

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Flavonoid származékok *in vitro* antioxidáns tulajdonságainak,
citotoxicitásának és oxidatív transzformációjának vizsgálata

Szabados-Fürjesi Péter

témavezető: Dr. Bak István



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2019

**Flavonoid származékok *in vitro* antioxidáns tulajdonságainak,
citotoxicitásának és oxidatív transzformációjának vizsgálata**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a gyógyszerészeti
tudományok tudományágban

Írta: Szabados-Fürjesi Péter okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bak István, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Csont Tamás Bálint, PhD
Dr. Papp Gábor, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára
2019. május 6. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Agócs Attila, PhD
Dr. Elek János, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora
tagok: Dr. Agócs Attila, PhD
Dr. Csont Tamás Bálint, PhD
Dr. Elek János, PhD
Dr. Papp Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2019. május 6. 13 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések.....	1
2. Anyagok és módszerek.....	3
2.1. Anyagok és módszerek - I. vizsgálat	3
2.1.1. ABTS assay	3
2.1.2. ORAC assay	3
2.1.3. FRAP assay	3
2.1.4. MTT assay	4
2.1.5. Kémiai Fenton rendszer	4
2.1.6. Szintetikus porfirin rendszer	5
2.1.7. Elektrokémiai oxidáció	5
2.2. Anyagok és módszerek - II. vizsgálat.....	6
2.2.1. Általános eljárás a 3a-c molekulák előállítására.....	6
2.2.2. Általános eljárás a 4a-c molekulák előállítására.....	6
2.2.3. Általános eljárás a 6a-f molekulák előállítására	6
2.2.4. ABTS assay	7
2.2.5. DPPH assay	7
2.2.6. FRAP assay	8
2.2.7. ORAC assay	8
2.2.8. MTT assay	9
2.2.9. Kémiai Fenton rendszer	9
3. Eredmények	10
3.1. Eredmények - I. vizsgálat.....	10
3.1.1. Antioxidáns tulajdonságok.....	10

3.1.2. Citotoxicitás.....	10
3.1.5. Oxidatív stabilitás	11
3.2. Eredmények - II. vizsgálat.....	11
3.2.1. Kémiai szintézis.....	11
3.2.2. Antioxidáns tulajdonságok.....	12
3.2.3. Citotoxicitás.....	13
3.2.7. Oxidatív átalakulás	13
4. Megbeszélés.....	14
4.1. Az eredmények értelmezése - I. vizsgálat.....	14
4.2. Az eredmények értelmezése - II. vizsgálat	16
5. Összefoglalás	20

1. Bevezetés és célkitűzések

A szív- és érrendszeri betegedések (SZÉB) csak Európában évente 3,95 millió ember halálát okozzák, ami az összes haláleset 45 százaléka. A két legáltalánosabb SZÉB, az iszkémiás szívbetegség (ISZB) és a stroke. Magyarországon a negyedik legmagasabb az ISZB mortalitása az Európai Unióban: 2014-ben 32000 ember halt meg ISZB-ben és 31000 ember vesztette életét a többi SZÉB következtében, köztük stroke-ban. Számos SZÉB kialakulásának, köztük a miokardiális iszkémia/reperfúzió okozta sejtkárosodásnak is az oxidatív stressz az egyik fő oka. Oxidatív stressz során a pro-oxidánsok és a belső antioxidánsok közötti egyensúly felborul, ami a pro-oxidánsok túlzott mértékű képződésének kedvez, amelyek így biomakromolekulák károsodását okozzák. Az antioxidáns hatású molekulák, ha az oxidálható szubsztrátnál alacsonyabb koncentrációban vannak jelen, megelőzhetik vagy késleltethetik annak oxidációját, így ellensúlyozva az oxidatív stresszt és annak káros hatásait. A redox balansz visszaállítása és a biomolekulák funkcionális károsodásainak elkerülése végett egyre nagyobb igény mutatkozik az exogén antioxidáns molekulákra. A gyógyszerkutatás és fejlesztés a gyógyszeripart a modern világ egyik legköltségesebb iparágává tették. Ennek az egyik oka az olyan vegyületek magas száma, amelyek sosem kerülnek törzskönyvezésre, a kutatás és fejlesztés folyamat valamely fázisának a sikertelensége miatt. Egy hatóanyagjelölt molekula stabilitását és toxicitását is meg kell határozni a fejlesztési folyamat korai szakaszában, ezzel is csökkentve a költségnövelő sikertelen molekulák számát. A metabolizmus az egyik legfontosabb tényező, ami a molekula toxicitását meghatározza, éppen ezért szükséges a vegyület metabolikus „sorsának” tanulmányozása. A gyógyszermetabolitokkal kapcsolatos kutatásokat különböző *in vivo* és *in vitro* metabolizmus modellezésre szolgáló technikákkal vagy biomimetikus rendszerekkel végzik.

Vizsgálataink első részének a célja az volt, hogy a Debreceni Egyetem molekulabankjából kiválasztott kilenc flavonoid származék *in vitro* antioxidáns aktivitását, citotoxicitását és oxidatív átalakulását vizsgáljuk. Az antioxidáns aktivitást három assay-jel mértük (ABTS, FRAP és ORAC), a citotoxicitást és a H₂O₂-indukálta sejthalált H9c2 sejtvonalon MTT assay segítségével határoztuk meg. Az *in vitro* biológiai vizsgálatok alapján kiválasztott flavonoidok oxidatív átalakulásait három biomimetikus modell rendszerrel; kémiai Fenton reakcióval, szintetikus porfirin rendszerrel és on-line EC/LC/MS technikával vizsgáltuk.

