



1949

**A 2-ES TÍPUSÚ CUKORBETEGSÉG TERÁPIÁJÁBAN
ALKALMAZHATÓ GLIKOENZIM-INHIBITOROK *IN VITRO*
VIZSGÁLATA SORÁN FELMERÜLŐ NEHÉZSÉGEK ÉS AZOK
MEGOLDÁSA**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

szerző neve: Nagy-Szabó Kármén Annamária

témavezető neve: Dr. Gyémánt Gyöngyi

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémia Tudományok Doktori Iskola Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája (K/5) programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2020. augusztus 31.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Nagy-Szabó Kármén Annamária**. doktorjelölt 2016-2020 között a fent megnevezett Doktori Iskola Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája (K/5) programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2020. augusztus 31.

a témavezető aláírása

A 2-ES TÍPUSÚ CUKORBETEGSÉG TERÁPIÁJÁBAN ALKALMAZHATÓ GLIKOENZIM-INHIBITOROK IN VITRO VIZSGÁLATA SORÁN FELMERÜLŐ NEHÉZSÉGEK ÉS AZOK MEGOLDÁSA

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: Nagy-Szabó Kármén Annamária okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Tudományok doktori iskolája
(Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és kémiai biológiája, K/5 programja) keretében

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2020.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezető.....	1
2.	Irodalmi áttekintés.....	3
2.1	A cukorbetegség definíciója, csoportosítása és szövődményei.....	3
2.2	A T2DM kezelésének módjai.....	4
2.2.1	Életmódváltás.....	4
2.2.2	Gyógyszeres kezelés.....	5
2.2.2.1	Szulfonilurea-hatóanyagtartalmú készítmények.....	5
2.2.2.2	Biguanid-hatóanyagtartalmú készítmények.....	5
2.2.2.3	Tiazolidindion-hatóanyagtartalmú készítmények.....	6
2.2.2.4	Inzulinterápia.....	8
2.2.2.5	Kombinációs terápia.....	8
2.3	A T2DM terápiájának célenzimei.....	9
2.3.1	α -Amiláz.....	9
2.3.1.1	α -Amiláz enzim szerepe a T2DM-ben.....	11
2.3.1.2	α -Amiláz enzim aktivitásmérési módszerei.....	12
2.3.1.3	α -Amiláz inhibitorok.....	12
2.3.2	α -Glükózidáz.....	14
2.3.2.1	α -Glükózidáz enzim szerepe a T2DM-ben.....	15
2.3.2.2	α -Glükózidáz enzim aktivitásmérési módszerei.....	16
2.3.2.3	α -Glükózidáz inhibitorok.....	16
2.3.3	Glikogén foszforiláz.....	17
2.3.3.1	Glikogén foszforiláz enzim szerepe a T2DM-ben.....	19
2.3.3.2	Glikogén foszforiláz enzim aktivitásmérési módszerei.....	20
2.3.3.3	Glikogén foszforiláz inhibitorok.....	21
2.3.4	Aldóz reduktáz.....	22
2.3.4.1	Aldóz reduktáz szerepe a T2DM-ben.....	23
2.3.4.2	Aldóz reduktáz aktivitásmérési módszerei.....	24
2.3.4.3	Aldóz reduktáz inhibitorok.....	24
2.4	Inhibitor-promiszkuitás.....	25
2.4.1	Gyógyszer-promiszkuitás, mint a gyógyszerfejlesztés 'zsákutcája'.....	26
2.4.1.1	Az aggregációalapú gátlás azonosítására alkalmazható közvetett módszerek.....	27
2.4.1.2	Az aggregációalapú gátlás azonosítására alkalmazható közvetlen módszerek.....	29
2.4.2	Gyógyszer-promiszkuitás, mint a gyógyszerfejlesztés lehetőségeinek 'tárháza'.....	30
3.	Célkitűzések.....	33
4.	Vizsgálati eredmények és értékelésük.....	34

4.1	Új, ITC-alapú módszer kidolgozása a glikogén foszforiláz enzim aktivitásának mérésére	34
4.1.1	RmGF által katalizált enzimreakció karakterizálása ITC-vel	34
4.1.2	Hatásos aktivátorkoncentráció kiválasztása.....	35
4.1.3	Szubsztrátspecifitász vizsgálata	36
4.1.4	RmGFb szubsztrátgátlása	38
4.1.5	Gátlásvizsgálatok	39
4.2	Tiazolidinonszármazékok promiszkuis jellegének és aggregációra való hajlamának vizsgálata	46
4.2.1	Promiszkuitásra irányuló biokémiai vizsgálatok.....	47
4.2.2	AAG prognosztizálása az <i>Aggregator Advisor</i> szoftver segítségével	50
4.2.3	Detergenssel szembeni érzékenység vizsgálata	51
4.2.4	Enzim-inhibitor előinkubálás hatásának vizsgálata	58
4.2.5	Enzimkoncentráció-változtatás hatásának vizsgálata	64
4.2.6	Centrifugálás hatásának vizsgálata.....	68
4.2.7	AAG közvetlen módszerrel történő azonosítása	70
5.	Anyagok és módszerek	77
5.1	Alkalmazott pufferek	77
5.2	Felhasznált enzimek	78
5.3	Felhasznált szubsztrátok.....	79
5.4	Felhasznált inhibitorok	79
5.5	Kinetikai és gátlási vizsgálatok izotermális titrálási kalorimetriával (ITC)	81
5.5.1	ITC-alapú módszer kidolgozása az rmGFb enzim aktivitásának mérésére	83
5.5.2	Az akarbóz és az alleppó tannin promiszkuis jellegének és aggregációra való hajlamának vizsgálata.....	86
5.6	Természetes (akarbóz, tannin) és szintetikus eredetű (2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok) inhibitorok promiszkuis jellegének és aggregációra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel.....	88
5.6.1	Promiszkuis jelleg vizsgálata.....	88
5.6.2	Aggregációalapú gátlás közvetett stratégia szerinti vizsgálata	90
5.7	Az rmGFb aktivitásmérésre alkalmas módszer reakciókörülményeinek optimalizálása és az enzim gátlásvizsgálata HPLC módszerrel.....	91
5.8	Természetes (akarbóz, tannin) és szintetikus eredetű (2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok) inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata DLS módszerrel.....	92
6.	Összefoglalás	93
7.	Summary.....	97
8.	Irodalomjegyzék	101
9.	Tudományos munkásság	115
10.	Függelék.....	118

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, *Dr. Gyémánt Gyöngyi* egyetemi docensnek szeretnék köszönetet mondani, aki szakértelmével, tanácsaival és iránymutatásaival lassan egy évtizede segíti munkámat. Végtelenül hálás vagyok, amiért elfogadta és mindvégig támogatta ambíciózus törekvéseimet, illetve mindig biztosította számomra a megfelelő időt ahhoz, hogy maximálisan felkészültnék érezhessem magamat a vizsgákon vagy konferenciaelőadásokon. Az ő támogatásának köszönhetően lehetőségem nyílt elvégezni a Természettudományi szakfordító szakirányú továbbképzést.

Hálás vagyok *Dr. Kandra Lilinek*, amiért hasznos szakmai tanácsaival, illetve javaslataival hozzájárult tudományos közleményeim megírásához.

Köszönettel tartozok *Dr. Batta Gyula* egyetemi tanárnak és *Dr. Bécsi Bálint* egyetemi adjunktusnak, hogy igénybe vehettem a kutatócsoportjukban lévő ITC készülékeket. Szintén köszönöm *Dr. Kuki Ákos* egyetemi docensnek, amiért lehetővé tette a DLS méréseim kivitelezését.

Szeretném továbbá megköszönni *Dr. Somsák László* egyetemi tanárnak, illetve kutatócsoportjának, hogy rendelkezésemre bocsátották a gátlásvizsgálataimhoz alkalmazott GTH vegyületet.

Köszönöm *Dr. Fábrián Istvánnak* és *Dr. Gáspár Attilának*, mint a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék korábbi és jelenlegi vezetőjének, hogy lehetőséget biztosítottak a doktori értekezésem alapjául szolgáló kísérletek megvalósítására.

Hálával és köszönettel tartozok *Dr. Lehoczki Gábornak*, aki a kutatócsoportba kerülésem első pillanatától kezdve bátorított, támogatott, és szakmai, valamint baráti tanácsokkal látott el. Szakmai kompetenciája, elhivatottsága, türelme és segítőkészsége egyaránt követendő példaként szolgált számomra. Köszönöm továbbá *Hámori Csabának*, hogy gyakran a saját feladatait félretéve segítette munkámat.

Köszönöm a *GINOP-2.3.2-15-2016-00008*, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium *ÚNKP-19-3* kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának az anyagi támogatást.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném őszinte hálámat kifejezni *férjemnek*, aki támogatásával, türelmével és olykor megdorgálásával mindig arra ösztönzött, hogy a legjobbat hozzam ki magamból. Nélküle ez a doktori értekezés nem valósulhatott volna meg. Köszönetet szeretnék még mondani *édesapámnak*, *testvéreimnek* és *barátaimnak*, amiért egyetemi tanulmányaim során végig támogattak és bátorítottak.

Rövidítések jegyzéke

AAG	Aggregációalapú gátlás (ABI: Aggregation-Based Inhibition)
AAI	Aggregációalapú inhibitor
AGE	Előrehaladott glikációs végtermék (Advanced Glycation End Products)
AMP	Adenozin-monofoszfát
AR	Aldóz reduktáz
ARI	Aldóz reduktáz inhibitor
ATP	Adenozin-trifoszfát
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
CAZy	Szénhidrátokon ható enzimek (Carbohydrate-Active enZymes)
CNP-G7	2-Klór-4-nitrofenil- β -D-maltoheptaozid
DLS	Dinamikus fényszórásmérés (Dynamic Light Scattering)
DM	Diabétesz mellitusz
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EC	Enzim Bizottság (Enzyme Commission)
EC ₅₀	Félhatásos aktivátorkoncentráció
EDTA	Etiléndiamin-tetraecetsav
EI	Enzim-inhibitor komplex
ESI	Enzim-szubsztrát-inhibitor komplex
ESI-MS	Elektroporlasztásos ionizációs-tömegspektrometria (Electrospray Ionization Mass Spectroscopy)
FK	Foszforiláz kináz
G-1-P	Glükóz-1-foszfát
G5	Maltopentaóz
G-6-P	Glükóz-6-foszfát
G7	Maltoheptaóz
GalG ₂ CNP	2-Klór-4-nitrofenil-O- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glükopiranozil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glükopiranozid
GF	Glikogén foszforiláz
GS	Glikogén szintáz
GTH	Glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin
HDL	Nagy sűrűségű lipoprotein (High-Density Lipoprotein)
HILIC	Hidofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfia (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPA	Humán hasnyálmirigy-eredetű α -amiláz (Human Pancreatic α -Amylase)
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
HSA	Humán nyál eredetű α -amiláz (Human Salivary α -Amylase)
HTS	Nagy áteresztőképességű szűrés (High-Throughput Screening)
IC ₅₀	Az az inhibitor koncentráció, ami ahhoz szükséges, hogy az enzimaktivitás a felére csökkenjen
IDF	Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation)
ITC	Izotermális titrálási kalorimetria (Isothermal Titration Calorimetry)
k _{cat}	Katalitikus állandó (átviteli szám)
kcps	Kilo counts per second
K _i	Gátlási állandó
K _i [*]	Látszólagos gátlási állandó
K _M	Michaelis-állandó

MALDI-TOF MS	Mártix által segített lézerdeszorpciós ionizáció-repülési idő tömegspektrometria (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry)
MeCN	Acetonitril
MES	2-(N-morfolinó)-etánszulfonsav
Mt	Moláris tömeg
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
PDI	Polidiszperzitás index
P _i	Szervetlen foszfát
PNP- α -Glc	p-nitrofenil- α -D-glükopiranozid
PP1	Protein foszfatáz 1
PPA	Sertéshasnyálmirigy-eredetű α -amiláz (Porcine Pancreatic α -Amylase)
PPAR γ	Peroxiszóma proliferátor-aktivált γ -receptor
rmGFb	Nyúlvázizom-eredetű glikogén foszforiláz b (Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase)
ROS	Reaktív oxigén intermedier (Reactive Oxygen Species)
R&D	Kutatás és fejlesztés (Research and Development)
SAR	Szerkezet-aktivitás összefüggés (Structure-Activity Relationship)
T1DM	1-es típusú diabétesz mellitusz
T2DM	2-es típusú diabétesz mellitusz
TBDD	Targetalapú gyógyszertervezés (Target-Based Drug Discovery)
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkópia
TIM	Trióz-foszfát izomeráz
TZD	Tiazolidindion
UV-VIS	Ultraibolya-látható (Ultraviolet-Visible)
v ₀	Kezdeti sebesség
v _{max}	Enzimreakció maximális sebessége
ΔH	Entalpiaváltozás

1. Bevezető

A Nemzetközi Diabétesz Szövetség (International Diabetes Federation, IDF) legújabb felmérése szerint a világon mintegy 463 millió ember szenved 2-es típusú cukorbetegségben (T2DM). Ez a szám becslések szerint 2045-re körülbelül 51%-kal nőhet, vagyis a betegséggel élők száma 700 millióra emelkedhet. 2019-ben megközelítőleg 4,2 millió felnőtt veszítette életét a diabétesz és annak szövődményei (például neuropátia, szív-és érrendszeri betegségek, nefropátia, stb.) következtében, azaz minden nyolcadik másodpercben bekövetkezett egy haláleset [1]. Ennélfogva, a szénhidrát-anyagcsere szabályozására, a cukorbetegség megelőzésére, valamint kezelésére irányuló kutatások kiemelkedően fontosak. Figyelembe véve, hogy a diabétesz legjellemzőbb tünete a rendellenesen magas vércukorszint, ami a szövődmények kialakulásának elsődleges kiváltó oka, terápiájának alapvető célja a vér glükózkoncentrációjának fiziológias értéken tartása. Habár jelenleg számos hatékony gyógyszer (elsősorban inzulinhatást javító vagy inzulinkiválasztást serkentő készítmények) kapható kereskedelmi forgalomban, az általuk kiváltott mellékhatások miatt új, biztonságosabb alternatív terápiák kidolgozásra van szükség [2]. Az utóbbi években egyre nagyobb tudományos érdeklődésre tett szert a szénhidrátokon ható enzimek, az ún. glikoenzimek gátlása, mint a T2DM terápiájának egyik ígéretes módja. E stratégia alapvető célja a posztprandiális vércukorszint-emelkedés mértékének csökkentése. Az elsődleges biológiai célpontok közé az α -amiláz, az α -glükozidáz és a glikogén foszforiláz enzim tartozik [3-5]. Egy megfelelő farmakológiai tulajdonságokkal rendelkező inhibitor tervezése azonban meglehetősen bonyolult. Először is, szükség van a célenzim alapos ismeretére (szerkezet, mechanizmus, stabilitás, szubsztrátspecificitás, optimális működési körülmények, stb.). A megfelelő ismeretek birtokában választhatjuk ki/dolgozhatjuk ki az *in vitro* gátlásvizsgálat kivitelezésére legalkalmasabb módszert. Egy új aktivitásmérési módszer kidolgozása gyakran rendkívül összetett folyamat. Egyrészt számos enzim reverzibilis folyamatot katalizál, mely során a reakció *in vivo* irányát az egyensúlyi állandó és az egyes reaktánsok sejten belüli aránya határozza meg. A kutatók az enzimaktivitás-mérések során a szubsztrátokat a termékkoncentrációhoz képest jelentősen nagyobb mennyiségben alkalmazzák annak érdekében, hogy biztosítsák a reakció egyirányúságát. Néha azonban szükség van mindkét irányú reakció vizsgálatára. Ebben az esetben az eltérő reakciókörülmények miatt a különböző irányokban meghatározott kinetikai és/vagy gátlási paraméterek kevésbé összevethetők.

A gyógyszertervezés és fejlesztés másik nehézsége, hogy a már megtervezett és szintetizált gátlószerek gyakran bizonyulnak 'zsákutcának'. A gyógyszerfejlesztés szempontjából egyik

legkedvezőtlenebb jelenség a gyógyszerek vagy gyógyszerjelöltek nonspecifikus, ún. promiszkuis jellege. Ha a promiszkuitásnak csupán a definícióját tekintjük, vagyis hogy egyetlen inhibitor segítségével több, egymástól jelentősen eltérő enzimet lehet egyidejűleg gátolni, akkor a jelenség pozitívan is értékelhető. Az ilyen több célponton ható promiszkuis vegyületek megteremtik a lehetőséget a komplex betegségek (például a cukorbetegség) kezelésének több célnyomon keresztül történő megvalósítására. A legtöbb esetben azonban a promiszkuitás háttérben aggregátumok képződése áll, ami az adott inhibitor specifikus jellegének elvesztésével jár. A gyógyszeripar az ilyen típusú gátlószerekkel történő további kísérletezést rendszerint megszünteti, ugyanis ha egy vegyület nem csak a kívánt célnyom aktivitását képes csökkenteni, megnő a kockázata a lehetséges mellékhatások kialakulásának. Mindezek alapján elmondható, hogy egy új és hatékony antidiabetikum kifejlesztése, illetve engedélyeztetése rengeteg időt és anyagi forrást igényel. Ezért még inkább fontossá vált, hogy a glikoenzim-inhibitorok *in vitro* vizsgálataihoz még precízebb aktivitásmérési módszereket alkalmazzunk, és a kísérletek eredményeiből még körültekintőbben vonjuk le következtetéseinket. Ezek a tapasztalatok ugyanis nagymértékben elősegíthetik a gyógyszeripari kutatásokat is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A cukorbetegség definíciója, csoportosítása és szövődményei

A cukorbetegség, latinul *diabetes mellitus* (DM), olyan szénhidrátanyagcsere-zavar, melyet rendellenesen magas vércukorszint (hiperglikémia) jellemez. A betegség kialakulásának oka a hasnyálmirigy inzulintermelő képességének elégtelensége vagy a szövetek inzulinnal szembeni csökkent érzékenysége vagy mindkettő. Ebben a kóros állapotban a szervezet nem képes megfelelően szabályozni a vérben lévő glükóz mennyiségét és hasznosítását, ami a vércukorszint megemelkedését eredményezi [6].

A cukorbetegségnek két, egymástól jelentősen eltérő típusát különböztetjük meg: az inzulinfüggő 1-es típusú diabétesz mellituszt (T1DM) és a nem inzulinfüggő 2-es típusú diabétesz mellituszt (T2DM). Az előbbi elsősorban gyermekeknél és fiataloknál jelentkezik, míg az utóbbi többnyire felnőttkorban alakul ki. A T1DM egy olyan autoimmun betegség, mely során a hasnyálmirigy inzulintermelő β -sejtjei részben vagy teljesen elpusztulnak. Ennek hátterében az immunrendszer hibás működése áll, melynek következtében a szervezet nem ismeri fel a saját sejtjeit. Mivel a szervezet a β -sejteket idegenként azonosítja, olyan autoimmun folyamatok indulnak el (pl. autoantitestek termelése), melyek elsődleges feladata az inzulintermelő sejtek elpusztítása. A cukorbetegség tünetei akkor jelentkeznek, amikor a β -sejtek körülbelül 60%-a már elpusztult. A tünetmentes időszak után először az ún. exogén hiperglikémia, vagyis csökkent szénhidrát-tolerancia alakul ki. Ekkor a szénhidrátbevitelt követően a vér glükózkoncentrációja nagyobb mértékben emelkedik meg, mint az egészséges szervezetek esetében. Az exogén hiperglikémia következtében csökken a májban végbemenő glikogénképzés, a glükózból történő zsírsavképzés, illetve a zsírsejtek és izomsejtek glükózfelvétele. A β -sejtek további pusztulása endogén hiperglikémiához vezet. Ebben a kóros állapotban fokozódik a glükoneogenezis (glükóz nemszénhidrát-prekursorokból való szintézise), melynek eredményeképpen a vérplazma glükózsintje szénhidrátbevitel nélkül is folyamatosan magas. Ezt követően a β -sejtek száma még tovább csökken, végül pedig az inzulin teljes mértékben eltűnik a vérből és a hasnyálmirigyszövetekből [7-8].

A T2DM sokkal gyakoribb, mint a T1DM; a cukorbetegségben szenvedők mintegy 90-95% tartozik ide. Ez a típus egy heterogén eredetű anyagcsere-rendellenesség, mely kialakulásában genetikai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak. A T1DM-mel szemben, a T2DM esetében a hasnyálmirigy β -sejtjei képesek ugyan inzulint termelni, viszont a sejtek felszínén található inzulinreceptorok hibás működésének következtében a hormon nem tudja kifejteni vércukorszint-csökkentő hatását (glükóztermelés csökkentése a májban, glikogénszintézis fokozása az izmokban és a májban). A sejtek inzulinnal szembeni érzéketlenségét

inzulinrezisztenciának nevezzük, mely a T2DM kezdeti szakaszára jellemző. Mivel inzulinrezisztencia esetén a receptorok diszfunkciója miatt egy adott inzulinmennyiség nem képes a sejtekből megfelelő válaszreakciót kiváltani, a hasnyálmirigy még több inzulint állít elő annak érdekében, hogy mindenképpen elérje a glükóz sejtekbe történő beépülését. Bizonyos idő elteltével azonban a szervezet képtelenné válik kielégíteni ezt a jelentős mértékű inzulinigényt, ami a le nem bontott glükóz felhalmozódásához, és ezáltal a T2DM kialakulásához vezet [9-10].

A DM nagy halálozási aránya elsődlegesen a betegség hosszú távú szövődményeire vezethető vissza. E krónikus szövődmények leggyakrabban a keringési rendszert érintik. A hosszú ideig tartó magas vércukorszint hatására a kis (mikrovaszkuláris) és a nagy (makrovaszkuláris) vérerekben különféle kóros elváltozások mennek végbe. A nagy vérerekben sokáig fennálló rendellenesen magas vércukorszint szívinfarktushoz, perifériás érbetegséghez vagy agyi érkatasztrófához (stroke) vezethet. A mikrovaszkuláris szövődmények akkor alakulnak ki, ha a hajszálerekben hosszú ideig rendkívül nagy a vér glükózkoncentrációja. Ennek következtében károsodhatnak az erek, látásprobléma (retinopátia), vesebetegség (nefropátia), idegkárosodás (neuropátia) vagy keringési elégtelenség léphet fel. A diabétesz során kialakuló keringészavarok gyakran a cukorbetegség végtag-amputációját eredményezik [11].

2.2 A T2DM kezelésének módjai

2.2.1 Életmódváltás

A megfelelő étrend és a testmozgás az egészséges életmód két fő meghatározó tényezője, mely a cukorbetegség megelőzésében és terápiájában is kiemelkedően fontos szerepet játszik [12]. A helyes életmódra való áttérés nemcsak a szénhidrát-anyagcsere rendezéséhez járul hozzá, hanem csökkenti a cukorbetegség előrehaladásának mértékét, valamint a szövődmények kialakulásának esélyét is. Tehát a T2DM kezelésének első és legjelentősebb része az életmódváltás; a túlsúly csökkentése, az egészséges táplálkozásra való áttérés, a rendszeres testmozgás, a dohányzás abbahagyása, a vérnyomás, valamint a vércukorszint folyamatos ellenőrzése [13]. Az optimális testsúly elérése/megőrzése érdekében a dietetikusok többek között a telített zsírok bevitelének csökkentését, a hozzáadott cukrot tartalmazó termékek mellőzését és a magas rosttartalmú ételek fogyasztását javasolják [14]. Továbbá a rendszeres fizikai aktivitás is elősegíti a vér glükózkoncentrációjának csökkenését azáltal, hogy fokozza az inzulinnal szembeni érzékenységet, ami a glükózsabályozás javulásához vezet [15]. Többféle hipotézis létezik arról, hogy a testmozgás milyen mechanizmus révén állítja helyre az inzulinérzékenységet. Ezek közé tartozik a hasüregi zsír mennyiségének csökkenése, a sejtek

glükózfelvételének fokozódása a vázizomban található inzulinérzékeny glükóztranszporterek (GLUT-4) számának növekedése miatt, az inzulinérzékeny szövetek fokozott véráramlása és a szabad zsírsav szintjének csökkenése [16]. A mozgás továbbá hozzájárul a megfelelő vérnyomás eléréséhez és fenntartásához, javítja a szívizom teljesítményét, valamint megemeli a vér HDL-koleszterin (high density lipoprotein – nagy sűrűségű lipoprotein) szintjét [17].

2.2.2 Gyógyszeres kezelés

Ha a diéta és az életmódbeli változtatás önmagában nem elegendő a vércukor megfelelő szinten tartásához, hipoglikémiás szerek alkalmazására van szükség. Ezek többnyire szájon át szedhető tabletták (orális antidiabetikumok), melyeket gyakran kombinálnak más gyógyszerekkel (akár magával az inzulinnal) a nagyobb hatékonyság elérése érdekében. Napjainkban számos olyan gyógyszer kapható kereskedelmi forgalomban, melyek hatóanyagai különféle mechanizmusok révén fejtik ki vércukorszint-csökkentő hatásukat. Ide tartoznak többek között a szulfonilureák, a biguanidok, a tiazolidindionok (TZD-k), melyek vagy inzulinhatás-javító szerek, vagy inzulinkiválasztást serkentő készítmények, továbbá az inzulin [18].

2.2.2.1 Szulfonilurea-hatóanyagtartalmú készítmények

A szulfonilureákat, vagy más néven szulfonil-karbamidokat, már 1942 óta használják a T2DM kezelésére. Az antidiabetikumok e csoportjába tartozó gyógyszerhatóanyagok (glipizid, gliburid, tolbutamid, klórpropamid) olyan módon fejtik ki antihyperglükémiás hatásukat, hogy stimulálják a hasnyálmirigy β -sejtjeit, és a fokozott inzulinfelszabadulás eredményeképpen csökken a vércukorszint [19]. A jelenleg rendelkezésre álló valamennyi szulfonilurea a β -sejtek meghatározott receptoraihoz kötődik, ami az ATP-szenzitív K^+ -csatornák bezáródását és ezzel egyidejűleg a Ca^{2+} -csatornák megnyílását eredményezi. Ennek következtében, a citoplazmatikus kalcium koncentrációja megnő, ami serkenti az inzulin felszabadulását [20]. A szulfonilurea-hatóanyagtartalmú gyógyszerek alkalmazásának legnagyobb hátránya, hogy hipoglikémiát és testsúlynövekedést is okozhatnak, a betegek csupán egyharmadánál bizonyulnak eredményesnek, továbbá negatív hatást gyakorolhatnak a szív- és érrendszerre [21].

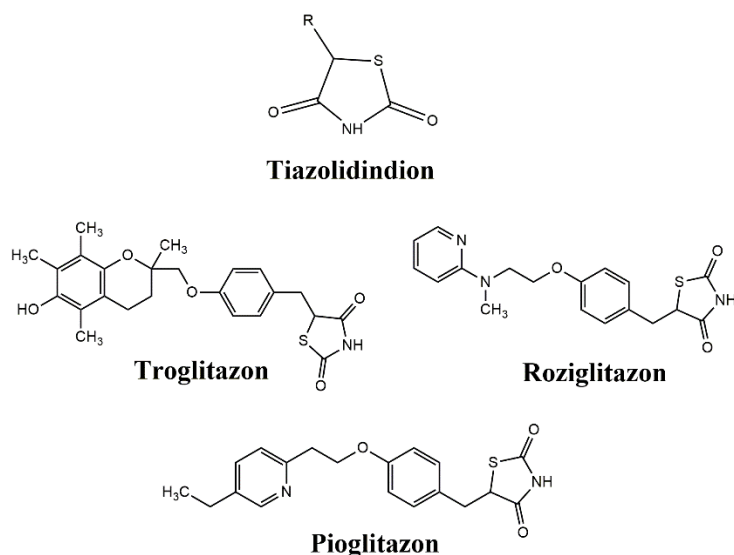
2.2.2.2 Biguanid-hatóanyagtartalmú készítmények

A biguanid-hatóanyagtartalmú vércukorcsökkentő készítmények első jelentősebb képviselője a fenformin volt, melyet azonban az 1970-es évek második felében visszahívtak a piacról. 20 évvel később került forgalomba a metformin elnevezésű második generációs biguanid típusú készítmény, mely hatékonysága és biztonságossága miatt rövid idő alatt gyorsan elterjedt [22].

20 évvel később került forgalomba a metformin elnevezésű második generációs biguanid típusú készítmény, mely hatékonysága és biztonságossága miatt rövid idő alatt gyorsan elterjedt [22]. Napjainkban a T2DM kezelésére leggyakrabban a metformint írják fel először a szakemberek. A metformin az inzulinhatás-javító készítmények közé tartozik, mely olyan módon fejti ki hatását, hogy csökkenti a májban felszabaduló glükóz mennyiségét, fokozza az izmok glükózfelhasználását, és ezzel egyidejűleg lassítja a glükóz belekben történő felszívódását, illetve csökkenti a perifériás inzulinrezisztencia mértékét. A vegyület további előnyeként említhető meg, hogy képes csökkenteni a vérsírt, valamint növelni a vér HDL-koleszterin szintjét. A szulfonilurea készítményekkel szemben, a metformin nem okoz testsúlynövekedést, és nem járul hozzá a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásához. Mivel a metformin magára az inzulinkiválasztásra nincs hatással, alkalmazása nem, vagy nagyon ritkán eredményez kórosan alacsony vércukorszintet (hipoglikémiát) [23-24].

2.2.2.3 Tiazolidindion-hatóanyagtartalmú készítmények

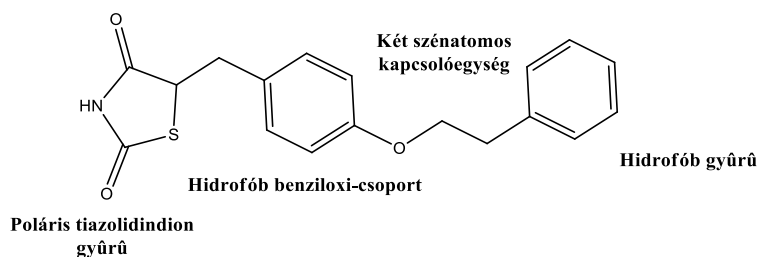
A TZD-hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek (1. ábra) a metforminhoz hasonlóan nem az inzulinszekréciót serkentik, hanem a célszövetek (izmok, zsírszövetek, máj) inzulinérzékenységét növelik [25]. Ezért a TZD-k, mint például a troglitazon, a pioglitazon és a roziglitazon nem okoznak hipoglikémiát.



1. ábra: Tiazolidindion-szerkezettel rendelkező gyógyszerhatóanyagok

Habár a TZD-k inzulinérzékenyítő mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, hatásukat valószínűleg a peroxiszóma proliferátor-aktivált γ -receptorokhoz (PPAR γ) való kötődésük révén tudják kifejteni [26]. Az emberi szervezetben ezek a receptorok a zsírszövetekben, a vázizomban, illetve a májban található meg, és a lipogenezisben (zsírszintézis) vesznek részt.

E magreceptor aktiválódása a zsírsav- és glükózfelvétel fokozódását, valamint a szabad zsírsavak mennyiségének csökkenését eredményezi, ami a zsírsavcsere javulásához vezet. A TZD-k PPAR γ receptorhoz való kötődése után egy olyan heterodimer PPAR γ -retinoid-X-receptor komplex jön létre, mely elősegíti az inzulin hatásának kifejtésében fontos szerepet játszó enzimek és egyéb transzporter fehérjék (pl. GLUT-4, zsírsavtranszporterek) géntranszkripcióját. Továbbá a glükóztranszporterek szintézisének serkentése révén hozzájárulnak az izomsejtek fokozott glükózfelvételéhez és ezzel egyetemben a májból történő glükózkiáramlás csökkenéséhez [27]. A TZD-k csoportjába tartozó gyógyszerek tehát hatékonyan képesek növelni a perifériás szövetek és a máj inzulinnal szembeni érzékenységét, fokozzák az inzulindependens glükózfelhasználást, csökkentik a glükóz májból történő felszabadulását és a trigliceridek mennyiségét, növelik a HDL-koleszterin koncentrációját, meggátolják a posztprandiális hiperglikémia bekövetkezését és a hemoglobin glikozilációját [28]. Mindezen előnyök ellenére csupán egyetlen TZD, a pioglitazon van jelenleg forgalomban (Actos). A troglitazon forgalmazását például 1997-ben hagyták jóvá, azonban 3 évvel később már vissza is vonták a piacokról a ritka, de végzetes kimenetelű mellékhatásai miatt [29]. Hasonló volt a helyzet a roziglitazon esetében is; kezdetben ugyan nagyon hatékony antidiabetikumnak bizonyult, de néhány évvel később kimutatták, hogy súlyosan károsítja a szív-és érrendszert [30]. E kudarcok azonban nem tántorították el a kutatókat attól, hogy újabb és újabb TZD vegyületeket tervezzenek és szintetizáljanak. A tiazolidin(di)on-alapváz különféle szubsztituensekkel való ellátása révén igyekeznek egyrészt kiküszöbölni a korábban felmerült mellékhatásokat, másrészt elérni és fokozni a kívánt biológiai hatást. A szakirodalomban számos olyan publikáció található, melyben a különböző TZD származékok változatos biológiai aktivitásáról számolnak be, többek között a fájdalomcsillapító, epilepsziaellenes [31], gyulladáscsökkentő [32], antimikrobiális [33], tuberkulotikus [34], központi idegrendszert stimuláló [35], antiproliferatív [36], HIV-ellenes [37], görcsoldó [38] és hisztamingátló hatásokról [39]. Prashantha Kumar és munkatársai például a szerkezet-aktivitás összefüggésre (SAR) irányuló vizsgálataikat követően megállapították, hogy a TZD vegyületek nagyobb antihyperglykémias aktivitásának eléréséhez a poláris tiazolidindion heterociklusos gyűrűt olyan hidrofób karakterű benziloxi-csoporttal kell ellátni, mely egy két szénatomos egységen keresztül kapcsolódik egy hidrofób gyűrűhöz (2. ábra) [40-41].



2. ábra: A tiazolidindionszármazékok hatékonyságát biztosító molekuláris szerkezet

2.2.2.4 Inzulinterápia

Habár a T1DM kezelése során az inzulinterápia az általános protokoll, a T2DM-ben szenvedő betegeknek a szakemberek csak akkor javasolják az inzulinra történő áttérést, ha az orális antidiabetikumok már nem elég hatásosak. Előfordul azonban, hogy a hosszú időn keresztül fennálló T2DM T1DM-mé alakul át, vagyis a kezdeti inzulinrezisztenciát az inzulintermelés teljes megszűnése követi, ilyenkor pedig már csak az állandósított inzulinterápia jöhet szóba [42-43]. A korábban használatos sertés- és marhapankreasz-eredetű inzulinkészítményeket napjainkra felváltották a humán inzulinkészítmények, illetve inzulinanalógok. Az analógok előállításának célja, hogy a humán inzulinmolekulán végrehajtott különféle változtatások révén hosszantartó egyenletes hatást érjenek el [44-45]. Az első inzulinanalóg a lispro inzulin volt, amely a humán inzulintól a két aminosav (BPro28-Lys29) sorrendjében különbözik [46]. Habár a lispro inzulin segítségével minimalizálni lehet az étkezés utáni glükózsint-növekedést, illetve csökkenteni lehet a mellékhatásként fellépő hipoglikémia kockázatát [47], még mindig fenntartással kezelik az inzulinterápia alkalmazását a T2DM esetében. Az inzulinterápia ugyanis további testsúlynövekedést okozhat a gyakran amúgy is túlsúllyal rendelkező 2-es típusú cukorbetegknél [48], ráadásul az exogén inzulinkezelés perifériás hiperinzulinémiához (a vér rendellenesen magas inzulinszintje) vezethet, megnövelve így a szív-és érrendszeri betegségek kialakulásának kockázatát [49].

2.2.2.5 Kombinációs terápia

A jelenleg rendelkezésre álló valamennyi orális antidiabetikum (biguanidok, szulfonilureák és tiazolidindionok) használható monoterápiásan [50]. Amennyiben 3-6 hónap elteltével a monoterápiás gyógyszeres kezeléssel nem lehet elérni a kívánt hatást, vagy az adott gyógyszert az ajánlott maximális dózishoz közeli mennyiségben kellene alkalmazni, szükségessé válik a kombinációs terápiára való áttérés. Abban az esetben, ha két gyógyszer együttes alkalmazása is elégtelennek bizonyul, megkísérelhető a hármas vagy többszörös kombináció is. A kombinációs terápia során azon antidiabetikumok alkalmazása célszerű, melyek szinergetikus

módon képesek kiegészíteni és felerősíteni egymás vércukorcsökkentő hatását, tehát többnyire egy inzulinrezisztenciát csökkentő gyógyszert kombinálnak egy inzulinszekréciót fokozó szerrel [51]. Mivel mai napig a metformin az elsődlegesen ajánlott antidiabetikum a T2DM monoterápiás kezelésében, a hatóanyag-kombinációk egyik leggyakoribb összetevője is a metformin (például metformin + pioglitazon) [52]. Sok esetben azonban az orális antidiabetikum mellett inzulinra is szükség van. Korábban többnyire csak akkor került sor az inzulin alkalmazására, amikor már két vagy három különböző hatóanyag-tartalmú orális szer is hatástalannak bizonyult. Napjainkban viszont már a kezelés korai szakaszában (például közvetlenül a metformin-monoterápia sikertelensége után) is egyre gyakrabban javasolják a beteg inzulinterápiába történő bevonását, ugyanis sokkal rövidebb idő alatt lehet helyreállítani az ideális anyagcsere-állapotot, és ezáltal a szövődmények kialakulásának kockázata is visszaszorítható [53]. Bár a kombinált terápia hatékonyan képes fokozni a glikémiás kontrollt, e kezelési formának is megvannak a maga korlátai és hátrányai. A többféle antihyperglükémiás gyógyszer szedése például növelheti egyrészt a hipoglikémia kialakulásának veszélyét, másrészt annak valószínűségét, hogy valamilyen farmakokinetikai kölcsönhatás jön létre a beteg által szedett egyéb gyógyszerekkel [54].

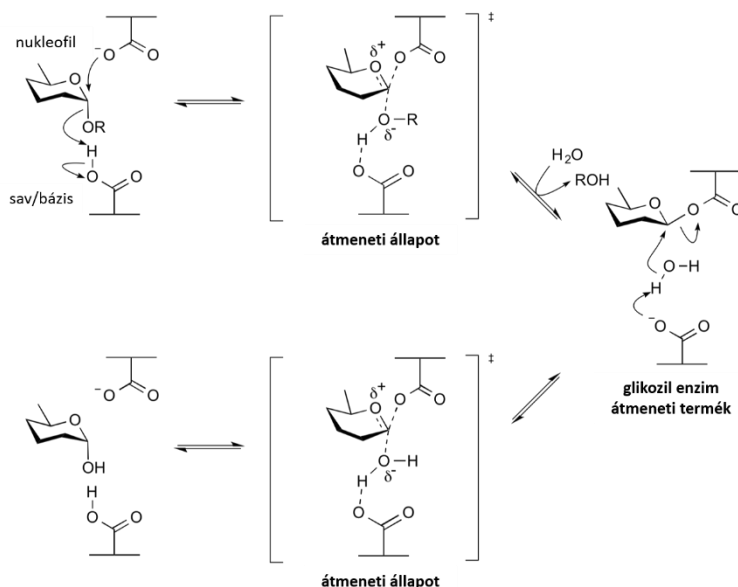
2.3 A T2DM terápiájának célzimelei

Napjainkban egyre nagyobb figyelmet szentelnek az olyan orális antidiabetikumok tervezésének és előállításának, melyek a szénhidrát-anyagcserében részt vevő valamely enzim aktivitásának gátlásán keresztül fejtik ki terápiás hatásukat. Egyes képviselőik az étkezés utáni vércukorszintet, illetve a glükóz abszorpciójának mértékét csökkentik, míg mások a hyperglükémia által előidézett szövődmények (például retinopátia, nefropátia, stb.) kialakulását gátolják, vagy a folyamat visszafordítását célozzák [55]. Az inzulinhatás-javító vagy inzulinkiválasztást serkentő készítményekhez hasonlóan, a gyógyszerként alkalmazott/alkalmazandó enziminhibitorok sem jelentenek tökéletes megoldást a T2DM kezelésére. Például az összetett szénhidrátokat hidrolizáló enzimek (α -amiláz, α -glükózidáz, stb.) működésének gátlása bélrendszeri zavarokat okozhat, hiszen a meg nem emésztett poliszacharidokat vagy oligoszacharidokat a vastagbélben található baktériumok erjesztéses vagy rothasztásos folyamatban tovább bontják, amit gázfejlődés és fokozott vízvisszaszívás kísér [56].

2.3.1 α -Amiláz

Az α -amiláz (EC 3.2.1.1, α -1,4-D-glükánhidroláz) enzim az O-glikozidok α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötéseinek hasításában részt vevő glikozid hidroláz. A Carbohydrate-Active enZymes (CAZy)

adatbázis szerint a legtöbb α -amiláz a 13-as glikozid hidroláz családnak tartozik [57]. Az α -amilázok endo-enzimek, vagyis a keményítő és maltooligomer-láncok belsejében található α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötéseket hasítják. A hidrolízis eredményeként redukáló oligoszacharidok keletkeznek, melyek megtartják α -anomer konfigurációjukat (retenciós mechanizmus) [58]. A konfiguráció megtartását eredményező hidrolízis leggyakrabban egy kétlépéses, kovalens glikozil-enzim intermedieren keresztül végbemenő, kettős helyettesítéses mechanizmus szerint játszódik le, amint az az alábbi ábrán látható:



3. ábra: Az α -amiláz enzim retenciós mechanizmusa

Valamennyi lépés egy oxokarbénium-ionszerű átmeneti állapoton keresztül megy végbe. A reakció egy sav/bázisként és egy nukleofilként funkcionáló aminosav-oldallánc részvételével következik be. Az α -amiláz katalízisében az aktív helyen lévő Asp és a Glu aminosavak vesznek részt. Az előbbi nukleofilként, míg az utóbbi protondonorként viselkedik. Miután a szubsztrát bekötődött, a glutamát protonálja a hasítandó glikozidos kötés oxigénatomját, és az aszpartát nukleofilként támadja a glükóz C1 anomer szénatomját. Ekkor egy oxokarbénium-ion jellegű intermedier jön létre, melyből egy kovalens átmeneti állapot képződik. Ezt követően a protonált glükózmolekula távozik az aktív helyről, amivel egyidejűleg egy víz- vagy egy újabb glükózmolekula lép be oda, és megtámadja a glükóz, valamint aszpartát között lévő kovalens kötést. Ennek hatására egy újabb oxokarbénium-ion jellegű intermedier jön létre. A glutamát (mint báziskatalizátor) a belépő víztől (vagy az új glükózmolekulától) egy hidrogént vesz fel. A vízmolekula (vagy az új glükózmolekula) oxigénatomja az eredeti glükózmolekula C1

szénatomján egy új hidroxilcsoportot (hidrolízis) vagy a két glükózegység között egy új glikozidos kötést (transzglykozilezés) hoz létre [59-60].

Az emberi szervezetben az α -amiláz legnagyobb mennyiségben a nyálmirigyekben és a hasnyálmirigyben, kisebb mértékben pedig a májban, belekben és a vázizomban termelődik. A 496 aminosavból álló humán hasnyálmirigy-eredetű α -amiláz (HPA) egyetlen polipeptidláncból álló, 55 kDa méretű kalciumkötő fehérje, mely három doménből (A, B és C) épül fel. Az 'A' alegység a katalitikus domén, melyre egy 8 α -hélixből és 8 β -redőből álló $(\beta/\alpha)_8$ -TIM (trióz-foszfát izomeráz)-hordó struktúra jellemző. A 'B' domén egy hurokban gazdag alegység, mely a katalitikus domén α -3 hélice és β -3 redője közötti hurokrégióban helyezkedik el. Az 'A' és 'B' alegység közötti árokban található meg a katalitikus aminosavak (Asp197, Glu223 és Asp300), valamint a szubsztrátkötő hely is. A fehérje C-terminális végén, közvetlenül az 'A' domén után elhelyezkedő 'C' alegység katalitikus aktivitással ugyan nem rendelkezik, de kulcsfontosságú szerepet játszik az enzim stabilitásának kialakításában és a szubsztrátkötésben [61].

Vizsgálataim során sertéshasnyálmirigy-eredetű α -amilázt (PPA) alkalmaztam modellenzimként, ugyanis a HPA aminosavszekvenciájával 91%-os homológiát mutat [62], könnyen beszerezhető, továbbá a szakirodalomban a PPA a legáltalánosabban elfogadott emlőseredetű amiláz-modellenzim.

