kölcsönhatása pedig olyan jelátviteli utakat indít el, ami fokozott ceramid képződéshez és CREB3L1

felszabadulásához vezet az endoplazmatikus membránból. Ezt követően a CREB3L1 N-terminális fragmentje a sejtmagba kerül, és részt vesz a sejtosztódást gátló transzkripció faktorok aktiválásában (Gewirtz, 1999) (Patel and Kaufmann, 2012) (Denard et al., 2012).

A klinikumban nagy népszerűsége tett szert a rendkívül lipofil, a szervezetben hosszú félélettíddel rendelkező gyógyszer a doxorubicin, amely a rosszindulatú daganatok számos változata ellen alkalmazott kemoterápiás készítmény és számos gyógyszergyár hoz forgalomba. Kereskedelmi nevei: pl. Adriamycin vagy Adriblastina (Pfizer), Bleomycin vagy Doxorubicin (TEVA) stb. Az akut leukémiák, Wilms-tumor, neuroblasztóma, mellrák, Hodgkin és non-Hodgkin limfómák, hepatómák, pajzsmirigydaganatok, petefészekrák a doxorubicin adásának indikációs körébe tartoznak. Ezen kívül gyomor-, nyaki-, here-, endometrium és méhnyakrákoknál, valamint mielómában is alkalmazható.

Klinikai felhasználóságának azonban gátat szab kardiotoxikus mellékhatása (Danesi et al., 2002), irreverzibilis kardiomiopátia és súlyos szívelégtelenség alakul ki. Ezek a szövödmények szoros összefüggést mutatnak a doxorubicin alkalmazott dóziséval, ami nem haladhatja meg az 550 mg/m^2 értéket. Morfológiai elváltozásokat (miofibrilláris átrendeződést, érképződést) találtak biopsziákban. A betegek szérumában troponint mutattak ki, ami a szívkárosodás mértékével függött össze. A doxorubicin kardiotoxikus hatása komplex, de szoros kapcsolatot mutat a ROS mennyiségével. Közvetlen elektron-kicserélődés megy végbe az oxigénmolekulka és az antraciklingyűrű kinoidális szerkezeti egysége között, továbbá a doxorubicin-vas komplex redox ciklusa is lejátsszódik.

A ROS jelátviteli rendszer és a doxorubicin okozta szívelégtelenség közti kapcsolatra számos állatkísérlet is felhívta a figyelmet. Kimutatták, hogy ferroporfirin-tartalmú antioxidánsok (Pacher et al., 2003), az E-vitamin előnyaga (Nagata et al., 1999) vagy PARP-inhibitor (Pacher et al., 2004) is képes csökkenteni a doxorubicin szívkárosító hatását. Az utóbbi években a topoizomeráz-2 α került a figyelem középpontjába (Vejjongsa and Yeh, 2014). A topoizomeráz-2 β enzim (elsősorban proliferáló szövetekben mutatható ki) tekintik a tumorsejtek doxorubicin kezelés célfehérjéjének. Ennek ellenére a topoizomeráz-2 α (elsősorban nem-osztódó sejtekben mutatható ki) fehérje a felelős az antioxidáns enzimaktivitás csökkenéséért, a mitokondriális biogenezis gátlásáért, továbbá a p53 és általa közvetített apoptotikus útvonal aktiválásáért: a doxorubicin kardiotoxikus hatásáért.

A rövid áttekintésben is be tudtuk mutatni, hogy nagyszámú vegyület, illetve kezelési stratégia került megismerésre és kidolgozásra a doxorubicin több mint négy évtizedes terápiás alkalmazásával párhuzamosan, hogy csökkentsék a doxorubicin káros mellékhatásait. További

protokollok bevezetéséhez újabb molekulák megismerése és élettani hatásuk felderítése elengedhetetlen, ezzel a klinikum további lehetőséget kaphat a doxorubicin tumorellenes kezelését kísérő mellékhatások kivédésére.

3. Célkitűzések

A molekulakönyvtárak szűrése sejtalapú, nagy áteresztőképességű (HTS) módszerekkel az egyik leghatékonyabb eljárás gyógyszerjelölt vegyületek azonosítására. Az értekezés célja egyetemi HTS környezetben, sejtes modelleken végzett molekulakönyvtár-szűrés eljárások kidolgozása, azon célból, hogy sejtvédő molekulákat azonosítsunk és/vagy a védőhatással rendelkező vegyületek hatásmechanizmusát vizsgáljuk.

A specifikus céljaink a következők voltak:

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

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok és molekulakönyvtárak

4.1.1 Anyagok

Reszazurin (R7017), hidrogén-peroxid (95302), dimetil-szulfoxid, ABTS (A1888: [2,2'-azino-bisz(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav)], tisztított hiszton fehérjék (H6005 és H9250), , izatin (58240), , peroxidáz-konjugált másodlagos antitestek (anti-nyúl IgG: A0545; anti-egér-IgG: A8924), kalkon (11970: [1,3-difenil-2-propen-1-on]), 1-(4-hidroxi-fenil-3-piridin-3-il-propenon (S218030), réz(II)klorid-dihidrát (307483), neokuproin (N1501: [2,9-dimetil-1,10-fenatrolin], kalcein-AM (17783 Calcein-AM), FeTPPS (87638: Fe-porfirin komplex: 5,10,15,20-tetrakis(4-szulfonsav-fenil)porforinát-vas(III)klorid), szulforodamin B (sulfo-rhodamine B: 230162) torna-peroxidáz (P8375) és Ampliflu™ (90101) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cég termékei voltak. A DMEM sejttenyésztő folyadékot és a MEM tápfolyadékot a Gibco (Thermo Fischer Sci.) cégtől vásároltuk.

A doxorubicint a TEVA-tól (Debrecen, Magyarország) vásároltuk. A kaszpáz-3 fluorometriás assay kit (DEVD-AMC) a Calbiochem (San Diego, CA, USA), az ECL Western blot kit és a RIPA Lysis and Extraction Buffer a Thermo Fisher Sci. Inc. (Rockford, IL, USA) termékei voltak. Az RPMI 1640 tápfolyadékot (BE12-115F), a glutamint (BE17-605F) és a főtális borjúsérumot (FBS: DE14-802F) a Lonza cégtől vásároltuk (Basel, Svájc).

Tisztított PARP enzimet (Trevigen, 4668-100-01, Gaithersburg, MDD, USA), a PARP aktivitás mérésére alkalmas DELFIA kiszemelést a Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) és a vízdoldható PJ-34 PARP inhibitor (Jagtap et al., 2002) az Inotek Pharmaceuticals (Beverly, MA, USA) cégektől vásároltuk, illetve kaptuk.

A MAP kinázok (9926S) és foszfo-MAP kinázok (9910S) elleni antitestek (ERK 1/2 és foszfo-ERK 1/2; p38 és foszfo-p38; JNK és foszfo-JNK) a Cell Signaling (Danvers, MA, USA) termékei voltak.

4.1.2 Molekulakönyvtárak

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

A **Debreceni Egyetem molekulakönyvtárát (UDM)** a Szerves Kémia Tanszék hozta létre és tartja fenn. A könyvtár kb. 2600 nagy tisztaságú (> 95%) vegyületet tartalmaz, emellett nagyszámú oxigén-heterociklusos vegyületet, valamint azok prekursorait. A vegyületeket hagyományos szintetikus módszerekkel állították elő, és azok nagymértékű változatosságot mutatnak. Az EDI index (Papp et al., 2006), ami a molekulakönyvtárban található vegyületek változatosságára utal 66,4. A molekulakönyvtárakra alkalmazható további adatok, pl. a Lipinski-szabály (Lipinski et al., 2001) vagy a Veber-szabály (Veber et al., 2002) 4,6 % és 8,5 % értékű. A Ghose szűrő alkalmazása (Ghose et al., 1999) pedig 23,9 %-ot eredményezett. Az alacsony százalékos értékek arra utalnak, hogy a molekulakönyvtár vegyületei oldékonyság, molekulatömeg, permeabilitás alapján alkalmasak sejtszisztemekben való vizsgálatokra. Vizsgálatainkra a könyvtár 1863 vegyületét használtuk.

4.2. Sejttenyészetek

4.2.1 Sejtvonalak

A Jurkat sejtek immortalizált humán T limfociták, míg az A549 humán alveoláris epitelsejt eredetű adenokarcinoma sejtek. A H9C2 patkány embrionális szív/miokardium eredetű, míg a SAOS-2 humán oszteosarkoma. A sejtvonalakat az ATCC-től (UK) szereztük be. A THP-1 sejtvonalat (humán monocita) a Sigma Aldrich (88081201) cégtől vásároltuk.

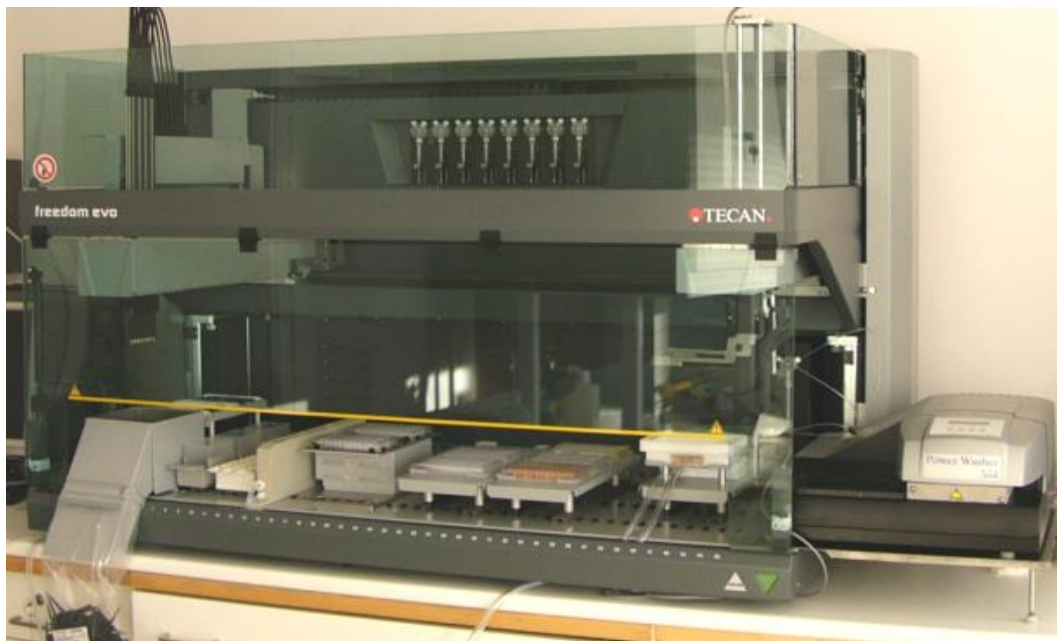
A Jurkat, az A549 és a THP-1 sejtvonalakat RPMI 1640-es médiumban tenyésztettük, amihez 10 % FBS-t és 2 mM glutamint adtunk. A H9C2 sejtvonalat és a primer patkány kardiomiocitákat DMEM (10 % FBS – 2 mM glutamine – 5 g/L glükóz) médiumban tenyésztettük, ill. tartottuk. A SAOS-2 sejtvonalat a fentivel azonos DMEM médiumban tenyésztettük, azonban a közeg csak 1 g/L glükózt tartalmazott.

4.2.2 Primer neonatális patkány kardiomiocita

1-3 napos Wistar patkányokból állítottuk elő a primer kardiomiocita kultúrát (Csont et al., 2010) és (Varga et al., 2013). Az állatok gerincének átvágása után a szívet eltávolítottuk és jéghideg PBS oldattal öblítettük. A billentyűket kivettük és 0,25 % tripszinnel emésztettük. A kardiomioblasztok mennyiségének növelése érdekében 90 percig 10 % FBS tartalmú DMEM oldatban tartottuk. A sejteket 96-lyukú sejtkultúra plate-ekbe helyeztük ($1,5 \times 10^4$ sejt/lyuk) és 10 % FBS DMEM oldatban kiegészítve 1 % glutaminnal és antibiotikum/antimikotikum eleggyel tartottuk az inkubátorban (37°C , 95 % O_2 és 5 % CO_2), 24 óra után a közeget 1 % FBS DMEM oldatra cseréltük elősegítve a kardiomioblasztok differenciálódását.

4.3. Tecan robot

A nagy áteresztőképességű vizsgálatokat a Tecan Freedom EVO robotjával végeztük (3. ábra).



3. ábra: Tecan Freedom EVO robot

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

4.4. Reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálat (HTS módszer)

A vizsgálat összes lépését a Tecan Freedom EVO robotjával hajtottuk végre. 20 μl Jurkat sejtszuszpenziót ($10^5/\text{ml}$) mértünk a 384-lyukú sejtenyésző lemezre a 8 csatornás folyadék-kezelő karral. A sejteket előkezeltük a vegyületekkel a „PIN TOOL” nevű eszköz alkalmazásával, ami 96 db vékony acélszálat tartalmazó eszköz. Ennek segítségével ~ 25 nl (nanoliter) mintát tudunk átvinni egyik plate-ről a másikra (ez esetünkben $\sim 1000x$ hígulást jelent). A tesztvegyületek végső koncentrációja így 20 μM volt. A kontroll mintákat DMSO-val kezeltük, majd 30 percre CO_2 inkubátorba helyeztük. A sejteket később 800 μM hidrogén-peroxiddal (vagy a kontroll minták esetén sejtenyésző médiummal) kezeltük. A mintákhoz 4 órás 37°C -on történő inkubálás után rezazurint (10 μl) adtunk 18 μM végkoncentrációban,

majd ismét 37°C-os inkubátorba helyeztük a mintákat, ezúttal 40 percre. A méréseket Victor V3 multi-label olvasóval (excitációs hullámhossz: 530 nm, emissziós hullámhossz: 590 nm) végeztük. A kísérletekben a sejtvédő hatást mutatjuk be, amit a következőképpen számoltunk. T: kontroll sejtek életképessége, H: hidrogén-peroxiddal kezelt sejtek életképessége, M: a kezelt minták sejtjeinek életképessége. Ez alapján a sejtvédő hatás %-os értéke az alábbi formában adható meg: $(M-H)/(T-H) \times 100$. A 30%-nál nagyobb hatékonyságú vegyületeket tekintettük sejtvédő hatásúnak.

4.5. Reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálat (kézi módszerrel)

A vizsgálat lépései a fent leírtak szerint történtek. A kísérletekhez 96-lyukú plate-eket használtunk, és minden minta esetén három párhuzamos mérést végeztünk. A hidrogén-peroxidot 800 µM végkoncentrációban alkalmaztuk, a vegyületeket pedig először 100 µM-ra hígítottuk, majd hígítási sort készítettünk 3 µM koncentrációig.

4.6. MTT életképességi teszt

4.6.1. MTT-teszt (kézi módszerrel)

Az MTT-teszt a sejtek életképességének, illetve proliferációjának vizsgálatára szolgáló módszer. A metabolikusan aktív sejtek endocitózissal felveszik a tetrazólium-bromid festékmolekulát (MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólium-bromid) és elsősorban a NAD(P)H-függő oxidoreduktáz enzimeikkel formazán-kristályokká alakítják át, amelyek lila színűek. A keletkezett kristályokat sósavas izopropil-alkoholban oldjuk, a kapott oldat színintenzitása arányos a sejtek életképességével, illetve a rendszerben lévő élő sejtek számával.

MTT-tesztet (Virag et al., 1995) a sejtek életképességének meghatározására végeztük az alábbi módosításokkal: a Jurkat és THP-1 sejteket szuszpenziós tenyészetben tartottuk és sejteket poli-D-lizin alkalmazásával kötöttük a mikroplate falához. A sejteket (10^5 /lyuk) 96-lyukú plate-re helyeztük és a megfelelő vegyületekkel kezeltük. A doxorubicin 24 órás kezelését követően a sejteket "V" aljú plate-re helyeztük. MTT hozzáadása után a plate-eket centrifugáltuk (1600 rpm, 5 perc), majd a médium leszívását követően 75 µl DMSO-t adtunk a formazán kristályok oldására. Az abszorbanciát 50 µl alikvot mintákból határozzuk meg (Virag et al., 1995) lapos aljú plate-eket használva.

4.6.2. MTT-teszt (HTS változat)

A sejteket (7×10^3 /lyuk) 96-lyukú plate-re helyeztük a kezelés előtt 1 nappal. A molekulakönyvtár vegyületeinek hozzáadását Tecan Freedom EVO robot segítségével végeztük (100 nl/lyuk 4 lépésben), a vegyületek végkoncentrációja $10 \mu\text{M}$ volt. 30 perc 37°C inkubálást követően a sejteket, illetve a kontroll mintákat (sejttenyésztő folyadék, kontroll sejtek) doxorubicinnel (300 ng/ml végkoncentráció) kezeltük 24 órán át 37°C -on. Ezt követően $10 \mu\text{l}$ MTT-t adtunk a mintákhoz $0,5 \text{ mg/mL}$ végkoncentrációban. A mintákat tovább inkubáltuk 120 percig 37°C -on. A tenyésztő folyadékot ezt követően leszívtuk és $50 \mu\text{l/lyuk}$ DMSO-t adtunk hozzá. Thermo multiskan készülékkel 540 nm hullámhosszon meghatároztuk a képződött színes vegyületet, amely arányos a sejtek életképességével. Az életképességi adatokat a kontroll (doxorubicin nélküli minta) százalékában fejeztük ki. Azokat a vegyületeket tekintettük kardioprotektívnek, amelyek hatása legalább 20% volt.

4.7. Életképesség meghatározása egyéb módszerekkel (LDH kiszabadulás, kalcein-AM hidrolízis)

A sejtek életképességét laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás meghatározásával is jellemeztük a korábban leírt módon (Lakatos et al., 2013), valamint kalcein-AM fluoreszcenciás festék felvételén alapuló módszerrel (Bencsik et al., 2014) az alábbiak szerint. A kalcein-AM csak élő sejtekben alakul át zölden fluoreszkáló vegyületté. Kalcein-AM alapú életképesség meghatározást végeztünk az EODB kardioprotektív hatásának további igazolására a doxorubicin-indukált sejt-sérüléssel szemben. Két napos neonatális kardiomiocita kultúrákat EODB $5\text{-}25 \mu\text{M}$ oldatával 30 percig inkubáltunk, majd 24 órán át 300 ng/ml végkoncentrációjú doxorubicint alkalmaztunk a védő vegyület jelenlétében. Kontrollként DMSO-t (oldószert) használtuk. PBS mosást követően a sejteket $1 \mu\text{M}$ kalcein-AM oldatával 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az élő sejtekben a sejtpermeábilis kalcein-AM hidrolizál és zöld fluoreszcenciát mutató kalcein képződik. Mosás után a sejtek fluoreszcenciáját 490 nm excitációs és 520 nm emissziós szűrőkkel határoztuk meg (Fluostar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Németország).

4.8. ABTS szintelenítési teszt

4.8.1. ABTS szintelenítési teszt (HTS változat)

Az ABTS előállítását az ismertetett módon (Assefa et al., 1999) hajtottuk végre. Az ABTS oldat alap abszorbanciáját $1,2$ -re állítottuk, a fotometriás mérés lineáris tartományának

megtartása céljából. A robot 8-csatornás pipettázófejének segítségével 20 µl ABTS oldatot mértünk 384-lyukú plate-ek lyukaiba. A tesztvegyületeket a „PIN TOOL” egység segítségével adagoltuk (20 nl/minta) 20 µM végkoncentrációban. A mintákat szobahőmérsékleten, 30 percig inkubáltuk. A dekolorizáció/szintelenedés mértékét Victor V3 mikroplate olvasóval határoztuk meg 405 nm hullámhosszon. A minták antioxidáns hatását a kontroll (DMSO-val kezelt) minták esetében kapott jel százalékában fejeztük ki. Azokat a vegyületeket tekintettük antioxidánsnak, melyek legalább 30 % dekolorizációt okoztak.