A második kísérlet sorozatban pedig új flavonol származékokat terveztünk és szintetizáltunk, valamint megvizsgáltuk azok biológiai aktivitását. További célunk volt, hogy a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoport 2-fenil-1,4-benzopiron alapvázú molekulák antioxidáns hatásainak kialakulásában játszott lehetséges szerepét kiderítsük. Az *in vitro* antioxidáns aktivitást különböző assay-jekkel vizsgáltuk (DPPH, ABTS, FRAP és ORAC), a citotoxicitást H9c2 sejtvonalon MTT assay segítségével határoztuk meg. A biológiai hatásuk alapján kiválasztott flavonolok oxidatív transzformációját pedig kémiai Fenton rendszerrel vizsgáltuk.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Anyagok és módszerek - I. vizsgálat

2.1.1. ABTS assay

Az ABTS gyökkationt (100 μM) ABTS/ H_2O_2 /metmioglobin rendszer segítségével generáltuk 2% etanolt tartalmazó citrát pufferben (pH 6,0, 50 mM) oldott ABTS-sóból, majd a vizsgált molekulák oldatával (25 μM) összekevertük. A reakcióelegy abszorbanciáját 730 nm-en mértük 2 órán át szobahőmérsékleten Helios- α -spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 0, 5, 15, 30, 60, 90 és 120 percenél. Minden kísérletet háromszor ismételtünk.

2.1.2. ORAC assay

AAPH (37,5 mM) és fluorescein (0,6 μM) törzsoldatait frissen készítettük foszfát pufferben (pH 7,0, 75 mM). A vizsgált molekulákat 0,05 mg/mL koncentrációban teszteltük. Mindegyik well 65 μL puffert, 20 μL fluorescein oldatot, 15 μL minta oldatot és 100 μL of AAPH oldatot tartalmazott. A plate-eket 37 °C-on tartottuk. A fluoreszcenciát minden második percben mértük 1 órán keresztül FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) plate reader-rel 485 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhosszon. A csúcs alatti területet (AUC) a következő egyenlettel kaptuk:

$$\text{AUC} = 0,5 + (\text{R}_2/\text{R}_1) + (\text{R}_3/\text{R}_1) + (\text{R}_4/\text{R}_1) + \dots + (\text{R}_n/\text{R}_1), \quad (1)$$

ahol R_1 a kezdeti fluoreszcencia a 0. percben és R_n az n. percben mért fluoreszcencia. A nettó AUC-t az AUC_{vak} $\text{AUC}_{\text{minta}}$ -ból történő kivonásával kaptuk. Minden mintát négyszer ismételve duplikátumban vizsgáltunk.

2.1.3. FRAP assay

A FRAP assay-hez a következő oldatokat készítettük el: acetát puffer (pH 3,6, 300 mM), TPTZ (10 mM) 40 mM HCl-ben és FeCl_3 (20 mM). A FRAP-reagenst frissen készítettük 25 mL acetát puffer, 2,5 mL TPTZ és 2,5 mL FeCl_3 elegyítésével. A reagenst 37 °C-on 15 percen át történő inkubálással aktiváltuk.

A reakcióelegyet 950 μL FRAP-reagens és 50 μL 0,05 mg/mL koncentrációjú mintaoldat összekeverésével készítettük. A 15 perces 37 °C-on történő inkubációt követően az abszorbanciát 593 nm-en mértük Helios- α -spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Különböző koncentrációjú trolox oldatok segítségével kalibrációs görbét vettünk fel 0,015-0,21 mM tartományban, ami alapján a FRAP-értékeket trolox ekvivalensként ($\mu\text{M}/\text{mL}$) fejeztük ki. A mintákat négyszer ismételve duplikátumban vizsgáltuk.

2.1.4. MTT assay

A H9c2 sejteket (ATCC, CRL-1446, LGC Standards GmbH, Wesel, Németország) 10% FBS-t és 1% penicillin-sztreptomicint tartalmazó DMEM-ben vettük fel, amelyeket aztán 96-lyukú plate-ekbe szélesztettük és 1 napig tenyésztettük. A következő napon a sejteket a vizsgálandó molekulák 150 μM -os médiumban készült oldatával kezeltük. A 30 perces inkubációt követően 125 vagy 250 μM H_2O_2 oldatot adtunk a well-ekhez. Négy óra elteltével 20 μL MTT PBS-ben készült oldatát (5 mg/mL) pipettáztunk a well-ekhez, majd 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk a plate-eket. A médium eltávolítása után a sejteket 150 μL *i*-propanollal lizáltuk és 15 percen keresztül inkubáltuk. Az abszorbanciát 570 és 690 nm-en mértük FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) plate reader segítségével. A kísérleteket háromszor ismételtük négy párhuzamos mintával.

2.1.5. Kémiai Fenton rendszer

A vizsgálandó molekulák oldatát (400 μL , 2,5 mM) elegyítettük 50 μL (20 mM) FeCl_3 oldattal, 50 μL EDTA- Na_2 (20 mM) oldattal és 500 μL 10 mM-os aszkorbinsav oldattal. A reakciót 1 μL H_2O_2 (30%) hozzáadásával indítottuk, majd az oldatot szobahőmérsékleten kevertettük. A 30, 140, percnél valamint a 18, 71 és 261 óránál vett mintákat azonnal off-line elemeztük egy ESI

ionforrással és fecskendőpumpával felszerelt API 2000 triplet kvadrupól tömegspektrométerrel (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). A tömegspektrumokat m/z 100–500 tartományban, pozitív módban vettük fel Analyst 1.5.1. szoftver (AB SCIEX, Concord, ON, Kanada) segítségével.