2.3.1.1 α -Amiláz enzim szerepe a T2DM-ben

A szénhidrátban gazdag ételek elfogyasztása olyan komplex élettani események sorozatát eredményezi, amelyek végül a szénhidrát felhasználásával vagy elraktározásával zárulnak le. Már közvetlenül az után, hogy az étel a szájba kerül, megindul az összetett szénhidrátok (poli- és oligoszacharidok) emésztése; a nyálmirigyekben termelődő α -amiláz aktiválódik, mely elkezd hidrolizálni a táplálék poliszacharid-tartalmát (például keményítőt). Mivel a táplálék csak rövid ideig tartózkodik a szájüregben, a nyáleredetű α -amiláz nem tudja sokáig érvényesíteni hidrolizáló hatását. Az étel ezt követően közvetlenül a gyomorba jut, ahol az erősen savas pH miatt megszűnik a nyál-amiláz aktivitása. Miután a táplálék a gyomorból a vékonybélbe (patkóbélbe) kerül, a poliszacharidokat a hasnyálmirigy által termelt, és a vékonybélbe szekretálódott α -amiláz oligoszacharidokká hasítja. Következésképp, a pankréasz- α -amiláz jelentős szerepet játszik az étkezés utáni magas vércukorszint (posztprandiális hiperglikémia) kialakulásában [63-64].

2.3.1.2 α -Amiláz enzim aktivitásmérési módszerei

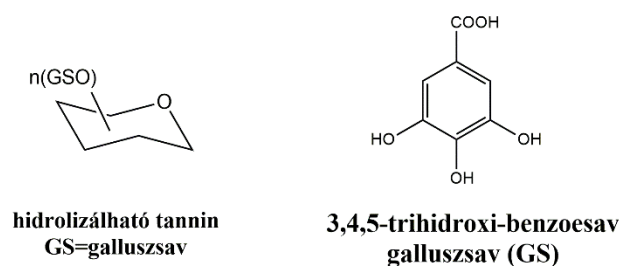
Figyelembe véve, hogy a gyógyászati (diagnosztikai és terápiás), valamint ipari célokra egyaránt felhasználható α -amiláz a legszélesebb körben tanulmányozott enzimek egyike, nem meglepő, hogy napjainkig számos módszert dolgoztak már ki aktivitásának pontos meghatározására. A szakirodalomban fellelhető módszerek és az egyes kinetikai vizsgálatok során számos különféle szubsztrátot alkalmaznak, többek között, keményítőt (az enzim természetes szubsztrátját) [65], módosított keményítőt [66], különböző hosszúságú maltooligomereket [67] és ezek kromofor- vagy fluoroforcsoportokat tartalmazó származékait [68]. Ilyen kromogén szubsztrát a 2-klór-4-nitrofenil-O- β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glükopiranozil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glükopiranozid (GalG₂CNP) [69], a 2-klór-4-nitrofenil- α -D-maltotriozid [70] és a 2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltoheptaozid-származék [71]. Kutatócsoportunk tagjai is szintetizáltak korábban kromogén szubsztrátot ciklodextrinből kiindulva [72] és glikogén foszforiláz által katalizált reakciókban [73], valamint fluorogén szubsztrátot mutáns amiláz katalizálta transzglykozilezési eljárással [68]. Az α -amiláz aktivitásmérésére leggyakrabban valamilyen kolorimetriás módszert alkalmaznak, mely gyors és egyszerű meghatározást tesz lehetővé. Keményítő szubsztrát esetében például elterjedten használják a 3,5-dinitrosalicilsav tesztet [74]. Ezzel a technikával az aktivitás ugyan jól mérhető, de a keletkező színes termék nem sztöchiometrikus mennyiségű. Mind a diagnosztikában, mind pedig az *in vitro* laboratóriumi vizsgálatoknál a kromogén szubsztrátok alkalmazását preferálják, ahol az enzimreakcióban felszabaduló kromoforcsoport által előidézett színváltozást detektálják spektrofotometriásan [75]. Az α -amiláz aktivitása kapcsolt enzimreakciók alkalmazásával is mérhető. Erre példaként hozható az oxidáz/peroxidáz enzimrendszer, mely során a glükóz oxidációját követően keletkező hidrogén-peroxid mennyiségét határozzák meg [76-77].

2.3.1.3 α -Amiláz inhibitorok

Az α -amiláz inhibitorok olyan orális antidiabetikumok, melyek terápiás hatásukat úgy fejtik ki, hogy gátolják a glükóz abszorpcióját, és csökkentik a vér étkezés utáni glükózkoncentrációjának növekedését [78]. Az egyik legismertebb és legáltalánosabban használt α -amiláz inhibitor az akarbóz. Habár a kereskedelmi forgalomban kapható akarbóz rendeltetészerűen egy α -glükozidáz gátló, bebizonyították, hogy ez az átmeneti állapot analóg, mikrobiális eredetű oligoszacharid-származék az emésztőrendszerben található több poliszacharid-bontó enzimet, így az α -amilázt is hatékonyan gátolja [79]. Az α -amiláz és α -glükozidáz szerkezete és katalitikus mechanizmusa közötti nagyfokú homológia miatt nem

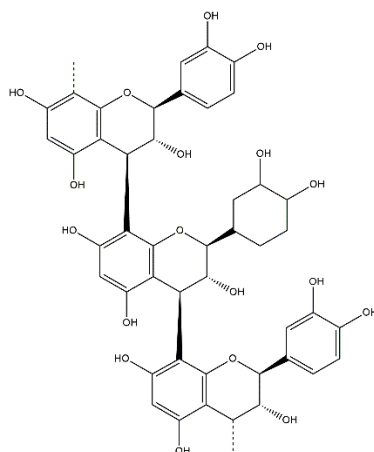
meglepő, hogy az egyik enzim esetében kifejlesztett inhibitor hatékony gátlószere a másinak is. Az akarbóz szerkezeti sajátosságait az α -glükozidáz inhibitoroknál fogom részletesen tárgyalni.

A rendelkezésre álló készítmények ellenére továbbra is intenzív kutatások folynak az újabb és újabb α -amiláz inhibitorok után annak érdekében, hogy megakadályozzák a T2DM és az azzal összefüggésbe hozható metabolikus rendellenességek rohamos terjedését. Az egyik lehetőség az α -amiláz-specifikus kismolekulák tervezése és szintézise. Ezek között szerepelnek oligopeptidok [80], szénhidrátszármazékok [81], valamint heterociklusos vegyületek is [82]. A szintetikus eredetű inhibitorok mellett azonban egyre nagyobb figyelmet fordítanak a természetes eredetű gátlószerek cukorbetegség terápiájába történő bevonására. Egy 2012-ben megjelent tanulmány arról számolt be, hogy körülbelül 800 növényfaj rendelkezik valamilyen antidiabetikus hatású komponenssel [83]. A flavonoidok, melyek jól ismert másodlagos növényi metabolitok, például bizonyítottan hatékony gátlószerei az α -amiláznak [84]. Az α -amiláz enzim gátlása szempontjából másik kiemelkedően fontos és bizonyítottan hatékony növényi eredetű vegyületcsalád a tanninok [85]. A tanninok olyan polifenolos vegyületek, melyeknek két fő típusát különböztethetjük meg: a hidrolizálható és a kondenzált tanninokat. A hidrolizálható tanninokban a központi poliolegységet (általában glükózt) fenolsavak (galluszsav a gallotanninokban; a galloilegységek oxidációjából származó egyéb fenolsavak az ellagitanninokban) észteresítik (4. ábra).



4. ábra: A hidrolizálható tanninok (bal) és a galluszsav (jobb) szerkezete

A kondenzált tanninok (5. ábra) katechinszármazékok, melyek fő szerkezeti egysége a 2-fenil-kromán (flaván)-váz. Vízben oldódó, nem hidrolizálható, nem észterjellegű vegyületek. Proantocianidineknek is nevezik őket, mivel az oxidatív körülmények között bekövetkező depolimerizálódásuk eredményeként antocianidinek jönnek létre, amelyek között szintén találhatóak amiláz gátlók [86].

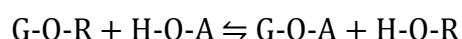
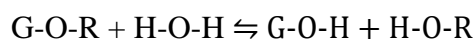


5. ábra: A kondenzált tanninok (proantocianidinek) szerkezete

A tanninok gátló mechanizmusa feltehetően az erős fehérjekötő képességükkel hozható összefüggésbe, aminek hatására a fehérje denaturálódhat, vagy egy oldhatatlan fehérje-tannin aggregátum alakulhat ki [87].

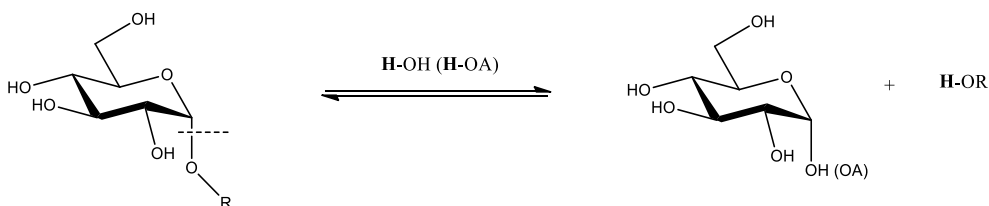
2.3.2 α -Glükozidáz

Az α -glükozidáz (EC 3.2.1.20, α -D-glükozid-glükohidroláz) az α -amilázhoz hasonlóan a harmadik enzimosztályba, vagyis a hidrolázok közé tartozik. Az α -glükozidáz egy olyan glikozid hidroláz (EC 3.2; GH31), mely az O-glikozidokban előforduló, α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötés hasításában vesz részt (EC 3.2.1) [88]. A hidrolitikus reakció úgy megy végbe, hogy a glikozilegység anomer szénatomja és a glikozidos hidroxilcsoport oxigénatomja közti (C1-O) kötés felhasad. Az α -amilázokkal ellentétben, az α -glükozidázok *exo*-enzimek, vagyis terminális glikozidos kötések hidrolizálnak, aminek eredményeként egy α -D-glükóz hasad le a szubsztrát nemredukáló végéről [89]. Az α -glükozidázok a hidrolízis (egy oligoszacharid nemredukáló végéről származó glikozilegység vízmolekulára történő átvitele) mellett a transzglykozilezést is (egy oligoszacharid nemredukáló végéről származó glikozilegység akceptorra történő átvitele) képesek katalizálni, éppen ezért ezeket az enzimeket gyakran transzglykozidázoknak is nevezik:



ahol 'G' a glikozilegység, 'R' az aglikon és 'H-O-A' az akceptor [90]. Mindkét reakció (hidrolízis és transzglykozilezés) tulajdonképpen egyfajta cserereakciónak tekinthető, mely a lehasadó glikozilegység és egy víztől vagy akceptortól származó proton között valósul meg. Ezeket a reakciókat formálisan úgy lehet tekinteni, mint az anomer centrum C1 atomján

bekövetkező nukleofil szubsztitúciót, mely a termék anomerkonfigurációjának megtartásával, vagyis retenciós mechanizmus szerint megy végbe (6. ábra) [59, 91].



6. ábra: Az α -glükozidáz enzim által katalizált hidrolitikus és transzglykozilezési reakció mechanizmusának egyszerűsített ábrázolása

Szubsztrátspecifitásuk meglehetősen változatos: számos α -glükozidáz nemcsak az oligoszacharidokat vagy az α -glikozidos kötést tartalmazó szintetikus α -glikozidokat képes hidrolizálni, hanem az olyan α -glükánokat is, mint például a keményítő vagy a glikogén [92]. Szerkezetét tekintve a humán eredetű α -glükozidáz egy 868 aminosavból felépülő, 110 kDa méretű fehérje. Az enzim öt alegységet tartalmaz (A, B C, D és E domén). Az 'A' domén egy P-típusú trefoil-alegység (1-51 aminosavak), míg a 'B' egy N-terminális β -szendvics domén (52-269 aminosavak). A 'C' alegység (270-651 aminosavak) a katalitikus domén, melyre az α -amilázhoz hasonlóan egy 8 α -hélixből és 8 β -redőből álló TIM-hordó harmadlagos szerkezet jellemző. A katalízisben részt vevő három aminosav, vagyis az ún. katalitikus triád (Asp443, Glu223 és Asp542) ebben a (β/α)₈ hordóban található. A 'D' a proximális C-terminális domén (652-730 aminosavak), az 'E' pedig a disztális C-terminális domén (731-868 aminosavak). Ezutóbbi két alegységre egyaránt a β -szendvics szerkezet jellemző [93-94].

2.3.2.1 α -Glükozidáz enzim szerepe a T2DM-ben

Ahogy azt az α -amilázok T2DM-ben betöltött szerepénél már részletesen leírtam, a táplálkozás útján szervezetbe juttatott poliszacharidok lebontása egy olyan komplex folyamat, mely több enzim együttes hatását igényli. Az összetett szénhidrátok α -amiláz enzimmel történő emésztése során keletkező di- és oligoszacharidok nem képesek felszívódni. Ebből adódóan, az összetett szénhidrátok hidrolízise tovább folytatódik: a di- és oligoszacharidok, mint szubsztrátok, hozzákötődnek a vékonybélben (éhbél) található α -glükozidáz enzimhez, mely monoszacharidokra bontja le azokat [95-96]. Az így keletkező monoszacharidok már fel tudnak szívódni a vékonybélből. Tekintve, hogy a keményítő egy homopolimer, a teljes hidrolízisét követően keletkező monoszacharid a glükóz. A felszabaduló glükóz a vékonybél hámsejtjein keresztül azonnal felszívódik, és a véráramból szállításukkal jut el a különböző sejtekbe. A glükóz különféle anyagcsere-folyamatokban használódhat fel, például a glikolízisben, a glikogenezisben vagy a pentóz-foszfát útvonalban, viszont hiperglikémia esetén

a szervezet nem tudja hasznosítani a rendellenesen nagy glükózmennyiséget [97]. Mindezek alapján elmondható, hogy az α -glükozidáz enzim aktivitásának gátlásával késleltethetjük az oligo-és diszacharidok monoszacharidokká történő bontását, ami így hozzájárul a posztprandiális hiperglikémia csökkentéséhez, az inzulinérzékenység fokozásához, és a hasnyálmirigy β -sejtjeinek védelméhez.

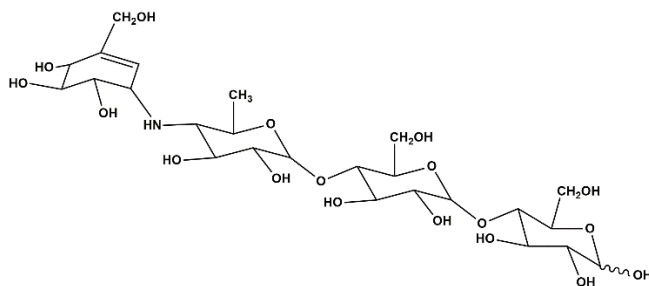
2.3.2.2 α -Glükozidáz enzim aktivitásmérési módszerei

Az α -glükozidáz-aktivitásmérés egyik lehetséges módja a hexokináz/glükóz-6-foszfát (G-6-P) dehidrogenáz kapcsolt enzimrendszer alkalmazása. Ennek alapja, hogy az α -glükozidáz enzim aktivitása révén keletkező glükózt a hexokináz G-6-P-vé foszforilálja, majd az így keletkezett G-6-P lesz a szubsztrátja a G-6-P dehidrogenáznak. Ez utóbbi enzim a G-6-P-t 6-foszfo-D-glükono-1,5-laktonná oxidálja, miközben a jelenlévő NADP^+ NADPH -vá redukálódik. A NADPH koncentrációjában bekövetkező változás spektrofotometriásan követhető 340 nm hullámhosszon [98].

Az α -glükozidáz-aktivitás meghatározásának legáltalánosabban alkalmazott protokollja során 4-nitrofenol (PNP) vagy 2-klór-4-nitrofenol (CNP) kromoforcsoportot tartalmazó α -D-glükopiranozidot használnak szubsztrátként, és a felszabaduló kromoforcsoportot detektálják spektrofotometriásan 400-410 nm hullámhosszon. Mivel mind a CNP, mind a PNP jellegzetes sárga színnel rendelkezik, a színintenzitás növekedéséből következtethetünk az enzim aktivitására [99-100].

2.3.2.3 α -Glükozidáz inhibitorok

A T2DM okozta hiperglikémia kezelésének egyik megközelítése a szénhidrát-anyagcserében résztvevő enzimek gátlása. Az egyik legrégebben vizsgált terápiás célpont az α -glükozidáz. Ezen enzim kompetitív gátlása csökkenti a monoszacharidok felszívódásának mértékét, és ez által mérséklődik a posztprandiális hiperglikémia. Jelenleg három α -glükozidáz inhibitor kapható kereskedelmi forgalomban: az akarbóz (Glucobay; 7. ábra), a miglitol (Glyset) és a voglibóz (Voglibose) [101].



7. ábra: Az akarbóz szerkezete

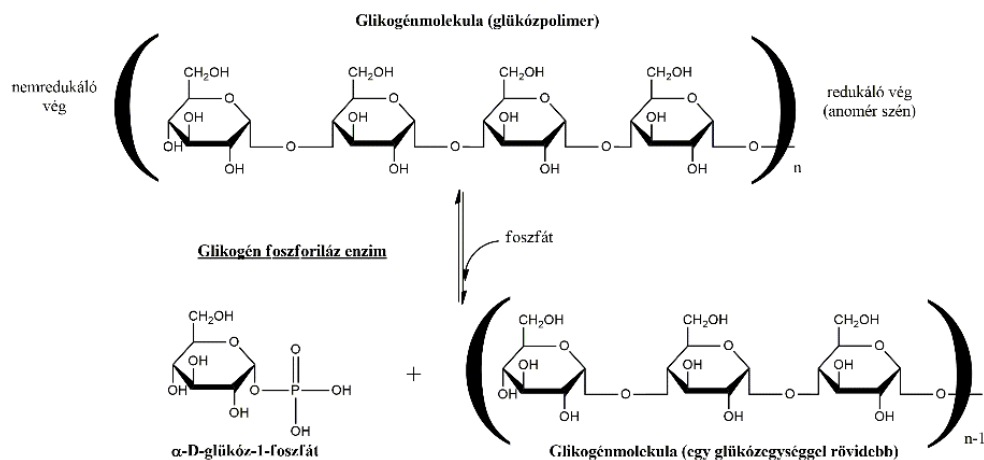
Ezek a készítmények monoterápiásan és kombinációs terápiában egyaránt alkalmazhatók. A szulfonilureákkal, biguanidokkal, inzulinnal vagy tiazolidindionokkal szemben, az említett három α -glükózidáz inhibitor egyike sem okoz hipoglikémiát. Továbbá azt is kimutatták, hogy 0,5-1%-kal képesek csökkenteni a hemoglobin glikoziláltságának mértékét. Hosszú távú terápiás felhasználásuk azonban nem javasolt, mert mellékhatásként emésztőrendszeri zavarok léphetnek fel, például haspuffadás vagy fokozott bélgázképződés [102]. Mivel kutatómunkám során az akarbózzal végeztem vizsgálatokat, szeretnék kitérni e gátlószer karakterizálására.

Az akarbóz egy olyan természetes eredetű pseudo-tetra-saccharid, melyet az *Actinoplanes* baktériumok állítanak elő fermentációval. Az akarbóz gátló hatása szokatlan szerkezetére vezethető vissza. Három különböző szerkezeti egységből áll: egy telítetlen ciklitolgyűrűből (2,3,4-tri-hidroxi-5-hidroximetil-5,6-ciklohexén), egy akarviozingyűrűből (4-amino-4,6-didezoxi-D-glükopiranoz) és egy maltózegységből. A nemredukáló végen található D-glükó konfigurációjú ciklitolgyűrű α -(1 \rightarrow 4) kötéssel kapcsolódik az akarviozin nitrogénatomjához, ami pedig szintén α -(1 \rightarrow 4) kötést alakít ki a maltózzal [103]. A szakirodalom alapján az akarbóz nemcsak az α -glükózidázoknak [104], hanem az α -amilázoknak [105], a glükóamiláznak [106] és a ciklomaltodextrin-glükano-transzferáznak [107] is hatékony kompetitív inhibitora.

2.3.3 Glikogén foszforiláz

A glikogén foszforiláz (GF; EC 2.4.1.1), melynek szisztematikus neve 1,4- α -D-glükózil-transzferáz, a transzferázok (EC 2) osztályába, pontosabban a glikózil transzferázok (EC 2.4; GT35 család) közé tartozó enzim. A még árnyaltabb besorolás érdekében elmondható, hogy a GF egy olyan hexozil transzferáz (EC 2.4.1), mely a katalízishez glikózil donorként glikogént, akceptorként pedig foszfátot (EC 2.4.1.1) használ. A GF a glikogénolízis, vagyis az energiatároló vegyületként funkcionáló glikogén lebontásának első, sebességmeghatározó lépését katalizálja. A GF egy exo-enzim, vagyis a glikogén terminális, nemredukáló végén lévő

α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötést hasítja [108], mely következtében egy egységgel rövidebb glükózpolimer és glükóz-1-foszfát (G-1-P) keletkezik (8. ábra).



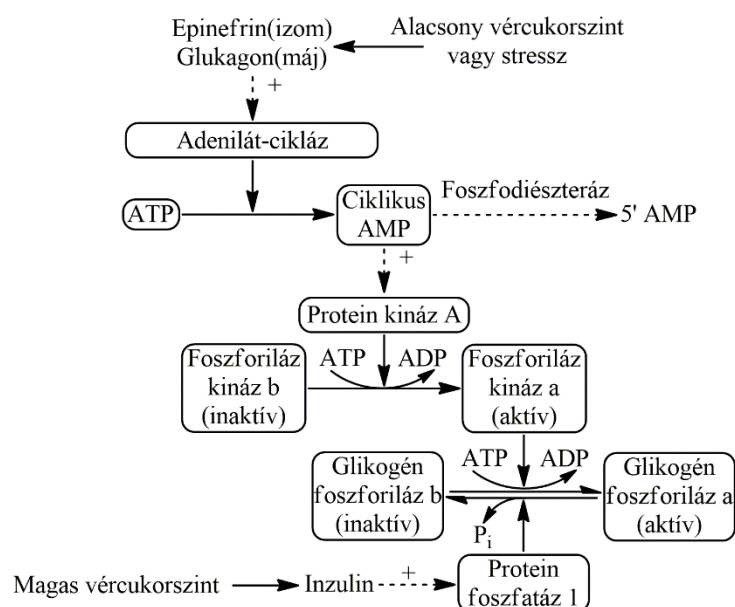
8. ábra: A glikogén foszforiláz enzim által katalizált foszforolitikus reakció

A glikogén foszforolitikus hasítása mindaddig folytatódik, amíg az enzim el nem éri az elágazást jelentő α -(1 \rightarrow 6) kötések előtti negyedik glükózegységet. Ennek háttérében az áll, hogy a GF-ben a szubsztrát kötődése az enzim aktív helyétől távolabb elhelyezkedő glikogén kötőhelyre történik, illetve az, hogy a hasítóhely egy mélyedésben található (máskülönben a rövidebb oligomereket nem tudná hasítani) [109]. A folyamat azonban megfordítható; az enzim fiziológiai körülmények között a G-1-P felszabadulásával járó glikogénlebontást végzi, de *in vitro* képes katalizálni a fordított irányú reakciót is, vagyis α -(1 \rightarrow 4) glikozidos kötés kialakításával glükózegységeket kapcsol az oligomer akceptorhoz, miközben szervesen foszfát (P_i) szabadul fel a G-1-P donorból. A GF két formában létezik: egy aktív, foszforilált GFa és egy katalitikus aktivitással nem rendelkező, foszforilálatlan GFb formában. A GFb foszforilációja egy foszforiláz kinázok (FK) által katalizált reakcióban valósul meg aktivátorok (pl. adenozin-monofoszfát: AMP) segítségével. Habár a GF katalitikus aktivitását csak GFa formában tudja kifejteni, nyugalmi állapotban általában az inaktív GFb-ként fordul elő [110]. Az enzim defoszforilálásában és így inaktíválásában a protein foszfatáz 1 (PP1) játszik szerepet. A GF inaktív monomerként és tetramerként [111] egyaránt előfordul, *in vivo* azonban többnyire homodimereként van jelen [112]. A két azonos alegységből felépülő dimer enzim egy doménja 842 aminosavból áll, molekulatömege pedig 97 kDa. Mindkét domén két további alegységre, egy C-terminális és egy N-terminális alegységre osztható, és e kettő találkozásánál helyezkedik el az aktív centrum. Minden alegység tartalmaz egy kovalensen kötött piridoxál-5'-foszfát prosztetikus csoportot és egy reverzibilisen foszforilálható Ser-14 oldalláncot [113]. A GF hét

kötőhellyel rendelkeznek: egy katalitikus, egy purin nukleotid, egy allosztérikus, egy glikogén, egy indol, egy benzimidazol és egy kvercetin kötőhellyel [114]. A GF enzimnek három különböző izoformája létezik: (1) az izom GF, mely az izomműködés energiaszükségletét fedező G-1-P felszabadításáért felelős, (2) a máj GF, ami a vércukorszint szabályozásában játszik szerepet, és (3) az agy GF, amely a hipoxiás és/vagy hipoglikémiás állapotokban a megfelelő agyműködéshez biztosítja a glükózt [115]. Vizsgálataim során nyúl vázizom-eredetű GFb-t (rmGFb) alkalmaztam, ugyanis a humán májeredetű GF és az rmGF katalitikus helyének aminosavszekvenciája 80%-os homológiát mutat [116], ráadásul beszerzése egyszerűen megvalósítható.

2.3.3.1 Glikogén foszforiláz enzim szerepe a T2DM-ben

A vércukorszint szabályozása és fenntartása egy meglehetősen összetett folyamat, melynek két kulcsfontosságú enzime a GF és az azzal ellentétes hatású glikogén szintáz (GS). A vér glükózkoncentrációjának csökkenésekor a GF aktiválódik, aminek eredményeként fokozódik a glikogénlebontás és a glükózfelszabadulás. Alacsony vércukorszint vagy stressz esetén a GFb→GFa átalakulás hormonális hatásra fokozódik; a májsejtekben a glükagon hormon, míg az izomsejtekben az epinefrin (adrenalin) érvényesíti hatását. A hormonok által mediált jelzés következtében aktiválódik a membránkötött adenilát-cikláz, ami a sejtben jelen lévő ATP egy részének ciklikus AMP-vé (cAMP) történő átalakítását katalizálja. A keletkező cAMP elősegíti a protein kináz működését, mely enzim aktiválja a foszforiláz kinázt, ami pedig a GFb-t GFa-vá foszforilálja, és így megindulhat a glükóz glikogénraktárból való mobilizálása (9. ábra).



9. ábra: A glikogén foszforiláz enzim vércukorszint-szabályozásban való részvétele

Táplálékbevitel, illetve magas vércukorszint esetén azonban éppen az ellenkező folyamat játszódik le. Szénhidrátbevitelt követően megindul az inzulin termelődése a hasnyálmirigy β -sejtjeiben, mely hormon a glükagonnal ellentétes hatást fejt ki. Inzulin hatására aktiválódik a protein foszfatáz enzim, ami defoszforilálja és ez által inaktíválja a GFa-t. Ezzel egyidejűleg a protein foszfatáz a GS-t is defoszforilálja, ami viszont ilyen módon aktiválódik. E folyamatok eredményeként a glikogénlebontás abbamarad, és megindul a szervezet által fel nem használt glükóz glikogénraktárba történő beépítése. Mindezekből látható, hogy a GF jelentős szerepet játszik a vér glükózkoncentrációjának megfelelő értéken tartásában, és hogy túlműködése hozzájárulhat a hiperglikémiás állapot kialakulásához [117- 119].

2.3.3.2 Glikogén foszforiláz enzim aktivitásmérési módszerei

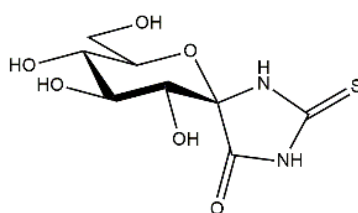
A T2DM terápiájának egyik széleskörűen tanulmányozott módja a GF enzim gátlása, emiatt aktivitásának minél pontosabb meghatározására számos eljárást dolgoztak már ki. Az újabb és újabb protokollok iránti igény legfőbb oka, hogy a GF egy reverzibilis reakciót katalizál, így különböző módszert kell kifejleszteni a lebontás- és a szintézisirányú reakció követésére. Tanabe és munkatársai egy olyan módszert dolgoztak ki a GF foszforolitikus reakcióban mutatott aktivitásának mérésére, mely során egy hidrolitikus lépést követően a G-1-P foszfát tartalmát határozták meg [120]. A lebontás irányú vizsgálatokat gyakran két segédenzimes (foszfo-glükomutáz és G-6-P-dehidrogenáz) rendszerben végzik, glikogént és foszfátot alkalmazva szubsztrátként. A redoxireakcióban keletkezett redukált koenzim (NADH vagy NADPH) koncentrációjában bekövetkező változást spektrofotometriásan követik 340 nm hullámhosszon [121]. Ez a rendszer azonban a két segédenzim jelenléte miatt kevésbé alkalmas gátlásvizsgálatok kivitelezésére, ugyanis az inhibitorok hozzákötődhetnek a targeten kívüli enzimekhez is.

A cukor foszforilázok proteomikai tanulmányozására legújabbán egy ESI-MS módszert javasolnak, melyben a glikogén vagy más maltooligomer szubsztrátok lebontásakor felszabaduló G-1-P mennyiségét határozzák meg [122]. Továbbá a glikogénlebontást követő G-1-P-tartalom mérése egy anioncserélő nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel is megvalósítható, CarboPack PA10 oszlop és pulzáló amperometriás detektálás alkalmazásával [123]. 2017-ben írtak le egy olyan HPLC módszert az rmGFb katalitikus helyének vizsgálatára, amiben fluoreszcens szubsztrátokat (piridinaminált maltohexaóz és származékai) és polimeralapú hidrofil kölcsönhatáson alapuló folyadékkromatográfiás (HILIC) oszlopot használtak [124]. Számos kutatócsoport a GF aktivitásának meghatározását a glikogénszintézis irányában végzi, ami azonban nem felel meg a fiziológiai körülmények

között lejátszódó reakciónak. A szintézisirányú folyamat esetén leggyakrabban alkalmazott módszer alapja a felszabaduló szervesetlen foszfát színreakcióval történő meghatározása. Habár ez a színreakció meglehetősen érzékeny, a színintenzitást számos tényező befolyásolja, ami jelentősen ronthatja a pontosságot [125]. A szakirodalomban megtalálható a GF katalizálta szintézisben képződő termék radioaktivitás-mérése alapján detektálása is. A módszer hátránya, hogy speciális felszerelést igényel, és radioaktív izotóppal jelzett G-1-P szubsztrátra van szükség [126]. Egy 2009-ben megjelent publikációban egy HPLC-vel megvalósított aktivitásmérési technikát mutattak be, amiben piridinaminálással előállított, kromoforcsoportot tartalmazó maltooligomer szubsztrátok G-1-P jelenlétében történő lánchosszabbítását követték nyomon [127].

2.3.3.3 Glikogén foszforiláz inhibitorok

Figyelembe véve, hogy a GF enzim hét kötőhellyel rendelkezik, melyek mindegyike az enzim gátlására alkalmas potenciális célpontnak számít, nem meglepő, hogy újabb és újabb GF inhibitorok felfedezéséről számolnak be. Elsősorban a katalitikus helyre kötődő, a szubsztrátra nézve kompetitív gátlószereket terveznek és szintetizálnak. Többnyire glükózanalóg-származékokat állítanak elő, hiszen a glükóz köztudottan a GP természetes inhibitora. Mivel azonban a glükóz csak gyenge gátló hatást tud kifejteni az enzimre, a jobb gátlási paraméterek elérése érdekében a glükóz-alapvázat különféle szubsztituensekkel látják el. Ilyen glükózanalóg vegyületek az N-glükozilszármazékok, például az N-acetil- β -D-glükopiranozil-amin [128], valamint glükopiranozilidén-spiro-heterociklusok, például a glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (GTH, 10. ábra) [129].

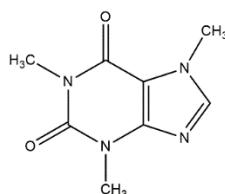


10. ábra: A glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoin (GTH) szerkezete

Az rmGFb-GTH komplex röntgenkristallográfiás vizsgálata felfedte azokat a szerkezeti sajátosságokat, melyek a GTH aktív centrummal szembeni nagy affinitásáért felelősek. Egyrészt, a hidantoin N(7)-H és az enzim His377 főláncának karbonil-oxigénatomja között hidrogénkötés alakul ki, ami elősegíti a glükóz $-\text{CH}_2\text{OH}$ csoportja és az enzim His377 oldallánca közti hidrogénkötés kialakulását. Másrészt, a merev planáris szerkezetű spirohidantoin-csoport a kötődés során kis mennyiségű konformációs energiát veszít.

Emellett gyakran állítanak elő olyan inhibitorokat, melyek az AMP-vel kompetitív módon, az allosztérikus helyhez kapcsolódva megakadályozzák az enzim allosztérikus aktiválását. Erre a helyre kötődik többek között a G-6-P, a dihidropiridin-disav, a ftálsav vagy az acilkarbamid [130].

Az aktív centrum kapujának közelében megtalálható purin nukleotid kötőhely gátlószerei egyre nagyobb figyelmet kapnak, ugyanis az ide kötődő vegyületek képesek gátolni a szubsztrát aktív helyre történő bejutását, és ez által csökkenteni tudják az enzim katalitikus aktivitását [131]. A nukleozidok, a purin bázisok és a heterociklusos vegyületek jellegzetes képviselői az inhibitorok e csoportjának [132]. Ide tartozik például a koffein (11. ábra), mely az aromás hidrofób csoportján keresztül kötést alakít ki a GF apoláris csoportjaival, stabilizálva így az enzim inaktív, katalitikus aktivitással nem rendelkező konformációját [133].



11. ábra: A koffein szerkezete

Habár maga a koffein meglehetősen gyenge inhibitora a GF-nek ($K_i=1$ mM), bebizonyították, hogy glükóz jelenlétében a koffein megközelítőleg a felére (1,7-szeresére) csökkenti az enzim aktivitását. Ennek magyarázata, hogy a két, önmagában kevésbé hatékony inhibitor elősegíti a másik bekötődését, és szinergetikus módon fejtenek ki egy nagyobb mértékű gátló hatást [134].

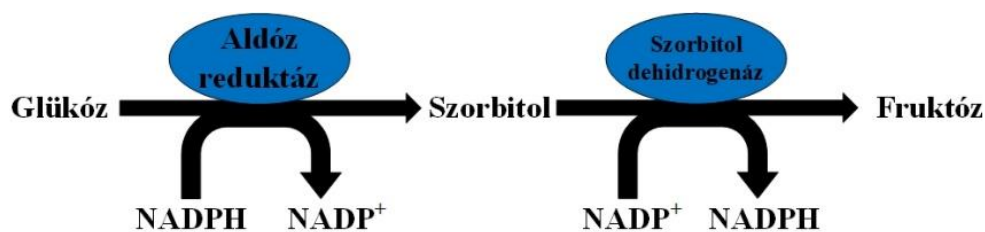
2.3.4 Aldóz reduktáz

Az aldóz reduktáz (AR; EC 1.1.1.21) a NADPH-függő aldo-keto reduktáz szupercsalád tagja, amely a különféle aromás és alifás aldehidek megfelelő alkohollá történő redukcióját katalizálja [135]. Az AR, mely az emlős szervezetekben legnagyobb mennyiségben a vesékben és a májban fordul elő, egy 315 aminosavegységből álló, 36 kDa molekulatömegű monomer fehérje [136]. Az enzim egyetlen polipeptidláncból áll, harmadlagos szerkezetét a 8 β/α egységből felépülő TIM-hordó határozza meg. A TIM-hordó nyolc párhuzamos β -szálat tartalmaz, melyeket nyolc perifériás α -hélix szegmens kapcsol össze. Csak úgy, mint valamennyi β/α -hordó szerkezetű enzim esetében, az AR aktív helye is a β -hordó C-terminális végén helyezkedik el [137]. Az aktív hely körülbelül 12 Å mélységű ürege erősen hidrofób karakterű, melynek belső felületét hét aromás aminosav (Trp20, Tyr48, Trp79, Trp111, Phe121, Phe122 és Trp219), négy apoláris aminosav (Val47, Pro218, Leu300 és Leu301) és csupán három

poláris oldallánc (Gln49, Cys298, His110) alkotja [138]. Az aktív hely nagy mérete és rendkívül hidrofób jellege összhangban van azzal a megfigyeléssel, miszerint az aromás aldehidek az AR legjobb szubsztrátjai. Az aktív hely cukrokkal szembeni specificitása és affinitása kicsi, ami magyarázza, hogy számos hexóz miatt rendkívül rossz szubsztrátja az AR-nek. Ennek megfelelően, az AR csak akkor képes átalakítani a szénhidrátokat, ha azok koncentrációja megfelelően nagy (például a cukorbetegség esetén) [139]. Az AR-nek NADPH kofaktorra van szüksége ahhoz, hogy hozzá tudjon kötődni a szubsztrátjához, és képes legyen kifejteni biológiai hatását. Miután az enzim-kofaktor komplex kialakult, az AR már könnyen katalizálni tudja szubsztrátjának redukcióját [140].

2.3.4.1 Aldóz reduktáz szerepe a T2DM-ben

Egyes tanulmányok kimutatták, hogy az AR kiemelkedően fontos szerepet játszik a cukorbetegség-szövődmények, elsősorban a retinopátia kialakulásában [141]. Ez az enzim katalizálja a glükózmetabolizmus poliol útvonalának első, sebességhatározó lépését, vagyis a glükóz szorbitollá történő redukcióját. Az átalakulást a $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ oxidáció kíséri (12. ábra). Az első lépésben keletkezett szorbitolt ezt követően a szorbitol dehidrogenáz enzim fruktózzá oxidálja, miközben a NADP^+ NADPH -vá redukálódik [142].



12. ábra: A glükóz poliol útvonalban történő átalakulásának egyszerűsített ábrája

Az AR-nek normál körülmények között kicsi a glükózzal szembeni affinitása, ezért megfelelő vércukorszint esetén az átalakulás lassú. Ekkor a vérben jelenlévő glükózt a hexokináz G-6-P-vé foszforilálja, mely vagy a glikolízisben, vagy a pentóz-foszfát ciklusban alakul tovább [143]. A cukorbetegéknél jelentkező hiperglikémiás állapotban azonban, amikor a vér glükózkoncentrációja rendellenesen megnövekszik, a hexokináz teljesen telítődik, és a feleslegben maradt glükóz belép a poliol útvonalba, ahol az AR szorbitollá redukálja azt. Az ilyen módon keletkezett szorbitol felhalmozódik a sejtben, ami ozmotikus stresszt vált ki [144]. Továbbá a poliol útvonalban keletkező fruktóz képes glikálni a fehérjékben (például kollagén, hemoglobin, krisztallin) található aminocsoportot, mely folyamat eredményeként ún. előrehaladott glikációs végtermékek (Advanced Glycation Endproducts: AGE) keletkeznek. Az

AGE akkumulációja az érfalak megvastagodásához és rugalmasságuk csökkenéséhez vezethet, illetve magas vérnyomást is okozhat [145]. Ráadásul a poliol útvonal aktiválódása révén csökken a redukált NADPH és az oxidált NADP^+ mennyisége, melyek a szervezetben lejátszódó redox folyamatok nélkülözhetetlen kofaktorai. A kisebb NADPH koncentráció a redukált glutation, nitrogén-monoxid, mio-inozitol és taurin szintézisének csökkenéséhez vezet. A mio-inozitol különösen a megfelelő idegműködéshez szükséges [146], a glutation pedig az emberi szervezet számára nélkülözhetetlen antioxidáns. A glutation redukált állapotában képes meggátolni a reaktív oxigén intermedierek (Reactive Oxygen Species: ROS) képződését, melyek oxidatív stresszt okozva megbontják a sejtek antioxidáns egyensúlyát, növelve azok érzékenységét, sérülékenységét [147].

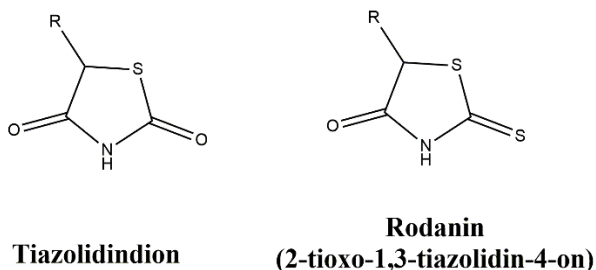
2.3.4.2 Aldóz reduktáz aktivitásmérési módszerei

Az AR enzim aktivitásmérését leggyakrabban úgy valósítják meg, hogy spektrofotometriás módszerrel ($\lambda=340$ nm hullámhosszon) követik a NADPH koncentrációjának csökkenését [148-151]. A meghatározás során az AR azon képességét használják ki, hogy a szubsztrát redukciójával párhuzamosan a NADPH oxidációját is katalizálja. Szubsztrátként többnyire glükózt, G-6-P-t [148], L-arabinózt, D-xilózt [149], D/L-gliceraldehidet [15] és D-galaktózt [151] használnak.

2.3.4.3 Aldóz reduktáz inhibitorok

Mivel a magas intracelluláris szorbitolszint bizonyítottan összefüggésbe hozható a T2DM szövődményeinek kialakulásával, a szorbitol szintéziséért felelős poliol útvonal első lépését katalizáló AR aktivitásának gátlásával csökkenthető például a szürkehályog, a retinopátia, a neuropátia és a nefropátia kockázata. Így az AR felhasználható terápiás célpontként a cukorbetegség szekunder szövődményeinek klinikai kezelésében. Habár napjainkig számos különféle szerkezetű AR inhibitor (ARI) fejlesztettek ki [152-153], továbbra is a karbonsavak képezik az ARI-k legjelentősebb és legnagyobb csoportját. Az e csoportba tartozó vegyületek AR-rel szemben mutatott nagyfokú gátló hatásának oka, hogy a karboxilát anion jól illeszkedik az AR aktív helyének ún. anionkötő zsebébe. Ez a zseb Tyr48, His110, Trp20 és Trp111 oldalláncokból, továbbá a NADP^+ kofaktor pozitív töltésű nikotinamid részéből áll [137]. Az AR enzimmel kapcsolatos kezdeti kutatások során megállapították, hogy az enzim érzékeny a szerves anionokra, különösen a hosszú láncú zsírsavakra [154]. Ez a felismerés vezetett az első ARI, a tetrametilén-glutársav, azonosításához az 1960-as években. Azóta a karbonsavtípusú ARI-k száma egyre csak nő. Közülük az epalresztát az egyetlen olyan ARI, amelynek gyógyszerként való forgalomba hozatalát jóváhagyták, és melyet azóta is alkalmaznak a

diabéteszes neuropátia klinikai kezelésében [155]. További ismert karbonsavtípusú ARI-k a zenaesztát [156], a zopolesztát [157], a ponalesztát [158] és a fidaesztát [159]. A közelmúltban számos egyéb, különböző alapszerkezetekkel rendelkező, hatékony ARI-t fejlesztettek ki és szintetizáltak. Maccari és munkatársai például évek óta foglalkoznak különféle tiazolidindion- és rodanin-alapvázal rendelkező vegyületek (13. ábra) előállításával, melyek rendkívül hatékonynak bizonyulnak nemcsak ARI-ként, hanem ún. több célponton ható gátlószerekként is [160-163].



13. ábra: A tiazolidindionok és rodaninok alapvázának általános szerkezete

2.4 Inhibitor-promiszkuitás

A gyógyszertervezésben gyakran alkalmaznak virtuális vagy valós nagy áteresztőképességű szűréseket (High-throughput Screening, HTS) az újabb és újabb vezérmolekulák azonosításához [164]. Sikerei ellenére azonban a módszer alkalmazhatóságát és megbízhatóságát beárnyékolják a szűrések során gyakran megjelenő fals pozitív találatok. Ezek ugyanúgy rendelkeznek a kívánt biológiai aktivitással, mint a tényleges találatok, de a későbbiek során rendszerint bebizonyosodik róluk, hogy nemspecifikus módon fejtik ki hatásukat. Erre azonban gyakran csak az után derül fény, hogy több évet és nagymértékű anyagi forrást fordítottak előállításukra, illetve tesztelésükre. Az ilyen 'nemvezérmolekula-jellegű' vegyületek zsákutcát jelentenek a gyógyszeripar számára, melyek további vizsgálatát azonnal megszüntetik [165]. Éppen ezért, nem meglepő, hogy az utóbbi években egyre több kutatócsoport foglalkozik a fals pozitív szűrési találatok molekuláris mechanizmusának felderítésével és megértésével, valamint olyan szűrők és kimutatási módszerek kidolgozásával, melyek segítségével már a gyógyszerfejlesztés korai fázisában fel lehet ismerni azokat [166]. A legújabb kutatások alapján a fals pozitív jelleg kialakulása szoros összefüggésbe hozható a vegyület promiszkuis mivoltával. A promiszkuis inhibitorok olyan kismolekulák, melyek képesek egyszerre több enzimen is kifejteni gátló hatásukat [167]. Napjainkig a promiszkuitás mechanizmusának számos okát tárták már fel. Egyes molekulák kovalens kötést alakítanak ki a fehérjék funkcionális csoportjaival, ami a célnzimek irreverzibilis gátlásához vezet. Más

inhibitorok „privilegizált” szerkezeti elemeket tartalmaznak, melyek egy adott fehérjecsalád több különböző tagjához is hozzá tudnak kötődni [168]. Vannak továbbá olyan vegyületek, amelyek a szűrési vizsgálatok során alkalmazott kolorimetriás vagy fluorometriás módszerekkel interferálnak, vagyis látszólag ugyan hatékonyan gátolnak, de ez tulajdonképpen csak egy mesterségesen előidézett hatás [169]. Az inhibitor-promiszkuitás háttérében álló legvalószínűbb mechanizmus azonban az aggregátumképződés: az oldatban lévő egyedi inhibítormolekulák 30-1000 nm átmérőjű részecskékké kapcsolódnak össze, és ez az aggregátum felelős az enzimgátlásért [170].