4.8.2. ABTS szintelenítési teszt (kézi módszer)

A meghatározás lépéseit a fent leírtak szerint végeztük. A vizsgálatokat 96-os plateken hajtottuk végre. Pozitív kontrollként aszkorbinsavat (C-vitamint) használtunk (20 µM).

4.9. A réz(II)ion redukálásán alapuló antioxidáns-kapacitás mérése (CUPRAC)

A módszer a réz(II)ion redukálásán alapul, a képződött réz(I)ion kolorimetriás meghatározásával. Az antioxidáns-kapacitások meghatározását Apak és mtsai szerint (Apak et al., 2007) végeztük a következő módosításokkal: 60 µM trolox oldatot használtunk standardként, a teljes térfogatot 100 µl-re csökkentettük és a mérésekhez 96 lyukú plateket használtunk.

4.10. Amplex® Red – hidrogén-peroxid meghatározása

Az Amplex Red reagens szintelen és 1:1 sztöchiometriával reagál a hidrogén-peroxiddal. A képződött floreszcens termékre jellemző excitációs/emissziós maximum: 570/585 nm. Az Amplex Red reakcióval már 10 pikomol H₂O₂ meghatározható 100 µl térfogatban, ezért legalább tízszer érzékenyebb, mint az általánosan használt hidrogén-peroxid meghatározások.

4.11. Hidrogén-peroxid eltávolító (scavenger) aktivitás

A hidrogén-peroxid scavenger aktivitást sejtmentes rendszerben Ampliflu red (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazin) segítségével mértük. 12 µM EODB vagy 10 µM aszkorbinsav oldatát inkubáltuk 0,1 µM H₂O₂, 50 mM Ampliflu Red és 0,1 E/ml torna-peroxidáz jelenlétében foszfát-NaCl pufferben 5 percig szobahőmérsékleten. A peroxidáz hatására az Ampliflu Red sztöchiometrikusan reagál vörös fluoreszkáló molekulává, reszorufinná. A fluoreszcenciát 530

nm excitációs és 590 nm emissziós hullámhosszon határoztuk meg Fluoroskan Ascent FL készülékben (Labsystems, Vantaa, Finnország).

4.12. Citotoxicitás meghatározása (propidium-jodid felvétel)

Az MNNG kezelés hatására kiváltott sejtpusztulást propidium-jodid (PI) felvétellel határoztuk meg (Bai et al., 2001). A sejteket 2,5 µg/ml PI oldattal festettük 15 percen át, majd PBS mosást követően áramlási citometriával analizáltuk a mintákat. A citotoxicitást a következő képlet segítségével számítottuk: $100 \times (T-C)/(100-C)$, ahol a T a PI pozitív sejtek százalékát jelenti a mintákban, míg a C a kontroll mintában a PI pozitív sejtek százalékát.

4.13. Sejtmorfológián alapuló citotoxicitás meghatározása

A sejteket (7×10^3 /lyuk) 96-lyukú plate-re helyeztük a kezelés előtt 1 nappal. A sejtekhez a tesztelendő vegyületek oldatát adtuk 12 µM végkoncentrációban. 30 perc 37°C inkubálást követően a sejteket, illetve a kontroll mintákat (sejttenyésztő folyadék, kontroll sejtek) doxorubicinnel (300 ng/mL végkoncentráció) kezeltük 24 órán át 37°C-on. A sejttenyésztő folyadékot lecseréltük 0,1 % Coomassie festékoldattal és azzal inkubáltuk a mintákat további 20 percig. A mintákat PBS oldattal mostuk, majd szárítottuk. A felvételeket Leica DM IL LED mikroszkópra szerelt kamerával (Leica MC 120 HD) készítettük 5x nagyítással. A képanalízist TScratch software segítségével értékeltük, meghatározva a sejttel borított területeket.

4.14. Sejtproliferáció meghatározása

A sejtek proliferációját szulforodamin B (SRB) módszerrel határoztuk meg (Skehan et al., 1990). Az SRB elektrosztatikusan és pH-függő módon kötődik a fehérjék bázikus aminosav-maradékaihoz TCA fixált mintákban. Gyengén lúgos közegben felszabadul, és mennyisége meghatározható. A sejteket ($2,5 \times 10^3$ /lyuk) 24-lyukú plate-re helyeztük, majd 5 napon át kezeltük 12 µM EODB és/vagy 300 nM doxorubicin oldatával. A kontroll mintákat az oldószer (DMSO) oldatával kezeltük. A sejteket 10 % TCA oldattal 1 órán át 4°C-on fixáltuk, majd desztillált vízzel 5x mostuk és levegőn szárítottuk. A sejteket 0,4 % szulforodamin B oldattal festettük 1 % ecetsavban 10 percig. A nem kötött festéket 1 % ecetsavval mostuk ki, a mosást ötször ismételve. A kötött festéket 10 mM Tris bázissal oldottuk, és mennyiségét Multiskan MS készülékkel (Labsystems, Vantaa, Finnország) 540 nm hullámhosszon határoztuk meg. A sejtproliferáció százalékos értékét a megfelelő oldószeres kontrollhoz viszonyítottuk.

4.15. PARP aktivitás meghatározása (DELFLIA)

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

4.16. PAR kimutatása

A poli(ADP-ribóz) polimereket Western blot és immuncitokémiai eljárásokkal mutattuk ki. A Western blot kísérlethez a sejteket RIPA (25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % Na-deoxikolat és 0,1 % SDS) pufferrel lizáltuk, 20 másodpercig szonikáltuk, majd SDS minta pufferrel kevertük össze. A lizátumokon ezután SDS-poli-akrilamid gélelektroforézist végeztünk 8 %-os gélen (100V, 90 perc), majd nitrocellulóz membránokra vittük fel (100V, 120 perc). A transzfer puffer összetétele: 25 mM Tris/HCl (pH 8,3), 192 mM glicerin, 0,02 % SDS és 20 % metanol. A vizsgálat során anti-PAR elsődleges antitesteket (10H klón), valamint peroxidázzal konjugált anti-egér IgG másodlagos antitesteket alkalmaztunk (Erdelyi et al., 2009). A jelet ECL reagenssel kaptuk, futtatási kontrollként aktint használtunk. A PAR immuncitokémiai kimutatását a fent leírtakkal azonos anti-PAR antitestekkel hajtottuk végre (Erdelyi et al., 2009).

4.17. A kaszpáz-3 aktivitásának meghatározása

A kaszpáz-3 aktivitást Vanags és mtsai (Vanags et al., 1996) által leírt módon végeztük el az alábbi módosításokkal (Virag et al., 1998) (Bai et al., 2007). Hat órával az MNNG kezelés megkezdése után a sejteket lízis pufferben lizáltuk (10 mM HEPES pH 7,25; 0,1 % CHAPS, 5 mM ditiotritol, 2 mM EDTA, 10 µg/ml aprotinin, 20 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 1 mM PMSF). A lizátumokhoz 1:1 arányban reakciópuffert adtunk (100 mM HEPES pH 7,25; 10 % szacharóz, 5 mM ditiotritol, 0,1 % CHAPS), amely 50 µM végkoncentrációban tartalmazta az amido-metil-kumarinnal konjugált tetrapeptid kaszpáz szubsztrátot (DEVD-AMC), mellyel 1 órán át inkubáltunk. A keletkezett amido-metil-kumarin (AMC) fluoreszcenciáját Fluoroskan Ascent FL microplate fluoriméteren detektáltuk (excitációs hullámhossz: 390 nm, emissziós hullámhossz: 460 nm).

4.18. MAP kinázok foszforilációs szintjének meghatározása Western blottal

A MAP-kinázok (ERK 1/2 és foszfo ERK 1/2; p38 és foszfo-p38; JNK és foszfo-JNK) azonosítása és aktivált (foszforilált) formáinak meghatározása Western blot módszerrel történt (Erdelyi et al., 2005). A kezelések elvégzése után homogenizáltuk a sejteket, majd gélelektroforézist végeztünk 8 % SDS-poliakrilamid gélben. Ezt követően a gélben lévő mintáinkat nitrocellulóz membránra transzferáltuk [transzfer puffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8.3, 192 mM glicin, 0,02 % SDS, és 20 % metanol] 250 mA áramerősségen, 90 percig. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5 % zsírszegény tejporoldattal blokkoltuk, melyet 0,01 % TBST-ben oldottunk. A mosási lépések (2x5 perc) után poliklonális nyúl antitestekkel (ERK 1/2 és foszfo ERK 1/2; p38 és foszfo-p38; JNK és foszfo-JNK) inkubáltuk a membránokat. A primer antitesteket 1 % tejporthoz tartozó TBST-ben oldottuk. A membránokat 2x15 percig mostuk TBST-vel, majd 1 órán keresztül inkubáltuk a torma-peroxidázzal jelölt szekunder antitesttel (anti-nyúl-IgG) 1 % tejporthoz tartozó TBST-ben oldva. A membránokat 3x20 percig mostuk TBST-vel, eredményeinket kemilumineszcencia előhívó oldattal (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria), röntgenfilmen tettük láthatóvá.

4.19. Gázkromatográfia – tömegspektrometria mérések

Méréseinkben Agilent 7890A gázkromatográfia készülékhez csatolt 5975C tömegspektrométer detektort használtunk. A vegyületeket HP-5MS kapilláris oszlopon (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm rétegvastagság) választottuk el. Az injektor 250°C hőmérsékletű volt és tisztított héliumgázt 1,5 ml/perc sebességgel alkalmaztunk. A fűtőköpeny izotermális hőmérséklete 80°C volt, majd 290°C-ra emeltük 15°C/perc lépésekben és 12 percen át ezen a magas hőmérsékleten volt. Az ionforrás hőmérséklete 230°C volt és 70 eV feszültséget alkalmaztunk. A tömegspektrométer beállításával 50 és 700 Da közötti molekulatömegeket detektáltunk. Az adatokat *MSD Chemstation* programmal analizáltuk. A DMSO oxidáló hatására képződött vegyületeket a NIST v2.0 könyvtár adataival vetettük össze. Csak azokat az oxidációs termékeket vettük figyelembe, amelyeknél az egyezés (hasonlósági faktor) nagyobb volt, mint 900. A molekulakönyvtárunk így azonosított vegyületeit összehasonlítottuk az eredeti mintákkal is, mint standard molekulákkal. Ezen módszerek kivitelezésében nem vettem részt, az eredmények fejezetben néhány mérési eredményre hivatkozom.

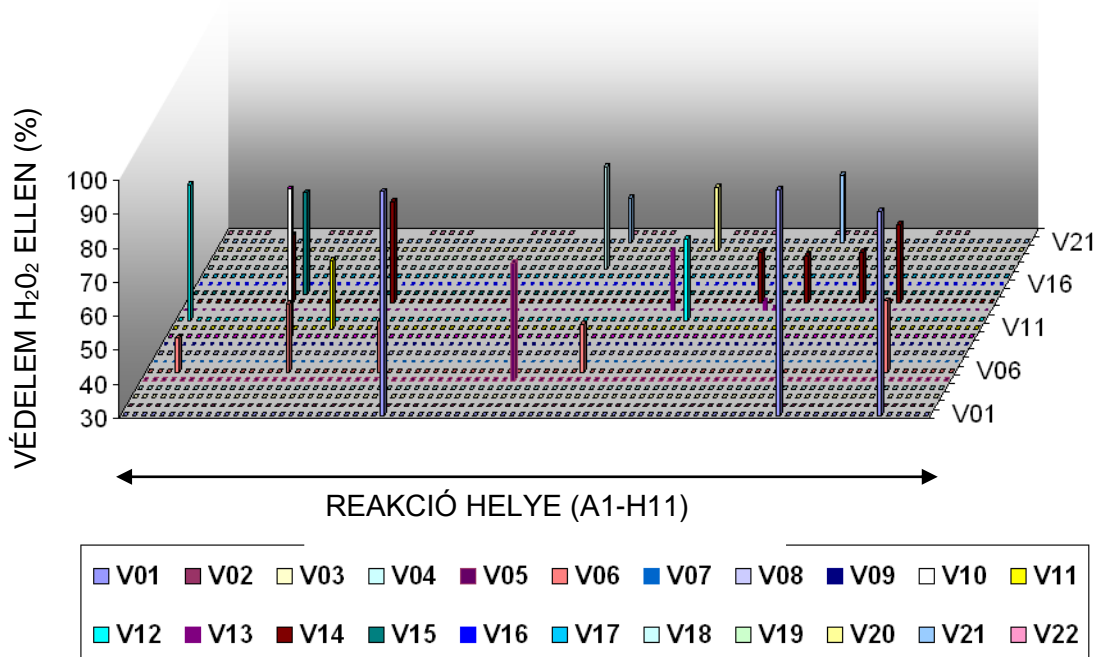
4.20. Statisztikai analízis

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

5. Eredmények

5.1. Nagy áteresztőképességű szűrések és az eredmények validálása

A Debreceni Egyetem molekulakönyvtárából (UDM) 1863 vegyület reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálatát Jurkat-sejteken végeztük HTS módszerrel. 29 olyan vegyületet találtunk, amelyek védtek a hidrogén-peroxid által okozott stressz ellen (4. ábra).

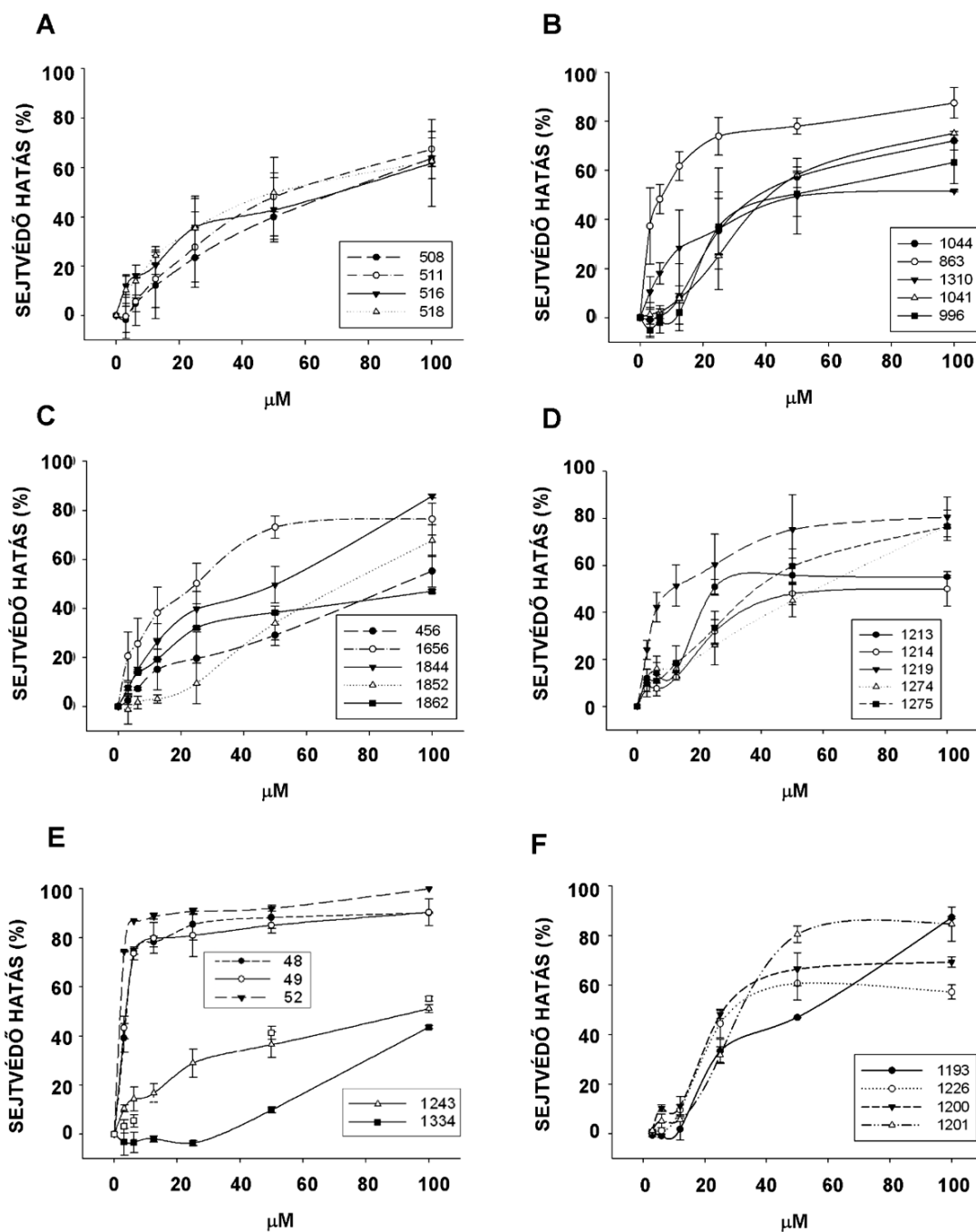


4. ábra: Az UDM molekulakönyvtár nagy áteresztőképességű szűrése citotoxicitás elleni védelemre Jurkat sejtekben

A sejteket 384-lyukú sejt kultúra plate-ekbe helyezve (az ábrán V01-V22 jelölésekkel) a molekulakönyvtár DMSO-ban oldott vegyületeivel kezeltük 20 μM koncentrációban, majd 30 perc elteltével hidrogén-peroxidot adtunk hozzájuk. Az életképességüket 4 óra múlva reszazurin-redukción alapuló módszerrel határoztuk meg, mely során a 30 %-nál nagyobb hatékonyságú vegyületeket tekintettük sejtvédő hatásúnak. Az 1863 vizsgált vegyületből 29 bizonyult sejtvédőnek. Ezt három, egymástól független kísérlet is bizonyította. A szórások a 3D ábrázolás miatt nem kerültek az ábrára.

A 4. ábrán bemutatott legjobb sejtvédő hatással rendelkező vegyületeket „kézi” módszerrel is vizsgáltuk reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálatával. A módszer

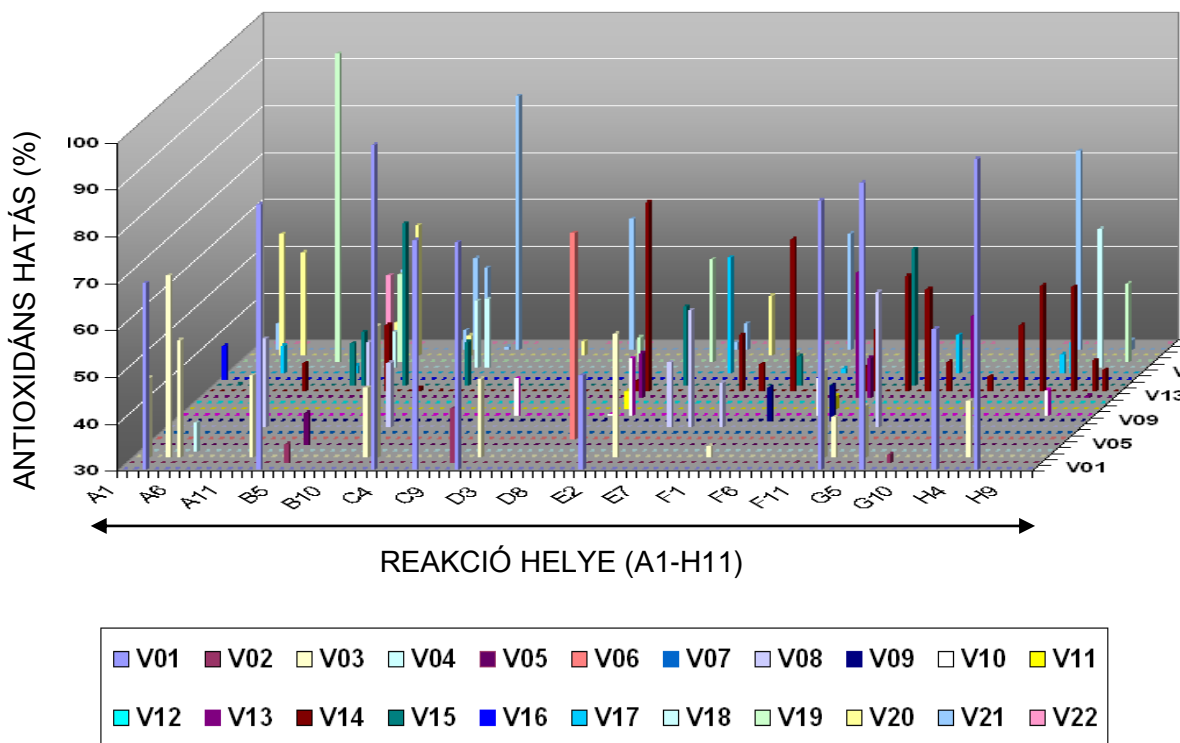
hasonló a HTS technikához, azonban a vizsgálatokat 3-3 mintával és 3-100 μM koncentráció-tartományban végeztük el (5. ábra A-F).