2.1.6. Szintetikus porfirin rendszer

50 μL vizsgálandó molekula 10 mM-os oldatát, 35 μL ACN-t, 315 μL hangyasavat (100 mM), 50 μL Fe(III) mezo-tetra(4-szulfonatofenil)porfin-klorid (10 mM) oldatot és 50 μL H_2O_2 -t (30%) kevertünk össze és rázattunk 37 °C-on 30 percig 700 fordulat/perccel ThermoMixer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) segítségével. Az off-line LC-MS analízist (Kinetex XB-C18 2.6 μm kolonna, 0,1% hangyasavval elegyített ACN és 0,1% hangyasav eluensek, gradiens elúció) LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) lineáris ioncsapda analizátorral és ESI ionforrással szerelt tömegspektrométerrel végeztük pozitív módban.

2.1.7. Elektrokémiai oxidáció

Az oxidációt bórral bevont gyémánt munkaelektrodból, grafitral bevont teflon ellenelektrodból és Pd/ H_2 referenciaelektrodból álló amperometriás elektrokémiai cellával (FlexCell, Antec, Zoeterwoude, Hollandia) és házi készítésű potenciosztáttal végeztük. A potenciált 0-2500 mV között 10 mV-onként növeltük másodpercenként. A vizsgált molekulák ammónium-formiát (pH 7,4, 10 mM) és ACN keverékében készült oldatát 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ áramlási sebességgel áramoltattuk át a cellán, majd az effluent azonnal egy ESI ionforrással felszerelt Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tömegspektrométerrel on-line analizáltuk. A full scan spektrumokat pozitív módban vettük fel m/z 100–800 tartományban XCalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) szoftverrel. A háromdimenziós tömeg voltammogramot a tömegspektrum az alkalmazott potenciál függvényében való

ábrázolásával kaptuk Origin 9.1 (OriginLab, Northhampton, MA, USA) szoftver segítségével.

2.2. Anyagok és módszerek - II. vizsgálat

2.2.1. Általános eljárás a **3a-c** molekulák előállítására

Benzaldehid (**2a,b**, 6,3 mmol) metanolos szuszpenzióját (5 mL) adtuk acetofenon (**1a,b**, 1,29 g, 6 mmol) metanolos oldatának (10 mL) és NaOH 50%-os vizes oldatának (1,26 mL, 24 mmol) a keverékéhez. Az oldatot 1 óra kevertetés követően 1 napig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A reakcióelegyet savanyítottuk (pH = 1) 10% sósavval és a kiváló szilárd anyagot szűrtük, majd 3 × 30 mL vízzel mostuk, ami a **3a-c** termékeket eredményezte 88-97% hozammal.

2.2.2. Általános eljárás a **4a-c** molekulák előállítására

Kalkont (**3a-c**, 2,7 mmol) 15 mL etanolban szuszpendáltunk. A szuszpenziót vízfürdővel hűtöttük és NaOH 8%-os vizes oldatát (3,9 mL, 8,41 mmol) adtuk hozzá. Az így készített oldathoz 30% H₂O₂-t (3,9 mL, 38,2 mmol) csepegtettünk. A reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten kevertettük, majd 250 mL jegesvízre öntöttük. Az oldatot 10%-os sósavval savanyítottuk (pH = 1) és 1 napig ülepedni hagytuk. A kiváló szilárd anyagot (**4a-c**) szűrtük és 2 × 50 mL tömény NaHCO₃ oldattal és 4 × 50 mL vízzel mostuk (hozam: 57-76%).

2.2.3. Általános eljárás a **6a-f** molekulák előállítására

Száraz nyomásálló csőben 3-hidroxi flavon (**4a-c**, 0,265 mmol), KF (46,3 mg, 0,795 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0,0133 mmol), XPhos (12,6 mg, 0,0265 mmol) és boronsav (**5a,b**, 0,53 mmol) toluol/t-BuOH (6:1, 3,5 mL) elegyében készült keverékét argon atmoszféra alatt 4 órán át 100 °C-on kevertettük. Az oldószert vákuumban eltávolítottuk, a maradékot adszorptív szűrővel tisztítottuk

toluol/EtOAc (2:1) keverékével. A nyersterméket diizopropiléterrel mostuk majd szűrtük, így kaptuk a kívánt terméket **6a-f** (hozam: 63-74%).

2.2.4. *ABTS assay*

Az ABTS gyök kationt ABTS (7 mM) és $K_2S_2O_8$ (2,45 mM) oldat összekeverésével generáltuk, majd 16 órán át sötétben tároltuk. A munkaoldatot frissen készítettük 50 μ L $ABTS^{*+}$ törzsoldatból és 2,9 mL metanolból. A reakcióelegy 180 μ L munkaoldatból és 20 μ L vizsgálandó anyag vagy kvercetin sztenderd különböző koncentrációjú (10, 20, 50, 100 és 200 μ M) DMSO-ban készített oldatából állt. Az $ABTS^{*+}$ koncentráció csökkenését az abszorbancia 737 nm-en történő monitorozásával mértük 2 órán keresztül 10 másodperces rázatást követően egy Multiskan GO microplate spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Minden mintát háromszor ismételve duplikátumban vizsgáltunk. Az IC_{50} átlagértéket (\pm SD) a 120 percnél mért inhibíciós százalék alapján számoltuk.