2.4.1 Gyógyszer-promiszkuitás, mint a gyógyszerfejlesztés ’zsákutcája’

A promiszkuisnak ítélt inhibitorok specificitásuk hiánya miatt alkalmatlanná válnak a gyógyszerhatóanyagként történő felhasználásra, ugyanis ha egy hatóanyag nem csak az adott célnzimet gátolja, megnő a kockázata a mellékhatások kialakulásának [171]. Ahogy korábban leírtam, a promiszkuis enzimgátlás különféle mechanizmusokkal magyarázható, viszont egy tanulmány szerint a jelenség 95%-os valószínűséggel az aggregáció miatt következik be, és csupán az esetek 5%-ában vezethető vissza olyan nonspecifikus gátlási mechanizmusokra, mint a kovalens módosítás [172]. Többféle elképzelés született már arról, hogy az aggregátumok milyen módon vesznek részt az enzimaktivitás-csökkentésben: a fehérje kitekeredése, a fehérjedinamika megváltozása, valamint az enzim szubsztrátjától történő fizikai elkülönítése egyaránt szerepel a lehetséges mechanizmusok között [173]. A legáltalánosabban elfogadott feltevés az, hogy a kolloidméretű aggregátumok adszorbeálják az enzimmolekulákat, ami azok kitekeredését eredményezi. Egy újabb hipotézis szerint azonban magának a fehérjének az aggregációja is bekövetkezhet, ahol az egyedi inhibítormolekula mintegy keresztkapcsoló vesz részt [174-175]. Valamennyi aggregációalapú inhibitorra (AAI) jellemző a specificitás hiánya, a csekély SAR és a nemkompetitív gátlási mód. Legjellemzőbb képviselőik a poliaromás és polifenolos vegyületek, továbbá a rendkívül lipofil és konjugált molekulák [176]. Az aggregációalapú gátlás (AAG) kimutatására közvetett és közvetlen módszerek egyaránt rendelkezésünkre állnak. A közvetett stratégia az AAI-k közös jellemvonásainak vizsgálatára támaszkodik, melyek a következők: (1) legalább három, eltérő szerkezettel, hatásmechanizmussal, funkcióval és/vagy ligandumfelismerési képességgel rendelkező célnzim gátlása (promiszkuitás), (2) időfüggő gátló hatás, (3) nemionos detergenssel szembeni érzékenység, illetve (4) a célnzim koncentrációjával szembeni érzékenység. Továbbá az is közvetett bizonyítékként szolgálhat az aggregáció bekövetkezésére, ha centrifugálást követően a vizsgált inhibitor gátló hatása jelentősen lecsökken (vagy teljesen megszűnik) [177].

Az aggregátumképződés megerősítésére, avagy kizárására alkalmazott közvetlen eljárások elsősorban a részecskeméret meghatározásán alapulnak, amihez többnyire dinamikus fényszórásmérést (DLS) vagy transzmissziós elektronmikroszkópiát (TEM) használnak [178]. A közvetett és közvetlen módszerek mellett azonban rendelkezésünkre állnak különféle számítógépes programok is, melyek segítségével kísérleteink előtt 'megjósoltathatjuk' azt, hogy a tesztelni kívánt vegyületünkre milyen valószínűséggel jellemző az AAG. A leggyakrabban használt ilyen típusú szoftver az online ingyenesen hozzáférhető *Aggregator Advisor* [179], mely két paraméter alapján ítéli meg a keresett vegyület aggregációra való hajlamát. Az egyik paraméter az ún. *Tanimoto-koefficiens*, ami a kemoinformatikában egyik legelterjedtebben alkalmazott hasonlósági együttható. Két szerkezet (az *Aggregator Advisor* adatbázisában szereplő ismert aggregátorok és a keresett molekula szerkezete) akkor tekinthető hasonlóknak, ha a *Tanimoto-koefficiens* nagyobb, mint 0,85 [180]. A másik paraméter a lipofilitás (hidrofóbicitás) kvantitatív mértékének tekinthető $\log P$, melyet a program a molekulaszerkezet alapján becsül meg. Egy vegyület minél nagyobb hidrofób karakterrel, vagyis minél nagyobb $\log P$ értékkel rendelkezik, annál valószínűbben tartozik az AAI-khoz. Szakirodalmi adatok szerint a $\log P > 3$ esetén beszélhetünk az AAI-k egyik képviselőjéről [181]; az *Aggregator Addvisor* is ezt az adatot tekinti határértéknek.

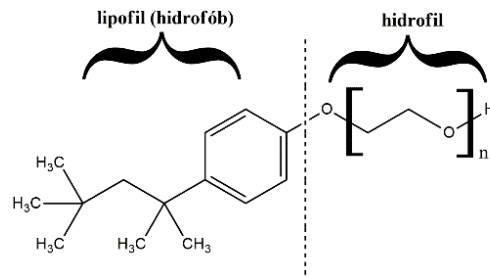
2.4.1.1 Az aggregációalapú gátlás azonosítására alkalmazható közvetett módszerek

Promiszkuitásra irányuló biokémiai vizsgálatok

A vizsgált inhibitor eltérő enzimeken kifejtett szignifikáns gátló hatása, vagyis a specificitás hiánya, az AAG felismeréséhez vezető egyik legkorábbi figyelmeztető jel. A korszerű proteomikai módszerek lehetővé teszik, hogy egy inhibitort egyidejűleg több különböző enzimen is teszteljünk [176].

Detergenssel szembeni érzékenység vizsgálata

A detergenssel szembeni érzékenység vizsgálata az egyik legegyszerűbb és leggyorsabb módja annak, hogy kísérleti úton megkülönböztessük az AAI-kat a specifikus gátlószerektől [167]. Az aggregációs vizsgálatokra egyik leggyakrabban alkalmazott nemionos detergens a Triton X-100, ami egy alkil-fenil hidrofób farokrészt tartalmaz (14. ábra). Aggregációs száma, ami megmutatja a micellán belül átlagosan jelen lévő detergensmolekulák számát, 100-155 [182]. Detergens jelenlétében az AAI-k által kifejtett gátló hatás jelentősen lecsökken [183]. Ennek oka, hogy a felületaktív anyag gátolja a hidrofób vegyületek aggregálódását, vagy megakadályozza a nemspecifikus kölcsönhatások kialakulását az aggregátumok és a fehérjék között [184].



14. ábra: A Triton X-100 nemionos detergens szerkezete

Az AAG kimutatására legáltalánosabban használt protokoll szerint 0,01% Triton X-100-tartalmú frissen készített pufferben kell megismételni a gátlásvizsgálatokat [183]. Az erős aggregátoroknál viszont nagyobb mennyiségű (0,1 v/v%) Triton X-100-ra is szükség lehet ahhoz, hogy a gátlás teljes mértékben megszűnjön [172].

Mivel a detergensmolekulák által alkotott micellák hidrofób magja hozzákötődhet a fehérje hidrofób részeihez, ami ez által az enzim aggregációjához vezethet [185], a gátlásvizsgálatok előtt mindenképpen érdemes megvizsgálni, hogy a használni kívánt detergens befolyásolja-e az enzim aktivitását.

Enzim-inhibitor előinkubálás hatásának vizsgálata

Tekintettel arra, hogy az AAI-k egyik közös jellemzője az időfüggő gátlás, az enzim-inhibitor előinkubálás hatására bekövetkező változás is indikátora lehet az AAG-nek. Ezen eljárás során az enzimet és inhibitorot bizonyos ideig inkubáljuk, majd a reakciót a szubsztrát hozzáadásával indítjuk. Az előinkubálást követően a specifikus inhibitorok gátlási paraméterei (IC_{50} , K_i) változatlanok maradnak, míg a nonspecifikus AAI-k gátló hatásában szignifikáns növekedés következik be. Ez a javulás azzal magyarázható, hogy minél több időt biztosítunk az enzim és inhibitor érintkezésére, annál több enzimmolekula tud adszorbeálódni az aggregátum felszínén [176, 186].

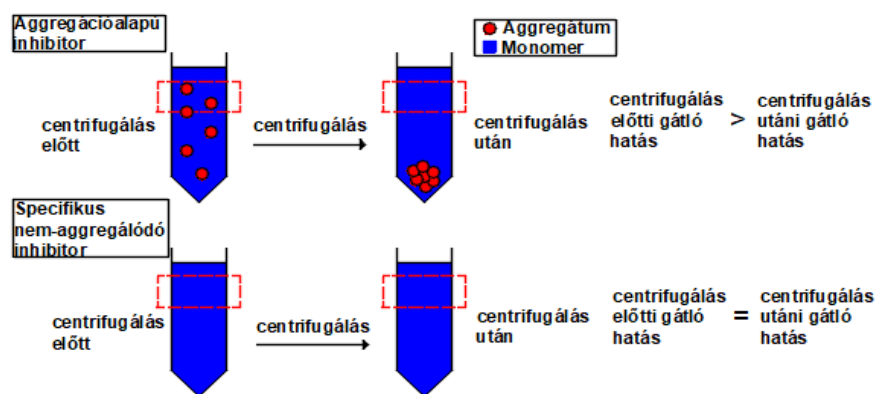
Enzimkoncentráció-változtatás hatásának vizsgálata

Az egyik legáltalánosabban elfogadott elmélet szerint az AAI-k egy adszorpciós mechanizmus szerint vesznek részt az enzimgátlásban. E hipotézis értelmében belátható, hogy az AAI-k rendkívül érzékenyek a célenzim koncentrációjára. Ha az aggregátum felszíne teljesen telítődik, minden további enzimmolekula szabad formában lesz jelen az oldatban, melyek így hozzá tudnak férni szubsztrátjukhoz. Amennyiben az inhibitor koncentrációját nem változtatjuk, de az enzimet többszörös koncentrációban alkalmazzuk, az enzim aktivitásának nőnie, míg a nonspecifikus AAI-k gátló hatásának jelentősen csökkennie kell. Ezzel szemben, egy

reverzibilis, kompetitív inhibitor esetében az enzimkoncentráció változtatása nem befolyásolja a vizsgált vegyület gátlási paramétereit [170, 176].

Centrifugálás hatásának vizsgálata

Az AAG bizonyítására gyakran alkalmazott eljárás a centrifugálás, mely során az inhibitor pufferes oldatát 30 percig centrifugálják, majd vizsgálják a gátló hatásában bekövetkező változást. Ha egy promiszkuis vegyület aggregátumot képez, és azok a kolloidális részecskék a felelősek az enzimgátlásért, az aggregátumok oldatból történő eltávolítása a gátlás csökkenését vagy teljes megszűnését eredményezi. A centrifugális erő hatására ugyanis az aggregátumok összetömörödnek, és leülepednek (15. ábra), így a centrifugálást követő mérések során felhasznált felülúszóban már csak az egyedi inhibitormolekulák (monomerek) vannak jelen [167, 187].



15. ábra: Centrifugálás hatása a specifikus és az aggregációalapú inhibitorokra

2.4.1.2 Az aggregációalapú gátlás azonosítására alkalmazható közvetlen módszerek

A fentebb leírt kísérletek megfigyelések útján, közvetett módon járulnak hozzá az AAI-k azonosításához, azonban közvetlenül nem bizonyítják az aggregátumok jelenlétét. Ehhez egy olyan biofizikai módszerre van szükség, mint a DLS, mely lehetővé teszi az oldatban lévő, 1-1000 nm-es részecskék detektálását, és a méretükben bekövetkező változás időbeli követését. A DLS mérések során meghatározható többek között a Z-átlag, a részecskeméret-eloszlás, a polidiszperzitás index (*PDI*) és a fotonbeütésszám (count rate). A Z-átlag egy kumulált átlag, mely az intenzitásátlagtól függő hidrodinamikai átmérőnek felel meg. Mivel a Z-átlagméret a mintában bekövetkező legkisebb változásra is meglehetősen érzékeny, polidiszperz rendszerek (például szennyeződések vagy aggregátumokat tartalmazó rendszerek) esetében nem javasolt használni. A részecskeméret-eloszláson belül megkülönböztethetünk intenzitás, térfogat és darabszám szerinti részecskeméret-eloszlást. Az intenzitás szerinti méreteloszlás a különböző

méretű részecskéken szóródott fény mennyiségét adja meg. Az intenzitás szerinti eloszlás átalakítható térfogat szerinti méreteloszlássá, ami a mintában lévő komponensek relatív tömeg- vagy térfogatarányát veszi alapul. A darabszám szerinti méreteloszlás pedig nem más, mint egy adott mérettartományba eső részecskék számának és a teljes részecskeszám hányadosa. E három érték közül polidiszperz minták esetében, így az aggregáció kimutatására is, leggyakrabban az intenzitás szerinti méreteloszlást alkalmazzák. Az aggregátum jelenlétére utaló paraméter még a *PDI*, ami a részecskeméret-eloszlás szélességét jellemző dimenziómentes szám. A DLS készülék 0-1 között határozza meg a *PDI* mértékét. Egy tipikus monodiszperz rendszer esetén a *PDI*-nek kisebbnek kell lennie, mint 0,1, míg polidiszperznek tekintünk egy mintát, ha a *PDI* meghaladja a 0,4-et. A fotonbeütésszám (count rate) az egy másodperc alatt detektált fotonok számát jelenti, és értékét kcps-ben (kilo counts per second) adja meg a műszer. Polidiszperz rendszereknél a beütésszámnak átlagosan 200-500 kcps közé kell esnie, míg monodiszperz mintáknál 100 kcps alattinak kell lennie. Ha a kísérlet során használt oldószer víz vagy vizes puffer, akkor a vakpróbánál kapott érték általában 20-50 kcps [188-189].

Habár a DLS módszer az egyik leggyorsabb és legegyszerűbb módja az aggregáció kimutatásának, használatának számos korlátozó tényezője van, ami miatt gyakran a közvetett stratégiákat részesítik előnyben. Ilyen hátrány például a viszonylag nagy mintamennyiség-igény (legalább 1 mL) vagy a vizsgált vegyület alapos ismerete. Ahhoz például, hogy a készülék az elsődlegesen kapott intenzitás szerinti méreteloszlás-értékeket át tudja konvertálni Z-átlaggá, térfogat vagy darabszám szerinti eloszlássá, szükség van a tesztvegyület refraktív indexének és a mérési hullámhosszon való abszorpciójának megadására, valamint előzetesen be kell állítani az alkalmazott oldószer viszkozitását (mérési hőmérsékleten) is. Ráadásul, mivel a szórt fény intenzitása a részecskeátmérő hatodik hatványával arányosan nő, a mintának rendkívül tisztának kell lennie ahhoz, hogy lehetővé váljon a kisméretű részecskék egyértelmű azonosítása, és méretük pontos megadása [190].

2.4.2 Gyógyszer-promiszkuitás, mint a gyógyszerfejlesztés lehetőségeinek 'tárháza'

Habár Seidler és munkatársai 2003-ban rávilágítottak arra, hogy az ismert, már kereskedelmi forgalomban kapható gyógyszerek között is előfordulnak promiszkuis AAI-k [177], a promiszkuitás gyógyszeripari megítélése negatív maradt, és továbbra is elzárkóznak az ilyen típusú vegyületek gyógyszerként való alkalmazásától. Úgy vélik, hogy ha egy adott inhibitor a célnyomóról kívül más fehérjével is kölcsönhatásba tud lépni, akkor a kívánt terápiás hatást nagy valószínűséggel mellékhatások fogják kísérni [191]. Ennek megfelelően, napjainkban is az ún.

targetalapú (Target-based Drug Discovery, TBDD) vagy más néven racionális gyógyszertervezés az elsődleges irányvonal. A TBDD során többnyire olyan kismolekulákat terveznek és fejlesztenek, melyek csupán egyetlen biológiai célponttal szemben mutatnak rendkívül nagy aktivitást [192]. Ugyanakkor a jelenleg gyógyíthatatlan betegségek esetében (összetettségük miatt) csak nehezen lehet elérni a kielégítő terápiás hatást az ilyen 'egy célponton ható' gyógyszerekkel'. Ráadásul ezek a szerek rendszerint nagyon drágák, és gyakran számos mellékhatással rendelkeznek. Emiatt a kutatók egyre elkötelezettebben igyekeznek alternatív megoldásokat kidolgozni. A század elejétől kezdve előtérbe került az ún. 'polifarmakológiai' gyógyszerfejlesztés, vagyis a korábbi egy célpontú stratégiával szemben a 'több célponton ható' gyógyszerek vizsgálata. A több célponton ható készítmények olyan szerek, melyek egyszerre több molekuláris célponttal is képesek kölcsönhatásba lépni (promiszkuitás), és valamennyi esetben ugyanolyan vagy hasonlóan jó farmakológiai hatást váltanak ki. Ezek a több célponton ható gyógyszerek sokkal eredményesebben használhatók a több gént egyaránt érintő, ún. komplex betegségek (például szív- és érrendszeri betegségek, daganatos megbetegedések, központi idegrendszert érintő kórképek, cukorbetegség) kezelésében, mint az egy célponton ható gyógyszerek [193]. Emiatt a polifarmakológia koncepcióján alapuló gyógyszerek kifejlesztése az utóbbi években egyre nagyobb figyelmet kapott. A szakirodalomban számos olyan publikáció található, melyekben a több célponton ható gyógyszerek racionális tervezésének különféle stratégiáiról számolnak be [194-195]. Azonban egy ilyen több célponton ható gyógyszer tervezése meglehetősen bonyolult, mely során számos szempontot kell figyelembe venni. Például kulcsfontosságú lépés a megfelelő biológiai célpontok kiválasztása, melyeknek jól karakterizáltaknak kell lenniük, és közös szerkezeti sajátosságokkal kell rendelkezniük. Továbbá, annak érdekében, hogy a tervezés eredményeként kapott vegyületek megfeleljenek a „gyógyszerszerű” molekulákkal szemben támasztott követelményeknek, elengedhetetlen a vezérmolekula-jelöltek optimalizálása is, mely során biztosítani kell a különböző hatásaik közötti megfelelő egyensúlyt [196]. A több célponton ható vegyületek kifejlesztésének egyik módja a már kereskedelmi forgalomban kapható, a visszavont vagy a még kísérleti fázisban lévő gyógyszerek új alkalmazási területeinek keresése (drug repurposing) [197]. A másik lehetőség értelmében, egy új több célponton ható gyógyszer tervezéséhez egy korábban már promiszkuisnak ítélt szerkezeti elemet vesznek alapul, és azt olyan specifikus kölcsönhatások kialakítására képes szubsztituensekkel látják el, melyek jelentősen megnövelik a vegyület kiválasztott célpontokkal szembeni hatékonyságát [198]. Maccari és munkatársai például olyan tiazolidinon vegyületeket terveznek és szintetizálnak, melyek az aldóz redukáz és a protein tirozin foszfatáz-1B enzimek egyidejű gátlásán keresztül

rendkívül nagymértékben hozzájárulhatnak a T2DM több szövődményének együttes kezeléséhez [199-200]. E tiazolidinonszármazékok alapvázát a rodanin képezi, mely szerkezeti elem már számos esetben eredményezte a kifejlesztett inhibitorok promiszkuis, aggregációalapú gátló hatását. A szerkezeti módosítások azonban lehetőséget biztosítanak arra, hogy kihasználják a promiszkuitás előnyeit, és ezzel egyidejűleg kiküszöböljék az aggregáció bekövetkezését okozó tényezőket [201].

3. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy napjainkban számos antidiabetikus hatású glikoenzim-inhibitor áll rendelkezésre, továbbra is intenzív kutatások folynak az új gátlószerek után. A gátlásvizsgálatok meghatározó részét képezi a megfelelő aktivitásmérési módszer alkalmazása, valamint az, hogy a kísérleti eredményekből helytálló következtetéseket vonjunk le. Doktori értekezésemben a glikoenzim-inhibitorok vizsgálatának e két kulcsfontosságú elemével foglalkoztam.

A glikogén foszforiláz esetében az enzim számos sajátosságát kell szem előtt tartani egy megfelelő aktivitásmérési módszer kidolgozásához. Egyrészt, ha az enzim inaktív formában van jelen (GFb), gondoskodni kell az aktiválásához szükséges AMP jelenlétéről. Mivel a GF egy két szubsztrátos enzim, így azt is biztosítani kell, hogy a reakció az egyik szubsztrátra nézve pszeudo nulladrendű legyen. Ráadásul az enzim reverzibilis reakciót katalizál, ezért olyan módszerre van szükség, ami lehetővé teszi mind a lebontás, mind a szintézis irányú folyamat vizsgálatát. A szakirodalomban viszont többnyire szakaszos GF-aktivitásmérési módszerek találhatók, melyeket csak az egyik irányban valósítanak meg. Ezért célul tűztem ki egy olyan aktivitásmérési módszer kidolgozását, mely során azonos körülmények között tudom követni mind a lebontás, mind a szintézis irányú reakciót. Az új módszer gátlásvizsgálatokra való alkalmazhatóságának alátámasztása érdekében két ismert GF inhibitor vizsgálatát terveztem elvégezni mindkét irányban úgy, hogy a reakciósebességet ugyanazon módszerrel mérjem.

A glikoenzim-inhibitorok tervezése és vizsgálata során felmerülő másik gyakori probléma az adott vegyület promiszkuitásra, illetve aggregálódásra való hajlama. Emiatt célul tűztem ki, hogy szintetikus eredetű, potenciális glikoenzim-inhibitorok aggregálódásra való hajlamát tanulmányozzam közvetlen és közvetett stratégiákat alkalmazva. Különbféle szubsztituensekkel módosított, rodanin-alapvázat tartalmazó tiazolidinonszármazékokon keresztül terveztem bemutatni azt, hogy az alapváz előzetes vizsgálatával valóban helyesen következtethetünk-e egy inhibitor nonspecifikus, promiszkuis jellegére, illetve azt, hogy a promiszkuisnak bizonyuló vegyületek gátló mechanizmusának hátterében valóban az aggregátumképződés áll-e.

4. Vizsgálati eredmények és értékelésük

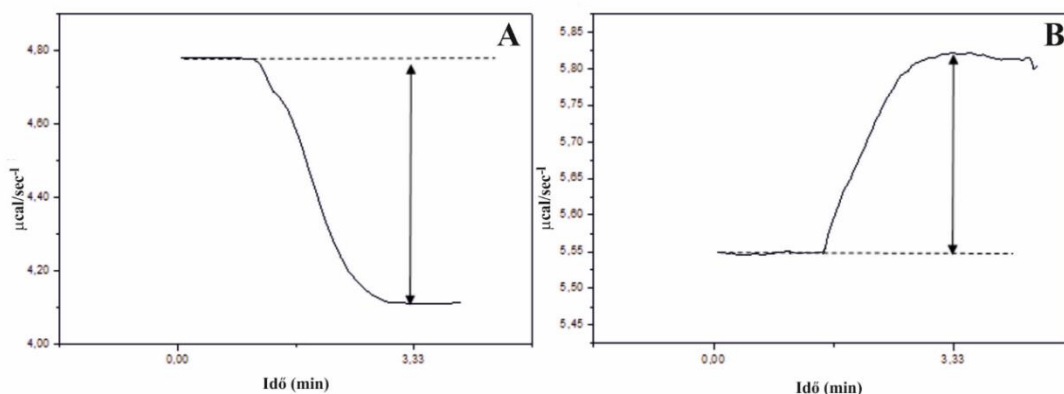
4.1 Új, ITC-alapú módszer kidolgozása a glikogén foszforiláz enzim aktivitásának mérésére

Az volt a célom, hogy kifejlesszek egy olyan aktivitásmérési módszert, mely alkalmazható a GF enzim által katalizált reverzibilis reakció mindkét irányában. Ehhez az ITC készülék megfelelőnek bizonyult, hiszen egy folyamat során keletkezett vagy elnyelt hőmennyiséget detektálja. Tekintettel arra, hogy majdnem minden kémiai reakciót hőváltozás kísér, az ITC univerzális detektornak tekinthető. Mivel nincs szükség arra, hogy a szubsztrát kromoforcsoporttal rendelkezzen, kiküszöbölhetővé válnak a fotometriás detektáláson alapuló módszerek hiányosságai. Ez lehetőséget biztosít az enzim természetes szubsztrátjának használatára származékképzés nélkül, ráadásul az alkalmazott ITC mérési módszer nem érzékeny a reakcióelegy összetételére sem. Az enzimkinetikai vizsgálatokra használt hagyományos ITC technikák (mint az egyszeres vagy többszörös injektálás) azonban nem alkalmasak a reverzibilis enzimreakciók tanulmányozására, mert a folyamat során keletkező termékek a fordított irányú reakció szubsztrátjai lehetnek. Ekkor a szubsztrát teljes átalakulása helyett, mely az egyszeres injektálással végzett ITC kísérlet végét jelentené, egy olyan egyensúlyi elegy alakul ki, ahol a két, egymással ellentétes irányú reakció azonos sebességgel játszódik le. Ez lehet az egyik oka annak, hogy az ITC módszert legfőképp olyan hidroláz enzimek tanulmányozására használják, ahol a fordított irányú reakció elhanyagolható a nagy mennyiségű víz jelenléte miatt [202- 203].

RmGF-et választottam modellenzimként, ugyanis a szakirodalomban szereplő legtöbb GF gátlásvizsgálatot is ezzel az izoenzimmal valósították meg (lásd a BRENDA adatbázist), így az általam kidolgozott új módszer során kapott eredmények könnyebben összevethetők az irodalmi adatokkal. A katalitikus aktivitással nem rendelkező GFb-vel végeztem a méréseimet, melynek allosztérikus aktiválásához biztosítanom kellett a megfelelő koncentrációjú AMP jelenlétét [204].

4.1.1 RmGF által katalizált enzimreakció karakterizálása ITC-vel

Az rmGF katalizálta szintézis és foszforolízis irányú reakciók sebességét ITC módszerrel határoztam meg. Ahogy az ITC méréseim során kapott termogrammok (16. ábra) szemléltetik, a glikogénszintézis egy exoterm, míg a lebontás egy endoterm folyamat, hiszen a bekövetkezett hőmérséklet-változás kiegyenlítéséhez az előbbi esetében negatív (16. A ábra), az utóbbinál pedig pozitív irányú (16. B ábra) változtatásra volt szükség.



16. ábra: 0,5% glikogénszubsztrát *rmGFb* enzim által katalizált lánchosszabbításának (A) és foszforolízisének (B) ITC vizsgálata során kapott termogrammok. A nyilak a mért hőáramot (dQ/dt) szimbolizálják, ami az alapvonaltól számított legnagyobb eltérésnek felel meg.

Mivel a reakciósebesség a folyamat maximális hőáramával (dQ/dt) arányos, nincs jelentősége annak, hogy a hőjelek pozitívak-e vagy negatívak. Az ITC kísérleteket egyszeres injektálási módszerrel hajtottam végre, mely során az injektorban lévő GFb oldat kis részletét (5 μ L) titráltam a mérőcellában található szubsztrátoldathoz (5 mg/mL glikogén). A kapott nyers kalorimetrikus jel alapján meghatároztam az alapvonaltól számított legnagyobb eltérés mértékét, mely a reakciósebességgel arányos dQ/dt értéket adta meg.

4.1.2 Hatásos aktivátorkoncentráció kiválasztása

A katalitikus aktivitással nem rendelkező, foszforilálatlan szabad GFb enzim AMP-vel allosztérikusan aktiválható. Annak érdekében, hogy meghatározzam a megfelelő AMP koncentrációt, vizsgáltam az AMP aktiváló hatását mind a foszforolízis, mind a szintézis irányában, 2-klór-4-nitrofenil- β -D-maltoheptaozid (CNP-G7) szubsztrát felhasználásával. Mivel a szintézis során keletkező P_i illetve a lebontás irányú folyamatban felszabaduló G-1-P is szubsztrátja lehet az enzimnek, biztosítanom kellett, hogy a reakció e komponensekre nézve pszeudo nulladrendű legyen. Méréseim során a félmaximális aktiváló hatást kiváltó koncentráció (EC_{50}) 50 μ M-nak adódott a glikogénlebontás irányában, míg 26 μ M-nak a szintézis esetén. A glikogénszubsztrátra megadott irodalmi EC_{50} érték 20-90 μ M [205-206], ami jó egyezést mutat az általam kapott eredményekkel.

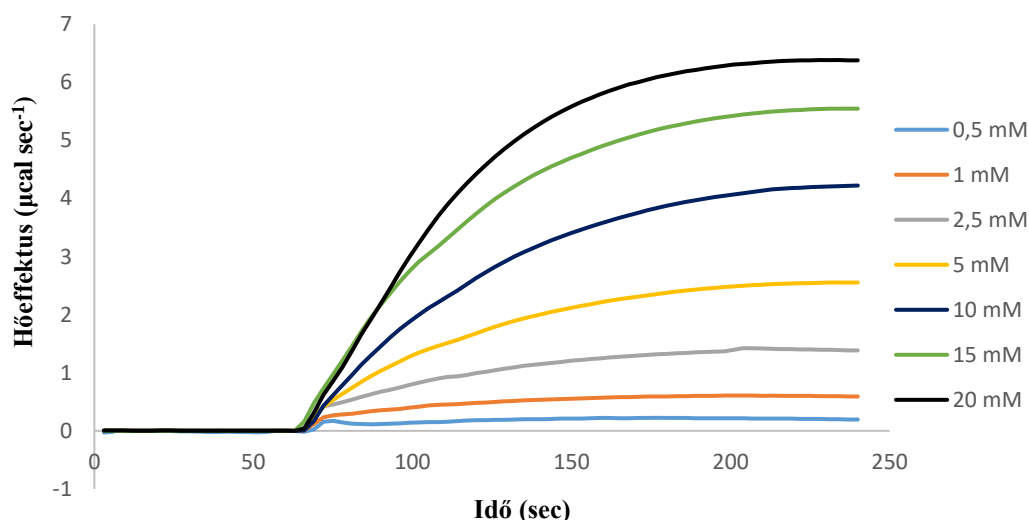
A kísérleti adatok alapján illesztett görbe 1 mM AMP koncentrációnál érte el a telítést, ami szintén összhangban van a szakirodalomban fellelhető releváns kísérletekben használt aktivátorkoncentrációval (1-2 mM AMP) [206-208].

Figyelembe véve, hogy 1 mM AMP koncentráció felett már nem következett be változás a reakciósebességben, a későbbi vizsgálataim során mindig ezt az aktivátormennyiséget alkalmaztam.

4.1.3 Szubsztrátspecifitás vizsgálata

Az új ITC módszer kidolgozása érdekében először a GFb enzim szubsztrátspecifitását vizsgáltam, hogy kiválaszthassam az aktivitásméréshez legalkalmasabb szubsztrátot. E kísérletekhez négy különböző szubsztrátot alkalmaztam: maltopentaózt (G5), maltoheptaózt (G7), glikogént és CNP-G7-et. Mind a négy szubsztrát esetében az ITC görbék maximumértékei alapján meghatározott, reakciósebességgel arányos dQ/dt értékeket ábrázoltam a szubsztrátkoncentrációk függvényében. Az ITC mérések során kapott adatokra Michaelis-Menten görbét illesztettem, és így hozzájutottam az enzim kinetikai paramétereihöz, vagyis a Michaelis-állandóhoz (K_M) és az enzimreakció maximális sebességéhez (v_{max}). Valamennyi mérést a fiziológias, G-1-P felszabadulással járó foszforolitikus folyamat irányában valósítottam meg, amit a puffer 1M foszfát tartalmával biztosítottam. A lebontási reakcióhoz alkalmazott 1M foszfát puffer (pH 6,8) 2,6 mM EDTA-t és 1 mM AMP-t tartalmazott.

A 17. ábra a különböző koncentrációjú G5 szubsztráttal végzett ITC kísérletek során kapott görbéket szemlélteti.



17. ábra: A G5 szubsztrát GFb által katalizált foszforolitikus reakciójának ITC vizsgálata során kapott termogrammok különböző szubsztrátkoncentrációk mellett. A G5 koncentrációja 0,5-30 mM tartományon belül változott, az alkalmazott rmGFb koncentrációja pedig 95,7 $\mu\text{g/mL}$ (0,37 μM) volt.

Annak érdekében, hogy össze tudjam vetni az rmGFb katalitikus hatékonyságát a vizsgált négy szubsztrátra nézve, kiszámoltam a k_{cat}/K_M arányokat. Az ITC kísérleteim során kapott eredményeket és az irodalmi adatokat az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: Az *rmGFb* enzim különböző szubsztrátokon meghatározott kinetikai paramétereinek összefoglalása.

Szubsztrát	Nemredukáló végek száma	ITC-vel mért adat*		Irodalmi adat [207]	
		Foszforolízis		Foszforolízis	Szintézis
		K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1}M^{-1}$)	K_M (mM)	K_M (mM)
G5	1	20,2 ±0,3	3,6*10 ³	9,1	38
G7	1	6,0 ±0,6	4,6*10 ³	7,1	31
CNP-G7	1	2,3 ±0,6[†]	10,1*10³	n.a.**	15,2 ±2,2^a
Glikogén	~200	1,5 ±0,1 ^{††}	6,3*10 ³	0,15	0,6

*: Az eredmények átlagérték ± illesztési hiba formában vannak feltüntetve.

** : nincs adat

^a: saját mérési eredmény

[†]: $[S]_{0,5}$, mivel a CNP-G7 reakció nem követi a Michaelis-Menten kinetikát.

^{††}: A glikogén esetében feltüntetett K_M érték mg/mL-ben van megadva.

Mivel a szakirodalomban nem találtam a CNP-G7 lánchosszabbítási reakciójára vonatkozó kinetikai adatokat, ezért ebben az esetben nemcsak a glikogénlebontás, hanem a szintézis irányában is elvégeztem az ITC kísérleteket, a puffer 50 mM G-1-P tartalmával biztosítva a megfelelő irányú reakció lejátszódását. E szintézis irányú mérésekhez 2,6 mM EDTA, 1 mM AMP és 50 mM G-1-P tartalmú 35 mM β -glicerofoszfát puffert (pH 6,8) használtam. A vizsgálatok során kapott adatok alapján a korábban leírtakhoz hasonlóan meghatároztam a kinetikai paramétereiket: a K_M 15,2±2,2 mM, a k_{cat}/K_M pedig $0,25*10^3 s^{-1}M^{-1}$ lett a glikogénszintézis irányában. Ha összehasonlítjuk a G7 és a CNP-G7 esetében meghatározott kinetikai paramétereiket, akkor látható, hogy a CNP kromoforcsoport hatására a specificitás mértéke jelentősen megnőtt (1. táblázat).

Annak ellenére, hogy az *rmGF* egy széleskörűen tanulmányozott enzim, a szakirodalomban jelenleg csupán egyetlen olyan közlemény található [209], ahol leírják a különböző lánchosszúságú maltooligomer-szubsztrátok K_M adatait. Ezeket az értékeket a reverzibilis reakció mindkét irányában meghatározták. Ha összevetjük a lebontás irányában általam kapott K_M értékeket az irodalomban szereplő, szintézis irányú adatokkal (1. táblázat), akkor megállapítható, hogy a maximális reakciósebesség felének eléréséhez a foszforolitikus reakcióban kisebb szubsztrátkoncentrációra van szükség, mint a szintézis irányában. Ugyanezt figyeltem meg a CNP-G7 szubsztrát esetében is, melynek a lebontás és szintézis irányú vizsgálatát egyaránt én valósítottam meg. Ez az eredmény megfelel a vártaknak, hiszen a GF fiziológiás körülmények között a glikogén foszforolízisét katalizálja.

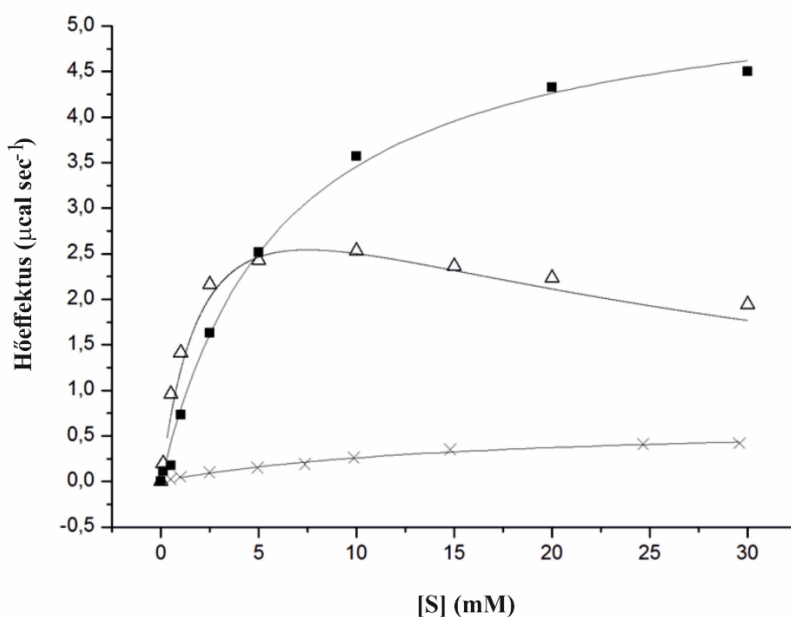
Továbbá az is látható az 1. táblázatban, hogy az egyes szubsztrátok általam meghatározott K_M értékei nagyságrendileg ugyan megegyeznek az említett publikáció ugyanazon szubsztrátra

feltüntetett adataival, azonban a különbségek nem elhanyagolhatók. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a két kísérletsorozatban nem egyezett meg az alkalmazott AMP és foszfátkoncentráció.

Az 1. táblázatból az is kiderül, hogy a lineáris szubsztrátok és a számtalan nemredukáló véget tartalmazó glikogén esetében az enzim katalitikus hatékonysága (k_{cat}/K_M) nagyságrendi hasonlóságot mutat. (A glikogén k_{cat}/K_M értékének meghatározásához a táblázatban feltüntetett mg/mL egységben kifejezett K_M -et átszámítottam mólos koncentrációra úgy, hogy a glikogén moláris tömegét $8,5 \cdot 10^5$ g/mól-nak vettem).

4.1.4 RmGFb szubsztrátgátlása

A GFb szubsztrátspecificitásának vizsgálatakor kapott adatok kiértékelésekor szubsztrátgátlást figyeltem meg a CNP-G7 kromoforcsoport-jelzett szubsztrát foszforolitikus reakciója esetén (18. ábra).



18. ábra: A [G7] és [CNP-G7] rmGFb enzim aktivitására kifejtett hatásnak ITC vizsgálata. A G7 foszforolízise (■) és a CNP-G7 szintézis irányú (x) reakciója során a görbék illesztése a Michaelis-Menten egyenlet alapján, nemlineáris regresszióval történt, míg a CNP-G7 foszforolízise (Δ) esetén a Haldane-egyenlet felhasználásával.

A természetben gyakran megfigyelhető a szubsztrátgátlás jelensége, ami fontos szerepet játszik a metabolikus folyamatok feedback mechanizmussal történő szabályozásában [210]. Szubsztrátgátlás akkor következik be, amikor az enzim rendelkezik egy másodlagos szubsztrátkötőhellyel is, és így lehetőség van két szubsztrát egyidejű kötődésére. A CNP-G7 foszforolitikus reakciója során kapott kísérleti adatok (Δ jelzés a 18. ábrán) e jelenséget szemléltetik. A maximális hőeffektus elérését követően a szubsztrátkoncentráció további

növelésével a reakciósebesség nem maradt állandó, hanem csökkenni kezdett, ami a második szubsztrát bekötődésének tulajdonítható. A kinetikai és gátlási paramétereket (K_M , K_i) ebben az esetben a szubsztrátgátlásra vonatkozó Haldane-egyenlettel határoztam meg, mely összefüggés alapján a K_M $2,3 \pm 0,6$ mM-nak, a K_i pedig 23 ± 7 mM-nak adódott.

A PNP kromoforcsoport gátló hatásáról korábban már beszámoltak, mely során a glikogén lánchosszabbítási reakciójában, G-1-P-ot alkalmazva második szubsztrátként, $IC_{50}=5$ mM értéket határoztak meg [206]. Megvizsgáltam a foszforolízis irányában a CNP kromoforcsoport okozta szubsztrátgátlást, ITC módszerrel, G7-et és foszfátot használva szubsztrátként. E kísérlet eredményeként azt kaptam, hogy 9 mM koncentrációjú CNP-re van szükség ahhoz, hogy az enzimreakció sebessége a felére csökkenjen ($IC_{50}=9$ mM). Az irodalmi adatok és a saját mérések alapján arra következtettem, hogy a szubsztrátgátlás egyfajta allosztérikus gátlásnak tekinthető, mely azt a kötőhelyet érinti, ahová a szabad PNP/CNP is tud kapcsolódni. A CNP-G7 esetében például bekövetkezhet, hogy az egyik szubsztrátmolekula maltoheptaózid része bekötődik az aktív centrumba, míg a másik szubsztrátmolekula kromoforcsoportja (CNP) nemkompetitív inhibitorként az enzim egy másik kötőhelyéhez kapcsolódik. A CNP-G7 szintézis irányú reakcióban mutatott nagy K_M értéke viszont nem tette lehetővé, hogy kísérleti úton elérjem a szubsztrát telítési tartományát. Ahhoz ugyanis, hogy pontosan meg lehessen határozni a Michaelis-állandót, a szubsztrátkoncentrációnak $0,1-10 \cdot K_M$ közötti tartományba kellene esnie. További vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy megbizonyosodhassak afelől, vajon a szubsztrátgátlás végbemegy-e a fordított irányú folyamat esetén is, illetve hogy e reakció eleget tesz-e a Michaelis-Menten kinetikának.

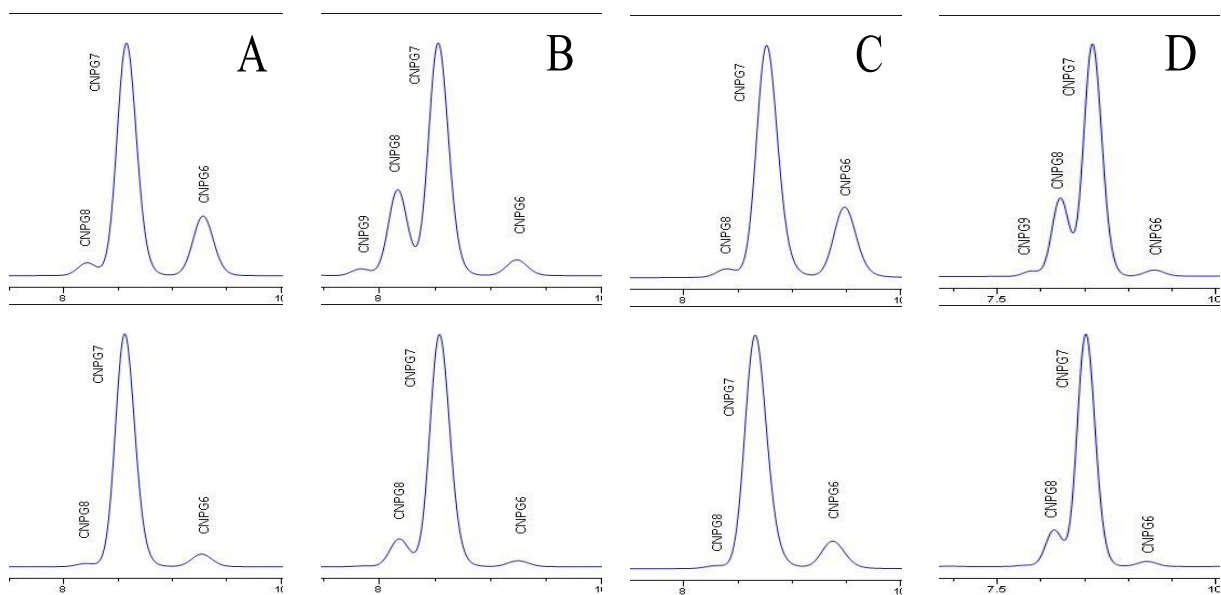
Mindazonáltal, a későbbi mérések során 2,5 mM CNP-G7 koncentrációt alkalmaztam, hogy kiküszöbölhessem a szubsztrát gátló hatását.