5. ábra: A sejtvédő hatás megerősítése hagyományos kézi elemzéssel Jurkat sejtekben

A nagy átteresztőképességű szűrési vizsgálatban sejtvédő hatást mutató vegyületek hatását meghatároztuk 3-100 μM koncentráció tartományban is. Három független mérési sorozatban 96-lyukú plate-ekben dolgoztunk. A sejtvédő hatást a hidrogén-peroxiddal kezelt minták életképességéhez hasonlítottuk, kivonva ennek értékét az adott vegyületre meghatározott adatból. A százalékos értékek a kezeletlen sejtekhez képest (100 %-os életképesség) értendők \pm SEM.

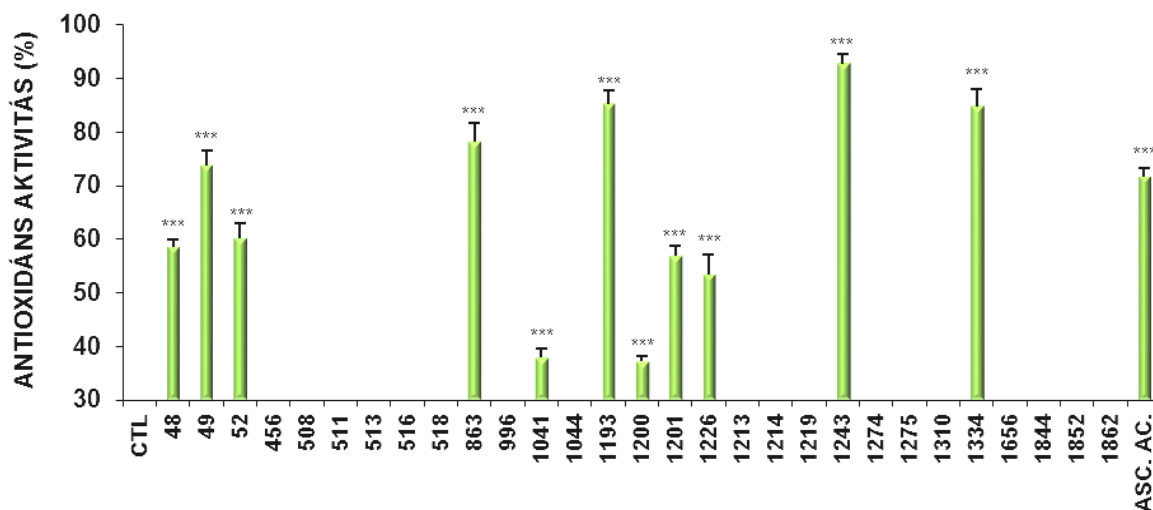
Az ABTS gyökfugó módszerrel is tanulmányoztuk a könyvtár vegyületeinek antioxidáns hatását és 123 molekulának mutattuk ki hatékony – legalább 30 %-os – gyökfugó képességét (6. ábra).



6. ábra: Az UDM molekulakönyvtár nagy áteresztőképességű szűrése antioxidáns hatásra

A molekulakönyvtár vegyületeinek antioxidáns hatását ABTS gyökfugó assay-vel vizsgáltuk. ABTS oldatot pipettáztunk egy 384 lyukú plate-re, ezután hozzáadtuk a vizsgált vegyületeket 20 μ M végkoncentrációban (a kontroll mintákat DMSO-val kezeltük, oldószer kontroll). A minták abszorbanciáját 20 perc elteltével, szobahőmérsékleten történő inkubáció után határoztuk meg. Az eredményeket az eredeti ABTS oldathoz viszonyítva százalékban tüntettük fel. Azokat a vegyületeket tekintettük antioxidánsnak, amelyek hatásfoka 30 % fölött volt. Az 1863 vizsgált vegyületből 123 bizonyult antioxidáns tulajdonságúnak. Ezt három, egymástól független kísérlet is bizonyította. A szórások a 3D ábrázolás miatt nem kerültek az ábrára.

A HTS módszerrel (6. ábra) meghatározott sejtvédő hatásokat kézi szűréssel is megerősítettük (7. ábra). A 29 sejtvédő hatású vegyület közül 11 molekula rendelkezett jelentős antioxidáns aktivitással.

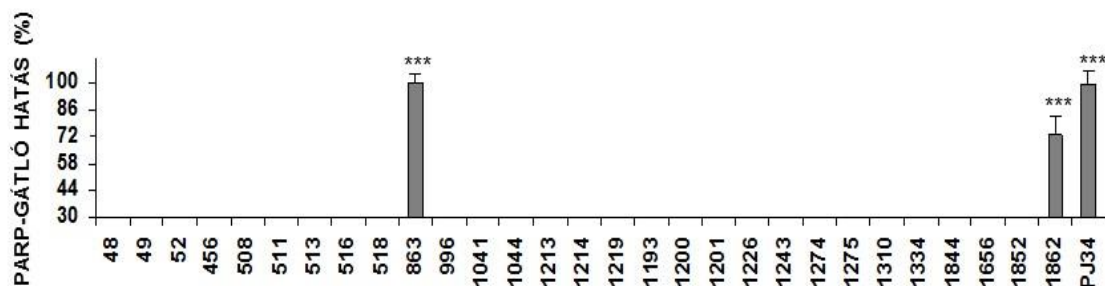


7. ábra: A sejtvédő vegyületek antioxidáns hatásának megerősítése hagyományos kézi elemzéssel

A meghatározás lépéseit a HTS módszerben leírtak alapján végeztük. A vizsgálatokat 96-os plateken hajtottuk végre. Pozitív kontrollként aszkorbinsavat (az ábrán ASC.AC. jelöléssel) használtunk (20 μ M). Három független kísérlet eredménye \pm SEM. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollhoz képest: *** $p < 0,001$.

5.2. A PARP aktivitását gátló sejtvédő-vegyületek azonosítása

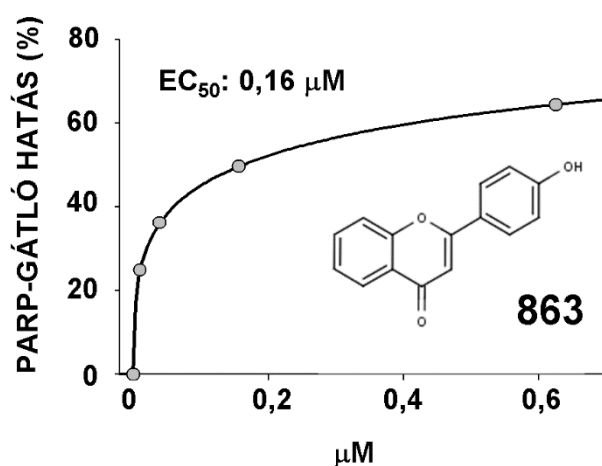
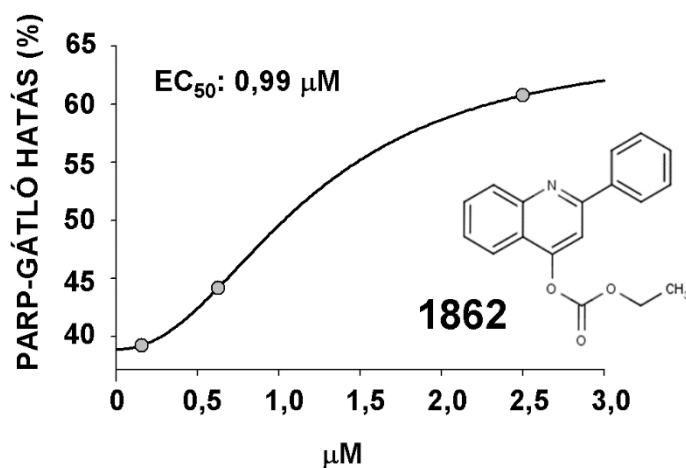
Az oxidatív stressz által kiváltott sejthalálban a PARP-1 enzim aktiválódása meghatározó. Ezért vizsgáltuk mintegy harminc sejtvédő hatású vegyület PARP-1 aktivitást gátló képességét sejtmentes rendszerben. Két vegyület: 863 és 1862 rendelkezett érdemi PARP-1 aktivás gátlással 20 μ M koncentrációban (8. ábra).



8. ábra: Sejtvédő vegyületek PARP-1 enzimgátló hatásának vizsgálata

A sejtvédő vegyületeket (20 μM koncentrációban alkalmazva) PARP aktivitásmérő módszerrel teszteltük. Szubsztrátként biotinnal jelzett NAD^+ -ot használtunk, az akceptor fehérje pedig tisztított H1 hiszton fehérje volt. A módszer a biotinnak a plate-hez rögzített hiszton fehérjékre való beépítésén alapul, melyet a PARP-1 enzim végez. Így a jel intenzitása arányos a PARP-1 enzim aktivitásával. A vizsgálat során pozitív kontrollként a PARP-gátló PJ34-et használtuk. Az ábrán a három független mérési eredményből számított átlagértékek láthatók $\pm\text{SEM}$. Két vegyület (863 és 1862) és a PJ34 bizonyult PARP-gátló hatásúnak: *** $p < 0,001$.

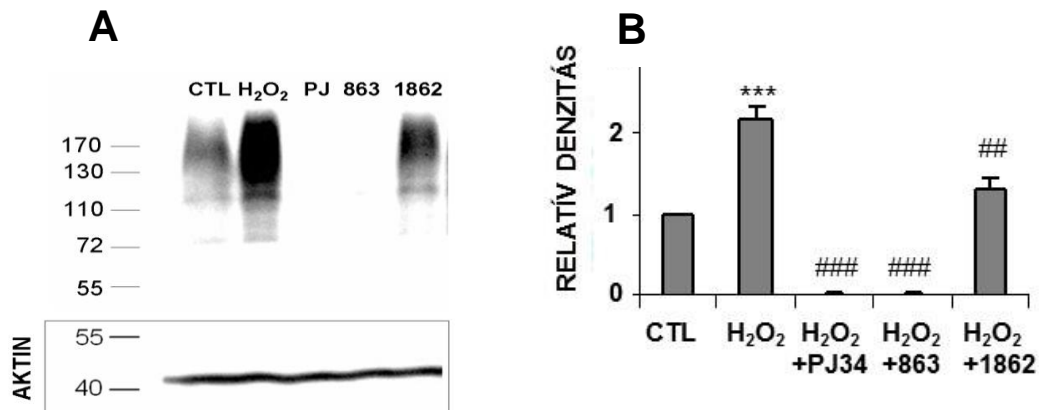
Ezen két vegyület koncentrációfüggő gátló hatását is tanulmányoztuk. Az EC_{50} érték az 1862-es vegyületre 0,99 μM , míg a 863-as vegyületre 0,16 μM volt (9. ábra).



9. ábra: Két vegyület (863 és 1862) fél-maximális gátlásához szükséges koncentráció (EC₅₀) meghatározása

A 8. ábra szövegében leírt kísérleti protokollt alkalmaztuk. A vegyületek fél-maximális gátlásához szükséges koncentrációt (EC₅₀) a dózis-hatás görbék alapján, Sigmaplot szoftver segítségével határoztuk meg. A diagramokon a jobb szemléltethetőség érdekében csak az ezekhez közel eső koncentrációtartományt ábrázoltuk. A mérési adatok 3 független kísérlet átlagát szemléltetik. Feltüntettük a két hatékony gátlószer szerkezeti képletét is.

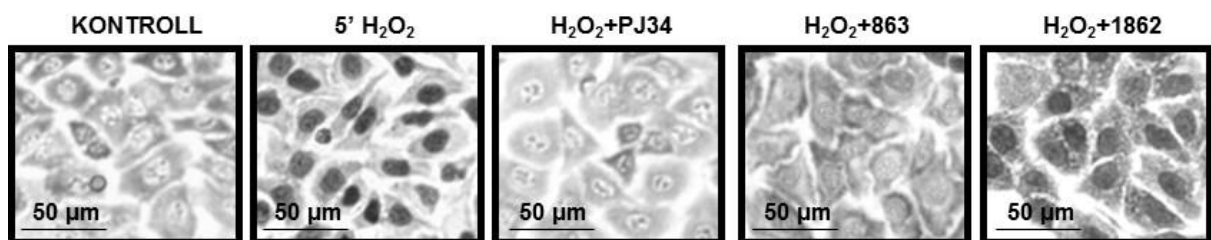
A két hatásos vegyület PARP-1 aktivitást gátló hatásának igazolására Jurkat (10. ábra) és A549 (11. ábra) sejtvonalakat használtunk. A sejteket 30 percig kezeltük a vegyületekkel, majd hidrogén-peroxid hozzáadásával stimuláltuk a PARP aktivitását, a PAR termék szintézisét. Az oxidatív stressz (hidrogén-peroxid kezelés) jelentős PARP aktiválódást okozott, amelyet a 10. ábrán bemutatott Western-blot PAR-polimerjének intenzív festése igazol. A denzitometriás kiértékelés alapján a 863-as vegyület hasonló védő hatást fejtett ki, mint a széleskörűen alkalmazott PJ34. A másik vegyület (1862) védő hatása lényegesen kisebb volt.



10. ábra: PARP-gátló hatás vizsgálata Western blot módszerrel Jurkat sejtekben

A 800 μM hidrogén-peroxiddal kezelt sejtekben termelődő ADP-ribóz polimerek mennyiségét Western blot-tal határoztuk meg (A), melyet denzitometria segítségével kvantifikáltunk (B). Három független kísérlet eredménye \pm SEM jellemzi a relatív denzitás értékeit. A kontrollal (CTL) való összehasonlítás során a hidrogén-peroxid jelentősen ($***p < 0,01$) növelte a PARP-aktivitást. A PJ34 (10 μM) és a 863-as vegyület (20 μM) pedig számottevően ($###p < 0,001$) csökkentették a PARP-aktivációt. Az 1862-es vegyület (20 μM) PARP-gátló kisebb mértékű ($##p < 0,01$).

Az A549 sejtvonal immuncitokémiai vizsgálata (11. ábra) megerősítette a Jurkat sejtekkel kapott eredményeinket. Rövid (5 perc) hidrogén-peroxid kezelés a PAR mennyiségét jelentősen fokozta. A 863-as és az 1862-es vegyület (gyengébben) egyaránt védett az oxidatív stresszel szemben.



11. ábra: PARP-gátló hatás vizsgálata immuncitokémiával A549 sejtekben

A PAR-polimerek jelenlétét immuncitokémiai módszerrel is meghatároztuk. Ezekben a kísérletekben az A549-es sejteket 30 percig előkezeltük a 863 és 1862 vegyületek 20-20 μM oldatával. Pozitív kontrollként 10 μM PJ34-t alkalmaztunk. A sejteket ezután 800 μM H₂O₂-dal kezeltük 5 percig. PAR-specifikus antitesttel kimutatható a PAR polimerek felhalmozódása, elsősorban a sejtmagban.

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

Áttekintve azon vegyületek szerkezetét, amelyek nem bizonyultak PARP inhibitoroknak vagy antioxidánsnak kiderült, hogy legtöbbjük indolvázat tartalmaz. Gázkromatográfiás és tömegspektrometriás módszerekkel Prof. Patonay Tamás és munkatársai (Debreceni egyetem, TTK Szerves Kémiai Tanszék) kimutatták, hogy a molekulakönyvtár eredeti mintái lebomlottak és mindegyikében izatin (1H-indol-2,3-dion) található jelentős mennyiségben. A vizsgálatokat közleményünk (Hegedus et al., 2013) kiegészítő mellékletében adtuk közre <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2013.03.002>

Kimutattuk, hogy izatin bomlásterméket tartalmazó vegyületek a reszazurin redukciót zavarják, hibás pozitív eredményeket adnak, és nem erősíthetők meg más módszerrel végzett sejthalál kísérletekben (ld. a fenti közlemény mellékletének S1 és S2 ábráit). Az izatin nem gátolta a kaszpáz-3 aktivitását, az LDH felszabadulását és a PI felvételét sem. Nem rendelkezett citoprotektív hatással az MTT tesztben sem (ld. a fenti közlemény S2 ábráját). Ezért az elsődlegesen kapott citotoxikációs adatokat újra mértük MTT-tesztel is (1. táblázat).

A táblázatban bemutatott 29 vegyület a reszazurin-redukción alapuló életképességi tesztben citoprotektív volt, azonban csak 16 bizonyult ilyennek az MTT-tesztben. A 16 molekula közül két szerkezetileg rokon családot lehet felismerni: dibenzoil-metán (DBM) származékok (1193, 1200, 1201 és 1226) és flavanon-származékok (996, 1041 és 1044).

**1. táblázat: Sejtvédő hatással rendelkező vegyületek EC₅₀ értékének meghatározása
reszazurin-redukcióval és MTT-teszttel Jurkat sejtekben**

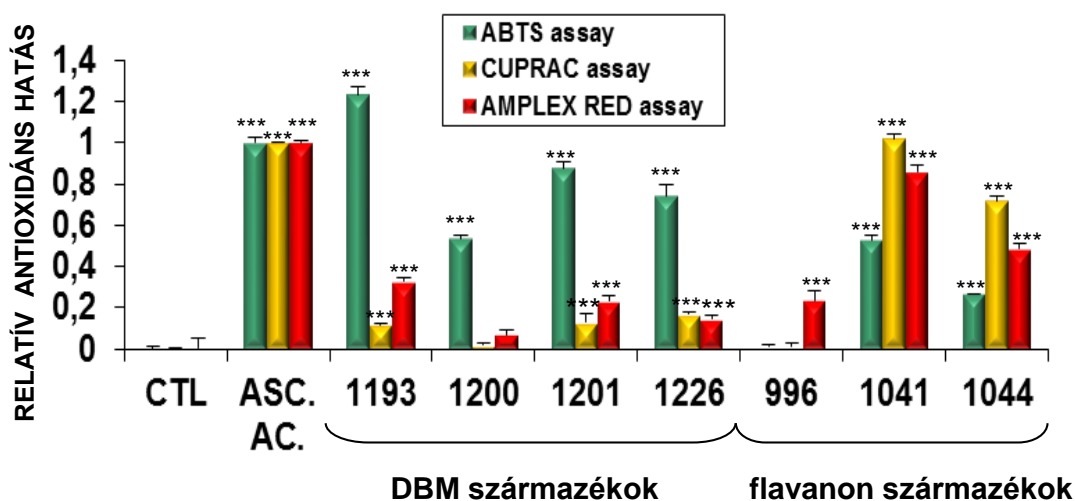
Félkövér kiemeléssel jeleztük azon 16 vegyületet, melyek mindkét módszerrel sejtvédő hatásúnak bizonyultak.