2.2.5. *DPPH assay*

Frissen készített DPPH metanos oldatát (180 μ L, 0,2 mM) és 20 μ L vizsgálandó anyag vagy kvercetin sztenderd különböző koncentrációjú (10, 20, 50, 100 és 200 μ M) DMSO-ban készített oldatát kevertük össze. A DPPH gyök koncentrációjában bekövetkező csökkenést az abszorbancia 515 nm-en 90 percen át történő monitorozásával határoztuk meg 10 másodperces rázatást követően Multiskan GO microplate spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Minden mintát háromszor ismételve duplikátumban vizsgáltunk. Az IC_{50} átlagértéket (\pm SD) a 90 percnél mért inhibíciós százalék alapján számoltuk.

2.2.6. FRAP assay

A FRAP munkaoldatot frissen készítettük 10 mL acetát puffer (pH 3,6, 300 mM), 1 mL TPTZ (10 mM) 40 mM sósavas oldat és 1 mL FeCl₃ (10 mM) oldat elegyítésével, amit 15 percen át inkubáltunk 37 °C-on. A vizsgálandó anyag vagy kvercetin sztenderd különböző koncentrációjú (10, 20, 50, 100 és 200 µM) 20 µL oldatából és 180 µL FRAP munkaoldatból készült elegyet 30 percen át sötétben állni hagytuk. A színes Fe(II)-TPTZ komplex abszorbanciáját 593 nm-en mértük Multiskan GO microplate spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vas(II)-szulfát oldatából készült kalibrációs sztenderdek alapján a FRAP-értékeket (±SD) µM vas(II) ekvivalensben fejeztük ki. Minden mintát háromszor ismételve duplikátumban vizsgáltunk.

2.2.7. ORAC assay

A vizsgált molekulák oxigéngyök abszorpciós kapacitását fekete 96-lyukú plate használatával mértük. Fluorescein (50 nM) és AAPH (180 mM) foszfát pufferes (pH 7,0, 75 mM) oldatait minden kísérlethez frissen készítettük. A vizsgálandó anyag vagy kvercetin sztenderd különböző koncentrációjú (10 és 20 µM) 20 µL acetonitriles oldatából és 160 µL fluorescein (50 nM) oldatból álló elegyet 15 percen át 37 °C-on inkubáltuk. A reakciót 20 µL AAPH oldat (180 mM) well-ekbe történő gyors pipettázásával indítottuk. A fluorescein fluoreszcenciájának csökkenését minden második percben 2 órán keresztül mértük FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) plate reader-rel 485 nm excitációs és 520 nm emissziós hullámhosszon. A csúcs alatti területet (AUC) a következő egyenlettel kaptuk:

$$AUC = 0.5 + (A_1/A_0) + (A_2/A_0) + (A_3/A_0) + \dots + (A_n/A_0), \quad (2)$$

ahol A_0 a kezdeti fluoreszcencia a 0. percben és A_n az n. percben mért fluoreszcencia. A nettó AUC-t az AUC_{vak} AUC_{minta} -ból történő kivonásával

kaptuk. Az eredményeket AUCnet átlagértékekkel (\pm SD) fejeztük ki. Minden mintát háromszor ismételve duplikátumban vizsgáltunk.

2.2.8. *MTT assay*

A H9c2 sejteket (ATCC, CRL-1446, LGC Standards GmbH, Wesel, Németország) 96-lyukú plate-ekben 10% FBS-t, penicillin és sztreptomicint tartalmazó 200 μ L DMEM-ben szélesztettük 6000 sejt/well sűrűséggel. A sejteket egy éjszakán át tenyésztettük, majd a vizsgálandó anyag vagy kvercetin sztenderd 20 μ M oldatát adtuk a well-ekhez. Tizenkét óra elteltével 20 μ L MTT oldatot (5 mg/ μ L PBS-ben) pipettáztunk a well-ekbe, majd 37 °C-on 4 órán át inkubáltuk azokat. A médium óvatos eltávolítását követően a keletkezett formazán kristályokat 100 μ L DMSO hozzáadásával oldottuk be. Az abszorbanciát 540 és 630 nm-en mértük egy Synergy HT (BioTek, Winoosky, VT, USA) plate reader segítségével. A kísérleteket kétszer ismételtük három párhuzamos mintával. Az eredményeket sejt életképesség százalék átlagaként (\pm SD) adtuk meg.

2.2.9. *Kémiai Fenton rendszer*

A flavonol származékok kémiai Fenton rendszerrel történő oxidációja a 2.1.5. bekezdésben leírtak szerint történt.

3. Eredmények

3.1. Eredmények - I. vizsgálat

3.1.1. Antioxidáns tulajdonságok

3.1.1.1. ABTS assay

A vizsgált molekulák közül a **865** vegyület rendelkezett a legnagyobb gyökfogási aktivitással, melyet a **893**-as vegyület követett. A **1019/2**, a kumarin sztenderdhez hasonló eredményt adott, míg a többi vizsgált molekula jelentősen alacsonyabb gyökfogási aktivitással rendelkezett.

3.1.1.2. ORAC assay

Ebben az esetben is a **865**-s számú molekula rendelkezett a legmagasabb ORAC-értékkel, de érdemes megemlíteni, hogy valamennyi vizsgált molekula jelentősen jobb oxigén gyök abszorpciós kapacitással rendelkezett, mint a kumarin sztenderd. A **865**-ös molekulát **874**, **890**, **893**, **987/3** és **1010/2** követték.

3.1.1.3. FRAP assay

A **865** molekula kimagasló FRAP aktivitást mutatott, ezzel szemben a többi vizsgált molekula a kumarin sztenderdhez képest vagy alig jobb (**870**, **874**, **991** és **1019/2**) vagy hasonló (**876**, **890**, **893** és **987/3**) trolox ekvivalens értékkel rendelkezett.

