

## Az aminoszázok és a NADPH-oxidáz szerepe az ér- és neuronkárosodások kialakulásában (patomechanizmus és gyógyszeres befolyásolás)

Az aminoszázok két nagy csoportjának, a monoamin-oxidáznak (MAO), valamint a szemikarbazid-szenzitív aminoszáznak (SSAO-VAP-1) az élő szervezetben kifejtett szerepét vizsgáltuk. A két csoport számos közös és néhány eltérő tulajdonsággal rendelkezik (1. táblázat).

<b>Aminoszázok</b>		
	<b>MAO</b>	<b>SSAO</b>
elsődleges szerepük	a ciklikus transzmitter aminok semlegesítése	az alifás endogén aminok hatástalanítása
szubsztrátok	primer, szekunder, terciár aminok	csak a primer aminok
lokalizáció	intracelluláris	extracelluláris
reakció egyenlet	$R-CH_2-NH_2 \rightarrow R-CHO + H_2O_2 + NH_3$	
izoenzimek	MAO-A, MAO-B	szolubilis forma szövethez kötött (VAP-1)
gátlószerek klinikai használata	a központi idegrendszer betegségei	a központi idegrendszer és a periféria betegségei
endogén regulátorok	tribulin, isatin	endogén anyagok?

Fő szerepük a védelem, melyre lokalizációjuk is utal. Mintegy védelmi barriert képeznek a központi idegrendszerben, az agykamrák falában és az erek endoteliumán, simaizmán, a gyomor-béltraktusban a rendkívül aktív fiziológiai hatású transzmitter aminok, valamint a táplálékkal bekerülő, biogén aminok farmakológiai hatásával szemben. Az enzimgátlás növeli a biogén aminok szintjét, ami a központi idegrendszer egyes betegségeiben, így a Parkinson kór kialakulásában, elsődleges szerepet játszó dopamin hiányt csökkenti, vagy az erek tónusának szabályozásában nélkülözhetetlen noradrenalin kellő koncentrációját biztosítja. A biogén aminok koncentrációjának megváltoztatása azonban kétélű fegyver. Így a gyomor-béltraktus (GIT) aminoszáz enzimének gátlása révén jön létre az életveszélyes „sajtreakció”, mely ilyenkor a táplálékban előforduló biogén aminok korlátlan szervezetbejutását teszi lehetővé, míg a MAO enzim egyenlőtlen

eloszlása, valamint heterogenitása (MAO-A, MAO-B) a biogén aminok oxidatív dezaminációjának kedvező kombinációját eredményezheti.

A munkacsoport évek óta foglalkozik a deprenyl (phenyl-isopropyl-methyl-propargylamin) balra forgató optikai izomerjének (selegiline) hatásmód-vizsgálatával. A pályázat indításának időpontjában a Current Medicinal Chemistry-ben megjelent dolgozatunk (Magyar et al., Curr.Med.Chem., 11: 2017-2031, 2004) jól összegzi az akkori ismereteket, együtt azzal az 5 közleménnyel, melyet a munkacsoport vezetőjének – mint vendégszerkesztő - felkérésére, a témakörben nemzetközileg elismert kutatók írtak.

## **I. A selegilinnel végzett kutatások**

### **I/1. A selegiline neuroprotektív hatásának vizsgálata**

A selegiline a MAO bénító koncentrációjánál ( $IC_{50}=5 \times 10^{-6}M$ ) hígabb oldatokban ( $>10^{-9}M$ ) gátolja *in vitro* sejtenyészetben a sejtek apoptózist, vagyis neuroprotektív hatást eredményez. Ebben a propargylamin szerkezettel rendelkező metabolitoknak van szerepe. A propargyl csoport jelenléte nélkülözhetetlen mind a neuroprotektív hatás, mind az enzimgátlás szempontjából, de vannak olyan propargyl csoporttal rendelkező molekulák, melyek MAO bénító hatással nem, csak neuroprotektív hatással rendelkeznek. Ez is bizonyítja, hogy a MAO bénító és a neuroprotektív hatás egymástól független tulajdonságok. A selegiline metabolizmusában másokkal egybehangzóan bizonyítottuk, hogy a mikroszómális CYP enzimek játszanak fő szerepet (dealkiláció, p-hidroxiláció), de részt vesznek ebben a flavin-tartalmú monooxygenáz (FMO) enzimek is. Az utóbbi esetben a selegiline nem csupán a MAO-B enzim gátlószere, de egyben szubsztrátja is az FMO enzimnek. A selegiline metabolizmusára vonatkozó ismeretek jó összefoglalását mutatja a 2010-ben megjelent '*R-Deprenyl: Pharmacological spectrum of its activity*' című dolgozatunk (Magyar et al., Neurochem Res. 35(12):1922-1932, 2010).