Vegyület száma	EC ₅₀ reszazurin (μM)	EC ₅₀ MTT (μM)
48	4	2
49	4	3
52	1	3
456	93	nem sejtvédő
508	61	nem sejtvédő
511	54	nem sejtvédő
513	73	nem sejtvédő
516	73	nem sejtvédő
518	52	nem sejtvédő
863	10	50
996	37	21
1041	40	25
1044	35	22
1193	60	52
1200	21	28
1201	28	30
1213	25	nem sejtvédő
1214	77	>100
1219	16	>100
1226	23	26
1243	99	50
1274	55	nem sejtvédő
1275	40	nem sejtvédő
1310	87	nem sejtvédő
1334	95	62
1656	20	nem sejtvédő
1844	42	nem sejtvédő
1852	64	65
1862	98	nem sejtvédő

5.4. DBM vegyületek sejtvédő hatása

A dibenzoil-metán és a flavanon származékok antioxidáns hatását három módszerrel tanulmányoztuk (12. ábra). Az Amplex Red mérés a hidrogén-peroxid titrálásával, így közömbösítésével jár, ezért a vizsgált vegyületek antioxidáns hatásának szempontjából a legalkalmasabb módszernek tekinthető. A DBM származékok antioxidáns hatását a CUPRAC

és Amplex Red módszerek nem erősítették meg. A flavanon származékok a CUPRAC és Amplex Red szerint hatásosabbnak bizonyultak az ABTS szintelenítési teszttel szemben.

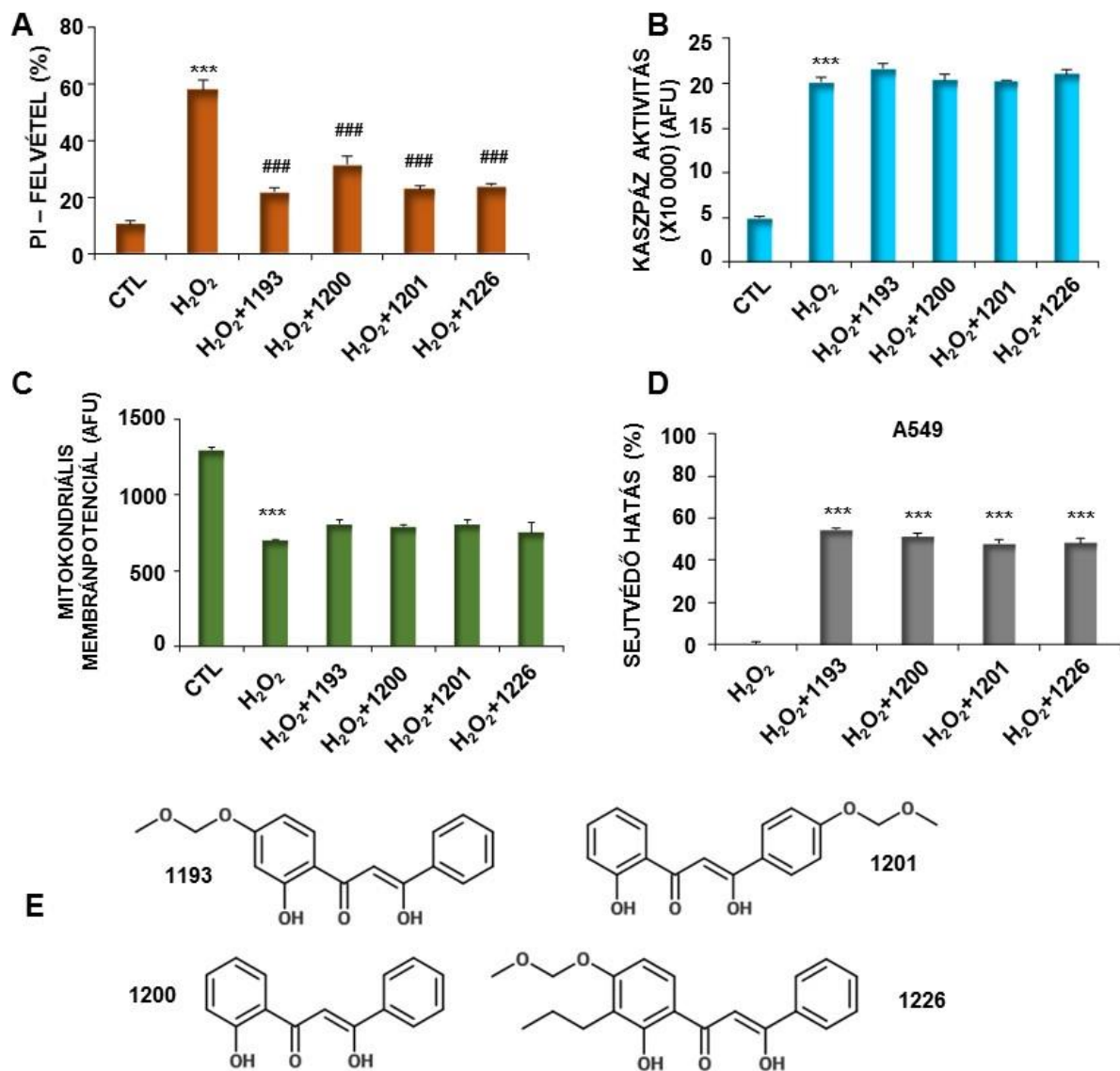


12. ábra: DBM és flavanon származékok antioxidáns hatása

A DBM és flavanon származékok 20 μ M kocentrációinak antioxidáns tulajdonságát három különböző módszerrel vizsgáltuk. Az ABTS szintelenítő mérés mellett a CUPRAC (réz-II-ion redukálása) és Amplex Red (hidrogén-peroxid fluoreszcenciás meghatározása) módszereket is alkalmaztuk. Zöld oszlopok: ABTS; sárga oszlopok: CUPRAC és piros oszlopok: Amplex Red mérés által meghatározott relatív antioxidáns hatásokat mutatják. Aszkorbinsavat (ASC. AC) pozitív kontrollként alkalmaztunk. Három független kísérlet eredménye \pm SEM. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollhoz képest: *** $p < 0,001$.

Az Amplex Red módszerrel kapott adatok alapján a DBM származékok kevésbé antioxidáns tulajdonságúak, mint a flavanon vegyületek. A szakirodalom számos antioxidáns vegyületet ismer, de kutatásaink szempontjából a sejtvédő hatás értékesebb biológiai alkalmazások lehetőségét veti fel. Ezért a továbbiakban a DBM származékokat tanulmányoztuk humán sejtvonalakban (13. ábra).

Kimutattuk, hogy a DBM származékok nem befolyásolják a Jurkat sejtek kaszpáz aktivitását (apoptózis marker), de szignifikánsan csökkentik a propidium-jodid felvételét (nekrotikus sejthalál marker) hidrogén-peroxid kezelés során anélkül, hogy befolyásolnák a mitokondriális membránpolarizációt (13. ábra A, B és C). A tüdő epitéliális A549 sejteket pedig védik a DBM vegyületek a citotoxikus hidrogén-peroxid ellen (13. ábra D), rámutatva arra, hogy a sejtvédő hatás nem sejttípus függő.

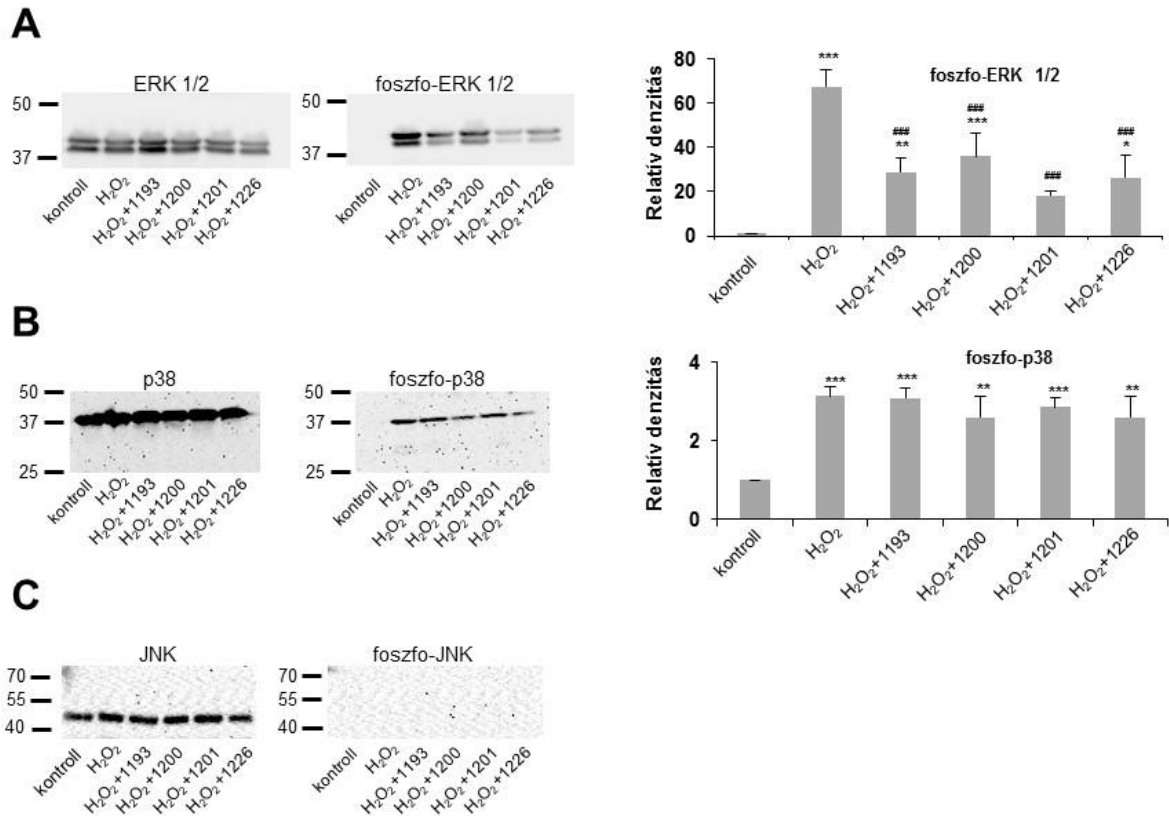


13. ábra: DBM származékok sejtvédő hatása

Mindegyik vegyület csökkentette a Jurkat sejtek hidrogén-peroxid által kiváltott PI-felvételét (A), de nem volt hatásuk a kaszpáz-3 aktivitására (B) és az oxidálószerrel (H₂O₂) indukált mitokondriális membrán depolarizációra sem (C). A vegyületek sejtvédő hatását igazolták az A549 tüdősejtvonalon kapott eredményeink is (D). A DBM származékokat 20 μM koncentrációban alkalmaztuk a mérésekben. Három független kísérlet eredménye ± SEM. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollhoz képest: ***p<0,001. ###Szigignifikáns különbség a hidrogén-peroxid kezelt sejtekhez képest (p<0,001). A vizsgált DBM származékok szerkezetét az (E) rész mutatja be.

5.5. DBM vegyületek hatása a mitogén-aktivált kinázok aktivitására

Tanulmányoztuk a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) közé tartozó ERK 1 és 2 (ERK 1/2), p38 és JNK (c-jun N-terminális protein kináz) aktivitásokat, illetve foszforilációs állapotok változását DBM származékok jelenlétében (14. ábra).



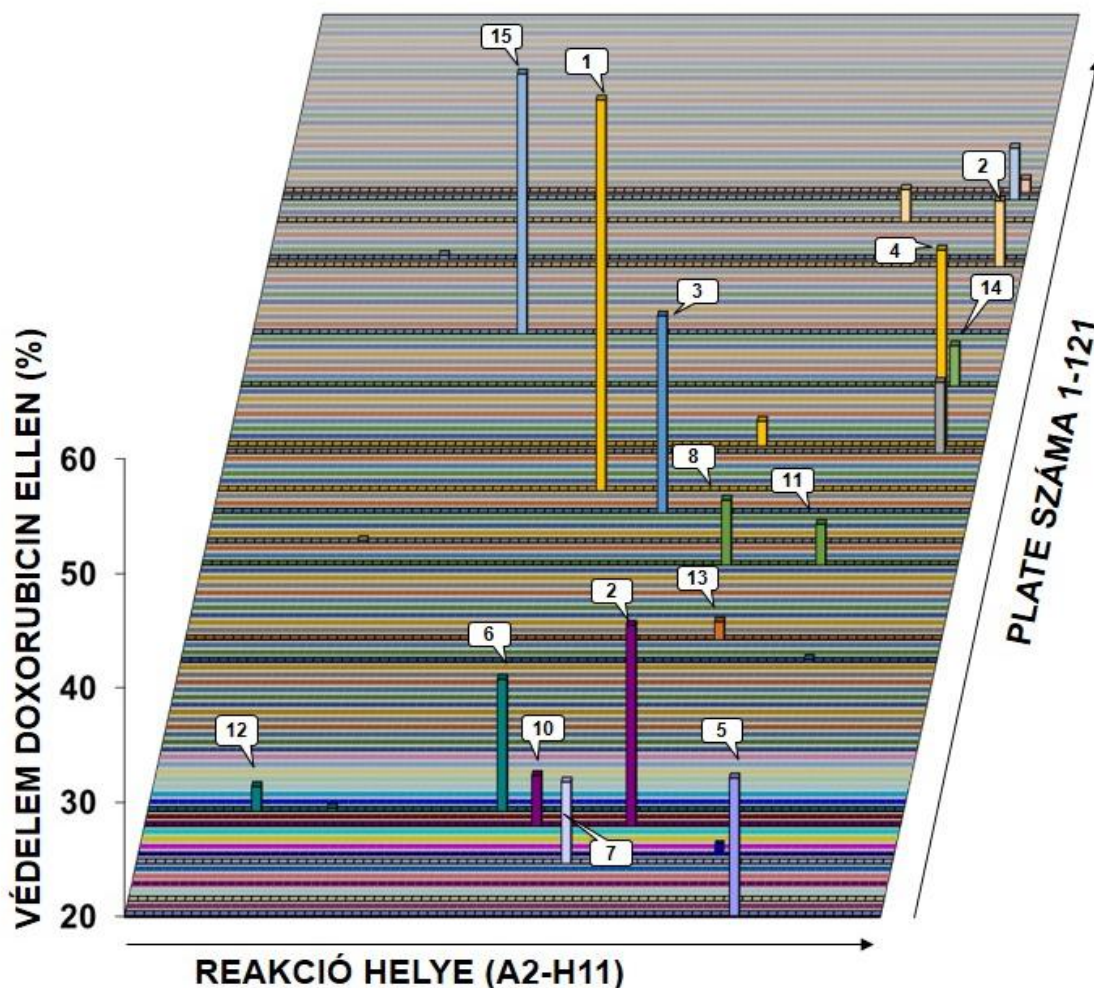
14. ábra: DBM vegyületek hatása MAP kinázok: ERK 1/2, p38 és JNK aktivitására (foszforilált formáinak mennyiségére)

A549 sejteket 30 percig 10 μ M DBM származékkal kezeltük, majd 15 percig 800 μ M hidrogén-peroxiddal. A mitogén-aktivált protein kinázok aktivitását Western blot segítségével mutattuk ki. A hidrogén-peroxid kezelés az ERK 1/2 (A) és p38 (B) jelentős növekedését váltotta ki. DBM származékok gátolták az ERK 1/2 foszforilációját (A), de nem befolyásolták a foszfo-p38 mennyiségét (B). JNK aktiválását, foszfo-JNK képződését nem detektáltunk (C). Az eredményeket denzitometriával is értékeltük, amelyek három független kísérlet adatát \pm SEM mutatják be. A csillagok szignifikáns különbséget jelölnek a kontrollhoz képest: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Szignifikáns különbség a hidrogén-peroxid kezelt sejtekhez képest: ###($p < 0,001$).

Western blot módszerrel kimutattuk, hogy hidrogén-peroxid jelenlétében az ERK 1/2 és p38 enzimek aktiválódtak, a JNK nem. A DBM származékok hatékonyan csökkentették az ERK 1/2 aktiválódását (foszfo-ERK 1/2 képződését), nem befolyásolták viszont a p38 foszfoformájának a mennyiségét. Adataink arra utalnak, hogy a DBM-származékok elsődleges célpontjai az ERK 1/2 enzimek lehetnek a nekrotikus sejthalál útvonalon.

5.6. HTS szűrés doxorubicin toxicitás ellen védő kardioprotektív vegyületek azonosítására

Munkánk során a Chembridge Diverset molekulakönyvtár 9680 vegyületét vizsgáltuk, a sejtek életképességét mérő MTT-teszt segítségével. Kísérleteinkhez H9C2 patkány kardiomiocita sejtvonalat használtunk (15. ábra).



15. ábra: Kardioprotektív anyagok szűrése doxorubicin toxicitás ellen

Az előző napon kiszélesztett H9C2 sejteket a molekulakönyvtár 10 μ M koncentrációjú vegyületeivel 30 percig kezeltük, majd 300 ng/ml doxorubicinnel történő kezelést végeztünk a vegyületek jelenlétében 24 órán át. A sejtek életképességét MTT-teszttel határoztuk meg. A diagram a doxorubicin hatásával szembeni védelmet mutatja. A méréseink során a 20 %-nál nagyobb védelmet nyújtó vegyületeket tekintettük hatékonynak. Ezek alapján, 15 vegyületet jelöltünk ki további vizsgálatra (1-15). A szórásokat a 3D ábrázolás miatt nem tüntettük fel.

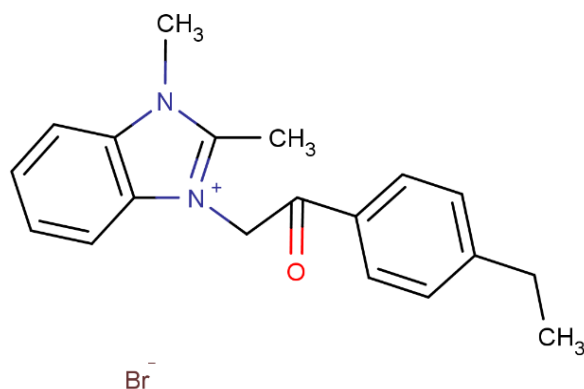
Kezeléseinket szubkonfluens (kb. 80 %) kultúrákkal indítottuk, azok 24 órán át tartottak. A mérés kiértékelése során a húsz százaléknál nagyobb sejtvédő hatású vegyületeket tekintettük kardioprotektív hatásúnak. A vizsgált vegyületek közül 15 teljesítette a fenti

kritériumokat (ld. 15. ábra, 1-15 vegyületek). További vizsgálatainkat már ezekkel a vegyületekkel végeztük.