3.1.2. Citotoxicitás

Az MTT assay eredményei alapján egyik vizsgált molekula sem bizonyult citotoxikusnak; **893**, **865**, **987/3**, **876**, **1019/2** és **890** molekulák pozitív hatást gyakoroltak a sejtek életképességére 125 μM H_2O_2 -dal történő kezelés során, míg 250 μM H_2O_2 alkalmazása esetében, a **874** kivételével valamennyi vizsgált molekula növelte a sejtek életképességét.

3.1.5. Oxidatív stabilitás

3.1.3.1. Kémiai Fenton reakció

Az off-line ESI-MS technikával gyűjtött spektrális adatok alapján három potenciális metabolitot azonosítottunk; a legnagyobb intenzitású **865-CH₃** (m/z 252,0), amelyet a **865+O** (m/z 282,3) követett, továbbá a **865-2CH₃** (m/z 238,0).

3.1.3.2. Szintetikus porfirin rendszer

A mesterséges porfirinnel végzett oxidációt követő LC-MS mérés alapján három oxidációs terméket detektáltunk; **865+O** (m/z 282,42), **865-2CH₃** (m/z 238,42) és **865+O-2H** (m/z 280,25). Mivel a **865-CH₃** szekunder-amin (m/z 252,33) csúcsa a kontrol mintában is megjelent, így ebben az esetben azt a **865** szennyezőjeként kezeltük.

3.1.3.3. Elektrokémiai oxidáció

A 865 oxidációja 1500 mV-nál kezdődik; a kiindulási vegyület csúcs (m/z 266,1165) intenzitása csökkent, míg más csúcsoké nőtt. Megjegyzendő, hogy a **865-CH₃** (m/z 252,1014) csúcs már 0 mV-nál is detektálható volt, ami feltehetőleg az ionforrásban történő oxidáció következménye volt, azonban mivel 1500 mV-on az intenzitása megnőtt, megerősítve, hogy ez a **865-CH₃** oxidációs termék. Magasabb potenciált alkalmazva ez a vegyület a **865-2CH₃** (m/z 238,0858) primer aminná oxidálódik. Az aromás hidroxiláció termékét (**865+O** (m/z 282,1133)), valamint annak dehidrogenált származékát, **865+O-2H** (m/z 280,0959), szintén detektáltuk.

3.2. Eredmények - II. vizsgálat

3.2.1. Kémiai szintézis

A **6a-f** flavonolok szintézisének első lépéseként kereskedelemben elérhető brómacetofenonok (**1a,b**) és benzalhidek (**2a,b**) Claisen-Schmidt kondenzációját (i) valósítottuk meg MeOH-ban, 4 ekvivalens NaOH-dal, ami a

megfelelő kalkonokat (**3a-c**) eredményezte kiváló hozammal (88-97%). A kalkonok (**3a-c**) etanolos oldatához adott 14,1 ekvivalens H₂O₂ segítségével ciklizáltuk (ii) azokat a flavonol alapvázú származékokká (**4a-c**). A bromoflavon származékokat (**4a-c**) a megfelelő boronsavval (**5a,b**) argon atmoszféra alatt (iii), KF, Pd(OAc)₂ és XPhos jelenlétében toluol/*t*-BuOH (6:1) elegyében kapcsoltuk, ami a várt molekulákat (**6a-f**) eredményezte a kívánt oldallánccal a B gyűrűn jó hozammal (63-74%).

3.2.2. Antioxidáns tulajdonságok

3.2.2.1. ABTS assay

A mérési eredményekből számolt IC₅₀ értékek alapján elmondható, hogy legjobb ABTS gyökkation-fogónak a **6c** molekula bizonyult, amit a **6e** és **6a** követett.

3.2.2.2. DPPH assay

A DPPH gyökkel szembeni aktivitást vizsgálva hasonlóan az ABTS assay-hez, a legalacsonyabb IC₅₀ értékkel a **6c** vegyület rendelkezett, amit ebben az esetben a **6a**, **6d** és **6b** molekulák követettek.

3.2.2.3. ORAC assay

Ellentétben az előző két assay eredményével, ebben az esetben mindkét alkalmazott (2 és 10 μM) flavonol koncentráció esetén a **6e** vegyület rendelkezett a legmagasabb ORAC-értékkel, amit a **6a** és **6b** követett. Továbbá a **6a** és **6e** kapacitása a sztenderdként használt kvercetinével összevethető volt 10 μM koncentrációban. Meglepetésre a **6c** molekula csak a negyedik legmagasabb ORAC értékkel rendelkezett.

3.2.2.4. FRAP assay

A legmagasabb FRAP aktivitást valamennyi vizsgált koncentrációban a **6c** vegyület, amit a **6a** és **6e** követett.

3.2.3. Citotoxicitás

A H9c2 sejteken végzett MTT assay eredménye alapján elmondható, hogy a **6a**, **6c** és **6e** vegyületek nem mutattak citotoxikus aktivitást, míg a **6b**, **6d** és **6f** molekulák jelentős mértékben csökkentették a sejtek életképességét.

3.2.7. Oxidatív átalakulás

A kémiai Fenton reakciót követően, a reakcióelegyek ESI-MS vizsgálata alapján a következő két potenciális metabolitot sikerült detektálni és azonosítani: az aromás hidroxilált **6c+O** (m/z 434,2) és legnagyobb mennyiségben jelenlévő *O*-demetilezett **6cO-CH₃** (m/z 404,1) oxidációs termékeket.