4.1.5 Gátlásvizsgálatok

Habár számos ismert GF inhibitor létezik [128-134], az irodalmi adatok nem mindig összevethetők. Sok vegyület esetében a gátlási paramétereket (IC_{50} , K_i) a biológiai szempontból nem releváns glikogénszintézis irányában határozzák meg (legtöbbször a P_i színreakciójának spektrofotometriás detektálásával) [125]. Ha a fiziológiásnak megfelelő folyamatot, vagyis a glikogénlebontást vizsgálják, az enzimaktivitás mérését leggyakrabban kapcsolt enzimrendszerrel valósítják meg [121]. A mindkét irányban végrehajtott aktivitásmérések meglehetősen ritkák [211], ráadásul az ellentétes irányokban kapott gátlási állandók (K_i) gyakran jelentősen eltérnek egymástól annak ellenére, hogy azoknak meg kellene egyezniük, hiszen a K_i az enzim-inhibitor komplex disszociációs állandójának felel meg. Mivel az volt a

feltevésem, hogy a különböző értékek az egyes mérések eltérő reakciókörülményeiből adódnak, egy olyan ITC módszert dolgoztam ki, mely lehetővé teszi mind a foszforolitikus, mind a szintetikus folyamat követését azonos reakciókörülmények között. Az új módszer gátlásvizsgálatokra való alkalmazhatóságáról való meggyőződés érdekében, két, korábban már hatékonynak bizonyult GF inhibitor gátló hatását tanulmányoztam a katalizált reakció mindkét irányában úgy, hogy, a reakciósebességeket ugyanazon ITC módszerrel határoztam meg. Az egyik gátlószer a koffein volt, mely a GF purin nukleotid kötőhelyéhez kapcsolódva stabilizálja az enzim inaktív, katalitikus aktivitással nem rendelkező konformációját. A másik inhibitor a szubsztrátra nézve kompetitív glükózanalóg vegyület, a GTH volt, melyet a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén Somsák László és kutatócsoportja szintetizáltak.

A reakciókörülmények optimalizálásához CNP-G7-et választottam szubsztrátként, mivel a CNP-G7 és a glikogénszubsztrátok K_M értékei nagyságrendileg megegyeznek, illetve a CNP lehetővé teszi a reakció HPLC segítségével történő követését. Egy enzimkatalizált reverzibilis reakció irányát a második szubsztrát határozza meg: a GF esetében a G-1-P a szintézis irányú, míg a P_i jelenléte a foszforolitikus reakció lejátszódásának kedvez. Mindhárom szubsztrát (CNP-G7, G-1-P, szervetlen foszfát) kiindulási koncentrációja 2,5 mM volt. Az egyensúly elérésekor a CNP-G7 58%-a alakult át nagyobb (24%) vagy kisebb (34%) tagszámú maltooligomer-termékekké. A G-1-P/ P_i arányt szisztematikusan változtatva el tudtam érni, hogy csak az egyik irány domináljon. 10-szeres felesleg már biztosította a kívánt irányt. Mielőtt ennek az új rendszernek megfelelően megvalósítottam volna az ITC gátlásvizsgálatokat, néhány előkísérletet végeztem el CNP-G7 szubsztráton, HPLC módszer segítségével. A 19. ábrán feltüntetett kromatogramok a CNP-G7 GFb katalizálta foszforolitikus és szintézis irányú reakciója során keletkező termékeket szemlélteti, 5 perc előinkubálást követően, a megfelelő inhibitor jelenlétében, valamint annak távollétében. A koffeint, illetve a GTH-t az irodalmi K_i értékek alapján meghatározott IC_{50} közeli koncentrációban alkalmaztam.



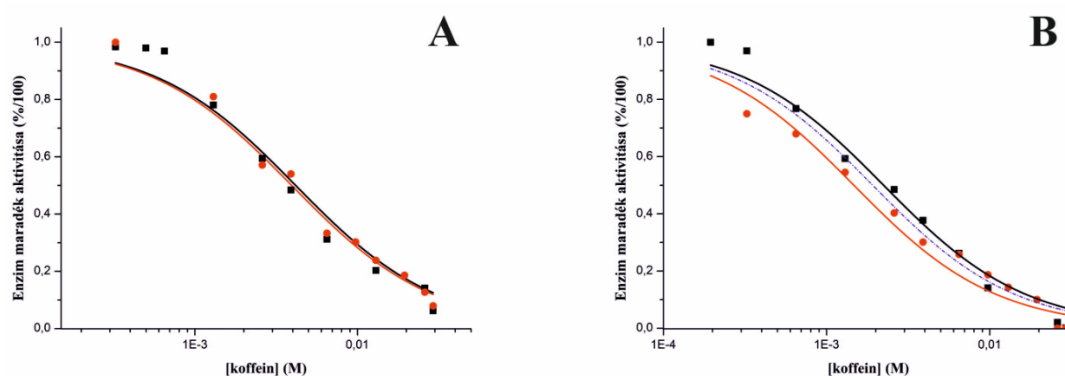
19. ábra: A CNP-G7 szubsztrát *rmGFb* enzim által katalizált foszforolízise és szintézise. A reakció követése HPLC módszerrel történt, inhibitorok alkalmazása nélkül (felső sor) és azok jelenlétében (alsó sor). A: GTH-foszforolízis irány; B: GTH-szintézis irány; C: koffein-foszforolízis irány; D: koffein-szintézis irány.

A foszforolízis körülményei között, tehát amikor a $P_i/G-1-P$ arány 10 volt, kisebb tagszámú maltooligomer-termékek keletkeztek, ahogy azt a 19. A (GTH) és 19. C (koffein) ábrák felső sorában található kromatogramok is szemléltetik. A szintézis körülményeit biztosítva pedig, amikor a $P_i/G-1-P$ arány 0,1 volt, hosszabb termékeket detektáltam, ami a 19. B (GTH) és 19. D (koffein) ábrák felső sorában lévő kromatogramokon jól látható. A termékek csúcsterületei csökkentek a GTH és a koffein jelenlétében, amit az alsó sorban feltüntetett kromatogramok mutatnak. A kromatogramokon található fő csúcs minden esetben a CNP-G7 szubsztráthoz tartozik, ami azt bizonyítja, hogy valamennyi mérés a kezdeti sebesség körülményei között történt.

Az ITC kísérleteket a HPLC vizsgálatokhoz hasonló reakciókörülmények között valósítottam meg, de a CNP-G7 helyett az enzim természetes szubsztrátját, vagyis a glikogént használtam. A kívánt reakció lejátszódását a puffer megfelelő $G-1-P/P_i$ tartalmával biztosítottam: 2,5 mM $G-1-P/25$ mM P_i arányt alkalmaztam a glikogén foszforolíziséhez, 25 mM $G-1-P/2,5$ mM P_i arányt pedig a glikogén lánchosszabbítási reakciójához.

Különböző inhibitor-koncentrációk mellett meghatároztam az enzim maradék aktivitását, majd a kapott pontokra nemlineáris regresszióval koncentráció-hatás görbéket illesztettem. E görbeillesztés alapján a látszólagos gátlási állandókhöz (K_i^*) jutottam, mely értékekből ki tudtam számolni a tényleges gátlási állandót (K_i).

Először a koffein gátló hatását vizsgáltam, mely során a szintézis és a lebontás irányában egyaránt végrehajtottam az ITC méréseket. Korábbi tanulmányokban már beszámoltak arról, hogy a koffein egy olyan, a szubsztrátra nézve nemkompetitív inhibitor, amely mind a máj-, mind pedig az izomeredetű GFa esetében az enzim purin nukleotid kötőhelyéhez kapcsolódik. A koffeint gyakran alkalmazzák pozitív kontrollként a különféle gátlásvizsgálatokhoz 1 mM koncentrációban [212-213]. A koffeinnel végzett gátlásvizsgálatok során kapott adatokra illesztett görbéket a 20. ábrán tüntettem fel.



20. ábra: A koffein *rmGFb* enzim által katalizált reverzibilis reakcióra kifejtett gátló hatásának ITC vizsgálata során kapott adatokra illesztett görbék. A: a glikogénlebontás irányában végzett párhuzamos mérések görbéi; B: a glikogénszintézis irányában végzett párhuzamos mérések görbéi. A B ábrán feltüntetett szaggatott vonal a szintézis irányú párhuzamos mérések együttes adatsorára illesztett görbét szemlélteti.

Ahogy a 20. ábrán is látható, a lebontás irányában (20. A ábra) a két mérés adatsoraira illesztett görbék szinte teljesen egybeesnek. A szintézis irányú reakció esetében a két mérés különálló adatsorára történő illesztés mellett elvégeztem az együttes adatsorra való illesztést is, melyet a 20. B ábrán látható szaggatott vonal jelöl. Habár a párhuzamos mérések pontjaira illesztett görbék mindkét irányban nagy hasonlóságot mutatnak, a foszforolitikus reakciónál sokkal jobb az egyezés. A Greco-Hakala-egyenlet felhasználásával megvalósított görbeillesztés alapján a K_i^* $1,9 \pm 0,1$ mM lett a glikogénszintézis irányában, míg $4,1 \pm 0,3$ mM a lebontási reakció esetén (2. táblázat). A tisztán nemkompetitív inhibitoroknál, mint például a koffeinnél, a K_i^* megegyezik a K_i értékével.

2. táblázat: A koffein és GTH rmGFb enzim által katalizált reverzibilis reakcióra kifejlesztett gátló hatásának ITC vizsgálata során meghatározott gátlási állandók összefoglalása és összevetése szakirodalmi adatokkal.

Inhibitor	K _i (μM)			
	Foszforolízis		Szintézis	
	ITC	Kapcsolt enzimrendszeres vizsgálat	ITC	Spektrofotometria (P _i)
Koffein	4050 ±260	n.a.*	1920 ±140	n.a.*
GTH	13,8 ±1,6	2,8 [214]	11,5 ±2,0	5,1 [215]

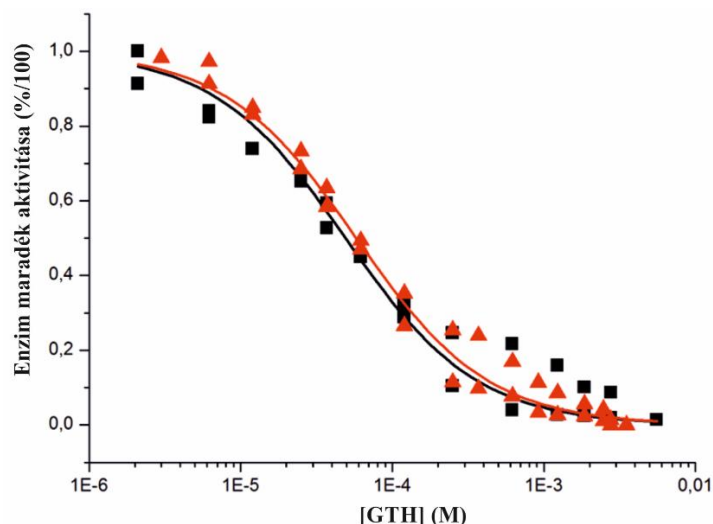
*: nincs adat

A 2. táblázat alapján látható, hogy bár az általam meghatározott gátlási állandók értékei nagyságrendileg megegyeznek, a lebontás irányában kapott érték mintegy kétszer nagyobb, mint a szintézisnél.

A 20. ábrán felfedezhető azonban, hogy az illesztést nem lehetett tökéletesen kivitelezni. Ez arra enged következtetni, hogy a koffein nem képes nagy affinitással kötődni a GFb enzimhez, ugyanis a Greco-Hakala egyenletet elsősorban a szorosan kötődő inhibitoroknál lehet alkalmazni. Abban az esetben, amikor logisztikus összefüggés alapján végeztem el az ábrázolást, a görbék ugyan jobban illeszkedtek a kísérleti adatokra, de az ellentétes irányokban meghatározott két K_i érték arányában nem mutatkozott lényeges eltérés (K_i=2,9 ±0,3 mM a foszforolízisre, K_i=1,7 ±0,6 mM a szintézisre).

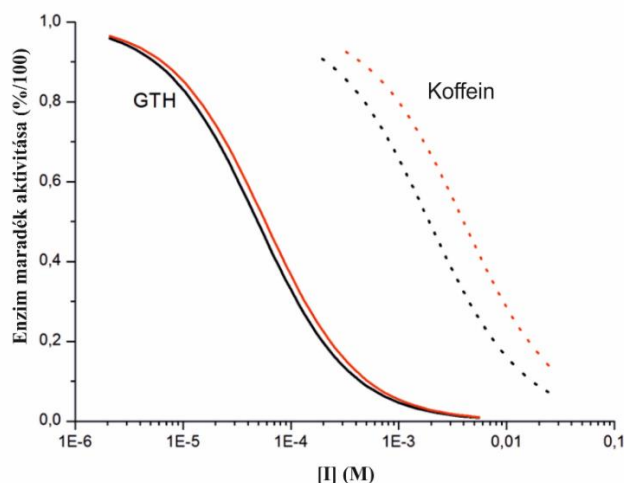
Szakirodalmi adatot a koffein esetében nem tudtam megadni, ugyanis a korábban már meghatározott gátlási állandót (K_i=0,1 mM) a GFa enzimen mérték [216]; ilyen jellegű irodalmi adatot eddig nem találtam a GFb enzimre nézve.

Az ITC-vel történő gátlásvizsgálatokat a koffeinnél leírtakhoz hasonlóan végeztem a másik inhibitor, a GTH jelenlétében is. A 21. ábrán a jobb áttekinthetőség érdekében csak a párhuzamos mérések együttes adatsorára, a Greco-Hakala egyenlet felhasználásával illesztett görbéket tüntettem fel, melyek alapján megkaptam a látszólagos gátlási állandókat. A szintézis, illetve lebontás irányú vizsgálatok során kapott görbék gyakorlatilag teljesen egybeesnek, ennek megfelelően a K_i^{*} értékek is közel állnak egymáshoz: 48,9 ±4,1 μM a szintézis esetén, míg 59,9 ±3,2 μM a lebontási reakcióban. A K_i^{*} értékekből számítottam ki a tényleges gátlási állandókat: a glikogénszintézis esetén K_i=11,5 μM, míg a glikogénlebontás irányában K_i=13,8 μM lett (2. táblázat).



21. ábra: A GTH *rmGFb* enzim által katalizált reverzibilis reakcióra kifejtett gátló hatásának ITC vizsgálata során kapott adatokra illesztett görbék. ■: a glikogénlebontás irányában végzett párhuzamos mérések együttes adatsorára illesztett görbék; ▲: a glikogénszintézis irányában végzett párhuzamos mérések együttes adatsorára illesztett görbék.

Ahogy a gátlásvizsgálatok során kapott eredmények is mutatják, a kompetitív inhibitor (GTH) esetében a K_i^* értékei között nem jelentkezett olyan nagymértékű különbség, mint a nemkompetitív típusú gátlószernél, a koffeinnél (22. ábra).



22. ábra: A GTH-val és koffeinnel végzett gátlásvizsgálatok eredményeinek összefoglalása. A szintézis (piros) és lebontás (fekete) irányú folyamatok ITC módszerrel történő vizsgálatát követően kapott adatokra illesztett görbék szemléltetése közös ábrán.

Ennek háttérében az állhat, hogy a kompetitív gátlás során egy enzim-inhibitor (EI) komplex jön létre, melyet egyetlen, jól-definiált K_{EI} gátlási állandó jellemez. Ennélfogva, a K_{EI} -nek meg kell egyeznie a lebontás illetve a szintézis irányban. A nemkompetitív (vegyes típusú) gátlás esetén azonban a gátlószert nemcsak a szabad enzimhez, hanem az enzim-szubsztrát

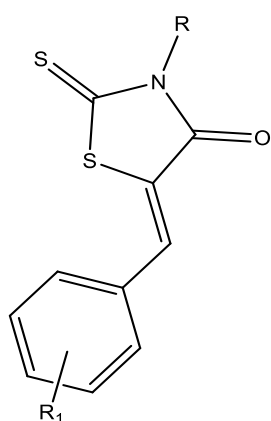
komplexhez is hozzá tud kapcsolódni. Mivel ekkor két inhibitor komplex, egy EI és egy ESI, is keletkezik, ezért a gátlás leírásához két különböző gátlási állandóra (K_{EI} és K_{ESI}) van szükség. A GF által katalizált reverzibilis reakcióban a szubsztrátok eltérnek a lebontás, illetve a szintézis irányú reakcióban, ami négy különböző gátlási állandót eredményez. Még ha az összes mikroszkópikus disszociációs állandó meg is egyezik a szintézis és a lebontási reakcióban, az azokból adódó makroszkópikus állandók eltérhetnek, ami az egyes irányok esetében kapott gátlási állandók közti különbséghez vezethet [217].

Habár a GTH esetében általam meghatározott lebontás és szintézis irányú K_i értékek a kompetitív inhibitorokra jellemző módon jó egyezést mutattak, az irodalmi adatoktól jelentősen eltértek (2. táblázat), ami az alkalmazott aktivitásmérési módszerek eltérő alapelveinek és a különböző kísérleti körülményeknek tulajdonítható.

A bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy a kidolgozott kísérlettervezési eljárást és reakciókörülményeket alkalmazva az ITC módszer lehetővé teszi a különféle foszforiláz enzimek aktivitásmérését mind a lebontás, mind a szintézis irányában, különböző szubsztrátok használata mellett, továbbá gátlásvizsgálatok kivitelezésére is kiválóan alkalmazható. Az általam kifejlesztett új módszer ilyen módon alkalmas lehet más, a GF-hez hasonlóan reverzibilis reakciókat katalizáló enzimek vizsgálatára is.

4.2 Tiazolidinonszármazékok promiszkuis jellegének és aggregációra való hajlamának vizsgálata

Kutatásom másik fő irányvonalát a molekulakönyvtárból származó, szintetikus eredetű tiazolidinonszármazékok promiszkuis jellegének, illetve aggregációra való hajlamának tanulmányozása képezi. Hét, eltérő szubsztituáltságú, rodanin-alapvázssal rendelkező (5-arylidén-4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)ecetsavszármazék (23. ábra, [200]) közvetett és közvetlen módszerekkel megvalósított vizsgálata során kapott eredményeket és azok értelmezését fogom bemutatni.



Vegyület száma	R	R ₁
1	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂
2	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂
3	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂
4	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂
5	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅
6	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅
7	H	4-OC ₆ H ₅

23. ábra: A vizsgált hét (5-arylidén-4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)ecetsavszármazék szerkezete

Az AAG bizonyításához valamennyi esetben PPA-t alkalmaztam modellenzimként, míg GalG₂CNP-t szubsztrátként. A GalG₂CNP enzimmel szembeni affinitása ugyan rosszabb, mint a természetes szubsztráté (keményítő), de ennek az egyetlen hasítási hellyel rendelkező kromogén szubsztrátnak a segítségével segédenzimek használata és további potenciális szubsztrátként szolgáló oligoszacharid termékek felszabadulása nélkül, egyetlen lépésben végbemegy a kromoforcsoport felszabadulása. A közvetett stratégia szerint megvalósított kísérletekhez, vagyis amikor az AAG feltételeinek teljesülését vizsgáltam, elsődlegesen UV-VIS spektrofotometriát használtam, melyet izotermális titrálási kalorimetriás (ITC) mérésekkel egészítettem ki. A közvetlen stratégia során DLS módszert alkalmaztam az inhibitor- és enzim molekulák méretében bekövetkező változás időbeli követésére.

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjak az AAG kimutatására alkalmazandó eljárások helytállóságáról, és hogy a tiazolidinonok esetében kapott eredményeket össze lehessen vetni egy pozitív és egy negatív kontrollal, először az akarbózzal és egy gallotanninnal végeztem el a kísérleteket. Mivel az akarbóz egy kereskedelmi forgalomban kapható antidiabetikum, meggyőződésem volt, hogy a PPA egy specifikus, kompetitív inhibitoráról van szó, mely kiválóan alkalmazható negatív kontrollként. Ennek megfelelően azt feltételeztem, hogy az

akarbóz nem fogja teljesíteni a promiszkuis AAI-k egyik feltételét sem (közvetett eljárás), valamint, hogy a részecskeméret meghatározására irányuló mérések (DLS) sem fogják kimutatni aggregátumok jelenlétét (közvetlen eljárás). Pozitív kontrollként egy hidrolizálható tannint választottam, mely egy hatékony α -amiláz gátlószerként ismert másodlagos növényi metabolit [85,222]. Polifenolos szerkezete és számos ismert biológiai hatása miatt erős volt a gyanúm, hogy az általam vizsgált aleppóitölgy-eredetű gallotannin az AAI-k egyik képviselője.

4.2.1 Promiszkuitásra irányuló biokémiai vizsgálatok

Mivel az AAG egyik legkorábbi figyelmeztető jele a promiszkuitás, vagyis a specificitás hiánya, először azt vizsgáltam, hogy az inhibitorok képesek-e szignifikáns gátló hatást kifejteni különféle enzimeken. Számos közlemény található, melyekben az akarbóz és a gallotanninok különböző enzimekkel szembeni gátló aktivitásáról számolnak be, ezért ezekben az esetekben a szakirodalomra támaszkodva határoztam meg a promiszkuitás jelenségének fennállását. A 3. táblázatban összefoglalt irodalmi adatok alapján látható, hogy az akarbóz ugyan több enzimre is jelentős gátló hatást tud gyakorolni, de ezek többsége a glikozid hidrolázok csoportjába tartozik [104, 218-221], melyek két szénhidrát egység vagy egy szénhidrát egység és egy aglikon közötti glikozidos kötés hasítását katalizálják. A 3. táblázatban szereplő valamennyi enzim a CAZy adatbázis szerinti besorolásuk alapján a GH13 vagy a GH31 család tagja [57]. Mindkét családra a $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-hordó struktúra és a két katalitikus karboxilcsoport (Glu, Asp vagy Asp, Asp) részvételével végbemenő retenciós mechanizmus jellemző. Következésképpen, ezen enzimek szerkezete, hatásmechanizmusa, funkciója és/vagy ligandumfelismerési képessége nem tér el nagymértékben. Habár a vártaktól eltérően az akarbóz promiszkuisnak bizonyult, annak hátterében nem aggregáció áll, hanem feltehetően olyan „privilegizált” szerkezeti elemek jelenléte, melyek egy adott fehérjecsalád több különböző tagjához is hozzá tudnak kötődni.

3. táblázat: Az akarbóz különféle enzimeken kifejtett aktivitáscsökkentő hatása

Enzim megnevezése	EC szám	CAZY család [57]	Gátlási paraméterek	Hivatkozás
HSA	3.2.1.1	GH13	$K_i = 1,3 \mu\text{M}$	218
PPA	3.2.1.1	GH13	$K_i = 0,8 \mu\text{M}$	218
Szukuráz	3.2.1.10	GH31	$K_i = 0,6 \mu\text{M}$	219
α -Glükózidáz	3.2.1.20	GH31	$K_i = 80 \mu\text{M}$	220
Ciklodextrin glükanozotranszferáz	2.4.1.19	GH13	$K_i = 2,5 \mu\text{M}$	104
Glükoamiláz	3.2.1.3	GH31	$IC_{50} = 1,7 \mu\text{M}$	221

A tanninok biológiai hatásának vizsgálata azért került az érdeklődés középpontjába, mert ezek az inhibitorok mikromólos vagy akár nanomólos koncentrációban is rendkívül nagymértékű gátló hatást tudnak kifejteni egymástól jelentősen eltérő enzimeken. Szakirodalmi adatok alapján (4. táblázat), a gallotanninok képesek csökkenteni az oxidoreduktázok (EC 1.), a transzferázok (EC 2.) és a hidrolázok (EC 3.) aktivitását is [222-227]. Ezek alapján a gallotannin – a vártaknak megfelelően – legalább három, eltérő szerkezettel, hatásmechanizmussal, funkcióval és/vagy ligandumfelismerési képességgel rendelkező célenzimet egyaránt képes gátolni, tehát e szempont értelmében a gallotanninok promiszkuis AAI-knak tekinthetők.

4. táblázat: A gallotanninok különféle enzimeken kifejtett aktivitáscsökkentő hatása

Enzim megnevezése	EC szám	Gátlási paraméterek	Hivatkozás
HSA	3.2.1.1	$K_i = 9 \mu\text{g/mL}$	222
PPA	3.2.1.1	$IC_{50}^* = 2,3 \mu\text{g/mL}$	-
Telomeráz	EC 2.7.7.49	$IC_{50} = 128,9 \text{ nM}$	223
Poli(ADP-ribóz) glikohidroláz	EC 3.2.1.143	$IC_{50} = 24,2 \mu\text{M}$	224
5 α -Reduktáz	EC 1.3.99.5	$IC_{50} = 7.8 \mu\text{M}$	225
α -Ketoglutarát-függő dioxigenáz AlkB	EC 1.14.11.33	$IC_{50} = 6.9 \mu\text{M}$	226
Zsírsvav szintáz	EC 2.3.1.85	$IC_{50} = 3.0 \mu\text{M}$	227

*: Ezen értekezésben meghatározott érték

Csakúgy, mint a negatív és pozitív kontrollként funkcionáló akarbóznál és tanninnál, a 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok esetében is azt vizsgáltam először, hogy promiszkuis AAI-knak tekinthetők-e. Mivel Maccari és munkatársai korábban már beszámoltak e vegyületek AR és

PTP1B enzimekkel szembeni gátló aktivitásáról, csupán egyetlen további, az előbb említettektől eltérő karakterisztikájú enzimet kellett vizsgálnom. Egy olyan enzimet szerettem volna választani, mely az AR-rel és PTP1B-vel szemben nem csak a T2DM szövődményeinek kialakulásában játszik szerepet, hanem a hiperglikémiás állapot kifejlődésében is. Emiatt döntöttem a hasnyálmirigy-eredetű α -amiláz (PPA) alkalmazása mellett. Mivel az összetett szénhidrátok monoszacharidokká történő teljes hidrolízise az α -amiláz és az α -glükozidáz együttes aktivitása révén valósul meg, ezért a tiazolidinonok promiszkuis jellegének meghatározásához mindkét enzim esetében elvégeztem a gátlásvizsgálatokat. Habár a PTP1B-hez hasonlóan ezek az enzimek is a hidrolázok osztályába tartoznak, mechanizmusukban és funkciójukban jelentősen eltérnek attól. A spektrofotometriás módszerrel általam kivitelezett gátlásvizsgálatok során kapott IC_{50} értékeket és az irodalmi adatokat az 5. táblázatban tüntettem fel.

5. táblázat: Az 1-7 tiazolidinonszármazék különféle mechanizmussal és/vagy funkcióval rendelkező enzimeken kifejtett gátló aktivitása.

Vegyület száma	R	R ₁	IC ₅₀ (μM)*			
			PPA	α -glükozidáz	AR [199]	PTP1B [199]
1	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂	194 ±3	208 ±3	0,06	717
2	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂	96,4 ±1,7	89,6 ±2,0	0,2	10%
3	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂	96,9 ±1,8	100 ±2	0,2	378
4	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂	66,2 ±0,3	62,1 ±1,2	0,1	679
5	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅	294 ±5	21% [†]	0,05	56
6	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅	23% ^{††}	141 ±5	0,05	43,1
7	H	4-OC ₆ H ₅	r.v. ^{**}	25% ^{†††}	0,06	63,9

*: Az IC_{50} értékek átlag ± illesztési hiba formájában vannak feltüntetve.

** : Rendellenes viselkedés

[†]: Maximálisan elérhető gátlás 102 μM inhibitor koncentráció esetén

^{††}: Maximálisan elérhető gátlás 193 μM inhibitor koncentráció esetén

^{†††}: Maximálisan elérhető gátlás 211 μM inhibitor koncentráció esetén

Még ha a PPA-t és az α -glükozidázt egyetlen csoportként is kezelem (hasonló mechanizmusuk és funkciójuk miatt), a hétből öt vegyület (**1**, **3**, **4**, **5**, **6**) akkor is egyértelműen promiszkuis AAI-nak tekinthető a három, egymástól eltérő enzimen kifejtett jelentős gátló hatásuk miatt. Habár a **2**-es és **7**-es származék teljesítette a promiszkuitás kritériumát, vagyis képesek voltak több enzimet is gátolni, a promiszkuis AAI-kal szemben állított követelménynek nem tettek eleget. A **7**-es vegyület ugyan gátolta az AR-t és a PTP1B-t, de az α -glükozidáz aktivitásának

legfeljebb 25%-os csökkentését lehetett elérni az alkalmazott legnagyobb inhibitor-koncentráció esetén (211 μM). Ráadásul a PPA-val szembeni gátló aktivitását egyáltalán nem lehetett meghatározni, mivel a folyamatosan csökkenő abszorbancia (rendellenes viselkedés) nem tette lehetővé az enzim kezdeti reakciósebességével (v_0) arányos $dAbs/min$ értékek mérését. A 2-es származék három enzimmel szemben (AR, PPA, α -glükózidáz) is szignifikáns aktivitáscsökkentő hatást mutatott, viszont a három gátolt enzim közül kettő gyakorlatilag azonosnak tekinthető (PPA és α -glükózidáz). Ez persze nem jelenti feltétlenül azt, hogy nem aggregáció áll e két vegyület promiszkuis viselkedésének hátterében, csupán azt, hogy e szempont teljesülésének vizsgálata önmagában nem elegendő az egyértelmű következtetések levonásához.

4.2.2 AAG prognosztizálása az *Aggregator Advisor* szoftver segítségével

Mivel a vegyületek promiszkuis jellegének leggyakoribb oka az aggregátumok képződése, következő lépésként az inhibitorok aggregációra való hajlamát vizsgáltam. Habár az alapszerkezeteket figyelembe véve gyanítottam, hogy a kilenc vegyület közül csak az akarbóz nem az AAI-k egyik képviselője, az AAG más szemszögből történő prognosztizálásához az *Aggregator Advisor* szoftvert hívtam segítségül. A program kiértékelése szerint, mely eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze, a kilencből csupán két esetben áll fent az AAG lehetősége: a gallotanninnál és a 7-es vegyületnél.

6. táblázat: A vizsgált inhibitorok *Aggregator Advisor* által meghatározott $\log P$ értéke és Tanimoto-indexe

Vegyület	$\log P$ érték	Tanimoto-index
Akarbóz	-5,5	-
Tannin	2,8	0,84
1	-0,1	-
2	-0,1	-
3	-0,5	-
4	-0,5	-
5	2,8	-
6	2,8	-
7	3,6	-

A gallotannin számított $\log P$ értéke meglehetősen magas volt (2,8), és 84%-os szerkezeti hasonlóságot mutatott egy korábban már aggregátornak bizonyult vegyülettel [228]. Azonban sem a $\log P$, sem pedig a Tanimoto-index nem haladta meg azt az irodalmi határértéket ($\log P > 3$; Tanimoto-index $> 0,85$), mely felett egy vegyület AAI-nak ítéltető. Ráadásul az *Aggregator Advisor*-ban megjelenő egyetlen találat esetében meghivatkozott közleményben tényleges nem szerepeltek az e vegyületre vonatkozó kísérleti adatok. Következésképpen, a gallotannin

aggregációalapú gátló mechanizmusának vizsgálata nem csak abból a szempontból volt fontos, hogy rendelkezésemre álljon egy pozitív kontroll a szintetikus inhibitorokkal történő későbbi kísérletekhez, hanem hogy egyértelmű bizonyítékot szolgáltatassak a gallotanninok nemspecifikus jellegét illetően.

A 7-es vegyület kémiai szerkezete és fizikai sajátosságai alapján a program nem talált hasonlóságot egyetlen ismert AAI-val sem. A nagy hidrofóbicitása ($\log P=3,6$) miatt azonban felhívta a figyelmet az aggregáció bekövetkezésének valószínűségére.

Habár a rodanin-alapvázat tartalmazó vegyületekről bebizonyították már korábban [201], hogy rendkívül hajlamosak az aggregálódásra vagy a fehérjék aggregációjának kiváltására, az *Aggregator Advisor* adatbázisában egy olyan ismert AAI sem szerepelt, mely az 1-7 származékokéhoz hasonló szerkezettel rendelkezett volna. Az 1-6 vegyületek számított $\log P$ értéke ráadásul negatív tartományba esett, vagyis lipofilitásuk olyan kicsi volt, hogy a szoftver egyáltalán nem vetette fel az aggregáció lehetőségét.

Az akarbóz AAI jellegének szoftveres előrejelzése viszont megfelelt a vártaknak: a becsült $\log P$ értéke lényegesen kisebb volt, mint a másik nyolc vegyületé, és egyetlen olyan szerkezeti egységet sem tartalmazott, ami alkalmas lett volna a *Tanimoto-indexének* meghatározására.

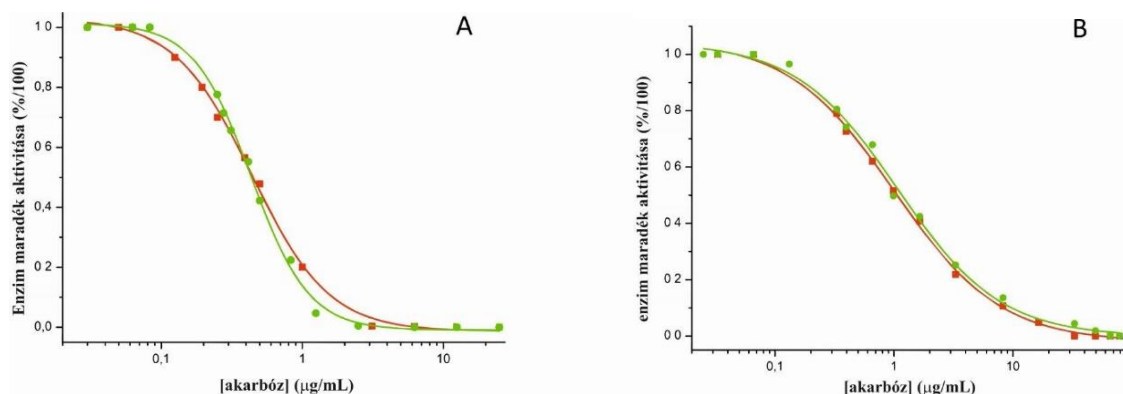
4.2.3 Detergensekkel szembeni érzékenység vizsgálata

Mivel a detergensekkel szembeni érzékenység vizsgálata az egyik legegyszerűbb és leggyorsabb módja annak, hogy kísérleti úton megkülönböztessük az AAI-kat a specifikus gátlószerektől, megismételtem az eredeti gátlásvizsgálatokat olyan módon, hogy a puffer, melyben az enzimet, inhibitorát és szubsztrátot oldottam, 0,01% Triton X-100 nemionos detergenst tartalmazott. Figyelembe véve azt, hogy a detergensek közismerten gátolják a hidrofób vegyületek aggregálódását, illetve a nemspecifikus fehérje-aggregátum kölcsönhatások kialakulását, azt feltételeztem, hogy a Triton X-100 alkalmazása következtében az akarbóz kivételével valamennyi vegyület gátló hatása romlani fog, vagyis az IC_{50} értékük nőni fog. Ez a feltevés azonban csak részben igazolódott be.

Először az akarbóz és a tannin detergensekkel szembeni érzékenységét vizsgáltam. Az enzimet (PPA) és szubsztrátot (GalG₂CNP) azonos koncentrációban alkalmazva (0,56 µg/mL enzim és 1 mM szubsztrát a reakcióelegyben) változtattam az akarbóz, valamint a tannin mennyiségét, és spektrofotometriás módszerrel meghatároztam az időegység alatt bekövetkező abszorbanciaváltozásokat. Az eredmények helytállóságának ellenőrzése érdekében ITC módszerrel is elvégeztem a kísérletet, ahol az időegység alatt felszabaduló hőmennyiséget

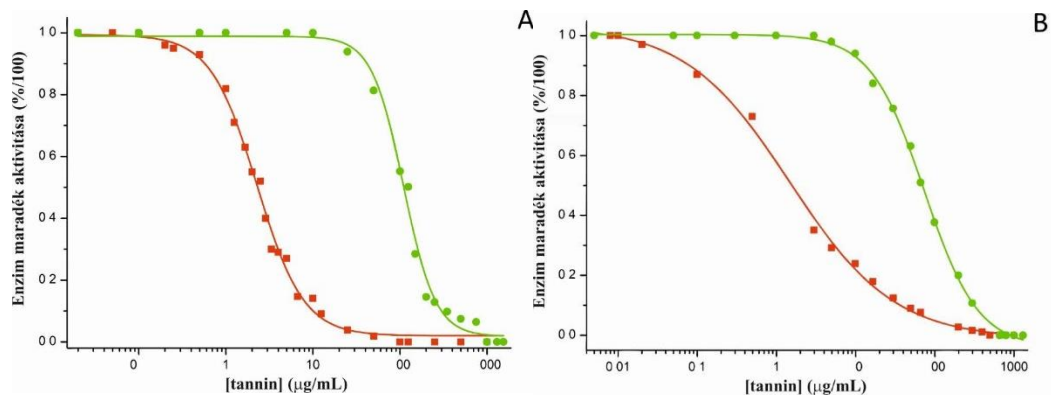
detektáltam. A detergenssel és az a nélkül végzett mérések során kapott pontokra illesztett görbéket a könnyebb összehasonlíthatóság érdekében közös ábrán tüntettem fel.

Mindkét technikával ugyanarra az eredményre jutottam: a Triton X-100 az akarbóz gátló hatását nem, míg a tanninét jelentősen befolyásolta. Az akarbóz esetében csupán 3% eltérés mutatkozott a detergens nélkül, illetve az azzal megvalósított spektrofotometriás mérések során meghatározott IC_{50} értékekben, és az ITC-vel is csak 6% volt ez a különbség (7. táblázat). Ráadásul, ahogy a 24. ábra is szemlélteti, a kapott 2-2 koncentráció-hatás görbe mindkét módszernél gyakorlatilag teljesen átfedi egymást.



24. ábra: Az akarbóz aggregálódásra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás (A) és ITC (B) módszerrel, PPA enzim és GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával, 0,01% Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében (●), illetve annak távollétében (■).

A gallotannin gátló aktivitásában azonban mindkét technikával jelentős eltérést tapasztaltam. Ahogy a 25. ábrán látható, a Triton X-100 alkalmazását követően kapott zöld színnel jelzett görbe a detergens nélkül végrehajtott gátlásvizsgálat adataira illesztett piros színű koncentráció-hatás görbéhez képest nagymértékben jobbra tolódott, ami a gátlási paraméter szignifikáns csökkenésében is megmutatkozott. A spektrofotometriás vizsgálatok szerint az IC_{50} érték 2,27 µg/mL-ről 110 µg/mL-re emelkedett (7. táblázat), ami egy megközelítőleg 50-szeres növekedést jelent. Az ITC kísérletek is alátámasztották ezt a változást: a detergens nélkül mért 1,5 µg/mL IC_{50} 74,1 µg/mL-re módosult Triton X-100 jelenlétében, ami ugyancsak majdnem 50-szeres gátlásromlást reprezentál.



25. ábra: Az aleppó tannin aggregálódásra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás (A) és ITC (B) módszerrel, PPA enzim és GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával, 0,01% Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében (●), illetve annak távollétében (■).

Egy tanninmolekulában számos –OH csoport található, melyek mindegyike képes hidrogénkötést létesíteni az α -amiláz valamely oxigén vagy nitrogén tartalmú aminosavával (például Asp, Glu, Tyr, Trp, His, Arg), illetve a tannin aromás gyűrűi és az enzim aromás aminosavláncai (Tyr, Trp) között Π -stacking kölcsönhatás jöhet létre [229]. Ha a detergens megbontja a tanninmolekulák által alkotott aggregátumot, kevesebb aminosavval tud egyidejűleg kötést létesíteni, ezáltal nagyobb lesz az enzim maradék aktivitása.

Következésképpen, a vártaknak megfelelően, az akarbóz gátló hatása nem bizonyult érzékenynek a detergenssel szemben, míg a gallotannin teljesítette a promiszkuis AAI-kal szemben állított kritériumainak e részét.

7. táblázat: A vizsgált inhibitorok spektrofotometriás (és ITC) módszerrel meghatározott gátlási paramétereinek változása Triton X-100 detergens jelenlétében.

Vegyület	R	R ₁	IC ₅₀ (μM)*		
			- detergens	+0,01% detergens	+0,1% detergens
Akarbóz	-	-	0,65 ±0,02 ^a ; 1,60 ±0,04 ^b	0,67 ±0,01 ^a ; 1,70 ±0,04 ^b	-
Tannin**	-	-	2,27 ±0,08 ^a ; 1,5 ±0,1 ^b	110 ±5 ^a ; 74,1 ±0,1 ^b	-
1	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂	194 ±3	192 ±4	-
2	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂	96,4 ±1,7	108 ±2	127 ±1
3	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂	96,9 ±1,8	93,9 ±0,5	-
4	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂	66,2 ±0,3	67,3 ±0,9	-
5	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅	294 ±5	149 ±4	88,9 ±0,7
6	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅	23% [†]	33% [†]	41% [†]
7	H	4-OC ₆ H ₅	r.v.***	109 ±1	81,3 ±1,9

*: Az IC₅₀ értékek átlag ± illesztési hiba formájában vannak feltüntetve.

** : A tannin esetében feltüntetett IC₅₀ értékek μg/mL-ben vannak megadva.

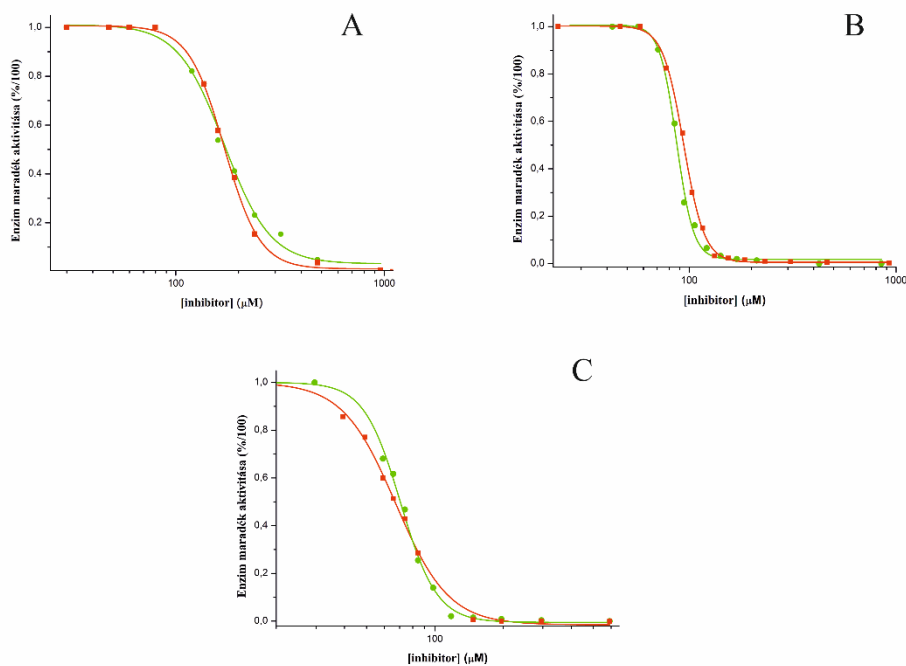
***: Rendellenes viselkedés

†: Maximálisan elérhető gátlás 193 μM inhibitor-koncentráció esetén

^a: Spektrofotometriás módszerrel meghatározott IC₅₀ értékek

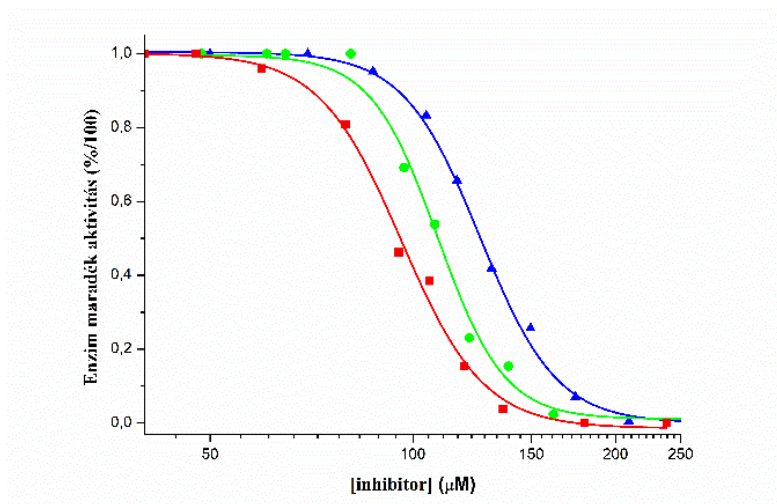
^b: ITC módszerrel meghatározott IC₅₀ értékek

A 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok detergenssel szembeni érzékenységének vizsgálata kizárólag spektrofotometriás módszerrel történt, melynek eredményei semmilyen tekintetben sem egyeztek az előzetesen vártakkal. Három inhibitor IC₅₀ értékében (**1**, **3** és **4**) az akarbózzal analóg módon nem mutatkozott eltérés; a detergenssel és a nélküle végzett kísérletekből származó adatokra illesztett görbék szinte teljesen egybeesnek (26. ábra), ebből adódóan a gátlási paraméterek is jó egyezést mutatnak (7. táblázat). Ennek értelmében az **1**-es, **3**-as és **4**-es vegyületek nem tekinthetők promiszkuis AAI-knak, hiszen nem tettek eleget az erre vonatkozó egyik legalapvetőbb feltételnek.