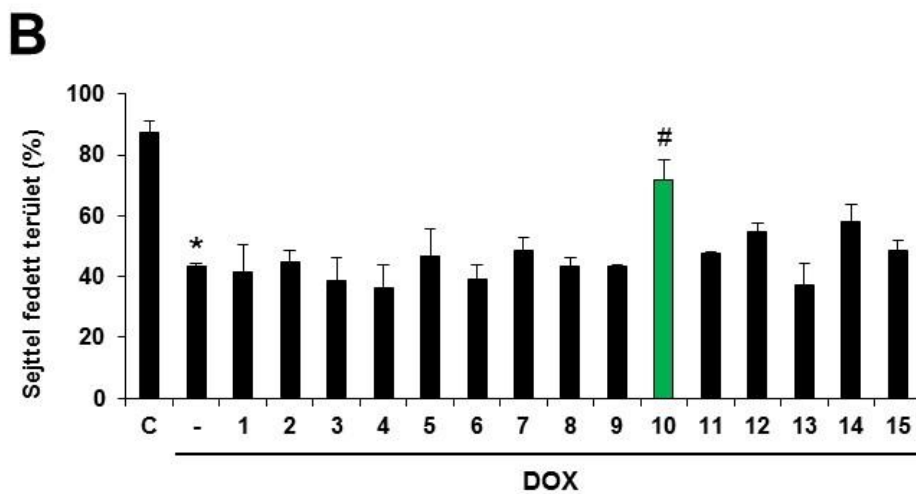
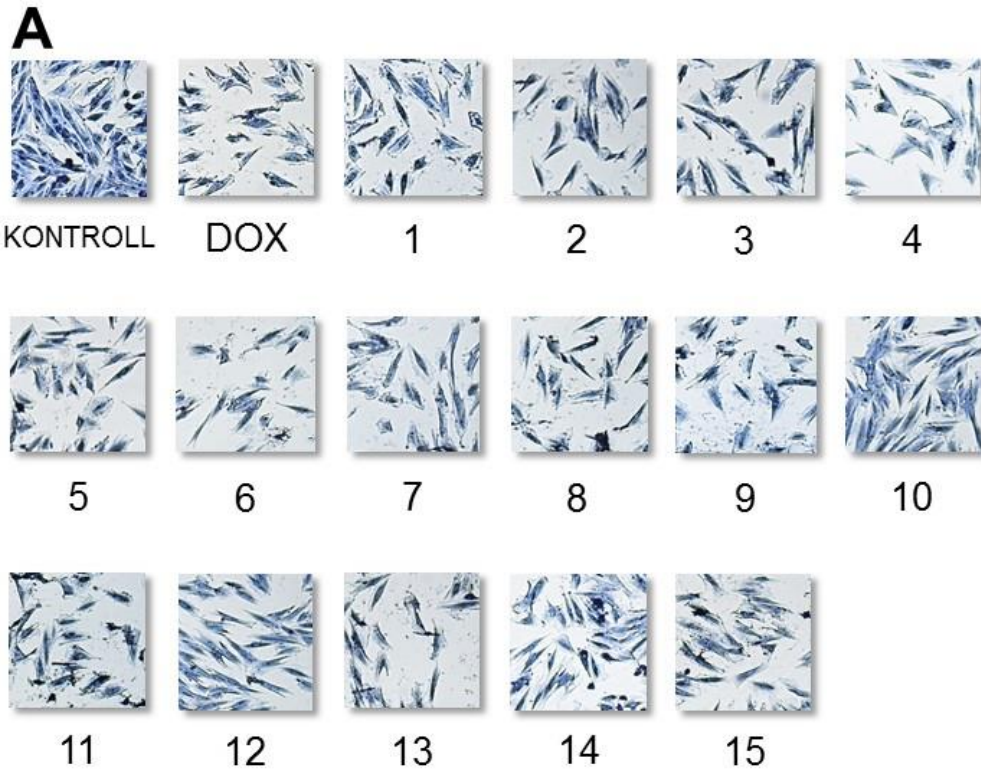
5.7. Kardioprotektív hatás megerősítése morfológiai vizsgálatokkal

A nagy átteresztőképességű vizsgálatokra használt módszerek kiválasztásánál fontos szempont a módszer egyszerűsége és könnyű reprodukálhatósága. A dehidrogenáz-enzimek aktivitásán alapuló életképesség-mérő módszereket ezért széles körben alkalmazzák HTS szűrésekre. Korábbi eredményeink alapján az MTT-teszt vagy más dehidrogenáz-aktivitásmérésen alapuló módszer hamis pozitivitást mutathat. Ezért a szűrés során pozitívnak bizonyult vegyületek esetében elvégeztük a doxorubicinnel kezelt sejtek morfológiai vizsgálatát, melyhez Coomassie festéket alkalmaztunk. Mintáinkról felvételeket készítettünk (16. ábra A), majd a TScratch képanalizáló szoftver segítségével meghatároztuk a sejtekkel borított felület százalékos arányát (16. ábra B).

A szignifikáns kardioprotektív hatást egyetlen vizsgált vegyület (10-es számú) esetében tudtuk megerősíteni. A vegyület szerkezeti képlete:



Kémiai elnevezése: 3-[2-(4-etil-fenil)—2-oxoetil]-1,2-dimetil-1H-3,1-benzimidazol-3-ium bromid, a továbbiakban a 10-es vegyületre EODB névvel hivatkozunk.

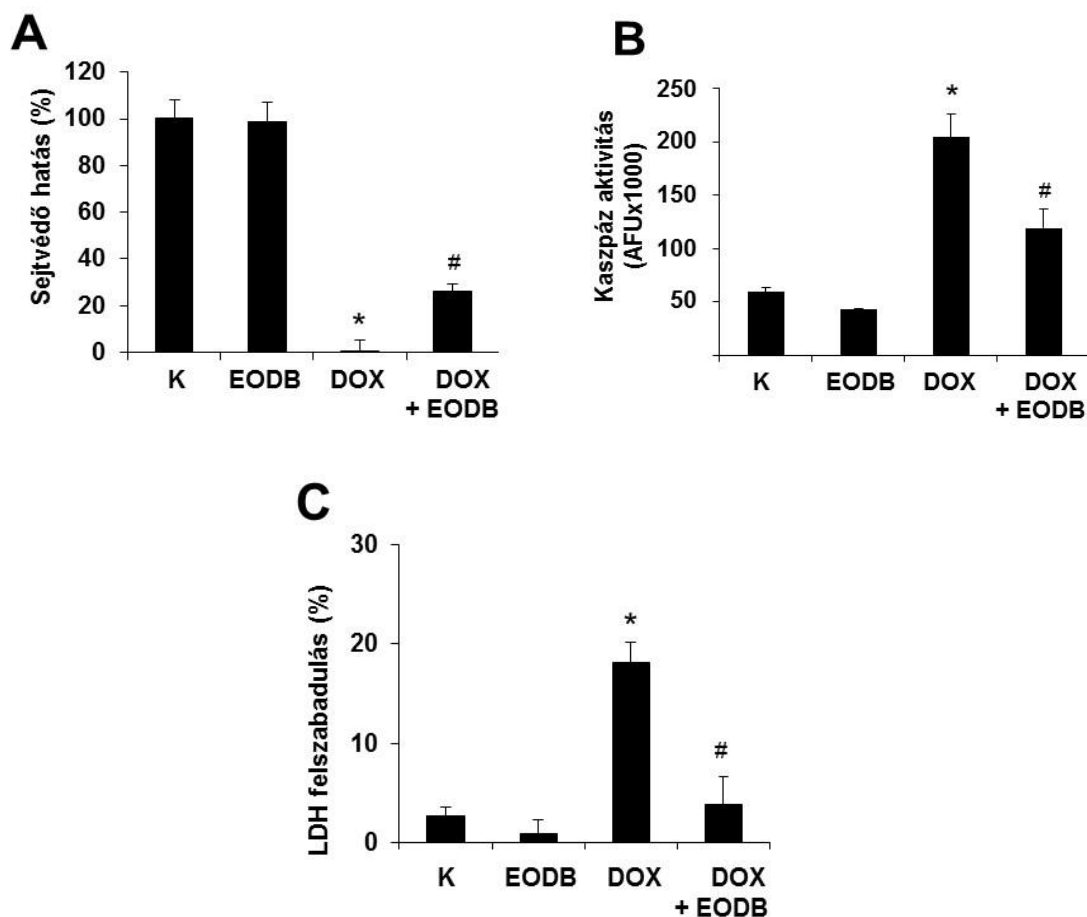


16. ábra: A kardioprotektív hatás morfológiai vizsgálata

H9C2 sejteket a molekulakönyvtár 10 μM koncentrációjú vegyületeivel 30 percig kezeltük, majd 24 órán át 300 ng/ml doxorubicinnel végeztünk további kezelést a vegyületek jelenlétében. A H9C2 sejteket coomassie festékekkel tettük láthatóvá, majd fénymikroszkópra (Leica DM IL LED) szerelt kamerával (Leica MC 120 HD) 5x nagyításon készítettük felvételeinket (A). A kezelés után a sejtekkel borított konfluencia értékeket a TScratch nevű szoftverrel értékeltük (B). A B ábrán 3 kísérlet átlagát ábrázoltuk \pm SEM. A szűrés eredményeit a 10-es vegyület esetében tudtuk megerősíteni. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; # $p < 0,05$ a doxorubicinnel kezelt mintákhoz képest. C: kontroll, DOX: doxorubicin.

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

Életképességi és morfológiai vizsgálataink nem szolgáltatottak információt azzal kapcsolatban, hogy a doxorubicin milyen típusú sejthalált okoz a H9C2 sejtekben. Először igazoltuk az EODB sejtvédő hatását (17. ábra A), megállapítva, hogy jelentős védelmet nyújt a doxorubicin toxikus hatásával szemben. Tanulmányoztuk a doxorubicin hatását a sejtek apoptotikus és nekrotikus paramétereire (Andrieu-Abadie et al., 1999) és (Rosenoff et al., 1975) EODB jelenlétében is. Mértük a kaszpáz-3 enzim aktivitását (apoptotikus paraméter, 17. ábra B), valamint a sejtek felülészójából meghatároztuk a nekrotikus sejthalálra jellemző laktát-dehidrogenáz aktivitást (17. ábra C). Az EODB előkezelés gátolta az LDH felszabadulását és a kaszpáz-3 enzim aktivációját, védelmet nyújtva az apoptózis és nekrozis ellen.



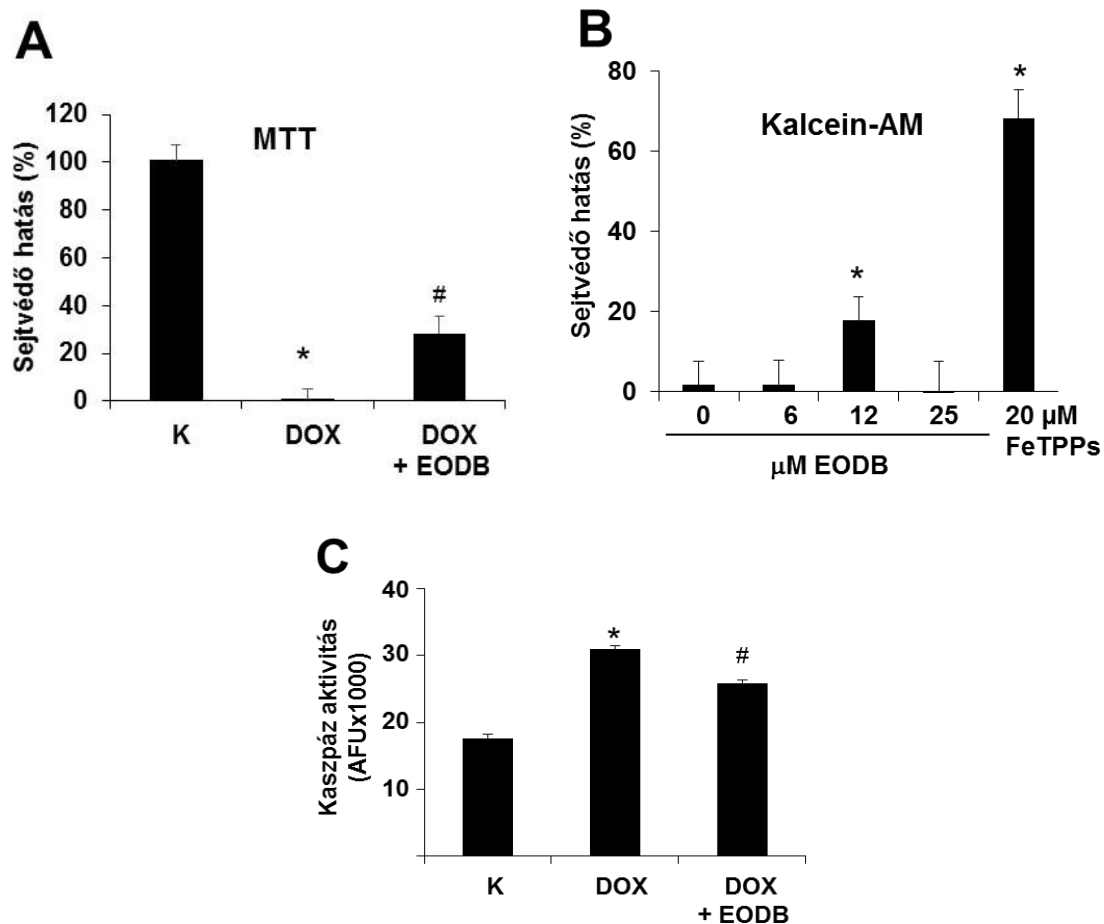
17. ábra: A doxorubicinnel kiváltott sejthalál jellemzése

H9C2 sejteket az EODB 12 μ M koncentrációjú oldatával 30 percig kezeltük, majd 300 ng/ml doxorubicint adtunk a sejtek szuszpenziójához a vegyület jelenlétében 24 órán át. A sejtek életképességét kalcein-AM hidrolízissel mértük (A rész). A sejthalál jellemzését a kaszpáz-3 (apoptózis, B rész) és a laktát-dehidrogenáz (nekrotikus paraméter, C rész) aktivitásokkal

határoztuk meg, 24 órával a doxorubicin kezelést követően. A doxorubicin kezelés hatására a kaszpáz-3 enzim aktivitásának emelkedését tapasztaltuk (**B**), melyet az EODB vegyülettel történő előkezelés jelentős mértékben csökkentett. A laktát-dehidrogenáz felszabadulásban (**C**) is tapasztaltunk csekély mértékű emelkedést, ami szintén szignifikánsan csökkenthető volt EODB kezeléssel. Az adatok 3 kísérlet átlagát szemléltetik \pm SEM. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; # $p < 0,05$ a doxorubicinnel kezelt mintákhoz képest.

5.9. Az EODB kardioprotektív hatása primer kardiomiocitákon

Az immortalizált sejtvonalak a legtöbb esetben jó modelljei a szöveti eredetüknek megfelelő sejtípusnak, nagyrészt megőrzik annak tulajdonságait. A nagy áteresztőképességű mérésekhez is praktikusán használhatóak, hiszen korlátlanul szaporodnak, jól reprodukálható eredményeket szolgáltatnak. Viszont néhány esetben különböző kezelésekre adott válaszuk, illetve érzékenységük a primer sejtektől eltér. Ezért tanulmányoztuk az EODB hatását doxorubicinnel kezelt, újszülött patkányok szívéből izolált sejtekben. 12 μ M EODB szignifikáns védelmet nyújtott a toxicitással szemben mind az MTT, mind a kalcein-AM életképességi vizsgálatokban (18. ábra A és B). A kalcein életképességi teszt arra is rámutatott, hogy 25 μ M EODB már nem rendelkezett sejtvédő hatással, feltehetőleg a vegyület citotoxicitása következtében. Az EODB jelentős védelmet fejtett ki a doxorubicinnel kiváltott kaszpáz-3 aktiválással szemben is (18. ábra C).



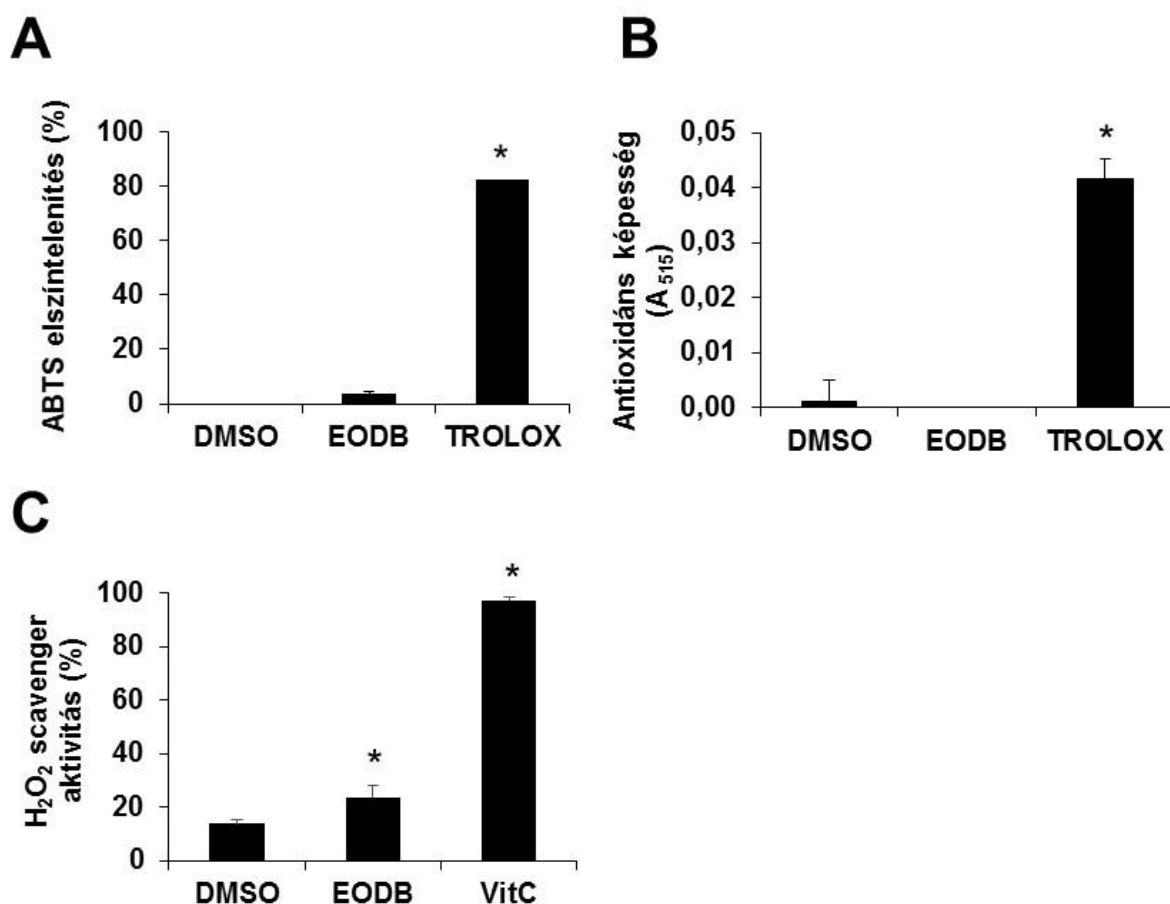
18. ábra: Az EODB kardioprotektív hatása primer kardiomiocitákban

Az EODB kardioprotektív hatását újszülött patkányokból izolált primer kardiomiocitákban vizsgáltuk. A sejteket 30 percig kezeltük 12 μM (A és C panelek) vagy különböző koncentrációjú EODB oldatával (B panel), melyet 24 órás 300 ng/ml doxorubicin kezelés követett. Az FeTPPS [Fe-porfirin komplex: 5,10,15,20-tetrakis(4-szulfonsav-fenil)porforinátvas(III)klorid] hatékony peroxinitritbomlást katalizáló anyag, pozitív kontrollként alkalmaztuk. A sejtvédő hatást MTT (A) és kalcein-AM tesztek (B) segítségével határoztuk meg. A kaszpáz-3 aktivitást, mint apoptózis markert mértük (C). A bemutatott adatok 3 kísérlet átlagát szemléltetik ± SEM. EODB szignifikáns védelmet nyújtott a doxorubicinnel kezelt mintákhoz képest. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; # $p < 0,05$ a doxorubicinnel kezelt mintákhoz képest.