4. Megbeszélés

4.1. Az eredmények értelmezése - I. vizsgálat

A három antioxidáns assay eredménye a **865** esetében konzisztens; a vizsgált kilenc molekula közül a **865**, egy relatíve egyszerű szerkezetű *N,N*-dimetilamino-csoportot tartalmazó flavonoid rendelkezett a legnagyobb antioxidáns aktivitással. A **865** kiváló ABTS gyökfogó aktivitást, nagyobb FRAP-értéket és jó oxigéngyök abszorpciós kapacitást mutatott a többi vizsgált vegyülethez képest. Meg kell említeni azonban, hogy valamennyi tesztelt molekula jelentősen jobb ORAC-értéket produkált a kumarin sztenderdhez képest. Érdekes módon, a **865** csak egy jelentős szerkezeti sajátossággal, a konjugációra képes 2,3-kettős kötés és a 4-es helyzetű oxo funkcióval rendelkezik, ami a flavonoid típusú vegyületeket hatékony szabadgyök-fogóvá teszi, azonban a további jellemzők: katechol (*o*-dihidroxi) rendszer megléte a B gyűrűn és további OH-csoportok a 3-as és 5-ös helyzetben hiányoznak. A három assay eredménye közötti különbséget valószínűleg azok eltérő mechanizmusa okozza; az ABTS és FRAP módszerek „single electron transfer” (SET) alapúak, míg az ORAC „hydrogen atom transfer” (HAT) mechanizmuson alapszik.

Az MTT assay általában az első módszer, amivel a sejtek életképességét meghatározhatjuk, azonban fontos megjegyezni, hogy a mitokondriális metabolizmus sebességének mérésén alapú, amit befolyásolhatnak bizonyos vegyszerek és különböző körülmények, így a kapott eredmény nem feltétlenül kapcsolódik közvetlenül a citotoxicitáshoz. Esetünkben azonban nincs olyan faktor, ami befolyásolná a kapott eredményeket: a sejtek életképessége a **865**, **876**, **893**, **987/3**, **876**, és **1019/2** molekulákkal nem csökkent. Hasonló eredmény figyelhető meg, amikor a sejteket a flavonoid származékokon kívül H₂O₂-vel is kezeltül; védték a sejteket a H₂O₂-indukálta sejthaláltól. Az antioxidáns aktivitás és a sejtek életképességére gyakorolt pozitív hatás alapján a **865** ígéretes jelölt lehet további, *in vivo* vizsgálatokban.

Azonban minden *in vivo* kísérlet előtt célszerű meghatározni a metabolikus sajátságokat és a lehetséges toxicitást, amelyen hamar csak lehet, hiszen így időt és költséget takaríthatunk meg; az ígéretes jelölteket azonosíthatjuk, míg a további kísérletekre alkalmatlan molekulákat kizselektálhatjuk. A **865** oxidatív metabolizmusát három biomimetikus modell rendszerrel vizsgáltuk. Elsőként, *N*-dealkilezés, *N*-oxidáció, *O*-dealkilezés, *S*-oxidáció, dehidrogenizáció és különböző hidroxiláció modellezésére alkalmas kémiai Fenton reakcióval oxidáltuk a **865** molekulát és a mintát off-line ESI-MS/MS technikával analizáltuk. A következő potenciális metabolitokat sikerült detektálnunk: az *N*-dealkilezett **865-CH₃** szekunder-amint a legnagyobb intenzitással, egy kétszeresen *N*-dealkilezett **865-2CH₃** primer-amint és a B gyűrűn történő aromás hidroxilált **865+O** terméket. Annak ellenére, hogy a Fenton rendszer alkalmas dehidrogenizáció modellezésére is, ennek a reakciónak a termékét nem sikerült detektálni, aminek az egyik lehetséges oka a termék detektálási limit alatti koncentrációja.

A szintetikus porfirin rendszerrel leginkább modellezhető reakciók az *N*-dealkilezés, *N*-oxidáció, *S*-oxidáció, dehidrogenizáció, hidroxiláció és epoxidáció. Az off-line LC/MS analízis alapján a **865** három reakcióját sikerült modellezni: *N*-dealkilezés során elvesztett két metilcsoport eredményezte a **865-2CH₃** primer-amint, a B gyűrűn történő aromás hidroxiláció adta a **865+O** terméket, aminek a dehidrogenizációja során a **865+O-2H** potenciális metabolit keletkezett. A **865-CH₃** szekunder-amint ebben az esetben is detektáltuk, azonban az a kontroll mintában is jelent volt, így metabolitként nem, csak szennyezőként tudtuk azonosítani.

Az EC/LC/MS és EC/MS technikák hasznos eszköznek bizonyultak olyan potenciális metabolitok előállításában, amelyek aromás hidroxiláció, dehidrogenizáció, *S*-, *P*-oxidáció és *N*-dealkilezés során keletkeznek. Ezzel a módszerrel generálható a tömeg voltammogram, amit a tömegspektrum változó potenciál függvényében történő ábrázolása eredményez. A tömeg

voltammogram segítségével megállapítható az az elektrokémiai potenciál, amelynél a legmagasabb a vizsgálandó anyag konverziója. A **865** esetében ez a potenciál 1500 mV. EC/LC/MS módszerrel ugyanazokat a potenciális metabolitokat sikerült detektálni, mint a két előző biomimetikus rendszerrel; a **865-2CH₃** primer amint és a **865-CH₃** szekunder-amint, valamint a B gyűrűn történő aromás hidroxiláció során keletkező **865+O** terméket és annak dehidrogenizációja révén a **865+O-2H** potenciális metabolitot.