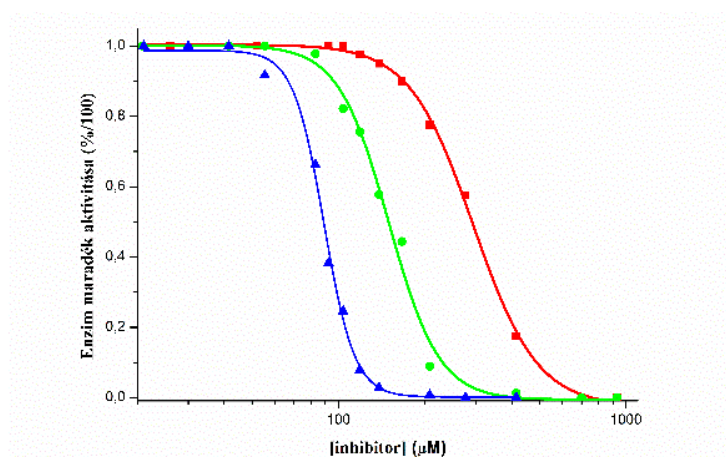
26. ábra: Az **1-es** (A), **3-as** (B) és **4-es** (C) 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék aggregálódásra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel, PPA enzim és GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával, 0,01% Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében (●), illetve annak távollétében (■).

A detergenssel szembeni érzékenységre irányuló vizsgálatok kezdete előtt – a rodanin-alapváz jelenléte miatt – valamennyi 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék, így a **2-es** vegyület esetében is azt feltételeztem, hogy AAG révén fejt ki hatását. Miután azonban az **1-es** vegyület IC_{50} értéke Triton X-100 hatására nem mutatott változást, úgy gondoltam, hogy a **2-es** származéknál is ugyanerre az eredményre fogok jutni, hiszen a két vegyület csupán az $-OCH_2CONH_2$ csoport pozíciójában különbözik. Ezzel szemben, a **2-es** származék IC_{50} értéke kis mértékben (12%) ugyan, de nőtt a 0,01% Triton X-100 hatására, ráadásul a detergenssel végzett mérés adataira illesztett görbe is egy határozott jobbra tolódást mutatott (27. ábra). Annak érdekében, hogy meggyőződjek arról, hogy a gátlásban bekövetkezett csökkenést valóban a detergens jelenléte eredményezte, megismételtem a kísérletet 0,1% Triton X-100 alkalmazása mellett. A tízszeres mennyiségű detergens jelenléte már egyértelműen jelezte a **2-es** vegyület és a pozitív kontroll közötti hasonlóságot: a gátló aktivitás jelentősen lecsökkent, amit az illesztett görbe markánsabb eltolódása (27. ábra) és a gátlási paraméter megközelítőleg 32%-os növekedése jelez.



27. ábra: A 2-es számú 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék aggregálódásra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel, PPA enzim és GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával, 0,01% (●) és 0,1% (▲) Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében, illetve annak távollétében (■).

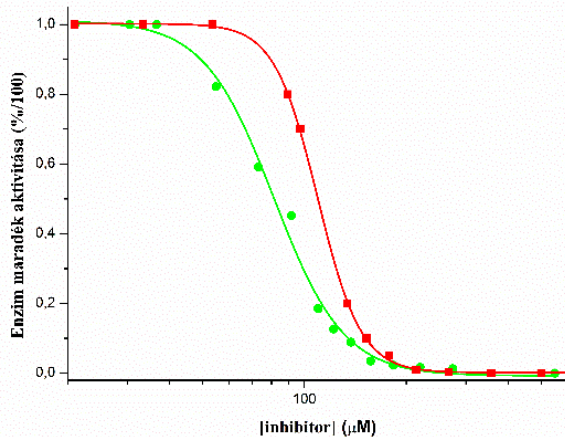
A maradék három vegyület (5, 6 és 7) vizsgálatokor pontosan az ellenkező irányú változás következett be, mint amit a szakirodalmi adatok alapján a promiszkuis AAI-knál várnánk: a gátlás mértéke a prognosztizált csökkenés helyett jelentősen nőtt. A legszembetűnőbb eltérés az 5-ös származék esetében mutatkozott, ahol a gátlás 0,01% Triton X-100 hatására 51%-kal, 0,1% detergens jelenlétében pedig mintegy 70%-kal lett jobb, amit a koncentráció-hatás görbék szignifikáns balra tolódása is jól szemléltet (28. ábra).



28. ábra: Az 5-ös számú 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék aggregálódásra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel, PPA enzim és GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával, 0,01% (●) és 0,1% (▲) Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében, illetve annak távollétében (■).

A 6-os és 7-es származékoknál ugyan nem ennyire nyilvánvaló a gátló aktivitás javulása, de a gátlási paraméterekben mutatkozó tendencia jól látható. A 6-os vegyület az enzim aktivitásának

legfeljebb 23%-os csökkenését eredményezte detergens alkalmazása nélkül, míg 0,01% Triton X-100 hatására már 33%-ra, 0,1% detergenstartalom mellett pedig 41%-ra nőtt a maximális gátló hatás. A 7-es származék hatékonyságának fokozódása abban nyilvánult meg, hogy detergens használatával az inhibitoromolekulák olyan mértékben stabilizálódtak, hogy pontosan meg lehetett határozni az IC_{50} értékeket. Detergens nélkül ugyanis a rendellenes viselkedésből adódóan nem lehetett kivitelezni az enzim aktivitásának mérését, viszont már 0,01% Triton X-100 jelenlétében is jól-definiált abszorbanciaértékeket kaptam, ami lehetővé tette így a görbeillesztést (29. ábra) és az IC_{50} értékek meghatározását. Mivel a változás irányára ekkor még nem tudtam következtetni, ebben az esetben is megismételtem a kísérletet tízszeres detergenskoncentráció alkalmazásával. Ahogy a 29. ábrán is látható, 0,1% Triton X-100 az illesztett görbe balra tolódását, és ebből következően az IC_{50} érték csökkenését eredményezte.



29. ábra: A 7-es számú 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék aggregálódásra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel, PPA enzim és GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával, 0,01% (■) és 0,1% (●) Triton X-100 nemionos detergens jelenlétében.

Az 5-ös, 6-os és 7-es vegyületek esetében a detergens hatására bekövetkező gátlásjavulás egyik oka az lehet, hogy detergens jelenlétében az inhibitormonomerek oldékonysága és így koncentrációja megnő, és a monomerek az aktív gátló részecskék.

A gátlásjavulás egy másik lehetséges magyarázata, hogy e három származék rendkívül hidrofób jellege miatt az inhibitoromolekulák hidrofób részei kölcsönhatásba léphetnek a detergensmolekulák apoláris farokrészeivel. Az ilyen módon kialakult detergens-inhibitor komplex pedig nagyobb felületet biztosít az enzimomolekulák számára, ami így a gátló aktivitás növekedéséhez vezet.

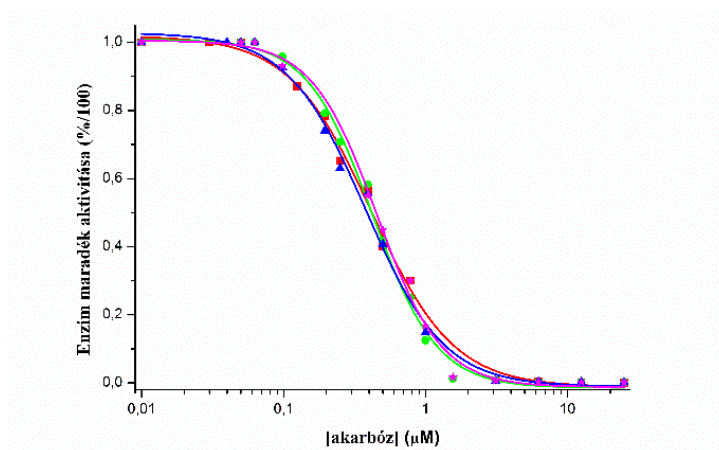
Ezen eredmények fényében azonban a szakirodalom pontatlannak mondható. A legtöbb közleményben ugyanis az szerepel, hogy egy vegyület szinte teljes bizonyossággal AAI-nak tekinthető, ha a detergens jelenlétében megismételt kísérlet során a gátló hatás csökkenését,

vagyis az IC_{50} érték növekedését tapasztaljuk. Ehelyett azt a megállapítást érdemes tenni, hogy amennyiben egy vegyület gátló aktivitásában jelentős változás következik be detergens alkalmazása esetén, akkor nagy valószínűséggel AAG révén fejt ki aktivitáscsökkentő hatását.

4.2.4 Enzim-inhibitor előinkubálás hatásának vizsgálata

Az AAI-k következő meghatározó jellemzőjének, vagyis az időfüggő gátlásnak a vizsgálata során a kísérleteket úgy valósítottam meg, hogy a PPA enzimet és az inhibitorokat 5, 10 és 30 percig inkubáltam, mielőtt a GalG₂CNP szubsztrát hozzáadásával elindítottam volna az enzimreakciót. Az előinkubálás hatására bekövetkező változások megfigyelése kizárólag spektrofotometriás módszerrel történt.

A korábbiakhoz hasonló módon, az időfüggés kritériumának teljesülését is először a pozitív és negatív kontrollok esetében vizsgáltam. A vártaknak megfelelően, az akarbóz gátló aktivitásában nem mutatkozott változás a 30 perces előinkubálást követően sem. Az IC_{50} értékek legfeljebb 1,5%-os eltérést mutattak (8. táblázat), és a koncentráció-hatás görbék is tulajdonképpen teljesen átfedték egymást (30. ábra).



30. ábra: Az akarbóz időfüggő gátló hatásának spektrofotometriás vizsgálata során kapott pontok és az illesztett görbék. A PPA és akarbóz 0 min (■), 5 min (●), 10 min (▲) és 30 min (★) ideig volt inkubálva a reakció indítása előtt.

8. táblázat: A vizsgált inhibitorok spektrofotometriás módszerrel meghatározott gátlási paramétereinek változása 5, 10 és 30 min előinkubálást követően.

Vegyület	R	R ₁	IC ₅₀ (µM)*			
			Előinkubálás ideje			
			0 min	5 min	10 min	30 min
Akarbóz	-	-	0,65 ±0,02	0,64 ±0,02	0,64 ±0,03	0,65 ±0,04
Tannin**	-	-	2,27 ±0,08	1,10 ±0,05	0,97 ±0,05	0,65 ±0,03
1	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂	194 ±3	195 ±2	201±3	200 ±3
2	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂	96,4 ±1,7	13%	n.g.†	n.g.†
3	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂	96,9 ±1,8	94,5 ±1,3	97,0 ±1,6	96,6 ±1,5
4	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂	66,2 ±0,3	69,0 ±1,6	68,9 ±2,1	69,7 ±1,1
5	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅	294 ±5	181 ±9	189 ±4	186 ±8
6	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅	23%††	18%††	12%††	9%††
7	H	4-OC ₆ H ₅	r.v.***	108 ±2	114 ±3	151 ±5

*: Az IC₅₀ értékek átlag ± illesztési hiba formájában vannak feltüntetve.

** : A tannin esetében feltüntetett IC₅₀ értékek µg/mL-ben vannak megadva.

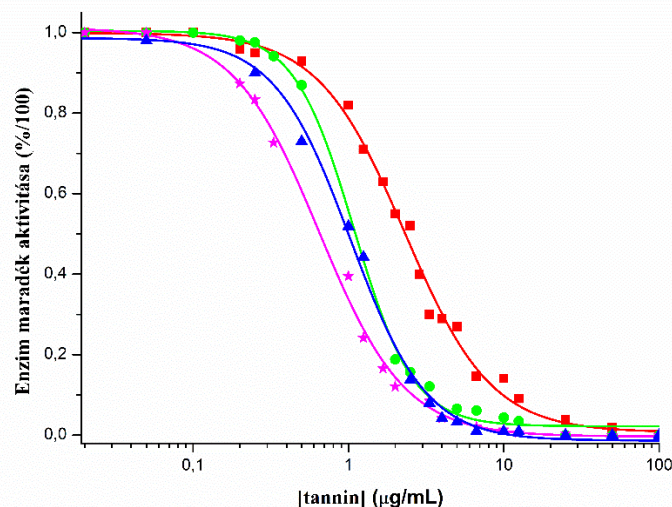
*** : Rendellenes viselkedés

† : Nincs gátlás

†† : Maximálisan elérhető gátlás 193 µM inhibitor-koncentráció esetén

A tannin gátló hatásában azonban ismételt eltérést tapasztaltam a reakciókörülmények változtatása során. Az enzim és inhibitor 5 perces előinkubálását követően végzett

görbeillesztés (31. ábra) alapján meghatározott IC_{50} érték több mint a felére csökkent, 30 perc után pedig már megközelítőleg a negyede lett.

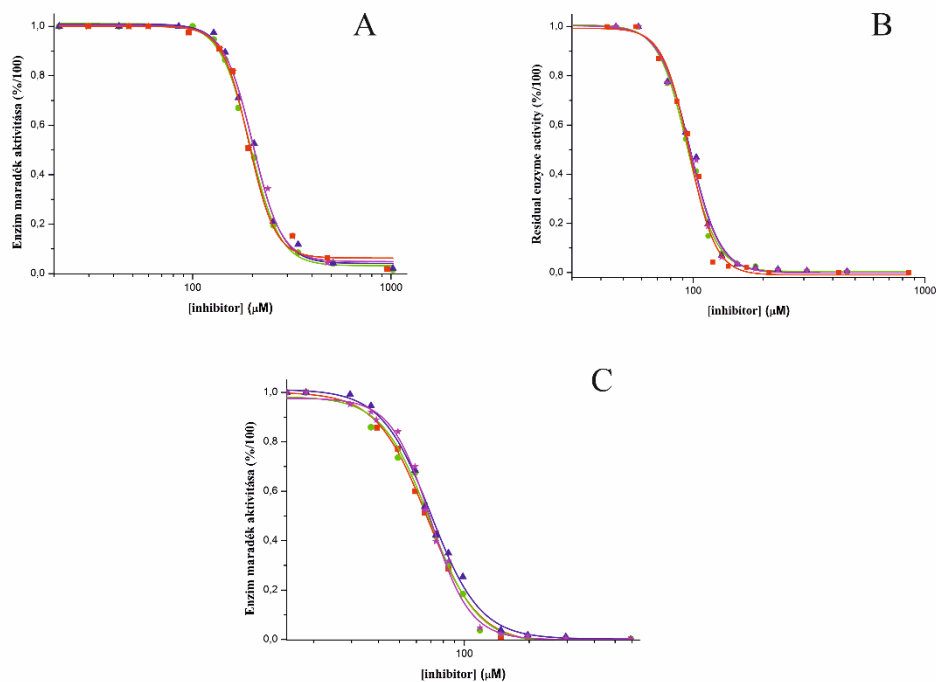


31. ábra: Az aleppó tannin időfüggő gátló hatásának spektrofotometriás vizsgálata során kapott pontok és az illesztett görbék. A PPA és tannin 0 min (■), 5 min (●), 10 min (▲) és 30 min (★) ideig volt inkubálva a reakció indítása előtt.

Ez a gátlásjavulás azzal magyarázható, hogy minél több időt biztosítottam a PPA és a tannin érintkezésére, annál nagyobb méretű aggregátumok jöttek létre, és így annál több enzim-molekulát voltak képesek adszorbeálni.

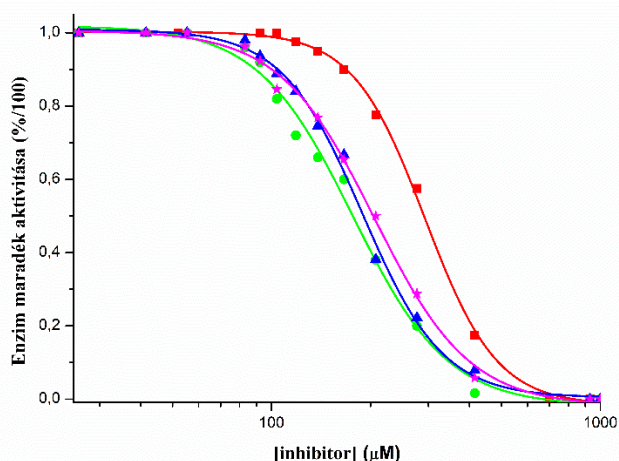
A kapott eredmények alapján tehát elmondható, hogy a gallotannin teljesítette az AAI-k azonosítására szolgáló második kritériumot is, vagyis az időfüggő gátló hatást.

Csakúgy, mint a detergenssel szembeni érzékenység vizsgálatakor, az enzim-inhibitor előinkubálás hatásának tanulmányozásakor is ellentmondásokba ütköztem a 4-tiazolidinonszármazékok esetében. Az 1-es, 3-as és 4-es vegyületek gátló aktivitásában továbbra sem következett be változás. IC_{50} értékeik közel azonosak maradtak 30 perc előinkubálás alkalmazása után is, ami megerősíti a detergenssel végzett kísérletekből levont következtetést, miszerint e három származék nem aggregáció révén fejt ki hatását. A spektrofotometriás mérésből származó pontokra illesztett koncentráció-hatás görbék (32. ábra) ugyanúgy átfedést mutattak, mint az akarbóz esetében.



32. ábra: Az 1-es (A), 3-as (B) és 4-es (C) származék időfüggő gátló hatásának spektrofotometriás vizsgálata során kapott pontok és az illesztett görbék. A PPA és az inhibitorok 0 min (■), 5 min (●), 10 min (▲) és 30 min (★) ideig volt inkubálva a reakció indítása előtt.

Habár a 2-es, 5-ös, 6-os és 7-es vegyületnél is a tanninéhoz hasonló gátlásjavulást vártam, csupán az 5-ös származék felelt meg ennek az előzetes feltevésnek. Az IC_{50} érték 58%-os csökkenése (8. táblázat), és a koncentráció-hatás görbe jelentős balra tolódása (33. ábra) egyértelműen jelezte a gátló hatás fokozódását, ami a tanninnál ismertetett okokra vezethető vissza.

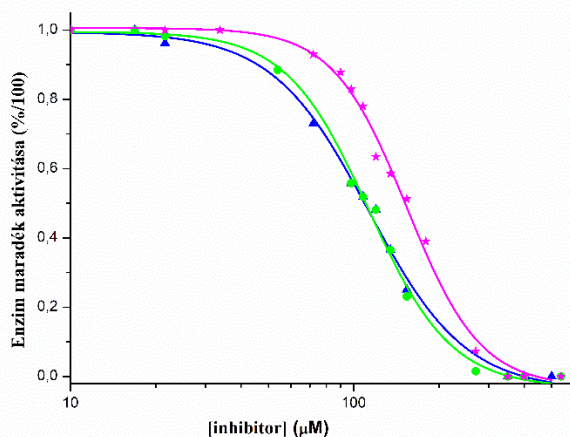


33. ábra: Az 5-ös származék időfüggő gátló hatásának spektrofotometriás vizsgálata során kapott pontok és az illesztett görbék. A PPA és az 5-ös inhibitor 0 min (■), 5 min (●), 10 min (▲) és 30 min (★) ideig volt inkubálva a reakció indítása előtt.

A fennmaradó három tiazolidinonszármazék (2, 6 és 7) gátló hatásában éppen az ellenkező irányú változás mutatkozott, mint a pozitív kontroll esetében, vagyis a gátlás jelentős romlását tapasztaltuk. A 6-os vegyület maximálisan elérhető gátlása 30 perc előinkubálást követően 23%-ról 9%-ra csökkent, míg a 2-es származék már 10 perc után teljesen elvesztette gátló aktivitását. Ennek hátterében az állhat, hogy az alkalmazott inkubálási idő alatt az aggregáció olyan szerkezeti változást indukált az inhibitor molekulában, aminek következtében nem tudta kifejteni aktivitáscsökkentő hatását. Ezek az aggregátumok ugyanis feltehetően fej-láb illeszkedéssel összekapcsolódnak, majd a kialakuló láncok *II-stacking* kölcsönhatással összetapadnak, még nagyobb méretű aggregátumot eredményezve [230]. A rodanin-típusú vegyületek számos olyan egységet tartalmaznak, melyek kölcsönhatást tudnak kialakítani az enzim valamely aminosavával. Az egyik lehetőség, hogy a nagy elektrofilicitású exociklusos kettős kötésre nukleofilként addicionálódik az enzim egyik kéntartalmú aminosavának (például cisztein) szulfhidrilcsoportja, ami a fehérje reverzibilis kovalens gátlásához vezet. Ez a reakció azonban nem kedvezményezett, mivel a kettős kötés felszakadásával megszűnne a heterociklusos gyűrű aromás jellege. Sokkal jellemzőbb, hogy a tioxocsoport kettős kötésű kénatomja, mely nagy elektronsűrűsége miatt kiváló hidrogénkötés-akceptor, hidrogénkötéseket vagy más, poláris intermolekuláris kölcsönhatásokat alakítson ki az enzimmal [231]. Ha azonban az inhibitor molekulák fej-láb kapcsolódásával keletkező láncok is összetapadnak, az inhibitoroknak nagy valószínűséggel nem marad olyan hozzáférhető része, mely például H-kötést tudna kialakítani az α -amiláz valamely aminosavával. Ez fokozottan igaz a 2-es vegyületre, melyben az $-OCH_2CONH_2$ aminosocsoportja és a tioxocsoport között is

kialakulhat hidrogénkötés, elveszítve így azt az elsődleges egységet, mellyel az enzimhez kötődne. Ez a megközelítés magyarázatként szolgálna továbbá arra is, hogy miért kapunk eltérő eredményeket az **1-2** és **5-6** vegyületek esetében, melyek csupán az arilidén molekulárisan elhelyezkedő szubsztituens pozíciójában különböznek. A para helyzetű szubsztitúció ugyanis lehetővé teszi az inhibitor-molekulák lineáris fej-láb kapcsolódását, míg meta helyzetben lineáris kapcsolódás nem jöhet létre. Ez utóbbi esetben a nitrogénatomon található karboxilcsoportok fej-fej összekapcsolódása révén antiparalel szálak jöhetnek létre, ami egy más típusú, kisebb aggregátumot hoz létre. Habár az előbbieket értelmében a **6-os** vegyület aggregálódása nem érinti sem a hidrogénkötés-akceptorként funkcionáló tioxcsoportot, sem az arilidényűrű para-helyzetű benziloxi szubsztituensét, azt vártam, hogy az előinkubálás hatására az egyre nagyobb aggregátum egyre jobb gátlást fog okozni. Ezzel szemben a gátló hatás csökkent, ami arra enged következtetni, hogy e származék más fajta mechanizmus (például fehérjeaggregáció) alapján fejt ki gátló aktivitását.

Ahogy azt a detergens alkalmazásakor is tapasztaltam, a **7-es** származéknál ismételtén jól definiált görbéhez jutottam (34. ábra) a reakciókörülmény módosítása révén. Már 5 perc előinkubálást követően meg lehetett határozni a gátlási paramétert, így a 30 perces mérés után már egyértelműen ki tudtam mutatni az IC_{50} értékekben jelentkező növekvő tendenciát, vagyis a gátló hatás csökkenését. 25 perc alatt mintegy 40%-kal rosszabb lett e vegyület hatékonysága (8. táblázat).



34. ábra: A **7-es** származék időfüggő gátló hatásának spektrofotometriás vizsgálata során kapott pontok és az illesztett görbék. A PPA és az **7-es** számú inhibitor 5 min (●), 10 min (▲) és 30 min (★) ideig volt inkubálva a reakció indítása előtt.

Ezek alapján arra következtettem, hogy a 7-es származék molekuláinak legnagyobb része gyorsan (5 percen belül) aggregálódott, ami a vegyület stabilitásának növekedéséhez, és ezáltal mérhető gátláshoz vezetett.

4.2.5 Enzimkoncentráció-változtatás hatásának vizsgálata

Az AAG következő fő ismervének tanulmányozásához a gátlásvizsgálatokat megismételtem úgy, hogy változtattam a célenzim (PPA) koncentrációját. Habár a szakirodalom 10-szeres enzimmennyiség alkalmazását javasolja, spektrofotometriás módszerrel legfeljebb 6-szoros fehérjekoncentrációt tudtam használni. A kinetikai és gátlásvizsgálatok során ugyanis minden alkalommal a kezdeti sebességet (v_0) mérem, ahol a szubsztrát kevesebb mint 10%-a alakul át. 10-szeres vagy annál is nagyobb enzimkoncentráció esetén azonban a nem gátolt enzim aktivitása túl nagy lenne ahhoz, hogy a v_0 -t lehessen mérni. ITC módszerrel viszont lehetőségem nyílt rá, hogy az akarbózzal és a tanninnal 20-szoros és 50-szeres enzimkoncentráció mellett végezzem el a gátlásvizsgálatokat.

Az volt a feltevésem, hogy az akarbóz, az 1-es, 3-as és 4-es vegyületnél, melyek eddig a promiszkuis AAI-kal szembeni kritériumok egyikét sem teljesítették, semmilyen változást sem fogok tapasztalni, míg az idáig valamennyi feltételnek eleget tevő gallotannin, a 2-es, 5-ös, 6-os és 7-es származék gátló hatásának jelentős csökkenésére számítottam. A nonspecifikus AAI-k esetében ugyanis az enzim és inhibitor nem 1:1 arányban kapcsolódik, vagyis nem egy enzim-inhibitor komplex az aktív gátló részecske, hanem egy nagyméretű aggregátum, mely meghatározott számú enzim-molekula adszorbeálására képes. Az aggregátum felületének teljes telítődése után azonban minden további enzim-molekula szabad formában lesz jelen, melyek így hozzá tudnak férni szubsztrátjukhoz, és képesek kifejteni katalitikus aktivitásukat. Kísérleteim során e feltételezések nagy része beigazolódott. Az akarbóz gátló hatása valóban függetlennek bizonyult a célenzim koncentrációjától. Az ITC módszerrel meghatározott IC_{50} 20-szoros PPA mennyiség (5,6 $\mu\text{g/mL}$) esetén 1,51 $\mu\text{M} \pm 0,08$, 50-szeres PPA alkalmazásakor pedig 1,44 $\mu\text{M} \pm 0,08$ volt, ami csak kis mértékben tért el a kiindulási értéktől (1,56 $\pm 0,04$ μM). Spektrofotometriával is hasonlóan kis különbségeket tapasztaltam (9. táblázat). Ráadásul mindkét technikánál majdnem teljesen egybeesnek a kísérleti adatokra illesztett görbék (35. A és 35. B ábra). A könnyebb összevethetőség érdekében az akarbózzal közös ábrán (35. ábra) tüntettem fel az 1-es, 3-as és 4-es vegyület spektrofotometriával kivitelezett gátlásvizsgálataiból származó görbéket. Valamennyi esetben a negatív kontrollhoz hasonló eredményre jutottam: a koncentráció-hatás görbéken semmilyen eltolódás nem mutatkozott, ennek megfelelően az IC_{50} értékek is közel állandók maradtak (9. táblázat).

9.táblázat: A vizsgált inhibitorok spektrofotometriás módszerrel meghatározott gátlási paramétereinek változása különböző enzimkoncentrációk alkalmazása esetén.

Vegyület	R	R ₁	IC ₅₀ (μM)*			
			[E]=0,28 μg/mL	[E]=0,56 μg/mL	[E]=1,12 μg/mL	[E]=1,68 μg/mL
Akarbóz	-	-	0,71 ±0,03	0,65 ±0,02	0,71 ±0,03	0,68 ±0,04
Tannin**	-	-	1,91 ±0,09	2,27 ±0,08	2,10 ±0,09	1,98 ±0,08
1	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂	198±2	194 ±3	191 ±2	197 ±2
2	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂	89,1 ±3,2	96,4 ±1,7	119 ±3	163 ±4
3	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂	95,6 ±1,0	96,9 ±1,8	89,9 ±0,8	94,2 ±0,8
4	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂	67,1 ±1,4	66,2 ±0,3	68,3 ±0,8	68,5 ±1,4
5	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅	290 ±14	294 ±5	295 ±12	290 ±10
6	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅	27% [†]	23% [†]	19% [†]	19% [†]
7	H	4-OC ₆ H ₅	r.v. ^{***}	r.v. ^{***}	r.v. ^{***}	39,5% ^{††}

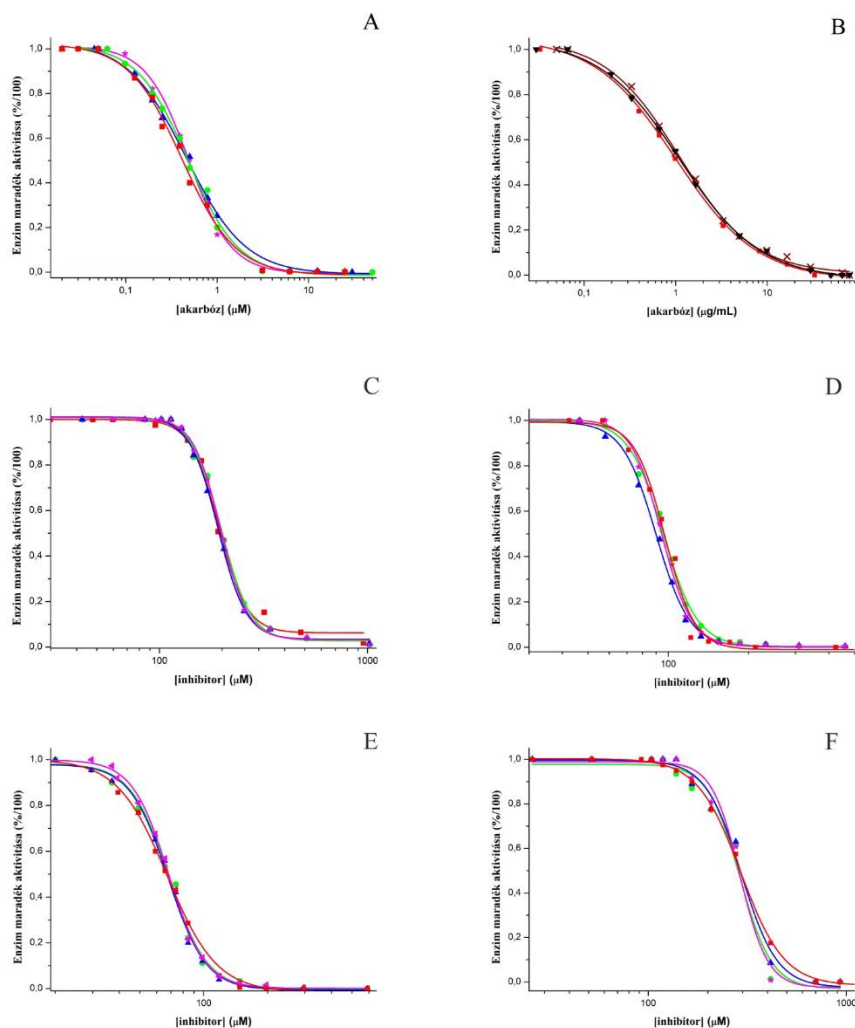
*: Az IC₅₀ értékek átlag ± illesztési hiba formájában vannak feltüntetve.

** : A tannin esetében feltüntetett IC₅₀ értékek μg/mL-ben vannak megadva.

*** : Rendellenes viselkedés

[†]: Maximálisan elérhető gátlás 193 μM inhibitor koncentráció esetén

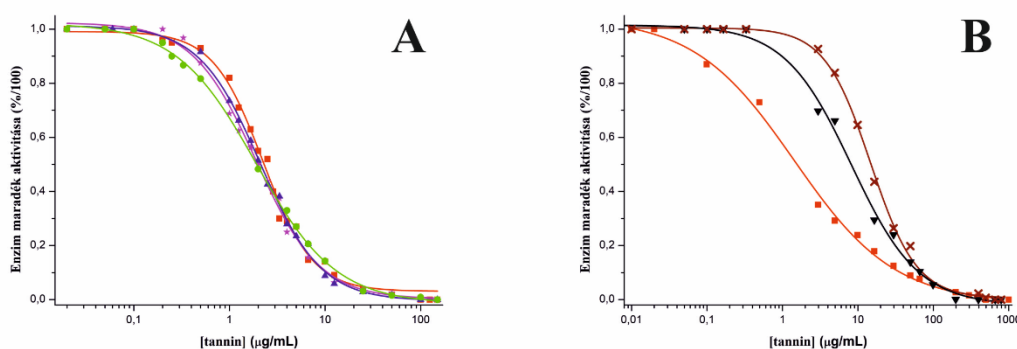
^{††}: Maximálisan elérhető gátlás 119 μM inhibitor koncentráció esetén



35. ábra: Az akarbóz enzimkoncentrációval szembeni érzékenységének spektrofotometriás (A) és ITC (B) módszerrel végzett vizsgálata, illetve az 1-es (C), 3-as (D), 4-es (E) és 5-ös (F) számú tiazolidinonszármazék gátló hatásának spektrofotometriával történő analízise során kapott eredmények bemutatása. 0,28 µg/mL (●), 0,56 µg/mL (■), 1,12 µg/mL (▲) és 1,68 µg/mL (★), 5,6 µg/mL (▼), 1,68 µg/mL (X) PPA koncentráció alkalmazása esetén kapott pontok és az illesztett görbék szemléltetése.

Váratlan volt azonban, hogy a PPA koncentrációjának változtatását követően az 5-ös tiazolidinonszármazék gátló hatékonyságában nem mutatkozott változás. Az illesztett görbék egybeesése (35. F ábra) és az IC_{50} értékekben mutatkozó kismértékű változás (9. táblázat) egyaránt a negatív kontrollal mutatott analógiát. Mivel a korábbi feltételek teljesülése (detergenssel szembeni érzékenység és időfüggő gátlás) miatt a specifikusság lehetősége nem jöhetett szóba, egyetlen lehetséges oka maradt e jelenségnek, mégpedig hogy a mikromólos koncentrációjú inhibitormolekulák olyan nagy felületű aggregátumot képeznek, hogy még 6-szoros enzimfelesleg alkalmazása esetén is képes megkötni az összes, nanomólos koncentrációban jelenlévő enzimmolekulát.

A pozitív kontrollként funkcionáló tannin gátló hatása –az előzetes feltevéseknek megfelelően– valóban érzékenynek bizonyult a célenzim koncentrációjával szemben. Bár spektrofotometriás módszerrel 6-szoros enzimkoncentráció alkalmazását követően is közel azonos IC_{50} értékeket (9. táblázat) és egymásra illeszkedő görbéket (36. A ábra) kaptam, az ITC kísérletek már kimutatták a várt gátlásromlást. Az IC_{50} 20-szoros PPA mennyiség (5,6 $\mu\text{g/mL}$) esetén $8,2 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$, 50-szeres PPA alkalmazásakor pedig $15 \pm 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ volt, vagyis egy nagyságrendi különbség mutatkozott a kiindulási értékhez ($1,5 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$) képest, amit az illesztett görbék nagyfokú jobbra tolódása is jól demonstrál (36. B ábra).

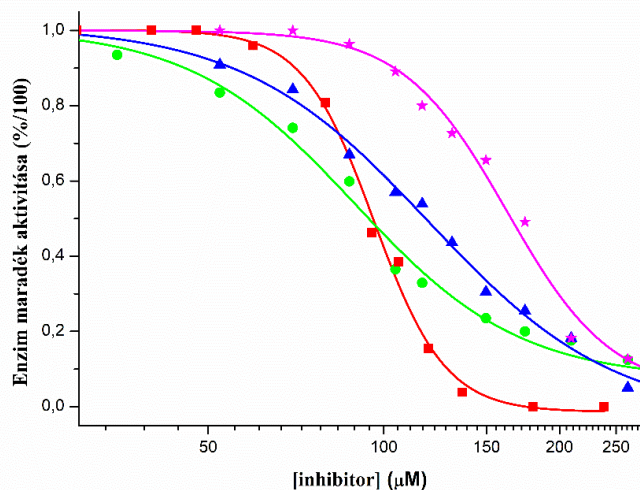


36. ábra: Az aleppó tannin enzimkoncentrációval szembeni érzékenységének spektrofotometriás (A) és ITC (B) módszerrel végzett vizsgálata. 0,28 $\mu\text{g/mL}$ (●), 0,56 $\mu\text{g/mL}$ (■), 1,12 $\mu\text{g/mL}$ (▲) és 1,68 $\mu\text{g/mL}$ (*), 5,6 $\mu\text{g/mL}$ (▼), 1,68 $\mu\text{g/mL}$ (X) PPA koncentráció alkalmazása esetén kapott pontok és az illesztett görbék szemléltetése.

A 7-es vegyületnél egyértelmű gátlásromlásról nem beszélhetünk, ugyanis a folyamatosan csökkenő abszorbanciaértékek miatt sem a görbeillesztés, sem pedig a gátlási paraméterek meghatározása nem volt lehetséges. 6-szoros enzimkoncentráció (1,68 $\mu\text{g/mL}$) alkalmazásakor azonban megszűnt ez a rendellenes viselkedés, és egy megközelítőleg 40%-os maximális gátlást lehetett elérni. A rendellenes viselkedés miatt, melyet akkor is tapasztaltam, amikor csupán magának az inhibitornak a pufferes oldatát vizsgáltam, kétség sem fért ahhoz, hogy maguk az inhibitor-molekulák aggregálódnak. Viszont az a tény, hogy a fehérje mennyiségének növelése képes volt stabilizálni az inhibitor-aggregátumot, arra enged következtetni, hogy a 7-es származék a fehérje aggregációját is képes kiváltani.

A tanninhoz hasonlóan, a 2-es és 6-os vegyületek gátló aktivitása is romlott az enzimkoncentráció növelésének eredményeként. A 6-os származéknál a gátlás csökkenése ugyan nem volt szignifikáns (a 23%-os maximálisan elérhető gátlás 19%-ra redukálódott), viszont a 2-es vegyületnél már annál nagyobb mértékű változás következett be. Az IC_{50} érték hozzávetőlegesen 82%-kal nőtt (9. táblázat), és ahogy a 37. ábrán látható, a görbék lefutása

jelentősen megváltozott. Ráadásul a PPA koncentrációjának módosítását követően a korábban alkalmazott maximális inhibitor-koncentrációval már nem lehetett elérni az enzim katalitikus aktivitásának teljes megszűnését, viszont a vegyület nagy hidrofóbicitása miatt nagyobb mennyiségű inhibitor vizes pufferben történő feloldása nem volt lehetséges.



37.ábra: A 2-es számú tiazolidinonszármazék enzimkoncentrációval szembeni érzékenységének spektrofotometriás módszerrel végzett vizsgálata során kapott eredmények bemutatása. 0,28 μg/mL (●), 0,56 μg/mL (■), 1,12 μg/mL (▲) és 1,68 μg/mL (★) PPA koncentráció alkalmazása esetében kapott pontok és az illesztett görbék szemléltetése.

4.2.6 Centrifugálás hatásának vizsgálata

Az AAG közvetett módon történő bizonyítására szolgáló utolsó kritérium a vegyületek gátló hatásának centrifugálással szembeni érzékenysége. Centrifugálást követően azt tapasztaltam, hogy az akarbóz, valamint az 1-es, 3-as és 4-es tiazolidinonszármazék gátló aktivitásában nem következett be jelentős változás; az IC_{50} értékek $\pm 10\%$ -os határon belül maradtak (10. táblázat). Ez az eredmény jó összhangban van az eddigiekkel, ugyanis e négy vegyület a korábban vizsgált feltételek egyikének sem tett eleget, vagyis az AAG azonosításának közvetett stratégiája értelmében az akarbóz, és az 1-es, 3-as, 4-es tiazolidinonszármazék nem tekinthető promiszkus AAI-nak.

10. táblázat: A vizsgált inhibitorok spektrofotometriás módszerrel meghatározott gátlási paramétereinek változása centrifugálás hatására.

Vegyület	R	R ₁	IC ₅₀ (μM)*	
			centrifugálás nélkül	30 perc centrifugálás után
Akarbóz	-	-	0,65 ±0,02	0,66 ±0,03
Tannin**	-	-	2,27 ±0,08	0,16 ±0,01
1	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ CONH ₂	194 ±3	200 ±5
2	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ CONH ₂	96,4 ±1,7	n.g.†
3	CH ₂ COOH	3-OCH ₃ , 4-OCH ₂ CONH ₂	96,9 ±1,8	105 ±2
4	CH ₂ COOH	4-OCH ₃ , 3-OCH ₂ CONH ₂	66,2 ±0,3	65,6 ±1,6
5	CH ₂ COOH	4-OCH ₂ C ₆ H ₅	294 ±5	n.g.†
6	CH ₂ COOH	3-OCH ₂ C ₆ H ₅	23%††	n.g.†
7	H	4-OC ₆ H ₅	r.v.***	n.g.†

*: Az IC₅₀ értékek átlag ± illesztési hiba formájában vannak feltüntetve.

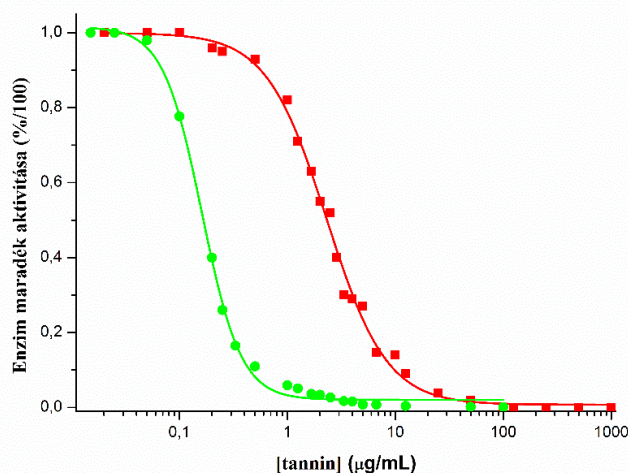
** : A tannin esetében feltüntetett IC₅₀ értékek μg/mL-ben vannak megadva.

***: Rendellenes viselkedés

†: Nincs gátlás

††: Maximálisan elérhető gátlás 193 μM inhibitor-koncentráció esetén

A másik öt vegyület (tannin, **2**, **5**, **6** és **7**) gátló aktivitása azonban a centrifugálás után jelentősen megváltozott (10. táblázat). A tannin IC₅₀ értéke 14-szer kisebb lett, ami a centrifugálást követően kapott kísérleti pontokra illesztett görbe nagyfokú balra tolódása jelez (38. ábra).



38. ábra: Az aleppó tannin gátló hatásának centrifugálás hatására bekövetkező változása. A PPA enzim aktivitásának spektrofotometriás mérése során kapott pontokra illesztett görbék szemléltetése centrifugálás alkalmazása nélkül (■) és 30 perc centrifugálást követően (●).

Ez a gátlásjavulás azonban ellentmondott a detergens jelenlétében tapasztalt változással, ahol a tanninmonomerek gyengébb gátló hatását mutattam ki. Ezen eltérés lehetséges magyarázatát a későbbi fejezetekben fogom ismertetni.

A 2-es, 5-ös, 6-os és 7-es tiazolidinonszármazék esetében éppen az ellenkező eredményt kaptam, mint a tanninnál, vagyis az egyedi inhibitormolekulák (a korábbi gátlásvizsgálatoknál alkalmazott koncentrációtartományban) egyáltalán nem voltak képesek gátolni az enzimet. Ez a végkimenetel már a spektrofotometriás mérések kivitelezése előtt is várható volt, ugyanis a centrifugálás következtében szilárd csapadék jelent meg az Eppendorf cső alján. A csapadékképződés és a gátlás megszűnése egyértelmű bizonyítékként szolgál az aggregátumok jelenlétére. A centrifugális erő hatására ugyanis az aggregátumok kiülepednek, így a felülúszóban, amivel a későbbi gátlásvizsgálatot is végzem, nincsenek jelen az aktív gátló részecskék. Ez két lehetséges módon következhet be. Egyrészt feltételezhető, hogy a centrifugálás hatására a felülúszóban csak a monomerrészecskék maradnak, amik nem képesek gátló hatást kifejteni a vizsgált koncentrációtartományban. Másrészt az a lehetőség is fennáll, hogy a mintaelőkészítéshez szükséges néhány perc elegendő volt ahhoz, hogy valamennyi inhibitormolekula aggregálódjon, ilyen módon pedig a centrifugálás után kapott felülúszó csupán maga a puffer volt.

Ezek a tapasztalatok szintén jó egyezést mutatnak a korábbiakkal, hiszen ezen öt vegyület a promiszkuis AAI-kal szemben állított valamennyi követelménynek eleget tett.