5.10. Az EODB nem rendelkezik antioxidáns hatással, de gátolja a JNK aktivitását

A doxorubicin kardiotoxikus hatását elsősorban a kezelés hatására fokozódó oxidatív stressznek: ROS és RNS képződésének tulajdonítják (Chatterjee et al., 2010). A doxorubicin kardiotoxicitását ellensúlyozó vegyületek nagy része rendelkezik antioxidáns hatással (Simunek et al., 2009). Az EODB antioxidáns tulajdonságait két különböző módszerrel vizsgáltuk (19. ábra). Az ABTS szintelenítési teszt a vizsgált vegyület szabadgyökfogó

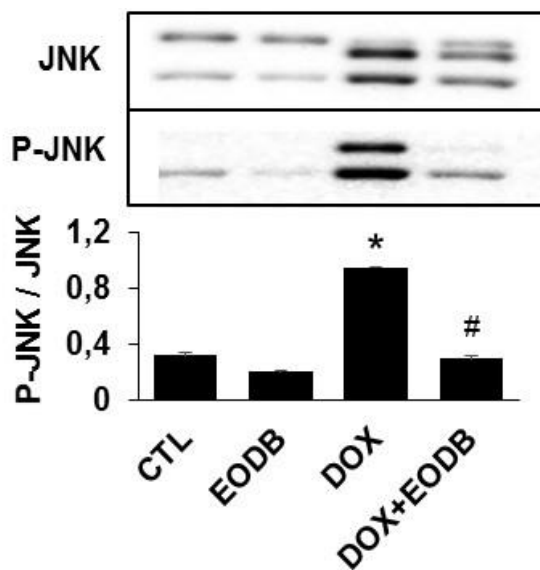
képességét, míg a CUPRAC módszer a vegyület redukálóképességét detektálja. Méréseinkben Trolox pozitív kontrollt használtunk, és megfigyeltük, hogy EODB sem az ABTS (19. ábra A), sem az antioxidáns képességet mérő CUPRAC-tesztben (19. ábra B) nem bizonyult antioxidáns hatásúnak. Vizsgáltuk a vegyület hidrogén-peroxid scavenger aktivitását is sejtmentes rendszerben Ampliflu red segítségével. A pozitív kontrollként alkalmazott aszkorbinsav hatékonyan gátolta a fluoreszcens festék hidrogén-peroxid-indukált oxidációját, az EODB csak csekély védőhatással rendelkezett (19. ábra C). Ebből arra következtetünk, hogy az EODB sejtvédő hatása nem a molekula antioxidáns képességének tulajdonítható.



19. ábra: Az EODB antioxidáns hatásának vizsgálata

Az EODB antioxidáns hatását sejtmentes rendszerben ABTS (A) és CUPRAC (B) tesztek segítségével vizsgáltuk. Az EODB-t a sejtes vizsgálatoknál is alkalmazott 12 μ M koncentrációban teszteltük. Mindkét vizsgálatban 12 μ M Troloxot alkalmaztunk pozitív kontrollként. A DMSO nem befolyásolta a tesztek eredményeit, az EODB oldószer kontrollként mutatjuk be. A hidrogén-peroxid scavenger aktivitást (C) sejtmentes rendszerben Ampliflu red segítségével mértük. 12 μ M EODB vagy 10 μ M aszkorbinsav (VitC) oldatát inkubáltuk 0,1 μ M H₂O₂, 50 mM Ampliflu Red és 0,1 E/ml torma-peroxidáz jelenlétében foszfát-NaCl pufferben 5 percig szobahőmérsékleten. A diagramokon 3 kísérlet átlagát ábrázoltuk \pm SEM. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest.

Tanulmányoztuk az EODB potenciális sejtvédő hatásának érvényesülését a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) közé tartozó p38 és JNK (c-jun N-terminális protein kináz) aktivitásokra, illetve foszforilációs állapotainak változására. A vegyület nem befolyásolta a p38 kináz funkcióját (adatokat nem közöljük), de a JNK aktiválása módosult (20. ábra). A JNK aktiválása (P-JNK/JNK arány) jelentősen fokozódott doxorubicinnel kezelt sejtekben, és az EODB hatékonyan csökkentette a kináz aktiválódását.



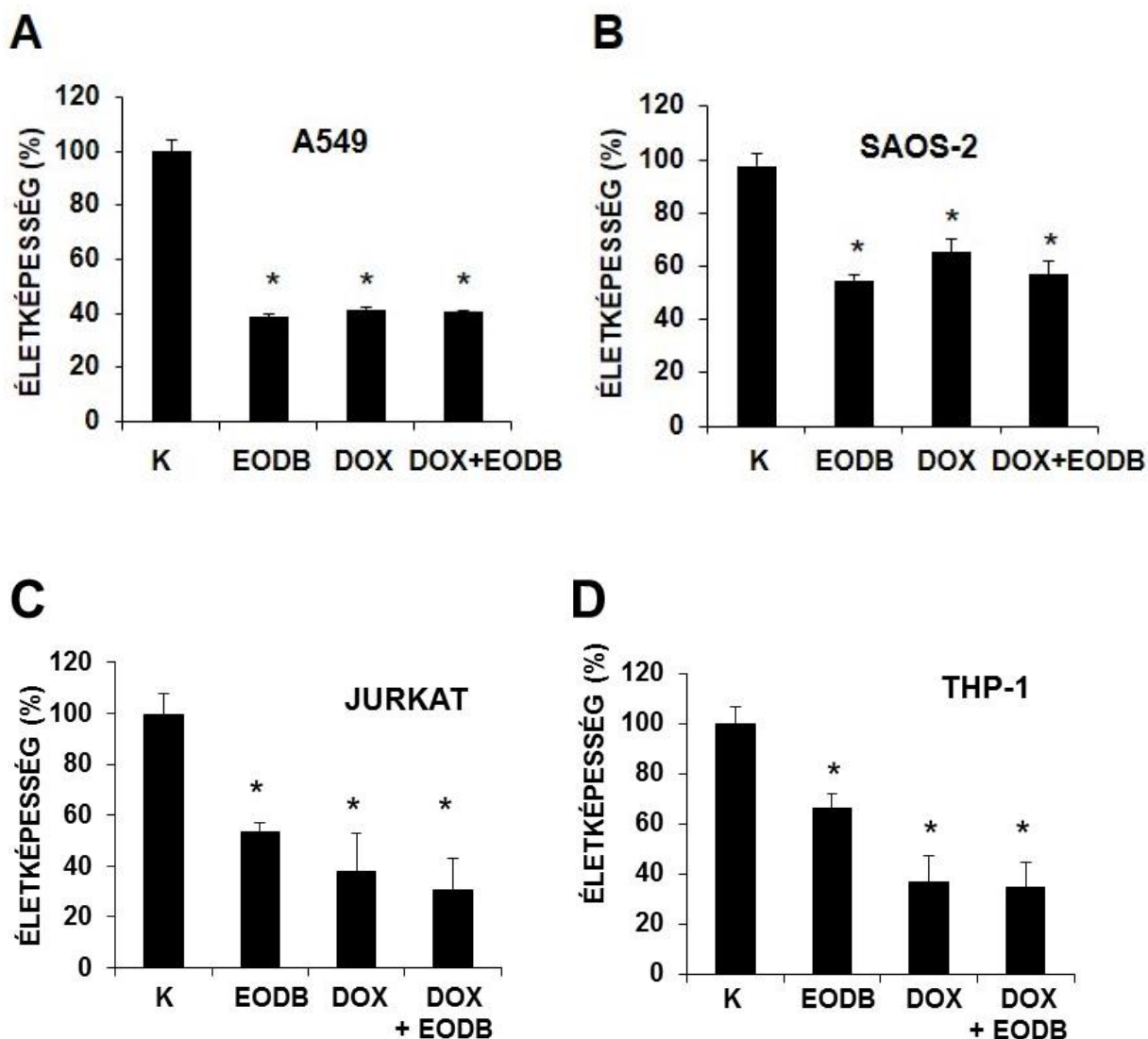
20. ábra: Az EODB hatása a doxorubicin-indukált JNK aktiválásra

Az EODB hatását H9C2 sejteken vizsgáltuk. A sejteket 30 percig kezeltük 12 μ M EODB oldatával melyet 24 órás 300 ng/ml doxorubicin kezelés követett. JNK aktiválását, foszfo-JNK képződését Western blot segítségével mutattuk ki. Az eredményeket denzitometriával is értékeltük, amelyek három független kísérlet adatát \pm SEM mutatják be. Szignifikáns különbség a kontrollhoz (CTL) képest: * $p < 0,05$, szignifikáns különbség a doxorubicin-kezelt sejtekhez képest: # $p < 0,05$.

5.11. Az EODB nem befolyásolja a doxorubicin tumorelles hatását

Doxorubicinnel kombináltan alkalmazható kardioprotektív vegyületekkel szemben támasztott elengedhetetlen követelmény, hogy ne vagy csak kis mértékben befolyásolják a doxorubicin tumorelles hatását. A doxorubicint a tumorok igen széles spektrumában alkalmazzák, így tüdő (Kenis et al., 1972), illetve csont tumorok (Sinks and Mindell, 1975) és leukémiák (Bassan et al., 1996) esetében is. Ezért vizsgálatainkhoz a tüdőepitel eredetű A549, SAOS-2 osteosarcoma sejt vonalat, Jurkat T-sejtes leukémia sejteket és THP-1 monocita leukémia sejt vonalat használtunk (21. ábra). Az EODB nem befolyásolta a doxorubicin sejtölő

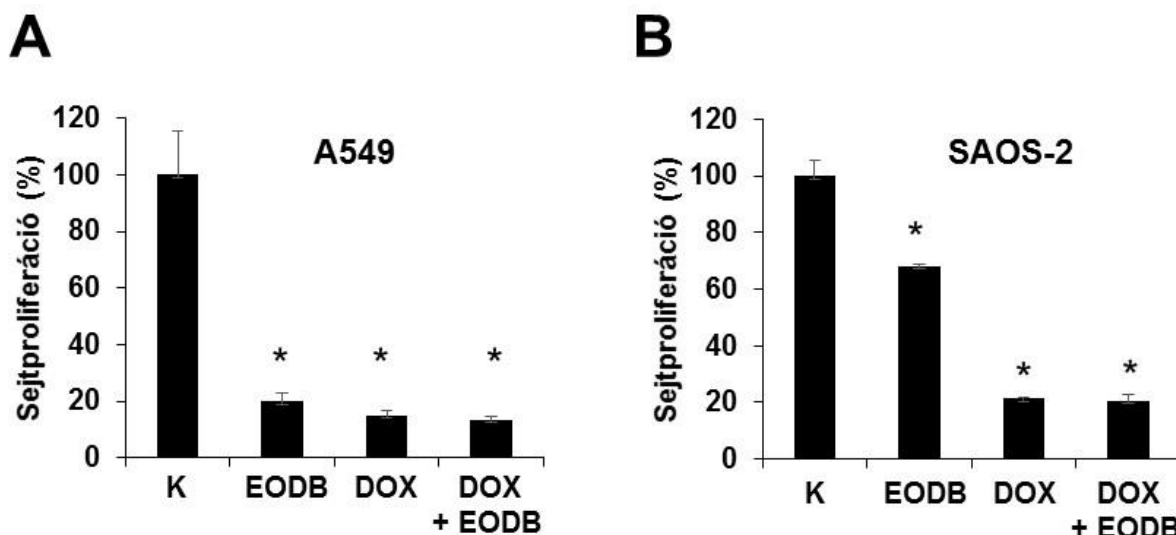
(tumorelles) hatását. Érdekes, hogy az EODB önmagában is toxikus volt mindegyik általunk vizsgált tumor sejtvonalon, illet a H9C2 sejtekkel nem tapasztaltunk.



21. ábra: Az EODB nem befolyásolja a doxorubicin tumorelles hatását

Az EODB hatását A549 (A), SAOS-2 (B), Jurkat (C) és THP-1 (D) sejtvonalon vizsgáltuk. A sejteket 30 percen keresztül kezeltük 10 μ M EODB oldatával, melyet 24 órás 300 ng/ml doxorubicin kezelés követett. A sejtek életképességét MTT életképességi teszt segítségével meghatároztuk. A bemutatott adatok 3 kísérlet átlagát szemléltetik \pm SEM. Eredményeinket a kezeletlen kontroll (100 %) mintákhoz viszonyítottuk. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest.

Tanulmányoztuk a doxorubicin hatását A549 és SAOS-2 sejtek proliferációjára is (22. ábra). Az EODB nem befolyásolta a doxorubicin jelentős proliferációt gátló hatását. Megjegyezzük, hogy az EODB a tüdő epitel eredetű A549 sejtek proliferációját sokkal kifejezetebben gátolta, mint a SAOS-2 osteosarcoma sejt vonalat.



22. ábra: Az EODB nem befolyásolja a doxorubicin sejtproliferációt gátló hatását
 Az EODB sejtproliferációra gyakorolt hatását A549 (A) és SAOS-2 (B) sejt vonalakra vizsgáltuk. A sejteket 30 percen keresztül kezeltük 10 μ M EODB oldatával, melyet 24 óráig 300 ng/ml doxorubicin kezeléssel követett. A proliferációt szulfuródamin B teszt segítségével határoztuk meg. A bemutatott adatok 3 kísérlet átlagát szemléltetik \pm SEM. Eredményeinket a kezetlen kontroll (100 %) mintákhoz viszonyítottuk. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest.

6. Megbeszélés

A molekulakönyvtárak szűrése nagy áteresztőképességű (HTS) módszerekkel az egyik leghatékonyabb eljárás új kémiai szerkezetek biológiai hatásosságának felismerésére. Az értekezés molekulakönyvtárak szűrési eljárásait mutatja be sejtes modellekben azon célból, hogy sejtvédő molekulákat azonosítsunk és/vagy a védőhatással rendelkező vegyületek hatásmechanizmusát vizsgáljuk.

6.1. Sejtvédő vegyületek antioxidáns hatásának vizsgálata

Reaktív oxigén gyökök (ROS) és nitrogéntartalmú szabadgyökök (RNS) a szöveti károsodások következtében számos betegség okozói, többek között stroke, miokardiális iszkémia-reperfúzió, sokk és gyulladásos kórfolyamatok (Loeper et al., 1991b); (Loeper et al., 1991a); (Bragt and Bonta, 1980). Az elmúlt évtizedekben nagyszámú protokollt vezettek be ezen betegségek kezelésére, de hatásos gyógymódok felismerése még mindig várat magára.

A jól ismert, de nem célzottan alkalmazható antioxidáns vegyületek (pl. A, C és E-vitaminok) értékes biológiai hatásait *in vitro* és állatkísérletekben *in vivo* is igazolták, de klinikai tanulmányok ezt kevésbé támasztják alá (Farbstein et al., 2010); (Bansal et al., 2011). A kutatás változatlan kihívása, hogy új, lehetőleg kis molekulatömegű (ezért gyógyszerfejlesztés céljaira jobban alkalmazható) sejtvédő vegyületeket ismerjenek meg a ROS és RNS által kiváltott sejtkárosodások és sejthalál megelőzésére.

A Debreceni Egyetem molekulakönyvtárát (UDM) a Szerves Kémia Tanszék hozta létre és tartja fenn. A könyvtár kb. 2600 nagy tisztaságú vegyületet tartalmaz, szerkezetileg eltérő típusokat. A molekulakönyvtár nagy áteresztőképességű (HTS) szűréssel 29 sejtvédő és 123 antioxidáns vegyületet találtunk. Az utóbbiakat ABTS szabadgyök kimutatási módszerrel azonosítottuk (ld. 4.-6. ábrák). Az UDM molekulakönyvtár vegyületei közül 11 molekula bizonyult mind sejtvédő, mind antioxidáns hatásúnak (ld. 7. ábra).

Az oxidatív stressz által indukált sejthalálban a PARP-1 aktivitásának jelentős fokozódását figyelték meg a vizsgált sejtes rendszerek szinte mindegyikében (Jagtap et al., 2002), ezért tanulmányoztuk a HTS szűréssel sejtvédő hatásúnak bizonyult vegyületeket a PARP-1 aktivitására. Két vegyület: 863 (flavanon-származék) és 1862 (kinolin-származék) rendelkezett kiemelkedő PARP-1 aktivitás gátlással 20 μ M koncentrációban hidrogén-peroxiddal kezelt Jurkat sejtekben is (ld. 8-11. ábrák). Adatunk összhangban van Geraets és mtsai. (Geraets et al., 2007) megfigyelésével: a táplálékban található flavonok és flavonolok (pl. kvercetin, fizetin, tricetin) gátolják a PARP aktivitását tüdő epitelsejtekben. Eredményeik

arra is rámutatnak, hogy a táplálék flavon-jellegű vegyületei a krónikus gyulladással járó betegségek kezeléséhez is hozzájárulhatnak.

A sejtvédő vegyületek közül azokat választottuk ki, amelyek nem bizonyultak antioxidánsnak és a PARP aktivitását sem gátolták. Számos szerkezetileg hasonló indolszármazékot ismertünk fel, amelyek rendelkeznek a fenti tulajdonságokkal. Együttműködő partnereink (Prof. Patonay Tamás és munkatársai, Debreceni Egyetem, TTK Szerves Kémiai Tanszék) tömegspektrometriás módszerrel kimutatták, hogy ezekben a mintákban az eredeti vegyületek azonos bomlásterméke az izatin (1H-indol-2,3-dion) található jelentős mennyiségben. Kimutattuk, hogy a HTS szűrésekben (reszazurin-redukció) felismert „sejtvédő” hatás döntően az izatinnak tulajdonítható. A HTS szűrés adatait nem tudtuk igazolni más módszerekkel: pl. izatin nem gátolta a kaszpáz-3 aktivitását, az LDH felszabadulását és a PI felvételét és nem rendelkezett citoprotektív hatással az MTT-tesztben sem [ld. közleményünk S1 és S2 ábráit a kiegészítő mellékletben (Hegedus et al., 2013)]. Ezért az izatin bomlásterméket tartalmazó vegyületeket nem vizsgáltuk tovább. Adataink arra is felhívják a figyelmet, hogy a HTS-módszerek közt nagy népszerűségnek örvendő reszazurin-redukció óvatossággal értékelendő, és csak megfelelő kontrollok alkalmazásával lehet kiszűrni a hibás pozitív eredményeket, illetve párhuzamosan más módszert is kell alkalmazni.

A vegyületek újabb szűrésével (MTT életképességi meghatározás, CUPRAC és Amplex Red mérések) a dibenzoil-metán (DBM) származékok bizonyultak sejtvédő hatásúnak (ld. 12. ábra). A DBM származékok különböznek az antioxidáns tulajdonságú vegyületektől, ugyanis nem védik a hidrogén-peroxiddal kezelt Jurkat sejteket a kaszpáz-mediált apoptotikus sejthaláltól, és nem befolyásolják a hidrogén-peroxid által kiváltott mitokondriális membránpolarizációt. Valójában a nekrotikus sejthalál útvonulatot módosítják, mert szignifikánsan csökkentik a propidium-jodid felvételét hidrogén-peroxid kezelés során, ami arra utal, hogy a plazmamembrán megőrizte integritását (ld. 13. ábra).