4.2. Az eredmények értelmezése - II. vizsgálat

A vizsgálat második részeként további kísérleteket végeztünk a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoport antioxidáns és citoprotektív aktivitásra gyakorolt lehetséges hatásának a kiderítésére. A vizsgálat első részének eredményei alapján új flavonol (**6a-f**) származékokat terveztünk és szintetizáltunk, amelyek az A gyűrű 6-os vagy 7-es helyzetében fenil-*N,N*-dimetilamino vagy metoximetil-fenil-csoportot tartalmaznak. Ezek a flavonolok rendelkeznek a konjugációra képes 2,3-as kettős kötéssel és a 4-es helyzetű oxo-csoporttal, azonban a B gyűrűn lévő catechol szerkezet kialakítása megoldhatatlannak bizonyult számunkra; a demetilezett származékok előállítására olyan erélyes körülményeket követelt, amely során a molekula a szerkezeti integritását nem tudta megőrizni.

A vizsgált **6a-f** molekulák antioxidáns aktivitását különböző HAT és SET mechanizmusokon alapuló tesztekkel mértük. Az ABTS IC₅₀ értéket a 120 percnél kapott inhibíciós százalékból számoltuk 10–200 μM koncentrációtartományban. Az ABTS gyökkation egy elektront „elszed” az antioxidánstól, így visszaalakulva eredeti állapotába és ezzel 737 nm-n mérhető abszorbancia-változás okoz. A legalacsonyabb IC₅₀ értékkel a **6c** molekula rendelkezett, így ez a molekula bizonyult a leghatásosabb ABTS gyökkfogó aktivitásúnak, amit a **6e** és **6a** követett. Ezek a molekulák rendelkeznek a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoporttal az A gyűrűn, így feltehetőleg az

elektronegativitásban lévő különbség és a nitrogént atomon lévő nemkötő elektronpár miatt bizonyultak jobb gyökfogóknak a metoximetil-fenil-csoportot tartalmazó származékoknál (**6b**, **6d**, és **6f**).

A DPPH assay az ABTS assay-hez hasonló elven alapul: a stabil DPPH-gyök oldata sötét lila színű, viszont ahogy az antioxidáns redukálja azt, így az oldat színtelenedni kezd. Ez a változás 515 nm-en detektálható. A DPPH IC₅₀ értéket a 90 percnél kapott inhibíciós százalékból számoltuk 10–200 μM koncentrációtartományban. A legalacsonyabb IC₅₀ értékkel szintén a **6c** rendelkezett, így ez a molekula bizonyult a leghatásosabb DPPH gyökfogó aktivitásúnak is, amit a **6a**, **6d** és **6b** követett. Ezen származékok csak két metoxicsoprotot tartalmaznak a B gyűrűn, míg a többi molekula (**6e** és **6f**) hármat. Azok a kalcionok, amelyeken B gyűrűn lévő két hidroxilcsoport *ortho* vagy *para* helyzetű sokkal jobb antioxidáns aktivitással rendelkeznek, mint *meta* helyzetű hidroxilcsoportokkal rendelkező kalcionok. Az *ortho*- és *para*-dihidroxi benzolgyűrűs rendszerek sokkal hatékonyabban tudják az elektronok delokalizálni, mint a *meta*- dihidroxi származékok, így sokkal stabilabb kalcion addukt keletkezik a szabadgyökökkel való reakció során. Továbbá, a három metoxicsoprot jelenlét a B gyűrűn növelik a sztérikus gátlást, amit a planaritás elvesztéséhez vezet, így csökkentve a hidrogén absztrakcióját, ami sokkal könnyebb egy sík geometriai konfiguráció esetén. Emiatt ezek a molekulák (**6e** és **6f**) alacsonyabb szabadgyök-fogó aktivitással rendelkezhetnek. A tény, hogy a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoportot tartalmazó **6c** molekula volt a legaktívabb az ABTS és DPPH assay-ekben jól korrelál korábbi megfigyelésekkel; 3-hidroxi flavon származékok közül a 4'-*N,N*-dimetil flavonol fogta legjobban a DPPH-gyököt és rendelkezett a legnagyobb ABTS gyökkation-fogó aktivitással is. A vizsgálat mindkét része során kapott gyökfogó assay-ek eredménye alapján megállapítható, hogy a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoport kulcsszerepet játszhat a vizsgált flavonoid származékok szabadgyök-fogó aktivitásának meglétében.

A FRAP assay eredményének alapján elmondható, hogy a **6c**, **6a**, és **6e** vegyületek rendelkeztek valamennyi vizsgált molekula közül minden tesztelt koncentrációban (10, 20, 50, 100 és 200 μM) a legnagyobb FRAP-értékel, míg a **6d**, **6f**, és **6b** molekulák jelentősen alacsonyabb vas redukáló képességet mutattak. Megjegyzendő azonban, hogy valamennyi flavonol származék (**6a-f**) FRAP-értéke jelentősen elmarad a kvercetin sztenderdétől, ami nem meglepetés, hiszen a metilezett flavonoidok sokkal kisebb aktivitással rendelkeznek azok demetilezett származékaihoz képest. Korábban leírták, hogy a metilezett kvercetin 650-szer alacsonyabb FRAP-értékkel rendelkezik, mint a kvercetin. Ilyen mértékű különbség azonban a vizsgálataink során nem volt megfigyelhető, aminek lehetséges okai az A gyűrűn található fenil-*N,N*-dimetilamino-csoport és a 3-as pozícióban a szabad OH-csoport megléte. A FRAP assay eredménye szintén megerősíti az fenil-*N,N*-dimetilamino-csoport fontosságát, ugyanis valamennyi vizsgált molekula rendelkezik a 3-as helyzetű szabad OH-csoporttal, azonban a *N,N*-dimetilamino-csoportot tartalmazó származékok (**6c**, **6e**, és **6a**) FRAP-értékei jóval magasabb voltak a többi molekuláéhoz képest.