4.2.7 AAG közvetlen módszerrel történő azonosítása

Az AAG kimutatására alkalmazott közvetett módszerek során kapott eredmények alátámasztása és kiegészítése érdekében elvégeztem az inhibitorok fizikai-kémiai sajátosságaiban (elsősorban a méretükben) bekövetkező változások közvetlen stratégia szerinti vizsgálatát. Ennek kivitelezéséhez DLS-t használtam, mely során az elsődleges célom a nanoméretű részecskék jelenlétének detektálása, illetve a részecskeméretben bekövetkező esetleges változások kimutatása volt. Az intenzitás szerinti részecskeméret-eloszlás, a *PDI* és a fotonbeütésszám alapján közvetlen bizonyítékot nyertem arra nézve, hogy a vizsgált kilenc vegyület közül melyik tekinthető AAI-nak. Minden inhibitornál két mérésorozatot valósítottam meg: az első esetben csupán az inhibitor (IC_{50} érték körüli koncentrációban) pufferes oldatát vizsgáltam, a második sorozatban pedig az inhibitor pufferes oldatához hozzáadtam a PPA-t is, melynek koncentrációja megegyezett a korábbi gátlásvizsgálatoknál alkalmazottal. Az előbbinél az inhibitormolekulák, az utóbbinál az enzim molekulák méretében bekövetkező növekedést szándékoztam kimutatni.

A korábbiakhoz hasonló módon, most is a pozitív (gallotannin) és a negatív kontrollal (akarbóz) kezdtem el a kísérleteket. Mind az akarbóz ($0,78 \mu\text{M} \sim IC_{50}$), mind a tannin ($2,5 \mu\text{g/mL} \sim IC_{50}$) DLS vizsgálata során 6 különböző időpontban (0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min) mértem előbb az inhibitor, majd a fehérje méretét. Ahogy vártam, az akarbóz pufferes oldatában még fél óra után sem volt jelen detektálható részecske, és a PPA méretében sem következett be figyelemreméltó változás; a fehérje mérete a vizsgált időszakban átlagosan $147,7 \pm 10,8 \text{ nm}$ -nek adódott (az inhibitor nélkül mért érték $156,3 \text{ nm} \pm 5,9$). Ez a kísérlet azonban rávilágított arra, hogy a vizsgálataimhoz használt PPA kis mértékben ugyan, de aggregálódott formában volt. Liu és kutatócsoportja kimutatta, hogy az α -amiláz enzim rendkívül hajlamos a spontán aggregációra, mely során a cisztein aminosavak között kovalens diszulfid hidak alakulnak ki [232]. Az enzim ilyenfajta kovalens módosítása azonban nem rontja a stabilitást; a későbbi DLS mérések során is ugyanazt a méretet detektáltam, és egyetlen, jól karakterizált csúcsot kaptam. Az akarbóz specifikus, nem aggregációalapú gátló mechanizmusát a fotonbeütésszám is alátámasztotta, mely értéknek a nagyméretű molekulák távollétében 50 kcps körülnek (legalábbis mindenképpen 100 kcps alattinak) kell lennie; a 6 mérés esetén a fotonbeütésszám átlagosan $36,7 \pm 5,4 \text{ kcps}$ volt. Továbbá a *PDI*, mely ugyancsak indikátora lehet az aggregátumok jelenlétének, átlagosan $0,14 \pm 0,2$ -nek adódott, ami ugyan meghaladja a monodiszperz rendszerekre megadott 0,1 határértéket, de meg sem közelíti a polidiszperz rendszerekre vonatkozó alsó értéket (0,4).

A gallotannin DLS vizsgálata során, melyet az akarbózával azonos módon végeztem el, már szignifikáns növekedés mutatkozott az inhibitormolekula méretében, azonban az enzim mérete ebben az esetben is változatlan maradt. Ahogy a 11. táblázat alapján látható, már a legelső mérésnél (0 min) két csúcsot kaptam, annak ellenére, hogy a megközelítőleg két perces mintaelőkészítés (tannin feloldása pufferben, minta szűrése, kűvetta készülékbe helyezése) után azonnal elindítottam a mérést. Ezek alapján arra következtettem, hogy a 2,2 nm részecske, mely feltételezhetően a monomer formához tartozó méret, már 2 perc alatt el kezdett összekapcsolódni nagyobb méretű (87 nm) aggregátummá. A viszonylag magas fotonbeütésszám (178 kcps) és *PDI* (0,19) szintén alátámasztja ezt az elképzelést. A 10 perccel későbbi mérés során már egy harmadik csúcs is megjelent, melynek mérete már egyértelműen az aggregátumokra jellemző mérettartományba esik. A 11. táblázat továbbá azt is jól szemlélteti, hogy a 30 perc mérési idő alatt a monomer végig jelen volt, míg a második és harmadik csúcs egyre nagyobb méreteknél jelentkeztek. Az utolsó esetben például már 5000 nm-nél is nagyobb részecskéket detektáltam. Továbbá az is elmondható, hogy a

fotonbeütésszám, mely az egy másodperc alatt detektált fotonok számát jelenti, a vizsgált időszakban folyamatosan nőtt, csakúgy, mint a minta polidiszperzitásának mértékére utaló *PDI*.

11. táblázat: Az aleppó tannin (2,5 µg/mL) DLS vizsgálata során kapott eredmények összefoglalása.

Idő (min)	Méret (nm)			Fotonbeütésszám (kcps)	PDI
	1. csúcs	2. csúcs	3. csúcs		
0	2,2 ±0,4	87 ±17	-	178	0,19
5	2,4 ±0,4	179 ±44	-	182	0,25
10	2,3 ±0,4	126 ±29	456 ±99	194	0,31
15	2,4 ±0,5	178 ±39	4480 ±881	235	0,34
20	2,5 ±0,6	234 ±92	4886 ±680	240	0,38
30	2,4 ±0,6	201 ±67	5281 ±419	279	0,47

Habár az AAG feltételeinek vizsgálata során kapott eredmények alapján biztos voltam abban, hogy a galloylannin aggregáció révén fejti ki gátló hatását, a DLS kísérletek tették egyértelművé, hogy az inhibítormolekulák által alkotott aggregátumok az aktív gátló részecskék, és nem az enzim aggregációja váltotta ki annak aktivitáscsökkenését. Továbbá a két módszer összehasonlításával az is megállapítható, hogy a 30 perces enzim-inhibitor előinkubálás okozta jelentős gátlásjavulás azért következett be, mert ennyi időre volt szükség ahhoz, hogy az 5281 nm méretű aggregátum kialakulhasson. Mivel ez a felület 60-szor nagyobb, mint az előinkubálás alkalmazása nélkül, sokkal több enzimet képes adszorbeálni. A Triton X-100 jelenlétében tapasztalt nagymértékű gátlásromlás arra vezethető vissza, hogy a detergens megakadályozta mind az inhibitor-inhibitor, mind pedig az enzim-enzim aggregátumok kialakulását (vagy megszüntette a már kialakult kölcsönhatásokat), és az enzim-inhibitor 1:1 arányú specifikus kölcsönhatásából származó komplex nem képviselt olyan markáns gátló hatást, mint az aggregátum. A centrifugálás okozta IC_{50} -csökkenés viszont azt jelzi, hogy az enzim-molekulák által alkotott kisméretű aggregátummal az inhibítormonomer sokkal kedvezőbben tud kialakítani egy specifikus enzim-inhibitor-komplexet. Az, hogy az inhibitoroldat 30 perces centrifugálása jelentősebb gátlásjavuláshoz vezetett, mint a 30 perces enzim-inhibitor előinkubálás azzal magyarázható, hogy a tanninmonomer sokkal több enzimaggregátumot tud gátolni, mint amennyit a tanninaggregátum képes adszorbeálni. Miután a DLS módszer esetében is rendelkezésemre állt egy pozitív és egy negatív kontroll, elvégeztem a hét tiazolidinonszármazék vizsgálatát is. Ebben az esetben 5 különböző

időpontban (0 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min) határoztam meg az inhibitor- (IC_{50} értékhez közeli koncentrációban) és az enzim molekulák méretét. Váratlan volt, hogy az **1-es**, **3-as** és **4-es** vegyületek pufferes oldatában nanoméretű részecskék voltak jelen (12. táblázat), ugyanis ezek a származékok a közvetett stratégia értelmében nem tartoznak az AAI-k közé. Az átlagosan 160 nm méretű részecskék a szakirodalom szerint ugyan már aggregátumnak számítanak [177], viszont a teljes mérési idő alatt tendenciaszerű változást nem lehetett megfigyelni.

12. táblázat: A hét 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék DLS vizsgálata során kapott intenzitás szerinti méreteloszlás-értékek összefoglalása.

Idő (min)	Méret (nm)						
	Inhibitor 1 (204 μ M)	Inhibitor 2 (105 μ M)	Inhibitor 3 (103 μ M)	Inhibitor 4 (73,9 μ M)	Inhibitor 5 (208 μ M)	Inhibitor 6 (193 μ M)	Inhibitor 7 (137 μ M)
0	153 nm ± 37	63 nm ± 6	125 nm ± 42	167 nm ± 52	506 nm ± 104	82 nm ± 12	201 nm ± 75
2	167 nm ± 59	163 nm ± 47	143 nm ± 56	167 nm ± 64	520 nm ± 101	97 nm ± 21	599 nm ± 103
5	165 nm ± 62	191 nm ± 34	129 nm ± 39	176 nm ± 80	532 nm ± 129	124 nm ± 38	679 nm ± 116
10	173 nm ± 56	240 nm ± 81	152 nm ± 22	182 nm ± 77	529 nm ± 132	103 nm ± 24	700 nm ± 126
20	167 nm ± 49	236 nm ± 80	196 nm ± 40	195 nm ± 91	509 nm ± 93	110 nm ± 28	758 nm ± 136

Emellett a fotonbeütésszám a 20 perc alatt átlagosan 145 kcps (inhibitor **1**), 193 kcps (inhibitor **3**) és 126 kcps (inhibitor **4**) volt, míg a *PDI* átlagok 0,13 (inhibitor **1**), 0,34 (inhibitor **3**) és 0,19 (inhibitor **4**) voltak, mely értékekben a tanninéhoz hasonló módon nem volt tapasztalható tendenciózus növekedés. Habár az előbbi két adat egyik esetben sem haladta meg a polidiszperz rendszerekre jellemző határértéket, sokkal közelebb állnak a tanninra kapott értékekhez, mintsem az akarbózához. E három származéknál is elvégeztem azt a DLS kísérletet, amikor a minta a pufferben oldott inhibitor mellett az enzimet is tartalmazta. Egyiknél sem következett be növekedés a fehérje méretében; 119 ± 5 nm átmérőjű részecskéket detektáltam, ami csak kis mértékben tért el attól az értéktől, amit az inhibitor távollétében határoztam meg az enzimre (124 ± 3 nm). Mindezen eredmények alapján azt a következtetést tudtam levonni, hogy az **1-es**, **3-as** és **4-es** tiazolidinonszármazék ugyan képez kisméretű (feltehetően fej-fej kapcsolódású) aggregátumot, de az AAI-kra jellemző feltételek teljesülésének vizsgálatán alapuló közvetett módszer értelmében ezen aggregátumok nem adszorpciós mechanizmus révén, hanem

specifikusan vesznek részt a gátlásban, hiszen a reakciókörülmények változtatása semmilyen hatást sem gyakorolt e vegyületek gátló aktivitására. Ezt alátámasztja az is, hogy a centrifugálást követően e vegyületeknek nem csökkent a gátló hatása.

A 2-es, 5-ös és 7-es inhibitorok esetében azonban már egyértelmű részecskeméret-növekedést tapasztaltam (12. táblázat). A 2-es származék méretének (179 nm), fotonbeütésszámának (119 kcps) és *PDI* (0,15) értékének átlagát tekintve nem mutat nagy eltérést az 1-es, 3-as és 4-es vegyülethez képest, viszont az AAI-k valamennyi kritériumának eleget tett, ami arra utal, hogy az aggregátum az aktív gátló részecske. Továbbá a közvetett és közvetlen módszerek eredményeinek összevetésével azt is meg lehet állapítani, hogy csak körülbelül 63-163 nm közötti mérettartományban képes az inhibitoraggregátum kifejteni hatását, 200 nm felett már nem. 5 perc előinkubálást követően ugyanis, ahol a részecskeméret megközelítőleg 200 nm volt, a maximálisan elérhető gátlás 13%-ra csökkent, míg 10 perc inkubálási idő alkalmazása (~240 nm méretű részecskék) a gátlás teljes megszűnéséhez vezetett.

Az 5-ös vegyület DLS vizsgálata feltárta, hogy a mintaelőkészítéshez szükséges néhány perc is elegendő ahhoz, hogy egy több mint 500 nm átmérőjű aggregátum jöjjön létre; már az első (0 perces) mérés során ezt az értéket kaptam, ami a következő 20 percben nem mutatott további növekedést. Ez az eredmény alátámasztja a közvetlen módszerrel tapasztalt változásokat: 5 perc enzim-inhibitor előinkubálás után sokkal kisebb lett az IC_{50} érték, ami viszont azt követően nem módosult tovább, vagyis az aggregátumképződési folyamat mindkét módszer értelmében rendkívül gyorsan ment végbe. Ezt bizonyítja a centrifugálást követő teljes gátlásvesztés is, ami azért következett be, mert a gyors aggregáció miatt sem monomer, a kiülepedés miatt pedig aggregátum sem volt jelen a vizsgált felülűszóban. Továbbá az is megállapítható, hogy a detergens okozta gátlásjavulás az egyedi részecskék nagyobb gátló aktivitására vezethető vissza, melyhez az enzim monomerformájának kisebb aktivitása is hozzáadódott. Az összes mérés során jelen lévő kisméretű enzimaggregátumot összetartó kölcsönhatásokat is megszünteti a detergens, csökkentve így az enzim aktivitását [233]. A 6-szoros enzimfelesleg alkalmazásának elégtelensége pedig összefüggésbe hozható az aggregátum DLS technikával kimutatott 500 nm feletti méretével, ami rendkívül nagy adszorpciós felületet tud biztosítani. Habár már a nagy részecskeméret is egyértelmű indikátora volt az aggregátumok jelenlétének, a *PDI* és a fotonbeütésszám tanninét meghaladó értéke még egyértelműbbé tette azt. Az 5 különböző időpontban végrehajtott kísérlet során kapott *PDI*-k átlagértéke 0,45, míg a fotonbeütésszámé 364 kcps volt, ami nemcsak a pozitív kontroll esetében mért értékeket, hanem a polidiszperz rendszerekre jellemző alsó határértéket is jelentősen meghaladja. Az enzim mérete viszont ez alkalommal is változatlanak bizonyult.

A 6-os tiazolidinonszármazék azonban eltérést mutatott a korábbi gátlószerekhez képest, ugyanis nem az egyedi inhibitormolekulák összekapcsolódása, hanem a fehérjemolekulák aggregációja következett be. Amikor csupán az inhibitor pufferes oldatát vizsgáltam, ~100 nm mérettel rendelkező részecskéket detektáltam. Ez az érték ugyan az 1-es, 3-as és 4-es vegyülethez hasonlóan már kisméretű aggregátumnak számít, viszont a 20 perc alatt ez esetben sem tapasztaltam tendenciaszerű változást. Ráadásul az átlagos *PDI* (0,19) és fotonbeütésszám (174 kcps) nem haladja meg sem a pozitív kontroll, sem a polidiszperz rendszerekre vonatkozó alsó határértékét. Habár az enzim méretének meghatározására irányuló kísérlet során sem tapasztaltam kezdetben növekedést (a mintaelőkészítést követő legelső mérés során 121 nm \pm 5 nm átmérőjű fehérjemolekulát detektáltam), 20 perccel később már három csúcs jelent meg (1. csúcs: 23,5 nm \pm 0,8; 2. csúcs: 70,7 nm \pm 3,7; 3. csúcs: 404 nm \pm 9,3). Ennek háttérében az állhat, hogy az összekapcsolódott fehérjeláncok egy része tovább aggregálódott (404 nm részecske), míg másik része fragmentálódott (a 121 nm-es részecske egy 23,5 nm és egy 70,7 nm átmérőjű részecskévé fragmentálódott). A fehérjeaggregátumok ugyanis hosszú, el nem ágazó, β -lemezes struktúrával rendelkező ún. amiloid szálakat tartalmaznak. Ezen amiloid szálak propagációja (újabb monomeregységek láncvégre való csatolása) során azonban gyakran előfordul, hogy a túl hosszú amiloidláncból több kisebb darab törik le (fragmentálódik) [234]. A PPA koncentrációjának növelése, illetve a 30 perc enzim-inhibitor előinkubálás hatására bekövetkező gátlásromlás a nagyméretű enzimaggregátumok nagyobb aktivitásra vezethető vissza.

A 7-es származék, vagyis az egyetlen olyan inhibitor, mely az *Aggregator Advisor* javaslata szerint hajlamos az aggregációra, egyedülálló eredményt hozott. Nemcsak az inhibitormolekulák, hanem az enzim molekulák aggregációja is bekövetkezett a DLS kísérletek eredményei alapján. Már a legelső mérés alkalmával, tehát közvetlenül a mintaelőkészítés után, 201 nm méretű inhibitorrészecskéket detektáltam, mely 5 perccel később már 679 nm volt. Ez az érték pedig fokozatosan nőtt; 20 perc elteltével már 758 nm átmérőjű aggregátum volt jelen a vegyület pufferes oldatában (12. táblázat). Azonban ugyanilyen növekvő tendencia mutatkozott a PPA méretében is: a kiindulási 103,1 \pm 30 nm méretű fehérje 5 perc elteltével már 864 \pm 33 nm volt, míg 20 perc után már egy nagyságrendbeli változás következett be (1039 nm \pm 52). Ezek alapján látható, hogy az inhibitormolekulák legnagyobb része már 5 perc alatt aggregálódott, ami jó egyezést mutat az időfüggés vizsgálata során tapasztaltakkal. Az a tény azonban, hogy az enzim és inhibitor további 15 percig történő inkubálása során az *IC*₅₀ nőtt, arra enged következtetni, hogy a fehérjeméret további növekedése kedvezőtlenül hat a vegyület gátló hatására. Ez a 6-os tiazolidinonszármazéknál leírtakhoz hasonlóan, az

enzimaggregátumok nagyobb aktivitása miatt következhet be. A detergens jelenlétében tapasztalt gátlásjavulás és a centrifugálás hatására bekövetkező aktivitásvesztés ugyanazzal magyarázható, mint az 5-ös vegyületnél.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Alkalmazott pufferek

Foszfát puffer

Az rmGFb szubsztrátspecificitásának vizsgálatához a foszforolízis irányában 1 M foszfát puffert (pH 6,8) alkalmaztam, mely 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ és 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1:1 arányú elegyét, 2,6 mM EDTA-t, illetve 1 mM AMP-t tartalmazott. Ugyanezen kísérlet lánchosszabbítási méréseihez 2,6 mM EDTA, 1 mM AMP és 50 mM G-1-P tartalmú 35 mM Na- β -glicerofoszfát puffert (pH 6,8) használtam.

Az rmGFb gátlásvizsgálata során valamennyi reagenst (enzim, szubsztrát és inhibitor) 35 mM Na- β -glicerofoszfát pufferben (pH 6,8) oldottam, mely a lebontás irányú kísérletek során 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t, 2,5 mM G-1-P-ot, 2,6 mM EDTA-t és 1 mM AMP-t, míg a glikogénszintézis vizsgálatokhoz 25 mM G-1-P-t, 2,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t, 2,6 mM EDTA-t és 1 mM AMP-t tartalmazott.

A pH beállításához H_3PO_4 -et és NaOH-t használtam.

A foszfát puffer EDTA, AMP, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 és β -glicerofoszfát komponenseit a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), míg a glükóz-1-foszfátot a Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft. (Budapest, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre.

A szintetikus eredetű 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok promiszkuis jellegének tanulmányozásakor végzett α -glükozidáz-aktivitásméréshez szintén foszfát puffert (pH 6,8) alkalmaztam, ami ebben az esetben 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ és 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1:1 arányú elegyét tartalmazta [235].

MES puffer

Az inhibitor-promiszkuitás vizsgálata során az enzimet (PPA), szubsztrátot (GalG₂CNP), valamint a gátlószereket (akarbóz, gallotannin és 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok) 50 mM MES pufferben oldottam (pH 6), ami 5 mM $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ -t, 51,1 mM NaCl-t és 152 mM NaN_3 -at tartalmazott, ahogy azt a szakirodalom javasolja az α -amiláz enzim GalG₂CNP szubsztrát felhasználásával történő aktivitásmérésének kivitelezéséhez [236]. A pH beállításához NaOH-t és HCl-t használtam.

Amikor az AAG közvetlen módszerrel történő kimutatása érdekében vizsgáltam az inhibitorok detergenssel szembeni érzékenységét, a MES puffer 0,01% vagy 0,1% Triton X-100 nemionos detergenst is tartalmazott, mely puffert mindig közvetlenül a mérés előtt állítottam össze. A

puffer valamennyi összetevője a Sigma-Aldrich Kft.-től (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) származott, míg a Triton X-100 detergenst a Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk.

5.2 Felhasznált enzimek

Nyúlvázizom-eredetű glikogén foszforiláz b (rmGFb)

Az új ITC-alapú GF aktivitásmérési módszer kidolgozásához használt liofilizált nyúlvázizom-eredetű glikogén foszforiláz b enzimet a Sigma-Aldrich Kft. gyártotta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A kétszeresen átkristályosított szilárd rmGFb (≥ 20 E/mg fehérje) kis mennyiségben laktózt és $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ -t (10 $\mu\text{mol}/100$ mg fehérje) is tartalmazott. E stabilizátorokat megkíséreltem eltávolítani egy centrifugális szűrőegységgel, ugyanis az adalékanyagok, illetve más szennyezők jelenléte az ITC mérések során jelentős hígulási hőeffektust okozhat. A tisztítás során azonban az enzim gyakorlatilag teljesen elveszítette katalitikus aktivitását, emiatt a vizsgálataimhoz a gyári készítményt alkalmaztam további tisztítási eljárás nélkül. Munkám során minden esetben 4 mg/mL koncentrációjú GFb törzsoldatot használtam.

Sertéshasnyálmirigy-eredetű α -amiláz (PPA)

A gyógyszer-promiszkuitás és aggregációalapú gátlás vizsgálatához alkalmazott PPA enzimet szintén a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be (Type 6B, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A GF-hez hasonlóan e készítmény is tartalmaz nyomokban laktózt stabilizálószerként. A kereskedelmi PPA enzim további tisztítását azonban meg lehetett valósítani anélkül, hogy csökkent volna az enzimaktivitás. Egy 30 kDa pórusméretű Amicon Ultra 30K centrifugális szűrőegység (Amicon Ultra 30K, Merck Millipore, MA, USA) segítségével 1 g PPA/15 mL MES puffer összetételű mintát centrifugáltam 15 percen keresztül 5000 rpm fordulatszámon. A felülúszóból többszöri centrifugálással eltávolítottam a szennyező sókat, majd az így kapott oldatot 1 mL térfogatra töményítettem. Ezt követően Bradford módszerrel [237] meghatároztam a tisztított PPA fehérjetartalmát, mely 28 mg/mL-nek adódott. A későbbi vizsgálataim során ezen enzim-törzsoldat megfelelő hígításával dolgoztam.

Saccharomyces cerevisiae eredetű α -glükozidáz

Az α -glükozidázzal végzett vizsgálatokhoz *Saccharomyces cerevisiae* eredetű enzimet használtam, melyet ismételten a Sigma-Aldrich Kft.-től (type I, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vásároltunk. E liofilizált enzimekészítmény, melynek fehérjetartalma $\geq 50\%$ volt (biurettel meghatározva), stabilizálószerként foszfátpuffer-sókat és EDTA-t tartalmazott. Mivel ez

alkalommal nem végeztem ITC kísérleteket, a gyári enzimek készítménnyel dolgoztam, melynek törzsoldat-koncentrációja minden kinetikai és gátlásvizsgálat alkalmával 1,5 mg/mL volt.

5.3 Felhasznált szubsztrátok

Az rmGFb szubsztrátspecifitásának vizsgálata során alkalmazott szabad maltopentaózt (G5; $M_t = 829 \text{ gmól}^{-1}$) és maltoheptaózt (G7; $M_t = 1153 \text{ gmól}^{-1}$) a Sigma-Aldrich Kft.-től (St. Louis, MO, USA), míg az osztrigaeredetű glikogént ($M_t = 850000 \text{ gmól}^{-1}$ [238]) a Merck-től (Darmstadt, Németország) szereztük be. Az ITC méréseknél a G5 koncentrációját 0,5-30 mM, a G7 koncentrációját pedig 0,5-20 mM tartományon belül változtattam. A glikogén esetében 20 mg/mL koncentrációjú törzsoldatból indultam ki a szubsztrátspecifitás mértékének meghatározásához, az ITC-vel végrehajtott gátlásvizsgálatoknál pedig 5 mg/mL volt a glikogén végkoncentrációja.

A 2-klór-4-nitrofenol kromoforcsoport-tartalmú maltoheptaóz-szubsztrátot (CNP-G7; $M_t = 1309 \text{ gmól}^{-1}$) kutatócsoportunk tagjai szintetizálták β -ciklodextrinből [72], majd folyadékkromatográfiás és MALDI-TOF-MS módszerekkel ellenőrizték annak tisztaságát. Az előbbi analitikai technika szerint a CNP-G7 tisztasága 96,9% volt. A szubsztrátspecifitás vizsgálata során a CNP-G7 koncentrációját 0,5-30 mM tartományon belül változtattam, míg a HPLC kísérletekhez 2,5 mM CNP-G7-et alkalmaztam.

A promiszkuitásra és AAG-ra irányuló kísérletekhez használt PPA enzim szubsztrátjaként egy rövid, kromogén, egyetlen hasítási ponttal rendelkező szubsztrátot, a GalG₂CNP-t ($M_t = 660 \text{ gmól}^{-1}$) választottam. A GalG₂CNP (Sorachim SA, Lausanne, Svájc) törzsoldat-koncentrációja valamennyi mérés esetén 5 mM volt.

Az α -glükózidáz enzim aktivitásméréséhez alkalmazott szubsztrátot, vagyis a p-nitrofenil- α -D-glükopiranozidot (PNP- α -Glc; $M_t = 301 \text{ gmól}^{-1}$) a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A 0,2 M foszfát pufferben oldott PNP- α -Glc-törzsoldat koncentrációja 10 mM volt.

5.4 Felhasznált inhibitorok

Glikogén foszforiláz inhibitorok

Az rmGFb enzimmel végzett gátlásvizsgálatok során két inhibitorot alkalmaztam, a glükopiranozilidén-spiro-tiohidantoint (GTH; $M_t = 264,1 \text{ gmól}^{-1}$), illetve a koffeint ($M_t = 194 \text{ gmól}^{-1}$). A GTH-t Somsák László és kutatócsoportja szintetizálta a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén [239]. A HPLC méréseknél a GTH koncentrációja 18,95 μM volt, míg az ITC kísérleteknél 2 μM -4 mM tartományon belül változtattam a koncentrációját.

A másik gátlószert, vagyis a koffeint a WHO International Chemical Reference Substances (Stockholm, Svédország) cégtől vásároltuk. A HPLC módszer esetén a koffeint 1 mM végkoncentrációban használtam, ami megfelel a szakirodalomban feltüntetett GF gátlásvizsgálatok során kontrollvegyületként alkalmazott koffein koncentrációjának. Az ITC méréseknél 0,3 mM és 30 mM közötti koncentrációtartományon belül határoztam meg a koffein gátló hatását.

Természetes eredetű α -amiláz inhibitorok

A promiszkuitás és az aggregációalapú gátlás vizsgálatához kontrollvegyületként két természetes eredetű inhibitorot választottam: az akarbózt, valamint egy tannint. Az akarbózt a Glucobay® néven kereskedelmi forgalomban kapható tablettából (Bayer, Leverkusen, Németország) nyertük ki vizes extrakcióval. 5 darab 50 mg hatóanyag-tartalmú elporított tablettát oldottunk fel 20 mL háromszor ioncserélt vízben, majd az oldatot 45 percig ultrahangos vízfürdőben inkubáltuk. Annak érdekében, hogy eltávolítsuk az oldhatatlan hordozóanyagokat (vízmentes kolloid szilícium-dioxid, mikrokristályos cellulóz, magnézium-sztearát, kukoricakeményítő), a vizes extraktumokat 2x15 percig centrifugáltuk 10000 rpm fordulatszámra. Ezt követően a felülúszót egy 0,45 μ m pórusátmérőjű fecskendőszűrővel tisztítottuk tovább, majd a tiszta oldatot liofilizáltuk. Az extrahált akarbóz tisztaságának analíziséhez MALDI-TOF MS (pozitív ion mód) módszert alkalmaztunk. A tömegspektrumban három fő csúcs volt jelen, melyek a protonált (646,4 Da), a nátriummal (668,4 Da) és a káliummal (684,4 Da) ionizált akarbózhoz tartoztak.

A promiszkuis AAI-k azonosításához használt közvetlen és közvetett módszerek esetén egyaránt az 1 mg/mL akarbóz-törzsoldat különböző hígításaival dolgoztam.

A pozitív kontrollként használt tannin a hidrolizálható tanninok, pontosabban a gallotanninok egyik képviselője volt. Az aleppói tölgy cserzőgubacsából (*Gallae Halepenses*) kinyert gallotannint a Biotechnology Services and Consulting Inc. (Coppell, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A vegyület további tisztítását kutatócsoportunk tagjai valósították meg méretkizárási kromatográfiával, Sephadex LH-20 oszlop segítségével. Az aleppó tannin összetételének felderítése (galluszsav- és ellagsav-tartalom meghatározása) spektrofotometriás módszerrel történt. Ezen analízis felfedte, hogy a vizsgált tannin 3% szabad, illetve 70% kötésben lévő galluszsavat tartalmaz, továbbá kis mennyiségben szabad (2%) és kötött (7%) ellagsav is megtalálható benne. Emellett ESI-MS technika (negatív ion mód) igazolta, hogy a tannin tisztítása sikeres volt, ugyanis csupán a 2-6 galluszsavval észterésített glükózhoz tartozó csúcsok jelentek meg a tömegspektrumban [222].

Mind a spektrofotometriás, mind az ITC kísérleteket a 4 mg/mL törzsoldat-koncentrációjú tannin megfelelő hígításaival végeztem el.

Szintetikus eredetű α -amiláz inhibitorok

A rodanin-alapvázal rendelkező szintetikus eredetű inhibitorokat Rosanna Maccari és munkatársai terveztek és szintetizálták a Messinai egyetemen (Messina, Szicília, Olaszország) [199]. E vegyületek szerkezeti karakterisztikáját, illetve kutatócsoportunk tagjainak hasonló inhibitorokkal végzett kísérleteinek tapasztalatait figyelembe véve, a vizsgált tiazolidinonszármazékokat rossz vízoldhatóságuk miatt dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottam fel. A gátlásvizsgálataimhoz 3-3,6 mg tömegű szilárd inhibitorot oldottam fel 200 μ L DMSO-ban, és a további hígításokat is ezzel a szerves oldószerrel végeztem el. A szerkezeti képleteket, a moláris tömegeket, valamint az alkalmazott törzsoldat-koncentrációkat a függelékben található táblázatban foglaltam össze.

5.5 Kinetikai és gátlási vizsgálatok izotermális titrálási kalorimetriával (ITC)

Kísérleteimet egy MicroCal ITC200 (Malvern, Worcestershire, UK) mikrokaloriméterrel valósítottam meg. Az ITC készülék két cellából és egy injektorból épül fel. Az injektor (40 μ L) a méréseim során az enzimet tartalmazta. A két cella közül az egyik a referenciacella (204 μ L), melyet az egyes komponensek oldásához alkalmazott pufferrel töltöttem fel, a másik cella pedig a mérőcella (204 μ L), ami a vizsgálataim során a pufferben oldott szubsztrátot, a gátlásvizsgálatok megvalósításakor pedig az inhibitorot is tartalmazta. Az ITC működésének alapelve, hogy a két cellát azonos hőmérsékletre termosztáljuk, és a mérés ideje alatt ezt az állandó hőmérsékletet kell fenntartani. Az enzim injektálását követően végbemegy a reakció, aminek eredményeképp a mérőcellában hőváltozás következik be a referenciacella hőmérsékletéhez képest. Az ITC módszernél azt a befektetett energiamennyiséget mérjük, ami ahhoz szükséges, hogy ezt a hőváltozást a készülék kompenzálni tudja, vagyis aminek a segítségével az izoterm körülmény fenntartható. A mérés során kapott nyers értékek (dQ/dt) a hőváltozást adják meg az idő függvényében. Az ITC tehát lehetőséget ad akár egy teljesen ismeretlen mechanizmus alapján lejátszódó reakció energetikai hátterének megismerésére, vagyis annak meghatározására, hogy egy adott folyamat energiefel szabadulással jár (exoterm reakció), vagy energiabefektetést igényel (endoterm reakció).

A reakciósebességet (v_0 kezdeti sebesség vagy v_{max} maximális sebesség) az időegység alatt képződött termék anyagmennyiségeként vagy az időegység alatt fogyott szubsztrát anyagmennyiségeként fejezhetjük ki, a kapott nyers kalorimetrikus jel pedig tulajdonképpen egy teljesítménynek (μcals^{-1} vagy μJs^{-1}) felel meg. Ahogy az 1. egyenletből is látszik, a

reakciósebesség az időegység alatt detektált hőváltozás (dQ/dt), illetve a reakció entalpiaváltozásának (ΔH) ismeretében kiszámítható [240]:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \times \Delta H} \times \frac{dQ}{dt} \quad (1)$$

ahol $d[P]/dt$ az időegység alatt keletkező termék koncentrációja, V a mérőcella térfogata, dQ/dt a hőáram, ΔH pedig a reakció entalpiaváltozása.

Ugyanazon rendszert (azonos cellatérfogat, hőmérséklet, enzim- és szubsztrátkoncentráció) alkalmazva a $(V \times \Delta H)^{-1}$ értéke állandó, így a nyers kalorimetrikus jel gyakorlatilag a reakciósebesség közvetlen mértékének tekinthető.

Kísérleteim során kezdeti sebességeket (v_0) mértem, ahol a szubsztrátnak még csak olyan kis mennyisége ($\leq 10\%$) alakult át terméké, hogy ez a koncentrációcsökkenés elhanyagolható a teljes szubsztrátkoncentrációhoz viszonyítva. Ekkor a reakcióelegy teljes szubsztráttartalma és a szabad szubsztrátkoncentráció gyakorlatilag azonos. Ezt a v_0 mérést úgy valósítottam meg, hogy az alapvonaltól számított legnagyobb kitérést a reakció kezdetén (1-2 perccel az injektálást követően) határoztam meg. Ilyen módon az egyszeres injektálás eredményeként egy $v_0-[S]$ adatpárhoz jutottam. A nyers kísérleti ITC adatok kiértékeléséhez minden esetben a Microcal Origin 7.0 grafikai és adatelemző szoftvert alkalmaztam (Northampton, MA, USA). Mind az enzimkinetikai, mind a gátlási vizsgálatok során 300 μL térfogatú mintákat állítottam össze, melyekből 204 μL -t használtam a cella feltöltéséhez. A végkoncentrációk számításához a cella tényleges térfogatát vettem figyelembe. Az alkalmazott kísérleti paramétereket, illetve azok beállított értékeit a 13. táblázatban foglaltam össze.

13. táblázat: Az ITC kísérletek során alkalmazott mérési paraméterek értékeinek összefoglalása.

Injektálások száma:	1
Cella hőmérséklete	37°C
Referencia teljesítmény	5 μcalsec^{-1}
Keverési sebesség	500 rpm vagy 800 rpm
'Feedback' mód	kicsi
Injektált térfogat	2-5 μL
Injektálás időtartama	4-10 sec
Adatvételezés gyakorisága	3 sec
Mérés időtartama	18000 sec

Az injektálást követően azonban olyan hőváltozás is kialakulhat, mely nem az adott enzimreakcióból származik. Mivel az ilyen nonspecifikus hőeffektust (például hígulási hőeffektus) a készülék nem tudja automatikusan kompenzálni, valamennyi enzimkinetikai és gátlási vizsgálathoz három további kontrollmérést is elvégeztem. Az egyes komponensek által kiváltott hígulási hőeffektus meghatározása érdekében (1) az enzimet (injektorban) pufferhez (mérőcellában) titráltam, (2) a puffer (injektorban) enzimmel ekvivalens térfogatú mennyiségét a szubsztrátoldathoz (mérőcellában), majd (3) az inhibitor pufferes oldatához (mérőcellában) injektáltam. A szubsztrátspecifitási vizsgálatok esetén mindegyik szubsztrátkoncentrációval elvégeztem a (2)-es kontrollt, míg a gátlásvizsgálatoknál az adott kísérletsorozaton belül alkalmazott összes inhibitor koncentrációra nézve végrehajtottam a (3)-as kontrollt. E három kontrollmérés során kapott adatsorokat manuálisan kivontam a tényleges aktivitásmérések adatsoraiból.

5.5.1 ITC-alapú módszer kidolgozása az rmGFb enzim aktivitásának mérésére

Hatásos aktivátorkoncentráció kiválasztása

Az rmGFb aktiválásához szükséges AMP koncentrációjának meghatározásához 2,5 mM CNP-G7-et használtam szubsztrátként, melyet a kívánt reakció irányától függően a glikogénszintézist vagy a foszforolízist biztosító pufferben oldottam fel. A lánchosszabbítás irányában 2,6 mM EDTA és 50 mM G-1-P összetételű 35 mM β -glicerofoszfát puffert (pH 6,8) alkalmaztam, míg a glikogénlebontás megvalósítása 1M foszfát pufferrel (pH 6,8) történt, mely 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ és 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1:1 arányú elegyből, valamint 2,6 mM EDTA-ból állt. Mindkét puffer tartalmazott továbbá AMP-t is, melynek koncentrációját 0 mM és 30 mM közötti tartományon belül változtattam. A kísérlet során a mérőcellát a különböző AMP koncentrációjú

pufferben oldott CNP-G7 szubsztráttal töltöttem fel, melyhez 5 μL 4 mg/mL GFb enzimet (azonos AMP tartalmú pufferben oldva) titráltam 10 sec alatt. A korrigált termogrammok kiértékelése során meghatározott reakciósebességeket ábrázoltam az AMP-koncentráció függvényében, majd a kapott pontokra a szoftverbe implementált hiperbolikus összefüggés alapján, nemlineáris regresszióval görbét illesztettem (2. egyenlet):

$$y = \frac{P_1 x}{P_2 + x} \quad (2)$$

ahol x az AMP-koncentrációnak, P_1 a maximális sebességnek (v_{max}), P_2 a félhatásos aktivátorkoncentrációnak (EC_{50}), y pedig a reakciósebességnek (v) felel meg.

Szubsztrátspecifitás vizsgálata

Az rmGFb szubsztrátspecifitásának ITC módszerrel történő vizsgálatához a korábban leírt kísérleti elrendezést alkalmaztam, vagyis az injektorban lévő 4 mg/mL GFb enzim pufferes oldatának 5 μL -es részletét titráltam 10 sec alatt a mérőcellában található különböző koncentrációjú szubsztrátoldatokhoz. A referenciacella ez alkalommal is az enzim és szubsztrát oldásához használt puffert tartalmazta. Négy szubsztráttal végeztem el ezeket a méréseket: G5-tel, G7-tel, glikogénnel, illetve CNP-G7-tel. Az első három esetben kizárólag a foszforolízis irányában határoztam meg az enzim aktivitását, míg a negyediknél a lánchosszabbítási reakcióban is. Ennek megfelelően oldottam fel az egyes szubsztrátokat a lebontást vagy szintézist biztosító pufferben, melyek összetétele megegyezett az AMP EC_{50} értékének meghatározásánál leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a puffer (iránytól függetlenül) minden alkalommal 1 mM AMP-t tartalmazott. A G5, G7 és CNP-G7 koncentrációját 0,5 mM és 30 mM, a glikogénét pedig 0,5 mg/mL és 20 mg/mL között változtattam. A kontrollkísérletek elvégzése, a szubsztrátspecifitás-vizsgálatok során kapott termogrammok korrigálása és kiértékelése, majd a reakciósebesség-szubsztrátkoncentráció ábrázolás után a Michaelis-Menten-egyenletnek megfelelő hiperbolikus összefüggéssel (2. egyenlet) görbét illesztettem, ahol ez alkalommal x a szubsztrátkoncentráció, P_1 a maximális sebesség (v_{max}), P_2 a Michaelis-állandó (K_M), y pedig a reakciósebesség (v) volt. Az ITC kísérletek során kapott hőeffektusok alapján és a szubsztrátkoncentrációk ismeretében hozzájuttattam az enzim két legfőbb kinetikai paraméteréhez (K_M és v_{max}).

A CNP-G7 foszforolízisének tapasztalt szubsztrátgátlás eredményeinek kiértékelésekor azonban a Michaelis-Menten-egyenlet helyett a szubsztrátgátlásra vonatkozó Haldane-egyenlettel (3. egyenlet; [241]) határoztam meg a kinetikai és gátlási paramétereket (v_{max} , K_M , K_i):

$$\frac{ds}{dt} = - \frac{v_{max} \times [S]}{K_M + [S] + [S]^2 / K_i} \quad (3)$$

ahol $[S]$ a szubsztrátkoncentráció, v_{max} a maximális sebesség, K_M a Michaelis-állandó és K_i a gátlási állandó.

Az rmGFb különböző szubsztrátokkal szembeni katalitikus hatékonyságának meghatározása érdekében kiszámoltam a k_{cat}/K_M arányokat. Egyszubsztrátos enzimreakciók esetén a k_{cat}/K_M dimenziója $\text{idő}^{-1} \cdot \text{koncentráció}^{-1}$ (például $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). A k_{cat} az enzimreakció sebességi állandója, mely megmutatja, hogy egységnyi idő alatt egy enzim molekula mennyi szubsztrátmolekulát képes termékké alakítani. A k_{cat} az enzimreakció maximális sebességének és a kiindulási enzimkoncentrációnak ($[E]_0$) a hányadosaként adható meg [242]. Ennek megfelelően, a k_{cat} kiszámításához először a v_{max} értékeket kellett meghatároznom. Ehhez az 1. egyenletet hívtam segítségül, mely során a teljes cellatér fogatot $V=204 \mu\text{L}$ -nek, a ΔH -t pedig $2,32 \text{ kcal/mól}$ -nak vettem. A ΔH -t egy egyszeres injektálással végrehajtott kísérlet alapján kaptam meg. Ekkor szubsztrátként G5-öt használtam, ugyanis ez a pentamer csupán egyetlen olyan glikozidos kötést tartalmaz, melyet a GFb képes foszforolitikusan hasítani. Ezt követően a v_{max} értékeket a kiindulási enzimkoncentrációval ($[E]_0=0,37 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) elosztva hozzájutottam a k_{cat} kinetikai paraméterekhez.

Gátlásvizsgálatok

Az rmGFb aktivitásmérésére kidolgozott új rendszerben kivitelezett gátlásvizsgálatokat GTH-val és koffeinnel végeztem el. Az enzimet (rmGFb), szubsztrátot (20 mg/mL glikogén) és inhibitorokat a kívánt irányt biztosító pufferben oldottam fel. A foszforolitikus reakcióhoz alkalmazott puffer (pH 6,8) 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -t; 2,5 mM G-1-P-ot, 2,6 mM EDTA-t, 35 mM β -glicerofoszfátot és 1 mM AMP-t tartalmazott, míg a glikogénszintézis vizsgálatához használt puffer (pH 6,8) 25 mM G-1-P-ból, 2,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -ból, 2,6 mM EDTA-ból, 35 mM β -glicerofoszfátból és 1 mM AMP-ből állt. Az injektor a gátlásvizsgálatok során is a 4 mg/mL rmGFb-t tartalmazta, melynek 5 μL -es részleteit titráltam a mérőcellába 10 sec alatt. Először a nemgátolt enzim aktivitását határoztam meg úgy, hogy a mérőcellában kizárólag az 5 mg/mL végkoncentrációjú szubsztrátoldat (75 μL 20 mg/mL glikogén törzsoldat + 225 μL megfelelő irányt biztosító puffer) volt jelen. Ezt a kísérletet ismételtam meg úgy, hogy a mérőcella a szubsztrátoldat mellett az inhibitor (GTH vagy koffein) is tartalmazta. A 300 μL végtér fogatra összeállított minta minden esetben 75 μL szubsztrátból állt, és az inhibitoroldat-puffer térfogatarány változtatásával értem el a különböző inhibitor koncentrációkat. A GTH

koncentrációját 2 μM és 4 mM, a koffein koncentrációját pedig 0,3 mM és 30 mM közötti tartományon belül változtattam. A kapott termogramok kontrollkísérletekkel történő korrigálását követően meghatároztam az enzim maradék aktivitását (%/100 egységben megadva) az egyes inhibitor-koncentrációk esetén úgy, hogy a gátolt enzimreakcióból származó dQ/dt értékeket az inhibitor-t nem tartalmazó referenciamintán (azonos [S] és [E] mellett) mért hőváltozáshoz viszonyítottam. A kapott pontokra a Greco-Hakala relatív reakciósebességi egyenletet alapján [243], nemlineáris regresszióval görbét illesztettem. A koncentráció-hatás görbék illesztéséből a látszólagos gátlási állandókhöz (K_i^*) jutottam (4. egyenlet), mely értékekből ki tudtam számolni a tényleges gátlási állandókat (K_i) (5. egyenlet):

$$\frac{v}{v_0} = \frac{E_t - I - K_i^* + \sqrt{(E_t - I - K_i^*)^2 + 4E_t \times K_i^*}}{2E_t} \quad (4)$$

$$K_i^* = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) \quad (5)$$

ahol (v/v_0) a relatív reakciósebesség, K_i^* a látszólagos gátlási állandó, E_t a teljes enzimkoncentráció, I az inhibitor-koncentráció, K_i a tényleges gátlási állandó, $[S]$ a szubsztrátkoncentráció ($[S]=5$ mg/mL), K_M a Michaelis-állandó ($K_M=1,5$ mg/mL). Az utóbbi kettő a glikogén-szubsztrátra vonatkozó érték.