6.2. Dibenzoil-metán származékok lehetséges sejtélettani szerepe

A DBM vegyületek antinekrotikus hatásának lehetséges célfehérjéi az ERK1/2 kinázok, aktivitásuk gátlása elősegíti a sejtek túlélését. Az ERK fehérjéről korábban kimutatták, hogy részt vesznek a hidrogén-peroxid által kiváltott nekrotikus sejthalálban (Zhuang et al., 2008), ezért kísérleti megfigyelésünk (ld. 14. ábra) molekuláris magyarázatát is jelenthetik. A DBM vegyületek antinekrotikus hatása értékes, mivel a nekrotikus sejthalál a legáltalánosabb és legveszélyesebb sejtpusztulás pl. stroke vagy miokardiális iszkémia-reperfúziós kórképekben.

Felismerték, hogy a DBM jótékony hatású az iszkémiás kórképekben, mivel stabilizálja a sejt adaptív hypoxiáért felelős „master” génjét a hypoxia-indukáló faktort: HIF-1 fehérjét (Mabjeesh et al., 2003). Az általunk igazolt sejtvédő effektus (13. ábra) további megerősítését jelenti a DBM származékok kedvező felhasználásának iszkémiás betegségekben, mivel ezeknek a vegyületeknek a toxikus hatása elenyésző (Kockler et al., 2013).

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

A DBM származékok felkeltették a gyógyszerkutatók és fejlesztők érdeklődését is. A vegyület több származékát alkalmazzák tumorok (pl. bél, mell és bőr) kezelésében, mivel a detoxifikáló enzimek (pl. glutation-transzferázok, epoxi-hidrolázok) indukcióját a tumorok I. stádiumában (Dinkova-Kostova and Talalay, 1999); (Singletary and MacDonald, 2000) és II. stádiumában is megfigyelték (Ebert et al., 2007). Ezek a detoxifikáló enzimek védenek az oxidatív stressz ellen is, továbbá számos toxikus és/vagy karcinogén anyagot is képesek hatékonyan eliminálni.

A gyomor-béltraktus tumoraival kapcsolatban megfigyelték, hogy a táplálék DBM tartalma csökkentette a szervezet prosztaglandin E2 vagy leukotrién B4 szintjét, gátolta a sejtek túlélését és több növekedési faktor által közvetített jelátviteli folyamatot (Shen et al., 2007). A DBM gátolta az emlő és a prosztata tumorokat is: az ösztrogén-receptor kötődésének elősegítésével a válaszó eleméhez (Lin et al., 2006), illetve csökkentve az androgén-receptor expresszióját (Frazier et al., 2004); (Jackson et al., 2007).

A DBM-ről és származékairól kimutatták, hogy sejtosztódást is gátolnak (Anand et al., 2011). Az egyik hasonló szerkezetű molekulának [1,3-bisz-(2-acetofenil)-propán-1,3-dion] gyulladáscsökkentő hatását figyelték meg a forbol-észter-indukált fül ödémában egerekben, ami nagymértékben hasonlít az Aspirin jól ismert védő hatásához (Lin et al., 2011).

6.3. A DBM és a sejthalál kapcsolata

A DBM és a sejthalál kapcsolata ellentmondásos. A DBM különböző hidroxilált származékai kaszpáz-függő apoptotikus sejthalálhoz vezetnek A549 és CH27 sejtekben, amelyet a mitokondriális membránpotenciál csökkenése is igazol (Weng et al., 2009). A hidroxil-DBM apotózist váltott ki HL-60 sejtvonalban, fokozta a ROS termelődést és gátolta az ornitin-dekarboxilázt, ami nélkülözhetetlen a sejtek növekedéséhez, mivel a DNS-t stabilizáló poliaminok szintézisének egyik kulcsenzime (Pendeville et al., 2001).

Egy másik DBM származék (2,2'-dimetoxi-dibenzoil-metán) neuroprotektív hatású volt oxidatív stresszben, sejtvédő hatása korrelált a vegyület antioxidáns kapacitásával (Takano et al., 2007).

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

6.4. A doxorubicin citotoxikus hatása

A doxorubicin széleskörűen használt gyógyszer a tumorterápiában. A vegyület citotoxikus, ezért alkalmazása a kemoterápiában nagy elővigyázatosságot igényel. A kemoterápiás gyógyszerek közül többnek is van olyan mellékhatása, ami a szívsejtekben diszfunkciót és sejthalált okoz. ROS és RNS képződik antraciklinvázat tartalmazó kemoterápiás gyógyszerek intracelluláris redox folyamatában, amelyek a kérdéses gyógyszer toxikus mellékhatásának fő kiváltói. Szuperoxid aniongyök, hidrogén-peroxid, hidroxilgyök és peroxinitrit képződése okozza elsősorban a doxorubicin kardiotoxikus hatását (Doroshov, 1986) és (Pacher et al., 2003). A redox-stressz által indukált jelátviteli útvonalak is szerepet játszanak, mint pl. p38 MAP kinázok, PARP-1, mátrix metalloproteinázok, továbbá anyagcsereváltozások is hozzájárulhatnak a doxorubicin kardiotoxicitásához (Volkova and Russell); (Pacher et al., 2002); (Bai et al., 2004) és (Szanto et al., 2011).

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

6.5. A doxorubicin kardiotoxikus hatásának csökkentése

Az értekezésben bemutatott vizsgálatainkban HTS módszerrel kívántunk kiválasztani olyan molekulákat, amelyek megvédik a szívsejteket a doxorubicin toxicitásától. A DiverSet 10.000 molekulakönyvtár (Chembridge, USA) változatos szerkezetű, ezért feltehetően eltérő farmakológiai hatásokkal rendelkező vegyületeket tartalmaz. A 9680 molekula kardioprotektív hatását elsődlegesen a doxorubicin citotoxicitására vizsgáltuk életképességet mérő MTT-tesztrel HTS módszerként alkalmazva (ld. 15. ábra). Ebben a tesztben 15 molekula bizonyult hatásosnak. Szem előtt tartva, hogy a citoprotektív hatás felismerése, különösen doxorubicin-

indukált kardiotoxicitásban (Calvert and Vohra, 2013) nem egyértelműen igazolja a vegyületek hatékonyságát, ezért a kiválasztott molekulákat újabb, morfológiai vizsgálatokkal elemeztük (ld. 16. ábra). A H9C2 sejtekkel borított felület nagyságának meghatározásával egyetlen vegyület, az EODB (kémiai elnevezése: 3-[2-(4-etil-fenil)-2-oxoetil]-1,2-dimetil-1H-3,1-benzimidazol-3-ium-bromid) esetében tudtuk megerősíteni a sejtvédő hatást.

A doxorubicin mellékhatását csökkentő kísérleti rendszerek a ROS és RNS képződésének csökkentésére fókuszálnak. Így pl. egy E-vitamin származék (Nagata et al., 1999), flavonoidok (Xiao et al., 2012) és (Subburaman et al., 2014) vagy a peroxinitrit bomlását katalizáló ferroporfirin vegyület (Pacher et al., 2003) és további antioxidáns szerek bizonyultak hatásosnak a doxorubicin által kiváltott szívkárosodások megelőzésében (Mukhopadhyay et al., 2009). Az EODB valószínűleg nem hat közvetlenül a ROS vagy RNS különböző fajtáira, mivel sem az ABTS szintelenítési tesztben, sem a CUPRAC módszerben nem bizonyult antioxidáns hatásúnak (ld. 19. ábra). Nagyon valószínű, hogy EODB kardioprotektív hatása közvetett: a sejtsérülésekre érzékeny jelátviteli útvonalakat befolyásolja.

A doxorubicin kardiotoxicitását kivédő modellekben az antioxidáns hatás hiánya nem kivételes, mivel PARP (Pacher et al., 2002), topoizomeráz és angiotenzin-II receptor (Zhang et al., 2012) inhibitorok sem rendelkeznek antioxidáns tulajdonsággal. Kimutattuk (ld. 17. ábra), hogy az EODB mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejthaláltól véd, feltehetőleg a doxorubicin citotoxikus hatás kialakulásának egyik kezdeti lépését befolyásolja és nem valamelyik sejthalálhoz vezető jelátviteli folyamatot. Az EODB "közvetett" hatása klinikai szempontból jelentősebb lehet, mint a közvetlen szabadgyök koncentráció csökkentése, mert az antioxidáns szerek (pl. N-acetil-cisztein vagy Fe-komplexek) nem bizonyultak hatásosnak preklinikai és klinikai vizsgálatokban (Dresdale et al., 1982) és (Hasinoff et al., 2003).

6.6. Az EODB kardioprotektív hatása

A vegyület kémiai szerkezete magyarázhatja sejtvédő tulajdonságát és mellékhatásait is. Elsősorban az EODB benzimidazol része tekinthető felelősnek, mivel ilyen gyűrűt tartalmazó származékok farmakológiailag jelentős családot képeznek igazolt antivirális (De Palma et al., 2008) és (O'Sullivan et al., 1967), antimikrobiális [(Rajanarender et al., 2008; Tuncbilek et al., 2009)], valamint antidiabetikus (Kwak et al., 2013) tulajdonságokkal. A telmisartan egy angiotenzin-II receptor blokkoló és két benzimidazol részt is tartalmaz. Patkányokban a telmisartan hemodinamikai adatokkal alátámasztva csökkentette a doxorubicin kardiotoxicitását, és jelentősen redukálta több mátrix metalloproteináz [p22(phox), p47(phox) és p67(phox)] vagy az NFκB és Nox4 expresszióját, továbbá mérsékelte az oxidatív DNS

károsodást, a lipid peroxidációt és a sejthalált [(Iqbal et al., 2008) és (Arozal et al., 2010)].

Feltételezhető, hogy EODB is angiotenzin-II receptor blokkoló, ez okozhatja a jelentékeny kardioprotektív hatását. Több benzimidazol származék antitumor hatását is igazolták, ami elsősorban a topoizomerázok gátlásának a következménye [(Galal et al., 2010); (Hasinoff et al., 2012) és (Rashid et al., 2014)]. Ez azért jelentős, mert magyarázhatja az EODB kardioprotektív hatását a doxorubicin kezelés során. Az EODB ugyanakkor nem befolyásolta a doxorubicin citotoxicitását tumor (A549, SAOS-2, Jurkat és THP-1) sejtvonalakban, bár citotoxikusnak bizonyult önmagában is (ld. 21. és 22. ábrák). Normál sejtvonalban (H9C2) nem tapasztaltunk EODB citotoxicitást, míg primer patkány kardiomiocitákban igen, ami korlátozhatja az EODB sejtvédő szerként történő felhasználását (ld. 18. ábra).

Összefoglalóan megállapíthatjuk, hogy a nagy áteresztőképességű szűrési (HTS) módszeren alapuló vegyületkiválasztás alkalmas a doxorubicin kardiotoxikus hatása elleni molekulák azonosítására. H9C2 sejtvonalban és primer patkány kardiomiocitákban az EODB kivédte a doxorubicin kardiotoxikus hatását anélkül, hogy csökkentette volna a kemoterápiás szer tumorelleses hatékonyságát. Az EODB alkalmasnak tűnik további kémiai szerkezet módosításokra, ún. "vezérmolekula" (lead molecule) kialakítására gyógyszerfejlesztési kísérletekben. További szerkezet-hatás vizsgálatok azonosíthatják a molekula sejtvédő és a toxikus hatásaiért felelős szerkezeti elemeket, melynek révén fokozottan sejtvédő és kevésbé toxikus származékok előállítására is lehetővé válhat.

7. Összefoglalás

A Debreceni Egyetem kutatói által létrehozott molekulakönyvtár 1863 vegyületéből 29 védett a hidrogén-peroxid által indukált citotoxicitás ellen Jurkat sejtekben. Ezen vegyületek közül 11 antioxidáns aktivitással is rendelkezett, és kettőt találtunk hatékony PARP gátlónak. Négy sejtvédő dibenzoil-metán (DBM) származékot részletesen is tanulmányoztunk, mert nem rendelkeztek antioxidáns hatással, és nem gátolták a PARP enzim aktivitását.

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

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

Az egyik legáltalánosabban használt tumorellenes antraciklin a doxorubicin, amit sikeresen alkalmaznak a legkülönbözőbb szervek tumorellenes kemoterápiájában. A gyógyszer alkalmazásának egyik hátránya súlyos kardiotoxikus hatása, mert a doxorubicin kezelés a beteg teljes életciklusában kumulálódik. A doxorubicin tumorellenes hatása és kardiotoxicitása eltérő molekuláris mechanizmusokon alapszik, ezért lehetőség van arra, hogy a súlyos mellékhatás kiküszöbölésével érintetlenül hagyjuk tumorellenes hatását.

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

Summary

Screening of the 1863 compounds of a small in-house library (University of Debrecen) identified 29 compounds that protected Jurkat cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. From the cytoprotective compounds eleven proved to possess antioxidant activity (ABTS radical scavenger effect) and two were found to inhibit poly(ADPribose)-ation (PARylation), a cytotoxic pathway operating in severely injured cells. Four cytoprotective dibenzoyl-methane (DBM) derivatives were investigated in more detail as they did not scavenge hydrogen peroxide nor did they inhibit PARylation.

DBM compounds protected cells from necrotic cell death while caspase activation, a parameter of apoptotic cell death was not affected. Hydrogen peroxide activated extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) and p38 MAP kinases but not c-Jun N-terminal kinase (JNK). The cytoprotective DBMs suppressed the activation of Erk1/2 but not that of p38.

Cytoprotection was confirmed in another cell type (A549 lung epithelial cells), indicating that the cytoprotective effect is not cell type specific. In conclusion we identified DBM analogs as a novel class of cytoprotective compounds inhibiting ERK1/2 kinase and protecting from necrotic cell death by a mechanism independent of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition.

Antracyclines are effective anti-tumor agents. One of the most commonly used antracyclines is doxorubicin, which can be successfully used to treat a diverse spectrum of tumors. Application of these drugs is limited mainly by their cardiotoxic effect, which is determined by a lifetime cumulative dose. As the processes that are responsible for tumor chemotherapy and cardiotoxicity are different, this may give a hope for eliminating the side effect without affecting the anti-tumor effect.

In our work, 9,680 compounds of the Chembridge's Diverset compound library were screened to identify compounds that can protect H9C2 rat cardiomyocytes against doxorubicin-induced cell death. An MTT-based high throughput viability screening was performed followed by retesting of the hit compounds in a morphology-based assay. The most effective compound proved protective in doxorubicin-treated primary rat cardiomyocytes and was further characterized to demonstrate that it significantly decreased doxorubicin-induced apoptotic and necrotic cell death without having a radical scavenging effect or interfering with the antitumor effect of doxorubicin. This benzimidazole compound may lead – through further optimization – to the development of a drug candidate protecting the heart from doxorubicin-induced injury.

8. Felhasznált irodalom

Amacher, D.E. (2006). Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective. *Current drug metabolism* 7, 219-229.

Anand, P., Sung, B., Kunnumakkara, A.B., Rajasekharan, K.N., and Aggarwal, B.B. (2011). Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: role of Michael acceptors and Michael donors. *Biochem Pharmacol* 82, 1901-1909.

Andrieu-Abadie, N., Jaffrezou, J.P., Hatem, S., Laurent, G., Levade, T., and Mercadier, J.J. (1999). L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation. *FASEB J* 13, 1501-1510.

Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., and Ozyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12, 1496-1547.

Arozal, W., Watanabe, K., Veeraveedu, P.T., Thandavarayan, R.A., Harima, M., Sukumaran, V., Suzuki, K., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2010). Effect of telmisartan in limiting the cardiotoxic effect of daunorubicin in rats. *J Pharm Pharmacol* 62, 1776-1783.

Assefa, Z., Vantieghem, A., Declercq, W., Vandenabeele, P., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., de Witte, P., and Agostinis, P. (1999). The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *The Journal of biological chemistry* 274, 8788-8796.

Bai, P., Bakondi, E., Szabo, E., Gergely, P., Szabo, C., and Virag, L. (2001). Partial protection by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocytes. *Free Radic Biol Med* 31, 1616-1623.

Bai, P., Hegedus, C., Erdelyi, K., Szabo, E., Bakondi, E., Gergely, S., Szabo, C., and Virag, L. (2007). Protein tyrosine nitration and poly(ADP-ribose) polymerase activation in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-treated thymocytes: implication for cytotoxicity. *Toxicol Lett* 170, 203-213.

Bai, P., Mabley, J.G., Liaudet, L., Virag, L., Szabo, C., and Pacher, P. (2004). Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep* 11, 505-508.

Bansal, D., Bhalla, A., Bhasin, D.K., Pandhi, P., Sharma, N., Rana, S., and Malhotra, S. (2011). Safety and efficacy of vitamin-based antioxidant therapy in patients with severe acute pancreatitis: a randomized controlled trial. *Saudi J Gastroenterol* 17, 174-179.

Bassan, R., Lerede, T., Rambaldi, A., and Barbui, T. (1996). Role of anthracyclines in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Acta haematologica* 95, 188-192.

Bellia, F., Vecchio, G., Cuzzocrea, S., Calabrese, V., and Rizzarelli, E. (2011). Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Molecular aspects of medicine* 32, 258-266.

- Bencsik, P., Paloczi, J., Kocsis, G.F., Pipis, J., Beleczi, I., Varga, Z.V., Csonka, C., Gorbe, A., Csont, T., and Ferdinandy, P. (2014). Moderate inhibition of myocardial matrix metalloproteinase-2 by ilomastat is cardioprotective. *Pharmacol Res* 80, 36-42.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., and Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, 1865-1874.
- Bragt, P.C., and Bonta, I.L. (1980). Oxidant stress during inflammation: anti-inflammatory effects of antioxidants. *Agents Actions* 10, 536-539.
- Bruynzeel, A.M., Vormer-Bonne, S., Bast, A., Niessen, H.W., and van der Vijgh, W.J. (2007). Long-term effects of 7-monohydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 60, 509-514.
- Calvert, R.J., and Vohra, S. (2013). Doxorubicin-treated H9c2 cells: caution with luminescent ATP and Hoechst 33258 assays. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49, 95-96.
- Champoux, J.J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry* 70, 369-413.
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., and Karliner, J.S. (2010). Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 115, 155-162.
- Cheeseman, K.H., and Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin* 49, 481-493.
- Cuzzocrea, S. (2005). Shock, inflammation and PARP. *Pharmacol Res* 52, 72-82.
- Csont, T., Gorbe, A., Bereczki, E., Szunyog, A., Aypar, E., Toth, M.E., Varga, Z.V., Csonka, C., Fulop, F., Santha, M., et al. (2010). Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 48, 649-652.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry* 52, 601-623.
- Danesi, R., Fogli, S., Gennari, A., Conte, P., and Del Tacca, M. (2002). Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clinical pharmacokinetics* 41, 431-444.
- De Palma, A.M., Heggermont, W., Lanke, K., Coutard, B., Bergmann, M., Monforte, A.M., Canard, B., De Clercq, E., Chimirri, A., Pustinger, G., et al. (2008). The thiazolobenzimidazole TBZE-029 inhibits enterovirus replication by targeting a short region immediately downstream from motif C in the nonstructural protein 2C. *J Virol* 82, 4720-4730.
- de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., and Vermeulen, N.P. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 26, 202-226.
- Decoursey, T.E., and Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 2173-2193.