6e, **6a**, és **6b** származékok rendelkeztek a legnagyobb oxigéngyök abszorpciós kapacitással, amelyek a kvercetinével összevethetőek 10 μM koncentráció esetén. Meglepetésre a **6c** molekula csak a negyedik legmagasabb ORAC-értékkel rendelkezett mindkét koncentráció esetén. Ez az eredmény jól korrelál egy korábbi megfigyeléssel, miszerint metilezett polifenolok ORAC-értékében bekövetkező változások drasztikusabbak, mint a FRAP assay esetében a nem metilezett származékokhoz képest.

A flavonolok hatását a H9c2 sejtek életképességére MTT assay-jel vizsgáltuk; a sejteket 12 órán át kezeltük 20 μM -os flavonol oldattal. A teszt eredménye alapján megállapítottuk, hogy a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoportot tartalmazó származékok (**6a**, **6c** és **6e**) nem rendelkeztek citotoxikus hatással: a életképesség százalékban kifejezve a kvercetinhez és a kezeletlen kontrollhoz hasonló volt. Fontos megemlíteni, hogy az A gyűrűn metoximetil-csoportot

tartalmazó molekulák (**6b**, **6d** és **6f**) más eredményt szolgáltattak; a sejtek életképessége nagymértékben csökkent, ami a **6d** esetében volt a legjelentősebb, (46%).

A **6c** molekula lehetséges oxidatív transzformációs útvonalait az előzményekben említett antioxidáns aktivitása és a H9c2 sejtek életképességére gyakorolt hatása miatt vizsgáltuk. A vizsgálatokhoz a kémiai Fenton rendszert választottuk I.-es fázisú metabolikus reakciók biomimetikus modell rendszereként. A **6c** molekulából keletkező potenciális metabolitokat ESI-MS és LC/ESI-MS technikákkal detektáltuk és azonosítottuk. A csúcs intenzitás alapján *O*-dealkilezés eredményezte **6cO-CH₃** volt a legnagyobb mennyiségben keletkező termék, továbbá detektáltuk az aromás hidroxiláció révén keletkező **6c+OH** metabolitot is. A reakciók helyzetét a 3-hidroxiflavon struktúrára is jellemző retro Diels-Alder reakció segítségével állapítottuk meg, ahogy az a kutatás első részében is tettük. További vizsgálati módszerekkel, mint az elektrokémiai oxidáció és a szintetikus porfirin rendszer feltehetőleg más metabolitok is generálhatóak és detektálhatóak; az *N*-dealkilezés során keletkező **6cN-CH₃** szekunder és **6cN-2CH₃** primer amin. Fontos azonban megemlíteni, hogy ezeknek a reakcióknak az egzakt helyzetét az általunk alkalmazott analitikai módszerek limitációi miatt nem tudtuk meghatározni.

5. Összefoglalás

A kutatás első részében kilenc flavonoid származék antioxidáns hatását és citotoxicitását tanulmányoztuk. Eredményeinkből kiderült, hogy a 4-*N,N*-dimetilamino flavon (vegyület **865**) jelentős antioxidáns és citoprotektív hatással rendelkezik, valamint metabolikusan stabil.

Ezen adatok alapján, hat új flavonol származékot terveztünk és állítottunk elő a kutatás második részében, amely során vizsgáltuk a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoport hatását az antioxidáns aktivitásra. Az eredmények azt mutatták, hogy a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoportot tartalmazó molekulák (**6a**, **6c** és **6e**) antioxidáns aktivitása nagyobb, továbbá kardioprotektív hatással is rendelkeznek H9c2 sejt vonal esetében.

A kutatás első és második részének az összevont eredményei szerint a fenil-*N,N*-dimetilamino-csoportnak kulcsszerepe van a flavonoidok antioxidáns aktivitásában és citotoxicitásában egyaránt. A oxidatív stabilitása ígéretes jelölteké teszi a **865** és **6c** molekulákat az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek vizsgálatában a megfelelő állatmodelleket alkalmazva.



Nyilvántartási szám: DEENK/375/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabados-Fürjesi Péter

Neptun kód: YZ19Y8

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabados-Fürjesi, P.**, Pajtás, D., Barta, A., Csépanyi, E., Kiss-Szikszai, A., Tósaki, Á., Bak, I.:
Synthesis, in Vitro Biological Evaluation, and Oxidative Transformation of New Flavonol
Derivatives: The Possible Role of the Phenyl-N,N-Dimethylamino Group.
Molecules. 23 (12), 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23123161>
IF: 3.098 (2017)
2. Csépanyi, E., **Szabados-Fürjesi, P.**, Kiss-Szikszai, A., Frensemeier, L. M., Karst, U., Lekli, I.,
Haines, D. D., Tósaki, Á., Bak, I.: Antioxidant Properties and Oxidative Transformation of
Different Chromone Derivatives.
Molecules. 22 (4), 1-12, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22040588>
IF: 3.098





További közlemények

3. Csépanyi, E., Czompa, A., **Szabados-Fürjesi, P.**, Lekli, I., Balla, J., Balla, G., Tósaki, Á., Bak, I.:
The Effects of Long-Term, Low- and High-Dose Beta-Carotene Treatment in Zucker Diabetic Fatty Rats: the Role of HO-1.
Int. J. Mol. Sci. 19 (4), 1132-, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041132>
IF: 3.687 (2017)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,883

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,196**

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

Debrecen, 2018.12.18.