5.5.2 Az akarbóz és az aleppó tannin promiszkuis jellegének és aggregációra való hajlamának vizsgálata

Az akarbóz és az aleppó tannin PPA enzimen kifejtett gátló hatásának és aggregációra való hajlamának közvetett stratégia szerint történő meghatározásához alkalmazott ITC módszernél az injektor 288 $\mu\text{g/mL}$ 50 mM MES pufferben oldott PPA enzimet tartalmazott, melynek 2 μL -es részleteit titráltam a mérőcellába 4 sec alatt (a reakcióelegyben lévő $[E]=2,8$ $\mu\text{g/mL}$). A mérőcellában az 1 mg/mL akarbóz-, illetve a 4 mg/mL tannin-törzsoldat különböző hígításainak, valamint az 5 mM GalG₂CNP szubsztrátnak az elegye volt (a reakcióelegyben lévő $[S]=1$ mM). Ebben az esetben is első lépésként a nemgátolt enzim aktivitását határoztam meg, mely szükséges volt ahhoz, hogy kiszámolhassam az egyes inhibitor-koncentrációk által kiváltott gátlás mértékét. A maradék enzimaktivitások inhibitor-koncentráció függvényében történő ábrázolása során a kísérleti adatokra nem a Greco-Hakala egyenlet felhasználásával illesztettem görbéket, ugyanis ez az összefüggés elsősorban a szorosan kötődő inhibitorok esetében alkalmazható. Habár az akarbóznál, mint mikromólos IC_{50} értékkel rendelkező,

szubsztrátra nézve kompetitív inhibitornál még kivitelezhető lenne a Greco-Hakala egyenlet szerinti görbeillesztés, a nemspecifikus gátlószereknél (tannin, tiazolidinonszármazékok) azonban nem. Ezért annak érdekében, hogy az összes alkalmazott inhibitornál azonos módon végezhessem el a görbeillesztést, a kinetikai és gátlásvizsgálatokból (mind az ITC, mind a spektrofotometriás módszernél) származó pontokra minden esetben logisztikus összefüggés alapján, nemlineáris regresszióval (6. egyenlet) illesztettem görbéket:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (6)$$

ahol $A_1 - A_2$ a görbe két végpontja közötti távolság, x az inhibitor koncentráció, x_0 az IC_{50} érték, y a mért dQ/dt értékkel arányos v_0 , p pedig a meredekségi faktor.

Detergenssel szembeni érzékenység vizsgálata

A detergenssel szembeni érzékenység vizsgálata során az előbb leírt módon végeztem el a kísérleteket, azzal a kivétellel, hogy az enzim (288 $\mu\text{g/mL}$ PPA), a szubsztrát (5 mM GalG₂CNP) és az inhibitorok (4 mg/mL tannin, 1 mg/mL akarbóz) oldására alkalmazott MES puffer 0,01% Triton X-100 nemionos detergenst is tartalmazott. Annak érdekében, hogy elkerüljem a fokozott habképződést, a méréseknél a keverés sebességét 800 rpm-ről 500 rpm-re csökkentettem.

Enzim-inhibitor előinkubálás hatásának vizsgálata

Az enzim-inhibitor előinkubálás hatásának tanulmányozásához nem tudtam elvégezni az ITC méréseket (az akarbóz és tannin esetében sem), ugyanis e módszer nem teszi lehetővé a reakció azonnali indítását az enzim és inhibitor meghatározott ideig tartó előinkubálása után. A kinetikai vizsgálatokhoz korábbiakban alkalmazott rendszerben ugyanis (mérőcella: szubsztrát + inhibitor pufferes oldata, injektor: enzim pufferes oldata) a fehérje és a gátlószer csupán a reakció kezdete után kerül érintkezésbe. A fordított rendszer, vagyis amikor a szubsztrátot adagoljuk a mérőcellában lévő enzim-inhibitor elegyhez, szintén nem jelent megoldást, mert az enzimreakció nem indítható el tetszőlegesen. A szubsztrát injektálását egy alapvonal-kalibráció előzi meg, melynek időtartama az adott készüléktől függ, manuálisan nem állítható be.

Az enzimkoncentráció változtatásának vizsgálata

Amikor az enzimkoncentráció változtatásának hatását vizsgáltam, ITC módszerre volt szükség ahhoz, hogy nagyobb (20-szoros és 50-szeres) PPA koncentráció esetén is meg tudjam határozni a gátlási paramétereket. Ennek megvalósítása érdekében megismételtem a korábbi

ITC gátlásvizsgálatokat úgy, hogy az 1 mM GalG₂CNP szubsztrátoldatot és a különböző koncentrációjú akarbóz- vagy tanninoldatot tartalmazó mérőcellába 2 µL 2,88 mg/mL (20-szoros [E]), majd 7,2 mg/mL (50-szeres [E]) PPA-t titráltam 4 sec alatt.

A tiazolidinonszármazékoknál nem lehetett használni ezt az analitikai módszert, mivel a tesztvegyületek rossz vízdoldhatósága miatt fennállt a veszélye az injektor eltömődésének. Ráadásul, az ITC vizsgálatok kivitelezését nehezítette volna a minta szervesoldószer-tartalma is. A tiazolidinonszármazékokat ugyanis DMSO-ban oldottam fel a törzsoldatok készítéséhez, és a hígításokat is azzal végeztem. Habár a minta DMSO tartalma csupán 2% volt, ami nem haladja meg a készülék szerves oldószerekkel szembeni maximális tűréshatárát (5 v/v%), a nagy hígulási effektus elkerülése érdekében az injektorban lévő enzimoldatnak is ugyanilyen mértékben kellett volna tartalmazni DMSO-t. Mivel egyetlen mérés során (30 perc) csak 2 µL PPA-t injektáltam a mérőcellába, a 40 µL ösztérfogatú injektor újratöltése nélkül majdnem tíz órán keresztül inkubálnánk az enzimet és a DMSO-t. Ez az inkubációs idő azonban elegendő lenne ahhoz, hogy a szerves oldószer megváltoztassa az enzim aktivitását, ez által a kapott eredmények nem lennének összevethetők.

5.6 Természetes (akarbóz, tannin) és szintetikus eredetű (2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok) inhibitorok promiszkuis jellegének és aggregációra való hajlamának vizsgálata spektrofotometriás módszerrel

5.6.1 Promiszkuis jelleg vizsgálata

A kilenc glikoenzim-inhibitor közül csak a hét 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék promiszkuitásának felderítésére irányuló kísérleteket végeztem el a szakirodalmi adatok hiánya miatt. Két hidroláz enzimet választottam ki e célból: a PPA-t, melyet az AAG közvetett és közvetlen stratégia szerinti meghatározása során modellenzimként alkalmaztam, és az α-glükozidázt. A kinetikai és gátlásvizsgálatok kivitelezéséhez egy termosztálható Jasco V550 típusú kétsugaras spektrofotométert (Jasco Corporation, Easton, MD, USA) használtam. Valamennyi spektrofotometriás mérést 37°C-on hajtottam végre.

A tiazolidinonok gátló hatásának vizsgálatát nehezítette, hogy nem lehetett nagyobb koncentrációtartományban dolgozni velük, ugyanis a pufferhez adva csapadékot eredményeztek. Ezáltal gyakran nem lehetett elérni az enzimaktivitás teljes megszűnését, sőt a 6-os és 7-es vegyület esetében az 50%-os gátlást sem.

PPA enzim aktivitásának meghatározása spektrofotometriás módszerrel

A 2-tioxo-4-tiazolidinonvegyületekkel végzett gátlásvizsgálatok során a reakcióelegyet 500 μL végtérfogatban állítottam össze, mely 20 μL 5 mM GalG₂CNP szubsztrátot (a reakcióelegyben lévő $[S]=0,2$ mM), 10 μL inhibitorot és 460 μL 50 mM MES puffert tartalmazott. A reakciót a 28 $\mu\text{g/mL}$ PPA 10 μL -es részletének mintához történő hozzáadásával indítottam (a reakcióelegyben lévő $[E]=0,56$ $\mu\text{g/mL}$). Az inhibitorokat rossz vízoldhatóságuk miatt DMSO-ban oldottam, és a hígításokat is azzal végeztem. Annak érdekében, hogy kiküszöböljem a 2% DMSO-tartalom okozta esetleges interferenciákat, a referenciaoldatként (vakoldat) alkalmazott MES puffer is ugyanilyen térfogatarányban tartalmazta a szerves oldószert.

Legelőször a nemgátolt enzim aktivitását határoztam meg úgy, hogy a minta összetétele 460 μL MES puffer, 20 μL 5 mM GalG₂CNP, 10 μL DMSO és 10 μL PPA volt. 3 percig követtem a PPA hidrolízise nyomán felszabaduló kromoforcsoport (CNP) által kiváltott abszorbancianövekedést 400 nm hullámhosszon. Ezt követően a Jasco Spectra ManagerTM szoftver (Jasco Corporation, Easton, MD, USA) Time course measurement funkciójának segítségével meghatároztam a kapott görbe kezdeti szakaszának meredekségét, vagyis az időegység alatt bekövetkező abszorbanciaváltozást ($dAbs/min$), mely érték a katalizált reakció kezdeti sebességével volt arányos. Ezt a mérést ismételtam meg úgy, hogy a minta DMSO helyett 10 μL adott hígítású inhibitorot tartalmazott. A különböző inhibitor koncentrációk esetében meghatározott $dAbs/min$ értékeket a nemgátolt enzimreakcióból származó $dAbs/min$ értékhez viszonyítva kiszámoltam az enzim százalékos maradék aktivitását. Ezutóbbi adatokat ábrázoltam az inhibitor koncentrációk függvényében, majd a kapott pontokra a 6. egyenlet felhasználásával görbét illesztettem, ismételten a Microcal Origin 7.0 szoftver segítségével.

α -glükózidáz enzim aktivitásának meghatározása spektrofotometriás módszerrel

A 2-tioxo-4-tiazolidinonvegyületek α -glükózidáz enzimen kifejtett aktivitáscsökkentő hatásának vizsgálata és az adatok kiértékelése ugyanolyan módon történt, mint a PPA-val végrehajtott spektrofotometriás kísérletek során. Ebben az esetben azonban az 500 μL végtérfogatú reakcióelegy 20 μL 10 mM PNP- α -Glc szubsztrátot (0,2 mM foszfát pufferben oldva) és 10 μL 1,5 mg/mL α -glükózidáz enzimet tartalmazott a 10 μL inhibitor, illetve a 460 μL foszfát puffer mellett. Ez alkalommal is 400 nm hullámhosszon követtem a felszabaduló kromoforcsoport (PNP) hatására bekövetkező abszorbancianövekedést, majd a Jasco Spectra ManagerTM szoftver segítségével meghatároztam az enzimreakció v_0 értékeit. A görbék illesztése ismét logisztikus összefüggés szerint történt.

5.6.2 Aggregációalapú gátlás közvetett stratégia szerinti vizsgálata

Az aggregátumképződés hatására végbemenő gátlás spektrofotometriás vizsgálatához PPA-t használtam modellenzímként, GalG₂CNP-t pedig szubsztrátként. Először az akarbóz és az aleppó tannin gátlásvizsgálatát végeztem el az eredeti reakciókörülmények között (detergens, előinkubálás, enzimkoncentráció-változtatás és centrifugálás alkalmazása nélkül). A reakcióelegyet 400 µL végtérfogatban állítottam össze, mely 80 µL 5 mM GalG₂CNP szubsztrátot (a reakcióelegyben lévő [S]=1 mM), 10 µL inhibitorot és 300 µL 50 mM MES puffert tartalmazott. A reakciót a 112 µg/mL PPA 10 µL-es részletének mintához történő hozzáadásával indítottam (a reakcióelegyben lévő [E]=2,8 µg/mL). Csakúgy, mint a 2-tioxo-4-tiazolidinonvegyületekkel PPA enzimen végzett gátlásvizsgálatok során, most is 3 percig követtem az abszorbancianövekedést 400 nm hullámhosszon. A nemgátolt és a gátolt enzim v_0 értékeinek meghatározása, a maradék enzimaktivitás kiszámítása, valamint a mérési pontokra történő görbeillesztés is a korábban leírt módon történt.

Detergennel szembeni érzékenység vizsgálata

A kilenc inhibitor detergennel szembeni érzékenységének vizsgálata és az eredmények kiértékelése ugyanúgy történt meg, mint ahogy azt az adott vegyület eredeti reakciókörülmények mellett kivitelezett gátlásvizsgálata során leírtam, azzal a kivétellel, hogy az enzim, a szubsztrát és az inhibitorok oldására alkalmazott MES puffer 0,01% vagy 0,1% Triton X-100 nemionos detergenst is tartalmazott. Az akarbóznál és a tanninnál használt vakoldat ugyanez a detergenstartalmú puffer volt, míg a tiazolidinonokkal végzett kísérletekben a referenciaoldatban további 2% (v/v%) DMSO is jelen volt.

Enzim-inhibitor előinkubálás hatásának vizsgálata

Az időfüggő gátlóhatás tanulmányozásához a PPA enzimet és az inhibitorokat 5, 10 és 30 percig inkubáltam, majd a GalG₂CNP szubsztrátot 20 µL-es részletének mintához történő hozzáadásával indítottam el az enzimreakciót. Az akarbóz és tannin esetében a reakcióelegy továbbra is 80 µL 5 mM GalG₂CNP szubsztrátot, 10 µL inhibitorot, 300 µL 50 mM MES puffert és 10 µL 112 µg/mL PPA-t tartalmazott. A tiazolidinonszármazékok előinkubálásra való érzékenységének vizsgálatakor is a korábbiakkal azonos összetételű reakcióeleggyel dolgoztam: 20 µL 5 mM GalG₂CNP szubsztrát, 10 µL inhibitor, 460 µL 50 mM MES puffer és 10 µL 28 µg/mL PPA.

Enzimkoncentráció-változtatás hatásának vizsgálata

Amikor az enzimkoncentráció változtatásának hatását vizsgáltam spektrofotometriás módszerrel, legfeljebb 6-szoros fehérjekoncentrációt tudtam használni a nemgátolt PPA túl

nagy aktivitásából eredő rendkívül gyors enzimreakció miatt. Ezeket a méréseket úgy hajtottam végre, hogy a korábbi gátlásvizsgálatoknál alkalmazott 10 μL PPA helyett 5, 20 és 30 μL enzimmel indítottam el a reakciót. A puffer térfogatát úgy módosítottam, hogy az enzim-puffer térfogatarány változatlan maradjon.

Centrifugálás hatásának vizsgálata

Az inhibitorok gátló hatásának centrifugálással szembeni érzékenységének kimutatásához a gátlásvizsgálatokat ugyanolyan módon végeztem el, mint korábban (azonos reakcióelegy-összetétel, puffer, illetve enzim-, szubsztrát- és inhibitor-koncentráció), azonban a spektrofotometriás aktivitásmérést megelőzően az adott inhibitor MES pufferes oldatát 30 percig centrifugáltam szobahőmérsékleten, 14.000 rpm fordulatszámom. A centrifugálást követően a felülúszó 470 μL -es (tiazolidinonszármazékok) vagy 310 μL -es (tannin és akarbóz) részletéhez adtam hozzá a 20 μL (tiazolidinonok) vagy 80 μL (tannin és akarbóz) GalG₂CNP szubsztrátot és a 10 μL PPA enzimet.

5.7 Az rmGFb aktivitásmérésre alkalmas módszer reakciókörülményeinek optimalizálása és az enzim gátlásvizsgálata HPLC módszerrel

Az rmGFb aktivitásmérésre alkalmas módszer reakciókörülményeinek optimalizálását és a GTH, illetve a koffein GFb enzimen kifejtett gátló hatásának előzetes vizsgálatát HPLC módszer segítségével végeztem el. A kísérletekhez egy kvaterner pumpával, gáztalanító egységgel, automata mintaadagolóval és diódasoros detektorral felszerelt Agilent 1260 Infinity II készüléket (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) használtam. Az elválasztást Hypersil ODS (20 cm x 4,6 mm, 120 Å, 5 μm , Agilent) oszlopon valósítottam meg, izokratikus elúciót (MeCN:H₂O=12:88 v/v%), valamint 1 ml/min áramlási sebességet alkalmazva. A szubsztrátként választott CNP-G7 és a hosszabb vagy rövidebb, kromoforcsoport-tartalmú maltooligomer-termékek detektálása 302 nm hullámhosszon történt. A kolonnátér hőmérséklete 30°C-ra volt állítva.

A 4 mg/mL törzsoldat-koncentrációjú enzimoldatot 2,6 mM EDTA és 1 mM AMP tartalmú 35 mM β -glicerofoszfát pufferben (pH 6,8) készítettem. Minden mérés során 2,5 mM CNP-G7, illetve 2,5 mM-25 mM G-1-P vagy foszfát (Na₂HPO₄) szubsztrátot oldottam fel frissen e glicerofoszfát pufferben. 14 μL enzim és 1 mL szubsztrát homogénizált elegyét inkubáltam 5 percig 37°C-on, majd 15 percenként (összesen 4-szer) 5 μL mintát injektáltam az oszlopra. A HPLC egyes moduljainak irányítása, valamint a kapott kromatogramok kiértékelése az Agilent ChemStation szoftver (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) segítségével

történt meg. A reakciósebesség meghatározásához a CNP-oligomertermékek összesített csúcs alatti területeit ábrázoltam a reakcióidő függvényében. Az adatokra lineáris regresszióval illesztettem görbét, mely egyenes meredeksége adta meg az enzim aktivitását.

5.8 Természetes (akarbóz, tannin) és szintetikus eredetű (2-tioxo-4-tiazolidinonszármazékok) inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata DLS módszerrel

Az AAG közvetlen stratégia szerinti felismeréséhez DLS módszerrel vizsgáltam a kilenc inhibitor részecskeméretét. Kísérleteimhez egy Zetasizer NanoZS dinamikus fényszórásmérő készüléket (Malvern Panalytical Kft., Worcestershire, UK) alkalmaztam. A berendezésben egy 4 mW teljesítményű, 633 nm hullámhosszúságú hélium-neon lézer szolgál fényforrásként, a szórt fény detektálása 173°-nál (visszaszórási módban) történik. A műszer 0,6-6000 nm átmérőjű részecskeméret kimutatására alkalmas. Az aggregáció okozta heterodiszperzitás miatt a minták jellemzésére az átlagos hidrodinamikai részecskeméret (Z-átlag) helyett az intenzitás szerinti részecskeméret-eloszlást használtam. Ezen érték mellett meghatároztam továbbá az egyes minták polidiszperzitás indexét és fotonbeütésszámát. Minden inhibitor esetében két mérésorozatot hajtottam végre. Először 20 µL inhibitorot adtam 980 µL MES pufferhez, a második sorozatban pedig a minta 20 µL inhibitorot, 20 µL PPA enzimet (0,56 µg/mL) és 960 µL MES puffert tartalmazott. A gátlószereket mindig az IC_{50} érték körüli koncentrációban alkalmaztam: 0,78 µM akarbóz, 2,5 µg/mL aleppó tannin, 204 µM **1-es**, 105 µM **2-es**, 103 µM **3-as**, 73,9 µM **4-es**, 208 µM **5-ös**, 193 µM **6-os** és 137 µM **7-es** tiazolidinonszármazék. Az 1 mL végtérfogatú mintákat egyszer használatos polisztirol küvettákban helyeztem a készülékbe. Valamennyi mérés előtt a mintákat, és magát a puffert is, egy 0,22 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel (Millex®-GP; Millipore™, Burlington, MA, USA) szűrtem, hogy elkerüljem az esetleges szennyeződések zavaró hatását. Minden DLS kísérlet 3 párhuzamos mérésből állt, melyek egyenként 30 sec-ig tartottak. A kísérleteket 37°C-on végeztem. Az adatgyűjtéshez és az eredmények kiértékeléséhez a Malvern DTS 7.12 szoftvert (Malvern Panalytical Ltd, Worcestershire, UK) használtam.

6. Összefoglalás

Annak ellenére, hogy a T2DM kezelésének számos módját (inzulinterápia, monoterápiás és kombinációs gyógyszeres kezelés, stb.) fejlesztették már ki, e komplex anyagcsere-rendellenesség évente továbbra is több millió ember életét követeli. Az egyes antidiabetikumokkal szembeni rezisztencia vagy a gyógyszerkészítmények által kiváltott, gyakran súlyos mellékhatások miatt egyre több kutatócsoport foglalkozik az új és hatékonyabb alternatív terápia kidolgozásával. Az utóbbi időkben a glikoenzimek – elsősorban a glikogén foszforiláz, α -amiláz és α -glükózidáz – gátlása révén megvalósítható glükózzá alakulás szabályozás került a tudományos érdeklődés középpontjába. Egy új gyógyszer kifejlesztése azonban rendkívül költséges és időigényes folyamat, mely a kutatás bármely fázisában (akár a végső klinikai tesztek során) elbukhat. Ezért az *in vitro* vizsgálatok egyre nagyobb szerepet kapnak a kutatás és fejlesztésben. Ha például egy potenciális inhibitor már az optimalizált és ellenőrzött körülmények között is hatástalannak és/vagy nonspecifikus mechanizmus alapján ható vegyületnek bizonyul, a gyógyszerjelöltként való alkalmassága megkérdőjelezhetővé válik. Ennek megfelelően, egy adekvát aktivitásmérési módszer alkalmazása, valamint a kinetikai és gátlásvizsgálatok eredményeiből levont helytálló következtetések nagy relevanciával bírnak.

Doktori értekezésemben a glikoenzim-inhibitorok vizsgálatának e két kulcsfontosságú elemével foglalkoztam. Munkám során egy új módszert dolgoztam ki a glükóz glikogénraktárakból történő felszabadítását katalizáló glikogén foszforiláz enzim aktivitásának mérésére. Továbbá néhány tiazolidinonszármazék segítségével vizsgáltam az aggregációalapú gátlás jelenségét, mint az inhibitor-promiszkuitás háttérben álló leggyakoribb molekuláris mechanizmust.

A GF enzim által katalizált reverzibilis folyamat azonos reakciókörülmények melletti követésére alkalmas új aktivitásmérési módszer kifejlesztéséhez ITC technikát használtam. Az ITC egy ígéretes és hatékony analitikai módszernek számít az enzimkinetikai vizsgálatokban, ugyanis nincs szükség a szubsztrát kromofor, fluorofor vagy radioaktív jelzett származékának képzésére, illetőleg kapcsolt enzimreakciók alkalmazására. Az ITC további előnyös tulajdonsága, hogy a mérések során kapott dQ/dt érték a reakciósebesség közvetlen mértéke, szemben a szakaszos aktivitásmérési módszerekkel, ahol a reakciósebességet a koncentráció-idő összefüggés alapján kell meghatározni. Az egyszeres vagy többszörös injektálással végrehajtott hagyományos ITC technikák nem alkalmasak a reverzibilis enzimreakciók kinetikai vizsgálatára, ugyanis a folyamat során képződő termék az ellentétes irányú reakció

szubsztrátjaként funkcionálhat. Ekkor a szubsztrát teljes átalakulása helyett egy olyan egyensúlyi elegy jön létre, ahol a két ellenkező irányú reakció azonos sebességgel játszódik le. Ez lehet az egyik oka annak, hogy az ITC módszert legfőképp hidroláz enzimek tanulmányozására használják. A nyúlvázizom-eredetű glikogén foszforilázt, mint cukor foszforiláz modellenzimet alkalmazva, kidolgoztam azokat a reakciókörülményeket, melyek alkalmasak a GF enzim aktivitásának mérésére a természetes szubsztrátján (glikogén), mind a foszforolízis, mind pedig a glikogén-lánchosszabbítás irányában, segédenzimek használata nélkül.

A szubsztrátspecificitás vizsgálatát és a reakciókörülmények kidolgozását, valamint optimalizálását követően ellenőriztem az új aktivitásmérési módszer helytállóságát két ismert GFb inhibitorral (GTH, koffein) kivitelezett gátlásvizsgálaton keresztül. Az ITC kísérletekben ugyanazon körülményeket alkalmaztam mindkét reakcióirányban, csupán a puffer G-1-P és szervesetlen foszfát koncentrációját változtattam. Az eredményeim, illetve azoknak a szakirodalmi adatokkal történő összevetése alapján elmondható, hogy az újonnan kidolgozott ITC módszer megfelelőnek bizonyult a GFb enzim aktivitásának mérésére. A katalizált reverzibilis reakció ellentétes irányú folyamataira kapott gátlási állandók közel azonosak voltak, főként a szubsztrátra nézve kompetitív GTH esetében. Az azonos reakciókörülmények alkalmazásával egy adott inhibitor gátlási paraméterei összevethetővé válnak, így meg tudjuk állapítani, hogy a vegyület a reverzibilis reakció melyik irányában képes hatékonyabban kifejteni gátló hatását. A gátlásvizsgálataim azt bizonyították, hogy a koffein és a GTH is a glikogénszintézis során tudja nagyobb mértékben csökkenteni a GF enzim katalitikus aktivitását. Az előbbi esetében a K_i értéke 1,92 mM volt a lánchosszabbítási folyamatban, ami közel fele a foszforolitikus reakciónál tapasztalt $K_i=4,05$ mM értéknek. A GTH szintézisirányú preferenciája kisebb mértékben nyilvánult meg: a glikogén-lánchosszabbítás során mért $K_i=11,5$ μ M a foszforolízis lejátszódásakor 13,8 μ M volt.

Egy megfelelő aktivitásmérési módszer kidolgozása azonban önmagában nem elegendő; alapos körültekintéssel kell megválasztani a gátlásvizsgálatokhoz alkalmazni kívánt inhibitorokat, illetve a kísérletek eredményeit is számos szempont figyelembe vételével kell értékelni. Például, a doktori munkám során is vizsgált tanninoknak újabb és újabb terápiás hatásáról számolnak be annak ellenére, hogy korábban már feltételezték e vegyületcsalád fehérjeaggregálódást kiváltó gátló mechanizmusát.

Habár az inhibitor-promiszkuitás a gyógyszertervezés és fejlesztés szempontjából nagy lehetőséget rejt (már ismert gyógyszerek más célú felhasználása, komplex tünetegyüttessel járó

betegségek monoterápiás kezelése, stb.), a gyógyszeripar mégis elzárkózik az ilyen típusú vegyületek használatától. A promiszkuitás háttérében ugyanis a legtöbb esetben aggregátumképződés áll, ami specificitás nélkül képes egymástól rendkívül eltérő enzimeket gátolni. Ezen instabil, reakciókörülményekkel szemben meglehetősen érzékeny kolloidméretű aggregátumok hatásának *in vivo* szabályozása viszont nehezen megvalósítható, ami növeli az adott gyógyszer mellékhatásainak kockázatát. Doktori értekezésemben kilenc inhibitor promiszkuis jellegét és aggregációra való hajlamát vizsgáltam közvetett és közvetlen stratégiák szerint. A kilenc vegyület közül ötről bizonyosodott be a nemspecifikus, aggregációalapú gátló hatás, és csak négy esetben eredményezte más jelenség a promiszkuitást. A kísérleteimhez negatív kontrollként használt akarbóz – a vártaknak megfelelően – a reakciókörülmények változtatása után (detergens és enzim-inhibitor előinkubálás alkalmazása, enzimkoncentráció változtatása) is ugyanolyan mértékben csökkentette az enzimaktivitást, és DLS módszerrel sem tudtam kimutatni nanoméretű részecskéket. Három 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazék (**1**, **3** és **4**) is specifikusan tudta gátolni a PPA enzimet, hiszen az AAI-kal szembeni egyik követelménynek sem tettek eleget. Az akarbózzal ellentétben viszont e vegyületek pufferes oldatában átlagosan 160 nm méretű részecskéket detektáltam DLS-sel, bár tendenciaszerű növekedést nem lehetett megfigyelni a teljes mérési idő alatt. Következésképpen, az enyhe aggregáció ellenére is stabilak maradtak, és gátló aktivitásukat konstans módon tudták érvényesíteni a különféle változtatásokat követően is, ami miatt egy specifikus enzim-inhibitor kölcsönhatást feltételeztem. Ezen inhibitorok az aggregáció ellenére is hatékony antidiabetikumokként szolgálhatnak, ugyanúgy, mint a jelenleg is kereskedelmi forgalomban kapható gliburid hatóanyagú szulfonilurea készítmény, melyről szintén bebizonyították már a promiszkuis jellegét és a 300 nm méretű aggregátumok képzését. Vizsgálataimhoz pozitív kontrollként az aleppó tannint választottam, ugyanis e vegyület számos olyan szerkezeti egységet tartalmaz, mely hidrogénkötések (-OH csoportok) és/vagy hidrofób kölcsönhatások (II-II stacking az aromás gyűrűk között) révén lehetőséget biztosít a tanninmolekulák aggregációjára. Ahogy vártam, a reakciókörülmények változtatása után jelentős eltérést tapasztaltam a tannin gátló aktivitásában. Detergens jelenlétében és a PPA- koncentráció növelésének hatására a gátlás nagymértékben romlott, míg az ellenkező irányú változást figyeltem meg az enzim-inhibitor előinkubálást követően. A DLS módszerrel kimutatott több ezer nm méretű tanninrészecskék jelenléte és az inhibitor pufferes oldatának centrifugálása után tapasztalt gátlásjavulás egyaránt alátámasztotta az aggregációalapú gátlást. Kísérleteim során tehát bebizonyítottam a gallotanninok nemspecifikus gátló hatását, továbbá azt, hogy ez a természetes eredetű inhibitor nem az enzim aggregálása, hanem az egyedi tanninmolekulák által alkotott nagyméretű

aggregátum adszorpciós mechanizmusa révén éri el a különféle enzimek aktivitásának csökkenését. Az időfüggő gátlást, a detergenssel, enzimkoncentrációval és centrifugálással szembeni érzékenységet, valamint a többszáz nm méretű részecskék jelenlétét négy 2-tioxo-4-tiazolidinonszármazéknál (**2**, **5**, **6** és **7**) is megfigyeltem. Habár e négy vegyület szerkezete nagy hasonlóságot mutatott, a szubsztituáltság mértéke és jellege nagy hatást gyakorolt az aggregátumképződés módjára. A **2**-es és **5**-ös származék esetében az egyedi inhibitormolekulák aggregálódtak, a **6**-os vegyület az enzim aggregációját váltotta ki, míg a **7**-es inhibitornál mindkét előbb leírt folyamat érvényesült.

E kísérletek alapján több következtetést is le tudtam vonni. Egyrészt az új antidiabetikumok utáni kutatás során mindenképpen érdemes megvizsgálni a választott inhibitor szerkezetét a gátlásvizsgálatokat megelőzően, mert az alapján előzetesen meg lehet becsülni a gátló mechanizmusuk specifikusságát. Másrészt arra is fény derült, hogy az alapvázhoz kapcsolt szubsztituensek jellege és pozíciója jelentősen befolyásolja az egyes vegyületek aggregációra való hajlamát, illetve az aggregátum gátlásban való részvételének módját (inhibitormolekula-aggregáció vagy fehérjeaggregáció). Továbbá megállapítottam, hogy a hidrofóbitás mértékének számító $\log P$ értékből nem lehet pontosan megjósolni egy inhibitor aggregálódásra való hajlamát. Habár az *Aggregator Advisor* szoftver által megbecsült $\log P$ értelmében a hét tiazolidinonszármazék közül csak egy esetben állt fent az aggregálódás esélye, a másik hatnál is kimutattam kisebb-nagyobb mértékű aggregációt annak ellenére, hogy valamelyik vegyület negatív $\log P$ -vel rendelkezett, vagyis csak csekély mértékben volt hidrofób.

A későbbiek során különféle szerkezetvizsgáló módszerek (pl. NMR, TEM, MS) segítségével lehetne meggyőződni arról, hogy az aggregátumok kialakulásának és az enzim-inhibitor kötődés módjára vonatkozó, illetve az egyes szubsztituensek aggregációra kifejtett hatásáról tett megállapításaim helyesek-e.

7. Summary

Recently, type 2 diabetes mellitus (T2DM) can be considered as one of the most common and dangerous diseases of civilization. Last year, approximately 4.2 million of adults lost their lives as a consequence of diabetes and its complications (e.g. nephropathy, neuropathy, cardiovascular disease, etc.). Despite the fact that various methods have already been developed for the treatment of T2DM (insulin therapy, monotherapy, combination therapy), the mortality rate for this complex metabolic disorder remains high. Resistance to some antidiabetic agents or serious side effects evoked by pharmaceuticals have motivated more and more research groups to work out new and more effective alternative therapies. In the last couple of years, the inhibition of glycoenzymes, involving in particular α -amylase, α -glycosidase, glycogen phosphorylase, has come into prominence. However, the development of a new drug is a time-consuming and costly process, which can fail in any stages of research, even during final clinical trials. Therefore, *in vitro* studies are getting play an increasing role in R&D. If, for instance, a potential inhibitor is found to be ineffective and/or act *via* non-specific mechanism under optimized and controlled conditions, its sufficiency as drug candidate will be questionable. Accordingly, the application of an adequate method for activity measurement as well as the correct deductions drawn from the results of kinetic and inhibition assays are of great relevance. I dealt with these two key points related to the study of glycoenzyme-inhibitors in my doctoral thesis. In my work, I developed a new method for the determination of glycogen phosphorylase activity that enzyme catalyses the release of glucose from glycogen stores. Furthermore, by means of some thiazolidinone derivatives, I investigated the phenomenon of aggregation-based inhibition, which is the most frequent molecular mechanism underlying inhibitor-promiscuity. I applied isothermal titration calorimetry (ITC) to develop the new method feasible for following the reversible process catalysed by glycogen phosphorylase under identical reaction conditions. ITC can be regarded as a promising and effective analytical tool for the study of enzyme kinetics as there is no need for providing substrates with chromophore, fluorophore or radioactive groups, and the use of coupled enzyme assays can also be avoided. A further advantageous property of ITC is that experimental dQ/dt value is the direct measure of reaction rate, in contrast to discontinuous methods for enzyme activity measurement, where reaction rate needs to be determined on the basis of a concentration-time relationship. Traditional ITC techniques used for enzyme kinetic assays (e.g. single or multiple injection mode) are not convenient to study reversible enzyme reactions since generated products can take part in the reverse reaction as substrates. In this case, instead of the complete conversion of substrate,

which would indicate the end of a single injection ITC method, an equilibrium mixture forms, in which forward and reverse reactions take place with identical rates. This can be one of the reasons for applying ITC mainly for the examination of hydrolase enzymes, where the reverse process is negligible due to the presence of large quantity of water. I applied rabbit muscle glycogen phosphorylase as a sugar-phosphorylase model enzyme to work out the reaction conditions feasible for the measurement of glycogen phosphorylase activity in the directions of both the elongation and the degradation of glycogen chain without the use of additional enzymes.

Following the investigation of substrate specificity, the development of reaction conditions, and the optimization process, I verified the accuracy of the activity assay by carrying out inhibition measurements using two well-known glycogen phosphorylase inhibitors (GTH, caffeine). For the ITC experiments, I applied identical reaction conditions in both directions, only the glucose-1-phosphate as well as inorganic phosphate content of buffer was modified. My results and their comparison with literature data demonstrate that this newly developed ITC method is convenient to the measurement of glycogen phosphorylase activity. Inhibition constants resulted from the opposite directions of the reversible reaction were near identical, particularly for GTH inhibitor competing with substrate. Applying the same reaction conditions, the inhibition parameters of a certain inhibitor can be compared, allowing us to establish the direction of reaction where the compound is able to represent higher inhibitory activity. My inhibition assays proved that both caffeine and GTH were able to lower the catalytic activity of glycogen phosphorylase enzyme during glycogen synthesis to a greater extent. For caffeine, K_i was 1.92 mM in the direction of chain elongation that value was about 50% smaller than $K_i=4.05$ mM obtained from the phosphorolytic reaction. GTH showed smaller preference towards glycogen synthesis; $K_i=11.5$ μ M measured in the chain lengthening process became $K_i=13.8$ μ M when the opposite reaction took place.

Nevertheless, an adequate activity assay is not sufficient in itself; the selection of inhibitors to be applied for the inhibition assays requires a great deal of foresight, and experimental results should be evaluated considering several aspects. For instance, the increasingly new therapeutic effects of gallotannins are still reported in literature, despite the fact that they were previously supposed to exert their inhibitory activity *via* inducing the aggregation of enzyme molecules. Although inhibitor-promiscuity may provide great opportunities for drug design and development (new potential uses of already known drugs, monotherapy for complex diseases, etc.), pharmaceutical industry still refuses to apply such compounds. The reason for this is that

promiscuity is mainly triggered by the formation of aggregates, which can inhibit markedly different enzymes without any sort of specificity. Since these colloidal aggregates are unstable and considerably sensitive to reaction conditions, the *in vivo* regulation of their therapeutic effect is difficult to achieve, which may contribute to the higher risk of side effects. In my doctoral thesis, I investigated the promiscuous nature as well as the aggregation-tendency of nine inhibitors using direct and indirect strategies. As expected, acarbose, which was applied as a negative control for my experiments, lowered enzyme activity to the same extent after the modification of reaction conditions (use of a detergent, enzyme-inhibitor pre-incubation, and diverse enzyme concentrations), in addition, I was not able to detect any nanoparticles by dynamic light scattering (DLS). Three of the seven 2-thioxo-4-thiazolidinone derivatives (**1**, **3**, and **4**) were also able to specifically inhibit PPA; they did not fulfilled any of the requirements for aggregation-based inhibitors. In contrast with acarbose, particles of averagely 160 nm size were detected here by DLS, however, tendentious increase could not be observed during the whole measurement time. Consequently, despite slight aggregation, these compounds remained stable, and they exerted their inhibitory activity in a constant manner even after the various changes in reaction conditions. Therefore, I assumed the occurrence of a specific enzyme-inhibitor interaction. Even though these thiazolidinones can be considered as weak aggregators, they could serve as effective antidiabetic agents as Glibenclamide (also called Glyburide), a currently available sulfonylurea drug, which was already proved to be promiscuous and form particles of 300 nm. Aleppo tannin was utilized as a positive control for my experiments since this compound contains several structural motifs that provide the opportunity for the aggregation of tannin molecules *via* the formation of hydrogen bonds (with the participation of –OH groups) and/or hydrophobic interactions (Π - Π stacking between aromatic rings). As expected, following the modification of reaction conditions, I experienced a notably change in the inhibitory activity of tannins. The presence of detergent and the increase in PPA concentration gave rise to a large-scale deterioration of inhibition, whereas enzyme-inhibitor pre-incubation led to the opposite change. Both the presence of tannin particles with thousands of nm size detected by DLS and the improvement of inhibition as a result of centrifugation confirmed aggregation-based inhibitory mechanism. Accordingly, I demonstrated the non-specific inhibitory effect of tannins as well as the fact that this naturally occurring inhibitor lowers the activity of different enzymes not by inducing protein aggregation but by the adsorption mechanism of large aggregates formed from discrete tannin molecules. I observed the time-dependent inhibition, the sensitivity to detergent, to enzyme concentration, and to centrifugation, furthermore the presence of particles with hundreds of nm size for four 2-thioxo-

4-thiazolidinone derivatives (**2**, **5**, **6**, and **7**) as well. Although the structure of these compounds showed a great similarity, the nature and the extent of substitution had significant effect on the mode of aggregation. In the case of derivatives **2** and **5**, discrete inhibitor molecules were involved in aggregation, compound **6** led to the association of enzyme molecules, whereas inhibitor **7** acted *via* both aforementioned mechanisms.

Based on these experiments, I was able to draw more conclusions. First, during the search for new antidiabetic agents, it would be particularly useful to examine the structure of the selected inhibitor prior to carrying out inhibition assays since this could provide us for important information about the specificity of its inhibitory mechanism. Secondly, I established that the nature as well as the position of substituents linked to a scaffold remarkably affect the aggregation-tendency of compounds and the way aggregates take part in inhibition (inhibitor or protein aggregation). Thirdly, I also concluded that *logP* value referring to the extent of hydrophobicity is not sufficient in itself to predict the aggregation-propensity of an inhibitor. Leaning on *logPs* calculated by *Aggregation Advisor* software, I assumed the occurrence of aggregation for only a single compound (derivative **7**). However, the remaining six derivatives also aggregated to a greater or lesser extent, in spite of the fact that some of these compounds were only slightly hydrophobic as they had negative *logP* values.

Later, the correctness of my findings related to the mode of aggregate formation, the manner of enzyme-inhibitor binding, and the effect of the substituents on aggregation should be verified using various methods of structural analysis (e.g. NMR, TEM, MS).

8. Irodalomjegyzék

1. IDF Diabets Atlas. 9. kiadás. International Diabetes Federation (IDF). Elérhető: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/159-idf-diabetes-atlas-ninth-edition-2019.html>. Közzététel: 2019. július.
2. Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*. 2001; 414: 821-827.
3. Shahidpour S, Panahi F, Yousefi R, Nourisefat M. Design and synthesis of new antidiabetic α -glucosidase and α -amylase inhibitors based on pyrimidine-fused heterocycles. *Medicinal Chemistry Research*. 2015; 24: 3086-3096.
4. Somsák L, Tóth M, Czifrák K. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential anti-diabetic agents. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15: 2933-2983.
- 5. Reuser AJJ, Wisselaar HA. An evaluation of the potential side-effects of α -glucosidase inhibitors used for the management of diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*. 1994; 3: 19-24.
6. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine*. 1998; 15: 539-553.
7. Ubaid M, Arif M, Usmani A, Anayatullah Khan N, Dash PP, Mishra A. An insight to diabetes mellitus and its complications. *Advances in Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2019; 2: 37-46.
8. Fonyó A, Ligeti E. Az orvosi élettan tankönyve. 4. kiadás. Medicina Kiadó Zrt. Budapest. 2008. 453-458.
9. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*. 2015; 6: 850-867.
10. Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*. 2009; 204: 1-11.
11. Vlad I, Oieru DS, Popa AR, Zaharia M. Long Term Complications of Diabetes – A Review. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*. 2014; 21: 344-355.
12. Guiding principles for the care of people with or at risk for diabetes. National Diabetes Education Program (NDEP). Elérhető: <http://www.niddk.nih.gov>. Közzététel: 2016. január.
13. Grundy SM. Diet therapy in diabetes mellitus: is there a single best diet? *Diabetes Care*. 1991; 14: 796-821.
14. Wing RR. Use of very low-calorie diet in the treatment of obese persons with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of the American Dietetic Association*. 1995; 95: 569-572.
15. Helmrigh SP, Ragland DR, Paffenberger RS. Prevention of non-insulin diabetes mellitus with physical activity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 1994; 26: 824-850.
16. Erisonn J, Taimola S, Eriksson K, Parviainen S, Peltonen J, Kujula U. Resistance training in the treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus. *International Journal of Sports Medicine*. 1997; 18: 242-246.
17. Mahler RJ, Adler ML. Type 2 Diabetes Mellitus: Update on Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999; 84: 1165-1171.
18. Rendell MS, Kirchain WR. Pharmacotherapy of Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Pharmacotherapy*. 2000; 34: 878-895.