- Del Rio, D., Serafini, M., and Pellegrini, N. (2002). Selected methodologies to assess oxidative/antioxidant status in vivo: a critical review. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 12, 343-351.
- Denard, B., Lee, C., and Ye, J. (2012). Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *Elife* 1, e00090.
- Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P. (1999). Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 20, 911-914.
- Dong, H.Y., Buard, A., Levy, F., Renier, A., Laval, F., and Jaurand, M.C. (1995). Synthesis of poly(ADP-ribose) in asbestos treated rat pleural mesothelial cells in culture. *Mutat Res* 331, 197-204.
- Doroshov, J.H. (1986). Prevention of doxorubicin-induced killing of MCF-7 human breast cancer cells by oxygen radical scavengers and iron chelating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 135, 330-335.
- Dresdale, A.R., Barr, L.H., Bonow, R.O., Mathisen, D.J., Myers, C.E., Schwartz, D.E., d'Angelo, T., and Rosenberg, S.A. (1982). Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol* 5, 657-663.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82, 47-95.
- Ebert, B., Seidel, A., and Lampen, A. (2007). Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[a]pyrene-3-sulfate. *Toxicol Sci* 96, 227-236.
- Erdelyi, K., Bai, P., Kovacs, I., Szabo, E., Mocsar, G., Kakuk, A., Szabo, C., Gergely, P., and Virag, L. (2009). Dual role of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the regulation of cell death in oxidatively stressed A549 cells. *FASEB J* 23, 3553-3563.
- Erdelyi, K., Kiss, A., Bakondi, E., Bai, P., Szabo, C., Gergely, P., Erdodi, F., and Virag, L. (2005). Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Mol Pharmacol* 68, 895-904.
- Farbstein, D., Kozak-Blickstein, A., and Levy, A.P. (2010). Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules* 15, 8098-8110.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Frazier, M.C., Jackson, K.M., Jankowska-Stephens, E., Anderson, M.G., and Harris, W.B. (2004). Proteomic analysis of proteins altered by dibenzoylmethane in human prostatic cancer LNCaP cells. *Proteomics* 4, 2814-2821.
- Frederick, C.A., Williams, L.D., Ughetto, G., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Rich, A., and Wang, A.H. (1990). Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29, 2538-2549.

- Galal, S.A., Hegab, K.H., Hashem, A.M., and Youssef, N.S. (2010). Synthesis and antitumor activity of novel benzimidazole-5-carboxylic acid derivatives and their transition metal complexes as topoisomerase II inhibitors. *Eur J Med Chem* 45, 5685-5691.
- Geraets, L., Moonen, H.J., Brauers, K., Wouters, E.F., Bast, A., and Hageman, G.J. (2007). Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J Nutr* 137, 2190-2195.
- Gewirtz, D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57, 727-741.
- Ghafourifar, P., and Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in pharmacological sciences* 26, 190-195.
- Ghose, A.K., Viswanadhan, V.N., and Wendoloski, J.J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem* 1, 55-68.
- Gros, L., Saparbaev, M.K., and Laval, J. (2002). Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21, 8905-8925.
- Gutteridge, J.M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry* 41, 1819-1828.
- Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899, 136-147.
- Haidara, M.A., Yassin, H.Z., Rateb, M., Ammar, H., and Zorkani, M.A. (2006). Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Current vascular pharmacology* 4, 215-227.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology* 186, 1-85.
- Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology* 142, 231-255.
- Hare, J.M. (2001). Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circulation research* 89, 198-200.
- Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American journal of cardiology* 91, 7A-11A.
- Harrison, D.K. (2003). Physiological oxygen measurements using oxygen electrodes. *Advances in experimental medicine and biology* 510, 163-167.
- Hasinoff, B.B., Patel, D., and Wu, X. (2003). The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med* 35, 1469-1479.

- Hasinoff, B.B., Wu, X., Nitiss, J.L., Kanagasabai, R., and Yalowich, J.C. (2012). The anticancer multi-kinase inhibitor dovitinib also targets topoisomerase I and topoisomerase II. *Biochem Pharmacol* 84, 1617-1626.
- Hegedus, C., Lakatos, P., Kiss-Szikszai, A., Patonay, T., Gergely, S., Gregus, A., Bai, P., Hasko, G., Szabo, E., and Virag, L. (2013). Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death. *Pharmacol Res* 72, 25-34.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Luscher, B., Schuler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends in biochemical sciences* 35, 208-219.
- Iqbal, M., Dubey, K., Anwer, T., Ashish, A., and Pillai, K.K. (2008). Protective effects of telmisartan against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Rep* 60, 382-390.
- Jackson, K.M., Frazier, M.C., and Harris, W.B. (2007). Suppression of androgen receptor expression by dibenzoylmethane as a therapeutic objective in advanced prostate cancer. *Anticancer Res* 27, 1483-1488.
- Jagtap, P., Soriano, F.G., Virag, L., Liaudet, L., Mabley, J., Szabo, E., Hasko, G., Marton, A., Lorigados, C.B., Gallyas, F., Jr., et al. (2002). Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. *Crit Care Med* 30, 1071-1082.
- Jimenez, L.A., Zanella, C., Fung, H., Janssen, Y.M., Vacek, P., Charland, C., Goldberg, J., and Mossman, B.T. (1997). Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H₂O₂. *Am J Physiol* 273, L1029-1035.
- Kang, S.W., Rhee, S.G., Chang, T.S., Jeong, W., and Choi, M.H. (2005). 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in molecular medicine* 11, 571-578.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50.
- Kenis, Y., Michel, J., Rimoldi, R., Levy, P., and Israel, L. (1972). Results of a clinical trial with intermittent doses of adriamycin in lung cancer. *Eur J Cancer* 8, 485-489.
- Kockler, J., Robertson, S., Oelgemoller, M., Davies, M., Bowden, B., Brittain, H.G., and Glass, B.D. (2013). Butyl methoxy dibenzoylmethane. Profiles of drug substances, excipients, and related methodology 38, 87-111.
- Koshland, D.E., Jr. (1990). The molecule of the year. *Science* 250, 1637.
- Kovacic, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, N., and O'Brien, P.J. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current medicinal chemistry* 12, 2601-2623.
- Kovacs, K., Erdelyi, K., Hegedus, C., Lakatos, P., Regdon, Z., Bai, P., Hasko, G., Szabo, E., and Virag, L. (2012). Poly(ADP-ribosyl)ation is a survival mechanism in cigarette smoke-induced and hydrogen peroxide-mediated cell death. *Free Radic Biol Med* 53, 1680-1688.

- Kunduzova, O.R., Bianchi, P., Pizzinat, N., Escourrou, G., Seguelas, M.H., Parini, A., and Cambon, C. (2002). Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue regeneration by monoamine oxidases after renal ischemia-reperfusion. *FASEB J* 16, 1129-1131.
- Kwak, H.J., Pyun, Y.M., Kim, J.Y., Pagire, H.S., Kim, K.Y., Kim, K.R., Rhee, S.D., Jung, W.H., Song, J.S., Bae, M.A., et al. (2013). Synthesis and biological evaluation of aminobenzimidazole derivatives with a phenylcyclohexyl acetic acid group as anti-obesity and anti-diabetic agents. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 4713-4718.
- Kyriakis, J.M. (2001). Life-or-death decisions. *Nature* 414, 265-266.
- Lakatos, P., Szabo, E., Hegedus, C., Hasko, G., Gergely, P., Bai, P., and Virag, L. (2013). 3-Aminobenzamide protects primary human keratinocytes from UV-induced cell death by a poly(ADP-ribosylation) independent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1833, 743-751.
- Liaudet, L., Szabo, E., Timashpolsky, L., Virag, L., Cziraki, A., and Szabo, C. (2001). Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences. *British journal of pharmacology* 133, 1424-1430.
- Lin, C.C., Liu, Y., Ho, C.T., and Huang, M.T. (2011). Inhibitory effects of 1,3-bis-(2-substituted-phenyl)-propane-1,3-dione, beta-diketone structural analogues of curcumin, on chemical-induced tumor promotion and inflammation in mouse skin. *Food & function* 2, 78-83.
- Lin, C.C., Tsai, Y.L., Huang, M.T., Lu, Y.P., Ho, C.T., Tseng, S.F., and Teng, S.C. (2006). Inhibition of estradiol-induced mammary proliferation by dibenzoylmethane through the E2-ER-ERE-dependent pathway. *Carcinogenesis* 27, 131-136.
- Liochev, S.I., and Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox report : communications in free radical research* 7, 55-57; author reply 59-60.
- Lipinski, B. (2011). Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2011, 809696.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 3-26.
- Loeper, J., Goy, J., Klein, J.M., Dufour, M., Bedu, O., Loeper, S., and Emerit, J. (1991a). The evolution of oxidative stress indicators in the course of myocardial ischemia. *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 2, 675-680.
- Loeper, J., Goy, J., Rozensztajn, L., Bedu, O., and Moisson, P. (1991b). Lipid peroxidation and protective enzymes during myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 196, 119-125.
- Mabjeesh, N.J., Willard, M.T., Harris, W.B., Sun, H.Y., Wang, R., Zhong, H., Umbreit, J.N., and Simons, J.W. (2003). Dibenzoylmethane, a natural dietary compound, induces HIF-1 alpha and increases expression of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 279-286.

- Madamanchi, N.R., Hakim, Z.S., and Runge, M.S. (2005a). Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3, 254-267.
- Madamanchi, N.R., Vendrov, A., and Runge, M.S. (2005b). Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 29-38.
- Marczin, N., Bundy, R.E., Hoare, G.S., and Yacoub, M. (2003). Redox regulation following cardiac ischemia and reperfusion. *Coronary artery disease* 14, 123-133.
- McCord, J.M. (1998). Oxidants and antioxidants: The concept of balance. *Age* 21, 79-80.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244, 6049-6055.
- Miesel, R., Kurpisz, M., and Kroger, H. (1995). Modulation of inflammatory arthritis by inhibition of poly(ADP ribose) polymerase. *Inflammation* 19, 379-387.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Batkai, S., Kashiwaya, Y., Hasko, G., Liaudet, L., Szabo, C., and Pacher, P. (2009). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H1466-1483.
- Mulder, K.M. (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 11, 23-35.
- Nagata, Y., Takata, J., Karube, Y., and Matsushima, Y. (1999). Effects of a water-soluble prodrug of vitamin E on doxorubicin-induced toxicity in mice. *Biol Pharm Bull* 22, 698-702.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13, 9-22.
- Nosseri, C., Coppola, S., and Ghibelli, L. (1994). Possible involvement of poly(ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 212, 367-373.
- O'Sullivan, D.G., Pantic, D., and Wallis, A.K. (1967). New 1,2-disubstituted benzimidazoles with high inhibiting effects on poliovirus replication. *Experientia* 23, 704-706.
- Pacher, P., Liaudet, L., Bai, P., Mabley, J.G., Kaminski, P.M., Virag, L., Deb, A., Szabo, E., Ungvari, Z., Wolin, M.S., et al. (2003). Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* 107, 896-904.
- Pacher, P., Liaudet, L., Bai, P., Virag, L., Mabley, J.G., Hasko, G., and Szabo, C. (2002). Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 862-867.
- Pacher, P., Vaslin, A., Benko, R., Mabley, J.G., Liaudet, L., Hasko, G., Marton, A., Batkai, S., Kollai, M., and Szabo, C. (2004). A new, potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor improves cardiac and vascular dysfunction associated with advanced aging. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 485-491.

- Papp, A., Gulyas-Forro, A., Gulyas, Z., Dorman, G., Urge, L., and Darvas, F. (2006). Explicit Diversity Index (EDI): a novel measure for assessing the diversity of compound databases. *J Chem Inf Model* *46*, 1898-1904.
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., and Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of molecular biology* *304*, 55-68.
- Patel, A.G., and Kaufmann, S.H. (2012). How does doxorubicin work? *Elife* *1*, e00387.
- Pendeville, H., Carpino, N., Marine, J.C., Takahashi, Y., Muller, M., Martial, J.A., and Cleveland, J.L. (2001). The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Molecular and Cellular Biology* *21*, 6549-6558.
- Perkins, A., Nelson, K.J., Parsonage, D., Poole, L.B., and Karplus, P.A. (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in biochemical sciences*.
- Pigram, W.J., Fuller, W., and Hamilton, L.D. (1972). Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nature: New biology* *235*, 17-19.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F., and Chiarotto, E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Current medicinal chemistry* *11*, 1163-1182.
- Polyak, K., Wu, T.T., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Less death in the dying. *Cell death and differentiation* *4*, 242-246.
- Poole, L.B., and Nelson, K.J. (2008). Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. *Current opinion in chemical biology* *12*, 18-24.
- Rajanarender, E., Ramu, K., Reddy, A.S.R., and Shaik, F.P. (2008). Synthesis and in vitro study of novel isoxazolyl benzoimidazolyl benzamides, acrylamides and propionamides as antimicrobial agents. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* *47*, 1284-1290.
- Rashid, M., Husain, A., Shaharyar, M., and Sarafroz, M. (2014). Anticancer activity of new compounds using benzimidazole as a scaffold. *Anticancer Agents Med Chem* *14*, 1003-1018.
- Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Mancardi, D., Espey, M.G., Miranda, K.M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., and Wink, D.A. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biological chemistry* *385*, 1-10.
- Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., and Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters* *582*, 1783-1787.
- Rosenoff, S.H., Olson, H.M., Young, D.M., Bostick, F., and Young, R.C. (1975). Adriamycin-induced cardiac damage in the mouse: a small-animal model of cardiotoxicity. *J Natl Cancer Inst* *55*, 191-194.
- Roskoski, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* *66*, 105-143.

- Schraufstatter, I.U., Browne, K., Harris, A., Hyslop, P.A., Jackson, J.H., Quehenberger, O., and Cochrane, C.G. (1990). Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *The Journal of clinical investigation* 85, 554-562.
- Shen, G., Khor, T.O., Hu, R., Yu, S., Nair, S., Ho, C.T., Reddy, B.S., Huang, M.T., Newmark, H.L., and Kong, A.N. (2007). Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by natural dietary compounds sulforaphane and dibenzoylmethane alone and in combination in ApcMin/+ mouse. *Cancer research* 67, 9937-9944.
- Simunek, T., Sterba, M., Popelova, O., Adamcova, M., Hrdina, R., and Gersl, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 61, 154-171.
- Singletary, K., and MacDonald, C. (2000). Inhibition of benzo[a]pyrene- and 1,6-dinitropyrene-DNA adduct formation in human mammary epithelial cells by dibenzoylmethane and sulforaphane. *Cancer Lett* 155, 47-54.
- Sinks, L.F., and Mindell, E.R. (1975). Chemotherapy of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, 101-104.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82, 1107-1112.
- Soloviev, A.I., Tishkin, S.M., Parshikov, A.V., Ivanova, I.V., Goncharov, E.V., and Gurney, A.M. (2003). Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *British journal of pharmacology* 138, 837-844.
- Stohs, S.J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology* 6, 205-228.
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10, 1881-1896.
- Subburaman, S., Ganesan, K., and Ramachandran, M. (2014). Protective role of naringenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity in a rat model: histopathology and mRNA expression profile studies. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 33, 363-376.
- Szabo, C. (2003). Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett* 140-141, 105-112.
- Szanto, M., Brunyánszki, A., Kiss, B., Nagy, L., Gergely, P., Virag, L., and Bai, P. (2012). Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA repair protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 4079-4092.
- Szanto, M., Rutkai, I., Hegedus, C., Czikora, A., Rozsahegyi, M., Kiss, B., Virag, L., Gergely, P., Toth, A., and Bai, P. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. *Cardiovasc Res* 92, 430-438.
- Takano, K., Kitao, Y., Tabata, Y., Miura, H., Sato, K., Takuma, K., Yamada, K., Hibino, S., Choshi, T., Iinuma, M., et al. (2007). A dibenzoylmethane derivative protects dopaminergic

neurons against both oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1884-1894.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279, L1005-1028.

Tuncbilek, M., Kiper, T., and Altanlar, N. (2009). Synthesis and in vitro antimicrobial activity of some novel substituted benzimidazole derivatives having potent activity against MRSA. *Eur J Med Chem* 44, 1024-1033.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160, 1-40.

Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H., and Orrenius, S. (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 271, 31075-31085.

Varga, Z.V., Kupai, K., Szucs, G., Gaspar, R., Paloczi, J., Farago, N., Zvara, A., Puskas, L.G., Razga, Z., Tiszlavicz, L., et al. (2013). MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 62, 111-121.

Weber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., and Kopple, K.D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 2615-2623.

Vejpongsa, P., and Yeh, E.T. (2014). Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* 64, 938-945.

Virag, L. (2013). 50Years of poly(ADP-ribosyl)ation. *Molecular aspects of medicine* 34, 1043-1045.

Virag, L., Kerekgyarto, C., and Fachel, J. (1995). A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 185, 199-208.

Virag, L., Scott, G.S., Cuzzocrea, S., Marmer, D., Salzman, A.L., and Szabo, C. (1998). Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly (ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology* 94, 345-355.

Virag, L., and Szabo, C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54, 375-429.

Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., and Szabo, C. (2003). Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141, 113-124.

Volkova, M., and Russell, R., 3rd Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev* 7, 214-220.

Wang, H., Long, C.L., and Zhang, Y.L. (2005). A new ATP-sensitive potassium channel opener reduces blood pressure and reverses cardiovascular remodeling in experimental hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 1326-1333.

Weng, C.J., Yang, Y.T., Ho, C.T., and Yen, G.C. (2009). Mechanisms of apoptotic effects induced by resveratrol, dibenzoylmethane, and their analogues on human lung carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 57, 5235-5243.

Whisler, R.L., Goyette, M.A., Grants, I.S., and Newhouse, Y.G. (1995). Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. *Arch Biochem Biophys* 319, 23-35.

Xiao, J., Sun, G.B., Sun, B., Wu, Y., He, L., Wang, X., Chen, R.C., Cao, L., Ren, X.Y., and Sun, X.B. (2012). Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology* 292, 53-62.

Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.

Zhang, B., Wang, Y., and Su, Y. (2009). Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Lett* 286, 154-160.

Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.S., Lyu, Y.L., Liu, L.F., and Yeh, E.T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 18, 1639-1642.

Zhang, Y., Shi, H., Sun, G., Li, S., Xu, X., Ye, C., Li, X., and Wang, S. (2011). High glucose induces dysfunction and apoptosis in endothelial cells: is the effect of high glucose persistence more important than concentration? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119, 225-233.

Zhuang, S., Kinsey, G.R., Yan, Y., Han, J., and Schnellmann, R.G. (2008). Extracellular signal-regulated kinase activation mediates mitochondrial dysfunction and necrosis induced by hydrogen peroxide in renal proximal tubular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 732-740.

Zweier, J.L., Rayburn, B.K., Flaherty, J.T., and Weisfeldt, M.L. (1987). Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. *The Journal of clinical investigation* 80, 1728-1734.

9. Tárgyszavak

doxorubicin

apoptózis-nekrózis

hidrogén-peroxid

dibenzoil-metán származékok

benzimidazol származék

poli-ADP-riboziláció

kardiomiocita

extracelluláris szignál által szabályozott protein kinázok

doxorubicin

apoptosis-necrosis

hydrogen-peroxide

dibenzoyl-methane derivatives

benzimidazole derivative

poly(ADP-ribosyl)ation

cardiomyocytes

extracellular signal regulated protein kinase

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

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

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

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

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

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

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

11. Függelék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu



További Közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,242

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

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

Debrecen, 2015.06.05.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai

Hegedűs C, Petra Lakatos P, Kiss-Szikszai A, Patonay T, **Gergely S**, Gregus A, Bai P, Haskó G, Szabó É, Virág L: Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death

Pharmacological Research 72:25-34 (2013)

Gergely S, Hegedűs C, Lakatos P, Kovács, K, Gáspár R, Csont T, Virág L: High throughput screening identifies a novel compound protecting cardiomyocytes from doxorubicin damage

Oxidative Medicine and Cellular Longevity (2015) Article ID 178513, 12 pages