19. Loubatieres A. The mechanism of action of the hypoglycemic sulfonamides: a concept based on investigations in animals and human beings. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1957; 71: 192-206.
20. Philipson LH, Steiner DF. Pas de deux or more: the sulphonylurea receptor and K1 channels. *Science*. 1995; 268: 372-373.
21. Harrower AD. Comparison of efficacy, secondary failure rate, and complications of sulphonylureas. *Journal of Diabetes and its Complications*. 1994; 8: 201-203.
22. Mahler RJ. Metformin: actions and indications for use in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Endocrine Practice*. 1995; 1: 418-422.
23. Wu MS, Johnston P, Sheu WHH, Hollenbeck CB, Jeng CY, Goldfine ID, Chen YD, Reaven GM. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1990; 13: 1-8.
24. Davidson MB, Peters AL. An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*. 1997; 102: 99-110.
25. Antonucci T, Whitcomb R, McLain R, Lockwood D. Impaired glucose tolerance is normalized by treatment with the thiazolidinedione troglitazone. *Diabetes Care*. 1997; 20: 188-193.
26. Lehman JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome-proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 12953-12956.
27. Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1999; 10: 9-13.
28. Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 1996; 45: 1661-1669.
29. Mayall SJ, Banerjee AK. The evolution of therapeutic risk management. *Therapeutic Risk Management of Medicines*. 2014; 1: 25-59.
30. Kalra S, Shukla R. Pioglitazone: Indian perspective. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011; 15: 294-297.
31. Dwivedi J, Devi K, Asmat Y, Jain S, Sharma S. Synthesis, characterization, antibacterial and antiepileptic studies of some novel thiazolidinone derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2016; 20: S16-S20.
32. Vigorita MG, Ottana R, Monforte F, Maccari R, Trovato A, Monforte MT, Taviano MF. Synthesis and anti-inflammatory, analgesic activity of 3, 3'-(1-2-Ethanediy)-bis [2-aryl-4-thiazolidinone] chiral compounds part 10. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2001; 11: 2791-2794.
33. Singh B, Maheshwari A, Dak G, Sharma K, Talesara GL. Studies of antimicrobial activities of some 4-thiazolidinone fused pyrimidines, [1,5]-benzodiazepines and their oxygen substituted hydroxylamine derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 72: 607-612.
34. Chadha N, Bahia MS, Kaur M, Silakari O. Thiazolidine-2,4-dione derivatives, programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2015; 23: 2953-2974.
35. Chaudhary M, Parmar SS, Chaudhary SK, Chaturvedi AK, Sastry BVR. CNS depressant activity of pyrimidylthiazolidones and their selective inhibition of NAD-dependent pyruvate oxidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1976; 65: 443-446.
36. Sharath Kumar KS, Hanumappa A, Vetrivel M, Hegde M, Girish YR, Byregowda TR, Rao S, Raghavan SC, Rangappa, KS. Antiproliferative and tumor inhibitory studies of 2,3 disubstituted 4-thiazolidinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015; 25: 3616-3620.

37. Sucheta TS, Verma P K. Biological potential of thiazolidinedione derivatives of synthetic origin. *Chemistry Central Journal*. 2017; 11: 1-29.
38. Ragab FA, Eid NM, el-Tawab HA. Synthesis and anticonvulsant activity of new thiazolidinone and thioxoimidazolidinone derivatives derived from furochromones. *Die Pharmazie*. 1997; 52: 926-929.
39. Diurno MV, Mazzoni O, Piscopo E, Calignano A, Giordano F, Bolognese A. Synthesis and antihistaminic activity of some thiazolidin-4-ones. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1992; 35: 2910-2912.
40. Prashantha Kumar BR, Nanjan MJ. Comparative molecular similarity indices analysis for predicting the antihyperglycemic activity of thio-glitazones. *Medicinal Chemistry Research*. 2010; 19: 1000-1010.
41. Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorganic Chemistry*. 2018; 77: 548-567.
42. Lee BW, Kim JH, Ko SH, Hur KY, Kim NH, Rhee SY. Insulin therapy for adult patients with type 2 diabetes mellitus: a position statement of the Korean Diabetes Association, 2017. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2017; 41: 367-373.
43. Jansen HJ, Vervoort GM, de Haan AF, Netten PM, de Grauw WJ, Tack CJ. Diabetes-related distress, insulin dose, and age contribute to insulin-associated weight gain in patients with type 2 diabetes: results of a prospective study. *Diabetes Care*. 2014; 37: 2710-2717.
44. Burge MR, Schade DS. Insulins. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1997; 26: 575-598.
45. Gyires K, Fürst Zs. *A farmakológia alapjai*. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest. 2011. 866-886.
46. Holleman F, Hoekstra JBL. Insulin Lispro. *New England Journal of Medicine*. 1997; 337: 176-183.
47. Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR. [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin: a rapidly absorbed analogue of human insulin. *Diabetes*. 1994; 43: 396-402.
48. Dagogo-Jack S, Santiago JV. Pathophysiology of type 2 diabetes and modes of action of therapeutic interventions. *Archives of Internal Medicine*. 1997; 157: 1802-1817.
49. Després JP, Lamarche B, Mauriège P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, Lupien, PJ. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *New England Journal of Medicine*. 1996; 334: 952-958.
50. DeFronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*. 1999; 131: 281-303.
51. Charpentier G. Oral combination therapy for type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2002; 18: S70-S76.
52. Cahn A, Cefalu WT. Clinical considerations for use of initial combination therapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2016; 39: S137-S145.
53. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: A patient-centered approach: Update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the study of diabetes. *Diabetes Care*. 2014; 38: 140-149.
54. Scheen AJ, Lefèbvre PJ. Antihyperglycaemic agents drug interactions of clinical importance. *Drug Safety*. 1995; 12: 32-45.
55. Alam F, Shafique Z, Amjad ST, Bin Asad MHH. Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review. *Phytotherapy Research*. 2018; 33: 1-14.
56. Bedford MR, Cowieson AJ. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Animal Feed Science and Technology*. 2012; 173: 76-85.

57. Lombard V, Golaconda RH, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*. 2014; 42: D490-D495.
58. Sundarram A, and Thirupathihalli PKM. α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2014; 2: 166-175.
59. CAZypedia Consortium. Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*. 2018; 28: 3-8.
60. Kuriki T, Imanaka T. The concept of the α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999; 87: 557-565.
61. Ferey-Roux G, Perrier J, Forest E, Marchis-Mouren G, Puigserver A, Santimone M. The human pancreatic alpha-amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; 1388: 10-20.
62. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, Yu YK. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal*. 2005; 272: 5101-5109.
63. Sudha P, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011; 11: 1-10.
64. Ponnusamy S, Haldar S, Mulani F, Zinjarde S, Thulasiram H, RaviKumar A. Gedunin and Azadiradione: Human pancreatic alpha-amylase inhibiting limonoids from neem (*azadirachta indica*) as anti-diabetic agents. *PLOS ONE*. 2015; 10: e0140113.
65. Xiao Z, Storms R, Tsang A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*. 2006; 351: 146-148.
66. Lehoczki G, Kandra L, Gyémánt G. The use of starch azure for measurement of alpha-amylase activity. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 183: 263-266.
67. Tran PL, Lee JS, Park KH. Experimental evidence for a 9-binding subsite of *Bacillus licheniformis* thermostable α -amylase. *FEBS Letters*. 2014; 588: 620-624.
68. Mótóyán JA, Fazekas E, Mori H, Svensson B, Bagossi P, Kandra L, Gyémánt G. Transglycosylation by barley α -amylase 1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011; 72: 229-237.
69. Xu Y, Zhang Z, Li L, Joshi MK, Huang N, Niu J, Lu Y. Catechins play key role in green tea extract-induced postprandial hypoglycemic potential *in vitro*. *European Food Research and Technology*. 2013; 237: 89-99.
70. Lorentz K, Gütschow B, Renner F. Evaluation of a Direct α -amylase assay using 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotrioxide. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1999; 37: 1053-1062.
71. Henkel E, Morich S, Henkel R. 2-Chloro-4-nitrophenyl- β -D-maltoheptaoside: A new substrate for the determination of α -amylase in serum and urine. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*. 1984; 22: 489-495.
72. Farkas E, Jánossy L, Harangi J, Lipták A. Synthesis of chromogenic substrates of α -amylases on a cyclodextrin basis. *Carbohydrate Research*. 1997; 303: 407-415.
73. Kandra L, Gyémánt G, Pál M, Petró M, Remenyik J, Lipták A. Chemoenzymatic synthesis of 2-chloro-4-nitrophenyl β -maltoheptaoside acceptor-products using glycogen phosphorylase b. *Carbohydrate Research*. 2001; 333: 129-136.
74. Manaharan T, Appleton D, Cheng HM, Palanisamy UD. Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents. *Food Chemistry*. 2012; 132: 1802-1807.
75. Morishita Y, Iinuma Y, Nakashima N, Majima K, Mizuguchi K, Kawamura Y. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside. *Clinical Chemistry*. 2000; 46: 928-933.

76. Foo A, Brosalki S. Measurement of plasma amylase activity. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1986; 23: 624-637.
77. Kapustka LA, Annala AE, Swanson WC. The peroxidase-glucose oxidase system: A new method to determine glucose liberated by carbohydrate degrading soil enzymes. *Plant and Soil*. 1981; 63: 487-490.
78. Agarwal P, Gupta R. Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. *Research and Reviews Journal of Medical and Health Sciences*. 2016; 5: 1-8.
79. Caspary WF, Graf S. Inhibition of human intestinal α -glucoside hydrolases by a new complex oligosaccharide. *Research in Experimental Medicine*. 1979; 175: 1-6.
80. Dolečková-Marešová L, Pavlík M, Horn M, Mareš M. *De Novo* design of α -amylase inhibitor: a small linear mimetic of macromolecular proteinaceous ligands. *Chemistry & Biology*. 2005; 12: 1349-1357.
81. Kato E, Chikahisa F, Kawabata J. Synthesis and study of the pancreatic α -amylase inhibitory activity of methyl acarviosin and its derivatives. *Tetrahedron Letters*. 2016; 57: 1365-1367.
82. Shahidpour S, Panahi F, Yousefi R, Nourisefat M, Nabipoor M, Khalafi-Nezhad A. Design and synthesis of new antidiabetic α -glucosidase and α -amylase inhibitors based on pyrimidine-fused heterocycles. *Medicinal Chemistry Research*. 2015; 24: 3086-3096.
83. Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, Magalhães PO, Silveira D. α -Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2012; 15: 141-183.
84. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 51: 3555-3561.
85. Kandra L, Gyémánt G, Zajác Á, Batta G. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 319: 1265-1271.
86. Homoki J, Nemes A, Fazekas E, Gyémánt G, Balogh P, Gál F, Mortier J, Wolber G, Babinszky L, Gálné Remenyik J. Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and alpha-amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.). *Food Chemistry*. 2016; 194: 222-229.
87. Khanbabaee K, Ree T. Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*. 2001; 18: 641-649.
88. Naumoff DG. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochemistry (Moscow)*. 2011; 76: 622-635.
89. Del Moral S, Barradas-Dermitz DM, Aguilar-Uscanga MG. Production and biochemical characterization of α -glucosidase from *Aspergillus niger* ITV-01 isolated from sugar cane bagasse. *3 Biotech*. 2018; 8: 7.
90. Krasikov VV, Karelov DV, Firsov LM. Alpha-glucosidases. *Biochemistry (Moscow)*. 2001; 66: 267-281.
91. Rye CS, Withers SG. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2000; 4: 573-580.
92. Chiba S. Molecular Mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1997; 61: 1233-1239.
93. Sim L, Quezada-Calvillo R, Sterchi EE, Nichols BL, Rose DR. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *Journal of Molecular Biology*. 2008; 375: 782-792.
94. Roig-Zamboni V, Cobucci-Ponzano B, Iacono R, Ferrara MC, Germany S, Bourne Y, Parenti G, Moracci M, Sulzenbacher G. Structure of human lysosomal acid α -

- glucosidase—a guide for the treatment of Pompe disease. *Nature Communications*. 2017; 8: 1-10.
95. Holst JJ, Gribble F, Horowitz M, Rayner CK. Roles of the gut in glucose homeostasis. *Diabetes Care*. 2016; 39: 884-892.
96. Wong JMW, Jenkins DJA. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137: 2539S-2546S.
97. Southgate DA. Digestion and metabolism of sugars. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1995; 62: 203S-210S.
98. Kochmann G, Kochmann R, Pape W, Blank M, Baumann K. Selective determination of the activities of neutral and acid α -glucosidase using discontinuous assays. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1983; 21: 503-509.
99. Matsui T, Yoshimoto C, Osajima K, Oki, T, Osajima Y. *In vitro* survey of α -glucosidase inhibitory food components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1996; 60: 2019-2022.
100. Granados-Guzmán G, Castro-Rios R, Waksman de Torres N, Salazar Aranda R. Optimization and validation of a microscale *in vitro* method to assess α -glucosidase inhibition activity. *Current Analytical Chemistry*. 2018; 14: 458-464.
101. Scheen AJ. Is there a role for α -glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus? *Drugs*. 2003; 63: 933-951.
102. Perfetti R, Barnett PS, Mathur R, Egan JM. Novel therapeutic strategies for the treatment of Type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Reviews*. 1998; 14: 207-225.
103. Truscheit E, Frommer W, Junge B, Müller L, Schmidt DD, Wingender W. Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1981; 20: 744-761.
104. Kim MJ, Lee SB, Lee HS, Lee SY, Baek JS, Kim D, Moon TW, Robyt JF, Park KH. Comparative study of the inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and cyclomaltodextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine–glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1999; 371: 277-283.
105. Agu KC, Eluehike N, Ofeimun RO, Abile D, Ideho G, Ogedengbe MO, Elekofehinti OO. Possible anti-diabetic potentials of *Annona muricata* (soursop): inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities. *Clinical Phytoscience*. 2019; 5: 1-13.
106. Breitmeier D, Günther S, Heymann H. Acarbose and 1-deoxynojirimycin inhibit maltose and maltooligosaccharide hydrolysis of human small intestinal glucoamylase–maltase in two different substrate-induced modes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997; 346: 7-14.
107. Mosi R, Sham H, Uitdehaag JCM, Ruiterkamp R, Dijkstra BW, Withers SG. Reassessment of acarbose as a transition state analogue inhibitor of cyclodextrin glycosyltransferase. *Biochemistry*. 1998, 37: 17192-17198.
108. Newgard CB, Hwang PK, Fletterick RJ. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1989; 24: 69-99.
109. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5. kiadás. WH Freeman & Co Ltd. New York, USA. 579-583.
110. Klinov SV, Kurganov BI. Kinetic mechanism of activation of muscle glycogen phosphorylase b by adenosine 5'-monophosphate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994; 312: 14-21.
111. Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI. Pyridoxal 5"-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase b. *Biochemistry (Moscow)*. 2002; 67: 1089-1098.

112. Nadeau OW, Fontes JD, Carlson GM. The regulation of glycogenolysis in the brain. *Journal of Biological Chemistry*. 2018; 293: 7099-7107.
113. Fletterick RJ, Sprang SR. Glycogen phosphorylase structures and function. *Accounts of Chemical Research*. 1982; 15: 361-369.
114. Kyriakis E, Stravodimos GA, Kantsadi AL, Chatzileontiadou DSM, Skamnaki VT, Leonidas DD. Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. *FEBS Letters*. 2015; 589: 1787-1794.
115. McCormack J, Westergaard N, Kristiansen M, Brand C, Lau J. Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2001; 7: 1451-1474.
116. Browner MF, Fletterick RJ. Phosphorylase: a biological transducer. *Trends in Biochemical Sciences*. 1992; 17: 66-71.
117. Oikonomakos N. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Current Protein & Peptide Science*. 2002; 3: 561-586.
118. Elődi P. *Biokémia*. 3. kiadás. Akadémia Kiadó. Budapest. 1983. 407-450.
119. Ádám V, Dux L, Faragó A, Fésüs L, Machovich R, Mandl J, Sümegi B. *Orvosi biokémia*. Medicina Könyvkiadó Zrt. Budapest. 2001. 92-142.
120. Tanabe S, Kobayashi M, Matsuda K. Yeast glycogen phosphorylase: kinetic properties compared with muscle and potato enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1988; 52: 757-764.
121. Schreiber WE, Bowling S. An automated assay of glycogen phosphorylase in the direction of phosphorolysis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 1990; 27: 129-132.
122. Zea CJ, Pohl NL. Kinetic and substrate binding analysis of phosphorylase b via electrospray ionization mass spectrometry: a model for chemical proteomics of sugar phosphorylases. *Analytical Biochemistry*. 2004; 327: 107-113.
123. Alonso-Casajús N, Dauvillée D, Viale AM, Muñoz FJ, Baroja-Fernández E, Morán-Zorzano MT, Eydallin G, Ball S, Pozueta-Romero J. Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* Gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the non-reducing ends in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2006; 188: 5266-5272.
124. Nakamura M, Makino Y, Takagi C, Yamagaki T, Sato M. Probing the catalytic site of rabbit muscle glycogen phosphorylase using a series of specifically modified maltohexaose derivatives. *Glycoconjugate Journal*. 2017; 34: 563-574.
125. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*. 1925; 66: 375-400.
126. Gilboe DP, Larson KL, Nuttall FQ. Radioactive method for the assay of glycogen phosphorylases. *Analytical Biochemistry*. 1972; 47: 20-27.
127. Makino Y, Omichi K. Sensitive assay of glycogen phosphorylase activity by analysing the chain lengthening action on a fluorogenic maltooligosaccharide derivative. *Journal of Biochemistry*. 2009; 146: 71-76.
128. Watson KA, Mitchell EP, Johnson LN, Cruciani G, Son JC, Bichard CJ, Fleet GW, Oikonomakos NG, Kontou M, Zographos SE. Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 1995; 51: 458-472.
129. Gergely P. Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats. *Molecular Medicine Reports*. 2011; 477-481.
130. Somsák L, Bokor É, Czifrák K, Kónya B, Kun S, Tóth M. A glikogén foszforiláz glükózanalóg gátlószerei, mint potenciális antidiabetikumok. *Magyar Kémiai Folyóirat – Közlemények*. 2010; 116: 19-30.

131. Ekstrom JL, Pauly TA, Carty MD, Soeller WC, Culp J, Danley DE, Hoover DJ, Treadway JL, Gibbs EM, Fletterick RJ, Day YSN, Myszka DG, Rath, VL. Structure-activity analysis of the purine binding site of human liver glycogen phosphorylase. *Chemistry & Biology*. 2002; 9: 915-924.
132. Serrano FSJ, López JS, Martín LOG. Caffeine inhibition of glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle tissue. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1995; 27: 911-916.
133. Risman CA, David ES, Storey KB, Crerar MM. Glucose and caffeine regulation of liver glycogen phosphorylase activity in the freeze-tolerant wood frog *Rana sylvatica*. *Biochemistry and Cell Biology*. 1991; 69: 251-255.
134. Kasvinsky PJ, Fletterick RJ, Madsen NB. Regulation of the dephosphorylation of glycogen phosphorylase a and synthase b by glucose and caffeine in isolated hepatocytes. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1981; 59: 387-395.
135. Jez JM, Penning TM. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions*. 2001; 130: 499-525.
136. Wermuth B, Omar A, Forster A, di Francesco C, Wolf M, von Wartburg JP, Bullock B, Gabbay KH. Primary structure of aldehyde reductase from human liver. *Progress in Clinical & Biological Research*. 1987; 232: 297-307.
137. Urzhumtsev A, Tête-Favier F, Mitschler A, Barbanton J, Barth P, Urzhumtseva L, Biellmann JF, Podjarny AD, Moras D. A “specificity” pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure*. 1997; 5: 601-612.
138. Wilson DK, Tarle I, Petrash JM, Quioco FA. Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993; 90: 9847-9851.
139. Bander Jagt DL, Kolb NS, bander Jagt TJ, Chino J, Martinez FJ, Hunsaker LA, Royer RE. Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1995; 1249: 117-126.
140. Ehrig T, Bohren KM, Prendergast FG, Gabbay KH. Mechanism of aldose reductase inhibition: binding of NADP⁺/NADPH and alrestatin-like inhibitors. *Biochemistry*. 1994; 33: 7157-7165.
141. Dunlop M. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2000; 58: S3-S12.
142. Petrash JM. All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2004; 61: 737-749.
143. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1615-1625.
144. Ramasamy R, Goldberg IJ. Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circulation Research*. 2010; 106: 1449-1458.
145. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996; 19: 257-267.
146. Oates P. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Current Drug Targets*. 2008; 9: 14-36.
147. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*. 2004; 134: 489-92.
148. Matkovics B, Koncz C, Szabó L. Rapid and simple determination of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase. *Microchemical Journal*. 1977; 22: 65-69.

149. Witteveen CFB, Busink R, Van De Vondervoort P, Dijkema C, Swart K, Visser J. L-arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *Microbiology*. 1989; 135: 2163-2171.
150. Nishikawa M, Tsurumi Y, Murai H, Yoshida K, Okamoto M, Takase S, Tanaka H, Hirota H, Hashimoto M, Kohsaka M. WF-2421, a new aldose reductase inhibitor produced from a fungus, *Humicola grisea*. *The Journal of Antibiotics*. 1991; 44: 130-135.
151. Quehenberger J, Reichenbach T, Baumann N, Rettenbacher L, Divne C, Spadiut O. Kinetics and predicted structure of a novel xylose reductase from *Chaetomium thermophilum*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20: 185-202.
152. Kador PF, Kinoshita JH, Sharpless NE. Aldose reductase inhibitors: a potential new class of agents for the pharmacological control of certain diabetic complications. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1985; 28: 841-849.
153. Suzen S, Buyukbingol E. Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications. *Current Medicinal Chemistry*. 2003; 10: 1329-1352.
154. Hayman S, Kinoshita JH. Isolation and properties of lens aldose reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 1965; 240: 877-882.
155. Hotta N, Akanuma Y, Kawamori R, Matsuoka K, Oka Y, Shichiri M, Toyota T, Nakashima M, Yoshimura I, Sakamoto N, Shigeta Y, Shichiri M. Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy: the 3-year, multicenter, comparative aldose reductase inhibitor-diabetes complications trial. *Diabetes Care*. 2006; 29: 1538-1544.
156. Yamamoto T, Takakura S, Kawamura I, Seki J, Goto T. The effects of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on minimal F-wave latency and nerve blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 2001; 68: 1439-1448.
157. Inskeep PB, Reed AE, Ronfeld RA. Pharmacokinetics of zopolrestat, a carboxylic acid aldose reductase inhibitor, in normal and diabetic rats. *Pharmaceutical Research*. 1991; 8: 1511-1515.
158. Boland OM, Blackwell CC, Clarke BF, Ewing DJ. Effects of ponalrestat, an aldose reductase inhibitor, on neutrophil killing of *Escherichia coli* and autonomic function in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. 1993; 42: 336-340.
159. Asano T, Saito Y, Kawakami M, Yamada N. Fidarestat (SNK-860), a potent aldose reductase inhibitor, normalizes the elevated sorbitol accumulation in erythrocytes of diabetic patients. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2002; 16: 133-138.
160. Ottanà R, Maccari R, Ciurleo R, Paoli P, Jacomelli M, Manao G, Camici G, Laggner C, Langer T. 5-Arylidene-2-phenylimino-4-thiazolidinones as PTP1B and LMW-PTP inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009; 17: 1928-1937.
161. Maccari R, Paoli P, Ottanà R, Jacomelli M, Ciurleo R, Manao G, Steindl T, Langer T, Vigorita MG, Camici G. 5-Arylidene-2,4-thiazolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007; 15: 5137-5149.
162. Bruno G, Costantino L, Curinga C, Maccari R, Monforte F, Nicolo F, Ottana R, Vigorita MG. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2002; 10: 1077-1084.
163. Maccari R, Ottanà R. Targeting aldose reductase for the treatment of diabetes complications and inflammatory diseases: new insights and future directions. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 58: 2047-2067.
164. Alvarez JC. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2004; 8: 365-370.
165. Rishton GM. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discovery Today*. 2003; 8: 86-96.

166. Ajay WPW, Murcko MA. Can we learn to distinguish between “drug-like” and “non-drug-like” molecules? *Journal of Medicinal Chemistry*. 1988; 41: 3314-3324.
167. McGovern SL, Helfand BT, Feng B, Shoichet BK. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003; 46: 4265-4272.
168. Rishton GM. Reactive compounds and *in vitro* false positives in HTS. *Drug Discovery Today*. 1997; 2: 382-384.
169. Roche O, Schneider P, Zuegge J, Guba W, Kansy M, Alanine A, Bleicher K, Danel F, Gutknecht EM, Rogers-Evans M, Neidhart W, Stalder H, Dillon M, Sjögren E, Fotouhi N, Gillespie P, Goodnow R, Harris W, Jones P, Taniguchi M, Tsujii S, von der Saal, W, Zimmermann G, Schneider G. Development of a virtual screening method for identification of “frequent hitters” in compound libraries. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45: 137-142.
170. McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45: 1712-1722.
171. Mencher SK, Wang LG. Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue). *BMC Clinical Pharmacology*. 2005; 5: 1-7.
172. Feng BY, Simeonov A, Jadhav A, Babaoglu K, Inglese J, Shoichet BK, Austin CP. A High-throughput screen for aggregation-based inhibition in a large compound library. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007; 50: 2385-2390.
173. Coan KED, Maltby DA, Burlingame AL, Shoichet BK. Promiscuous aggregate-based inhibitors promote enzyme unfolding. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009; 52: 2067-2075.
174. Li X, Yu Z, Bian Z, Xu J, Zhang L, Qiao M. Physicochemical characterization of α -amylase as crosslinked enzyme aggregates. *Catalysts*. 2018; 8: 299.
175. Zbilut JP, Colosimo A, Conti F, Colafranceschi M, Manetti C, Valerio M, Webber CL, Giuliani A. Protein aggregation/folding: the role of deterministic singularities of sequence hydrophobicity as determined by nonlinear signal analysis of acylphosphatase and A β (1–40). *Biophysical Journal*. 2003; 85: 3544-3557.
176. Sink R, Gobec S, Pecar S, Zega A. False positives in the early stages of drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*. 2010; 17: 4231-4255.
177. Seidler J, McGovern SL, Doman TN, Shoichet BK. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003; 46: 4477-4486.
178. Sung JJ, Pardeshi NN, Mulder AM, Mulligan SK, Quispe J, On K, Carragher B, Potter CS, Carpenter JF, Schneemann A. Transmission electron microscopy as an orthogonal method to characterize protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 104: 750-759.
179. Irwin JJ, Duan D, Torosyan H, Doak AK, Ziebart KT, Sterling T, Shoichet BK. An Aggregation Advisor for ligand discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 58: 7076-7087.
180. Maggiora G, Vogt M, Stumpfe D, Bajorath J. Molecular similarity in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013; 57: 3186-3204.
181. Viviani L, Piccirillo E, Cheffer A, de Rezende L, Ulrich H, Carmona-Ribeiro A, Amaral A. Be aware of aggregators in the search for potential human ecto-5'-nucleotidase inhibitors. *Molecules*. 2018; 23: 1876.
182. Linke D. Guide to protein purification. 2. kiadás. Academic Press. Cambridge, USA. 2009. 603–617.
183. Ryan AJ, Gray NM, Lowe PN, Chung C. Effect of detergent on “promiscuous” inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003; 46: 3448-3451.

184. Coan KED, Shoichet BK. Stability and equilibria of promiscuous aggregates in high protein milieus. *Molecular BioSystems*. 2007; 3: 208-213.
185. Sipošova K, Kozar T, Musatov A. Interaction of nonionic detergents with the specific sites of lysozyme amyloidogenic region – inhibition of amyloid fibrillization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017; 150: 445-455.
186. Boulton S, Selvaratnam R, Ahmed R, Van K, Cheng X, Melacini G. Mechanisms of specific versus nonspecific interactions of aggregation-prone inhibitors and attenuators. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019; 62: 5063-5079.
187. Sassano MF, Doak AK, Roth BL, Shoichet BK. Colloidal aggregation causes inhibition of G protein-coupled receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013; 56: 2406-2414.
188. Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering (DLS). International Organization for Standardization (ISO) 22412:2008. Elérhető: <https://www.iso.org/standard/65410.html>. Közzététel: 2017. február.
189. Lorber B, Fischer F, Bailly M, Roy H, Kern D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2012; 40: 372-382.
190. Tomaszewska E, Soliwoda K, Kadziola K, Tkacz-Szczesna B, Celichowski G, Cichomski M, Grobelny J. Detection Limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids. *Journal of Nanomaterials*. 2013; 2013: 1-10.
191. Chartier M, Morency LP, Zylber MI, Najmanovich RJ. Large-scale detection of drug off-targets: hypotheses for drug repurposing and understanding side-effects. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2017; 18:1-16.
192. Samsdodd F. Target-based drug discovery: is something wrong? *Drug Discovery Today*. 2005; 10: 139-147.
193. Mei Y, Yang B. Rational application of drug promiscuity in medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry*. 2018; 10: 1835-1851.
194. Csermely P, Agoston V, Pongor S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005; 26: 178-182.
195. Korcsmáros T, Szalay MS, Böde C, Kovács IA, Csermely P. How to design multi-target drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2007; 2: 799-808.
196. Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands. an emerging drug discovery paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005; 48: 6523-6543.
197. Talevi A, Bellera CL. Challenges and opportunities with drug repurposing: finding strategies to find alternative uses of therapeutics. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2019; 15: 397-401.
198. Gilberg E, Gütschow M, Bajorath J. Promiscuous ligands from experimentally determined structures, binding conformations, and protein family-dependent interaction hotspots. *ACS Omega*. 2019; 4: 1729-1737.
199. Maccari R, Del Corso A, Paoli P, Adornato I, Lori G, Balestri F, Cappiello M, Naß A, Wolber G, Ottanà R. An investigation on 4-thiazolidinone derivatives as dual inhibitors of aldose reductase and protein tyrosine phosphatase 1B, in the search for potential agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018; 28: 3712-3720.
200. Maccari R, Vitale RM, Ottanà R, Rocchiccioli M, Marrazzo A, Cardile V, Graziano ACE, Amodeo P, Mura U, Del Corso A. Structure-activity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductase inhibitors and potential anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 81: 1-14.

201. Kaminskyy D, Kryshchyshyn A, Lesyk R. Recent developments with rhodanine as a scaffold for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2017; 12: 1233-1252.
202. Draczkowski P, Tomaszuk A, Halczuk P, Strzemski M, Matusiuk D, Jozwiak K. Determination of affinity and efficacy of acetylcholinesterase inhibitors using isothermal titration calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2015; 1860: 967-974.
203. Baumann MJ, Murphy L, Lei N, Krogh KBRM, Borch K, Westh P. Advantages of isothermal titration calorimetry for xylanase kinetics in comparison to chemical-reducing-end assays. *Analytical Biochemistry*. 2011; 410: 19-26.
204. Mateo PL, Barón C, Lopez-Mayorga O, Jimenez JS, Cortijo M. AMP and IMP binding to glycogen phosphorylase b. A calorimetric and equilibrium dialysis study. *Journal of Biological Chemistry*. 1984; 259: 9384-9389.
205. Assaf SA, Yunis AA. Physicochemical and catalytic properties of crystallized human muscle glycogen phosphorylase. *Annals of The New York Academy of Science*. 1973; 210: 139-152.
206. Ariki M, Fukui T. Inhibition of alpha-glucan phosphorylase by alpha-D-glucopyranosyl fluoride. *Journal of Biochemistry*. 1975; 78: 1191-1199.
207. Anderka O, Loenze P, Klabunde T, Dreyer MK, Defossa E, Wendt KU, Schmoll D. Thermodynamic characterization of allosteric glycogen phosphorylase inhibitors. *Biochemistry*. 2008; 47: 4683-4691.
208. Cecioni S, Argintaru OA, Docsa T, Gergely P, Praly JP, Vidal S. Probing multivalency for the inhibition of an enzyme: glycogen phosphorylase as a case study. *New Journal of Chemistry*. 2009; 33: 148-156.
209. Tanabe S, Kobayashi M, Matsuda K. Yeast glycogen phosphorylase: kinetic properties compared with muscle and potato enzymes. *Agricultural Biological Chemistry*. 1988; 52: 757-764.
210. Reed MC, Lieb A, Nijhout HF. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays*. 2010; 32: 422-429.
211. Somsak L, Nagy V, Hadady Z, Docsa T, Gergely P. Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Current Pharmaceutical Design*. 2003; 9: 1177-1189.
212. Freeman S, Bartlett JB, Convey G, Hardern JL, Teague JL, Loxham SJG, Allen JM, Poucher SM, Charles AD. Sensitivity of glycogen phosphorylase isoforms to indole site inhibitors is markedly dependent on the activation state of the enzyme. *British Journal of Pharmacology*. 2006; 149: 775-785.
213. Rath VL, Ammirati M, Danley DE, Ekstrom JL, Gibbs EM, Hynes TR, Mathiowetz AM, McPherson RK, Olson TV, Treadway JL, Hoover DJ. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chemistry & Biology*. 2000; 7: 677-682.
214. Oikonomakos NG, Skamnaki VT, Ósz E, Szilágyi L, Somsák L, Docsa T, Tóth B, Gergely P. Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase b. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2002; 10: 261-268.
215. Somsák L, Kovács L, Tóth M, Ósz E, Szilágyi L, Györgydeák Z, Dinya Z, Docsa T, Tóth B, Gergely P. Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of D-gluco- and D-xylopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins and N-(d-glucopyranosyl) amides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2001; 44: 2843-2848.
216. Cheng K, Liu J, Sun H, Xie J. Synthesis of glucoconjugates of oleanolic acid as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Chemistry & Biodiversity*. 2010; 7: 690-696.
217. Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. 3. kiadás. Wiley-VCH Inc. Weinheim, Németország. 2017. 195–221.

218. Yoon SH, Robyt JF. Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV-a-maltohexaosyl and 4IV-a-maltododecaosyl analogues. *Carbohydrate Research*. 2003; 338: 1969-1980.
219. Mukherjee A, Sengupta S. Characterization of nimbidiol as a potent intestinal disaccharidase and glucoamylase inhibitor present in *Azadirachta indica*(*neem*) useful for the treatment of diabetes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2012; 28: 900-910.
220. Bedekar A, Shah K, Koffas M. Natural products for type II diabetes treatment. *Advances in Applied Microbiology*. 2010; 71: 21-73.
221. Ren L, Cao X, Geng P, Bai F, Bai G. Study of the inhibition of two human maltase-glucoamylases catalytic domains by different α -glucosidase inhibitors. *Carbohydrate Research*. 2011; 346: 2688-2692.
222. Zajáč Á, Gyémánt Gy, Vittori N, Kandra L. Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition. *Carbohydrate Research*. 2007; 342: 717-723.
223. Savelyev N, Baykuzina P, Dokudovskaya S, Lavrik O, Rubtsova M, Dontsova O. Comprehensive analysis of telomerase inhibition by gallotannin. *Oncotarget*. 2018; 9: 18712-18719.
224. Aoki K, Nishimura K, Abe H, Maruta H, Sakagami H, Hatano T, Okuda T, Yoshida T, Tsai YJ, Uchiumi F, Tanuma SI. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993; 1158: 251-256.
225. Lee HH. Theaflavin-3,3'-digallate and penta-O-galloyl- β -D-glucose inhibit rat liver microsomal 5-reductase activity and the expression of androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 1109-1118.
226. Chen F, Tang Q, Ma H, Bian K, Seeram NP, Li D. Hydrolysable tannins are iron chelators that inhibit DNA repair enzyme ALKBH2. *Chemical Research in Toxicology*. 2019; 32, 1082-1086.
227. Mizushina Y, Zhang J, Pugliese A, Kim SH, Lü J. Anti-cancer gallotannin penta-O-galloyl-beta- D -glucose is a nanomolar inhibitor of select mammalian DNA polymerases. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 80, 1125-1132.
228. Ferreira RS, Simeonov A, Jadhav A, Eidam O, Mott BT, Keiser MJ, McKerrow JH, Maloney DJ, Irwin JJ, Shoichet BK. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53: 4891-4905.
229. Larson SB, Day JS, McPherson A. X-ray crystallographic analyses of pig pancreatic α -amylase with limit dextrin, oligosaccharide, and α -cyclodextrin. *Biochemistry*. 2010; 49: 3101-3115.
230. Tomašić T, Peterlin Mašič L. Rhodanine as a scaffold in drug discovery: a critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012; 7: 549-560.
231. Gao Y, Zhang X, Ma C, Li X, Jiang J. Morphology-controlled self-assembled nanostructures of 5,15-di[4-(5-acetylsulfanyl)pentyl]oxyphenyl]porphyrin derivatives. Effect of metal-ligand coordination bonding on tuning the intermolecular interaction. *Journal of the American Chemical Society*. 2008; 130: 17044-17052.
232. Liu HL, Chen WJ, Chou SN. Mechanisms of aggregation of alpha- and beta-amylases in aqueous dispersions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003; 28: 215-225.
233. Collins SR, Douglass A, Vale RD, Weissman JS. Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biology*. 2004; 2: e321.

234. Velasco-Lozano S, López-Gallego F, Mateos-Díaz J. C, Favela-Torres E. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. *Biocatalysis*. 2016; 1: 166-177.
235. Liu X, Zhu L, Tan J, Zhou X, Xiao L, Yang X, Wang B. Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa Ledeb*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 14: 1-10.
236. Winn-Deen ES, David H, Sigler G, Chavez R. Development of a direct assay for alpha-amylase. *Clinical Chemistry*. 1988; 34: 2005-2008.
237. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
238. Matsui M, Kakut M, Misaki A. Fine structural features of oyster glycogen: mode of multiple branching. *Carbohydrate Polymers*. 1996; 31: 227-235.
239. Somsák L, Nagy V, Hadady Z, Docsa T, Gergely P. Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Current Pharmaceutical Design*. 2003; 9: 1177-1189.
240. Todd MJ, Gomez J. Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity?. *Analytical Biochemistry*. 2001; 296:179-187.
241. Sonnad JR, Goudar CT. Solution of the Haldane equation for substrate inhibition enzyme kinetics using the decomposition method. *Mathematical and Computer Modelling*. 2004; 40: 573-582.
242. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 4. kiadás. John Wiley & Sons Inc. New Jersey, USA. 2011. 482-505.
243. Kuzmič P. History, variants and usage of the ‘Morrison equation’ in enzyme inhibition kinetics. 2015. Elérhető online: <http://www.biokin.com/publications/technotes/TN201501.html>

9. Tudományos munkásság

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Gábor Lehoczki, Kármén Szabó, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt: **Inhibition studies on α -amylase using isothermal titration calorimetry.**

Amylase, **2018**; 2: 11-16. DOI:10.1515/amylase-2018-0002

2. Kármén Szabó, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt: **Studies on the reversible enzyme reaction of rabbit muscle glycogen phosphorylase b using isothermal titration calorimetry.**

Carbohydrate Research, **2019**; 477: 58-65. DOI: 10.1016/j.carres.2019.03.014 (IF (2018): 1,873)

3. Kármén Szabó, Csaba Hámori, Gyöngyi Gyémánt: **Gallotannins are Non-Specific Inhibitors of α -Amylase: Aggregates are the Active Species taking part in Inhibition.**

Chemical Biology & Drug Design, **2020**. (IF (2018): 2,256)

További közlemények

1. Gábor Lehoczki, Kármén Szabó, István Takács, Lili Kandra, Gyöngyi Gyémánt: **Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase.**

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, **2016**; 6: 1648-1653. DOI:10.3109/14756366.2016.1161619 (IF (2018): 4,027)

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások

1. Lehoczki Gábor, Szabó Kármén, Takács István, Gyémánt Gyöngyi: **Gyors ITC módszer enzimreakciók vizsgálatához.**

Doctoral Workshop, 2015. október 10-11, Pécs

2. Szabó Kármén, Gyémánt Gyöngyi: **Új ITC aktivitásmérési módszer a glikogén foszforiláz katalizálta reverzibilis reakció követésére.**

Professzorok az Európai Magyarországiért Egyesület által szervezett XVII. PhD-Konferencia, 2018. november 15, Budapest

3. Szabó Kármén, Hámori Csaba, Gyémánt Gyöngyi: **Új ITC-alapú módszer kidolgozása a glikogén foszforiláz enzim aktivitásának méréséhez.**

I. FKF Szimpózium, 2019. április 3-5, Debrecen

4. Szabó Kármén, Gyémánt Gyöngyi: **Potenciális glikoenzim-inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata.**

XXII. Tavaszi Szél Konferencia, 2019. május 3-5, Debrecen

(Kémiai és környezettudományi szekció, Biokémia és orvosi kémia alszekció I. helyezés)

Az értekezés témájához kapcsolódó posztetek

1. Erika Fazekas, Gabriella Kis, Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt: **New method for the activity measurement of glycogen phosphorylase b.**

13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis (ISSSB), 2013. június 27-július 7, Debrecen

2. Kármén Szabó, Csaba Hámori, Gyöngyi Gyémánt: **Activity and inhibition studies on rabbit muscle glycogen phosphorylase b using isothermal titration calorimetry.**

5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 2018. szeptember 6-7, Ljubljana, Szlovénia

3. Ilenia Adornato, Kármén Szabó, Jérémie Mortier, Gerhard Wolber, Rosaria Ottanà, Rosanna Maccari: **Evaluation of 4-thiazolidinone derivatives as alpha-amylase inhibitors.**

5th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 2018. szeptember 6-7, Ljubljana, Szlovénia

4. Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt: **Study on the aggregation tendency of known glycoenzyme inhibitors.**

13th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 2019. május 19-22, Toulouse, Franciaország

5. Kármén Szabó, Csaba Hámori, Gyöngyi Gyémánt: **Study on the Aggregation Tendency of Tannins - or are Tannins Specific α - Amylase Inhibitors?**

7th Symposium on the Alpha-Amylase Family (ALAMY_7), 2019. szeptember 29-október 3, Smolenice, Szlovákia

6. Kármén Szabó, Gyöngyi Gyémánt: **Study on the promiscuous nature and aggregation-tendency of 4-thiazolidinone derivatives.**

21st International Conference and Exhibition on Pharmaceuticals & Novel Drug Delivery Systems, 2020. március 11-12, Róma, Olaszország

ISBN-számmal rendelkező, lektorált, szerkesztett konferenciakötetben megjelent tanulmányok

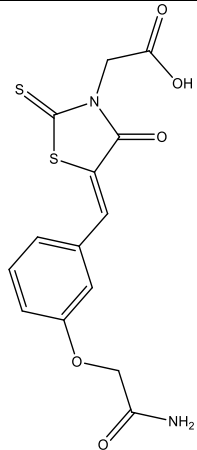
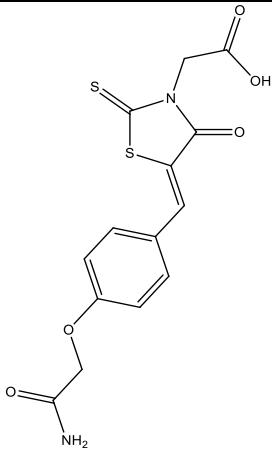
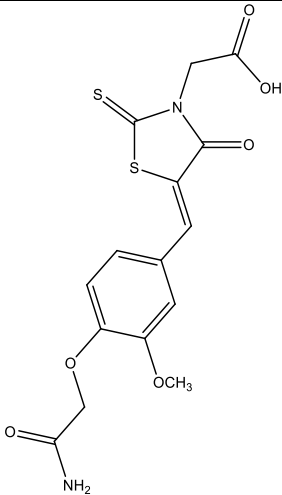
1. Szabó Kámen, Gyémánt Gyöngyi: **Új ITC aktivitásmérési módszer a glikogén foszforiláz katalizálta reverzibilis reakció követésére.**

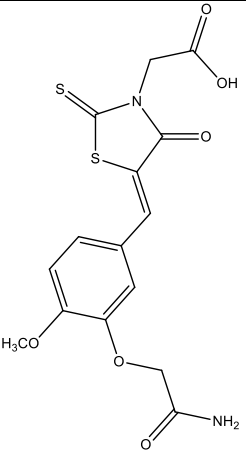
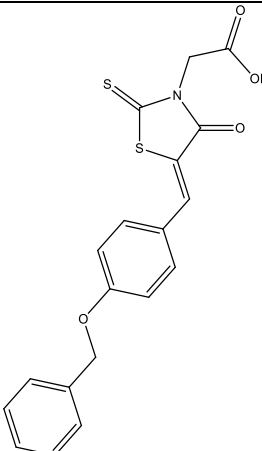
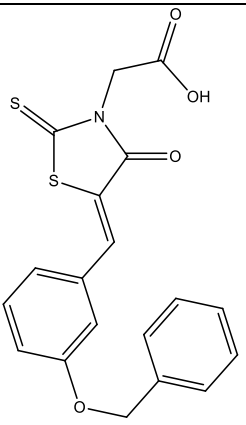
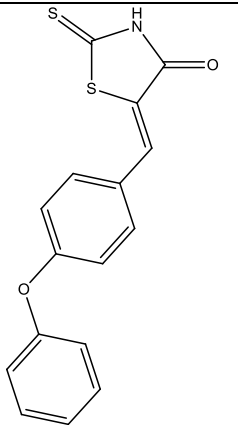
Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület, Budapest, 2018. 118-128. oldal.
Szerkesztette: Dr. Koncz István, Szova Ilona. ISBN 978-615-5709-05-0118-128

2. Szabó Kármén, Gyémánt Gyöngyi: **Potenciális glikoenzim- inhibitorok aggregálódásra való hajlamának vizsgálata.**

Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 2020. 105-116. oldal. Szerkesztette: Bihari Erika, Molnár Dániel, Szikszai-Németh Ketrin. ISBN 978-615-5586-61-3

10. Függelék

Vegyület száma	Szerkezet [200]	Moláris tömeg (gmól ⁻¹)	Törzsoldat-koncentráció (mM)	CAS-szám
1		352,4	51,1	1613190-91-2
2		352,4	52,4	444787-47-7
3		382,4	46,4	1005854-69-2

4		382,4	29,6	1057732-92-9
5		385,5	41,5	1151944-58-9
6		385,5	48,3	1151944-59-0
7		313,4	53,9	181765-57-1