A selegiline metabolitjai közül három vegyület rendelkezik N-propargyl csoporttal: az alapvegyület a selegiline, a desmethyl-selegiline (DD) és a

selegiline-N-oxid (DNO). Ezek szerkezeti tulajdonságaik alapján potenciálisan neuroprotektív tulajdonságúak lehetnek. Melanoma A-2058 típusú sejteken vizsgáltuk a három vegyület hatását az L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) glutathion depletáló toxin károsító hatására. A propargylamine típusú vegyületek különböző mértékben gátolják a BSO által kiváltott toxicitást. Az eredményt a 2. táblázat szemlélteti, a részeredményeket a 2010-ben megjelent dolgozatunk összegzi (Szende B, Barna G, Magyar K: *Cytoprotective effect of (-)-deprenyl, (-)-desmethyl-deprenyl and (-)-deprenyl-N-oxide on glutathione depleted A-2058 melanoma cells*. J Neural Transm. 117:695-698, 2010).

2. táblázat: A D, DD és a DNO hatása BSO kezelt, szérum megvonásos A-2058 melanóma sejt kultúrán az élő és a mitotikus sejtek arányára.

kezelés	élő sejtek aránya (%)	mitotikus sejtek aránya (%)
kontroll	100 (±3)	100 (±2)
BSO	50.2 (±1)*	55 (±1)*
D	63.1 (±2)*	57 (±1)*
DD	67.5 (±3)*	62 (±1)*
DNO	107.3 (±4) <sup># □</sup>	143 (±4) <sup>◆</sup>

\* =  $p < 0.001$  vs kontroll

# = ns vs kontroll

□ =  $p < 0.001$  vs BSO, D, DD

◆ =  $p < 0.001$  vs kontroll, BSO, D, DD

Az élősejtek aránya a kontrollhoz viszonyítva BSO jelenlétében mintegy felére csökkent, míg a DD és a selegiline az élősejtek arányát kismértékben, a DNO jelentősen növelte. A DNO különösen a mitotikus sejtek arányát emelte. Összegezve, a DNO kezelés stabilizálta az élősejtek arányát azáltal, hogy ugyan gyengén gátolta az apoptózist, de jelentősen növelte a mitotikus sejtek arányát a kontroll szinthez viszonyítva.

A DNO képződés esetében a vegyület tercier aminja kvaternerizálódik és új királis centrum alakul ki a molekulán. A citoprotektív hatás a selegiline esetében stereoszelektív jellegű, vagyis csak a balra forgató deprenyl, a selegiline rendelkezik antiapoptotikus hatással. Említésre érdemes, hogy mostanság a terápiába bevezetett rasagiline (Azilect) mindkét optikai izomerje hatásosan

gátolja az apoptózist. A DNO esetében két stereo-centrummal és négy diastereo-izomerrel rendelkezünk. Ha a selegilinből indul a szintézis, úgy két diastereo-izomer keletkezik. A farmakológiailag hatásos (neuroprotektív) stereo-izomerek farmakológiai vizsgálata még hátra van. A DNO optikai izomerjeinek szintézisét Dr. Fülöp Ferenc akadémikus, a Szegedi Egyetem Gyógyszerésztudományi Karának Technológiai Intézetében végezte. Figyelembe veendő, hogy az N-oxidok retro-redukcióval visszaalakulhatnak az eredeti vegyületté, ami befolyásolja az N-oxidok szerkezetbeni sorsát.

A selegiline neuroprotektív hatásának dózis-hatásgörbéje harang alakú. A  $10^{-7}$ M-nál magasabb koncentrációk pro-apoptotikus hatásúak, míg a  $10^{-9}$ - $10^{-13}$ M-ban antiapoptotikus hatást váltanak ki. A neuroprotektív hatás tehát koncentrációfüggő. A selegiline olyan koncentrációban neuroprotektív, melyben MAO bénító hatással már nem rendelkezik. A bifázisos jellegű antiapoptotikus - pro-apoptotikus hatás jellege miatt fennállhat annak a lehetősége, pld. túlzérékenység esetén, hogy a vegyület ahelyett, hogy gátolná, növeli az apoptózis mértékét. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a DNO magas koncentrációban sem indukál apoptózist, viszont antiapoptotikus tulajdonsága megmarad. A DNO reményt keltő vegyület lehetne, mint antiapoptotikus hatású struktúra a Parkinson kór megelőzésére, vagy korai gyógyítására.

A túlzott optimizmus azonban a kísérletek jelen fázisában még nem indokolt. Hátravannak még az *in vivo* kísérletek, valamint a neuroprotektív hatás több típusú szövetkultúrán végzendő vizsgálatai.

## **I/2. A selegiline 'first pass' metabolizmusa**

Bizonyítottuk patkánykísérletekben, hogy a selegilin per os beadása után mintegy 75%-a a gyomor-béltraktusban metabolizálódik és mintegy 20-25%-a jut be változatlanul a szisztémás keringésbe. Mások humán vizsgálatokban az előbbtől nagyobb mértékű (95%) 'first pass' metabolizmust írtak le. A parenterális beadási módok közül az igazán hatékony szubkután, intraperitoneális, intravénás beadási módok – különösen krónikus kezelés során – nem

alkalmazhatók. Egy jó hatásfokú parenterális (transzdermális), a beteg számára kényelmes beadási mód kimunkálása számos előnnyel rendelkezne. Nem csupán növekedne a felszívódás hatásfoka, hanem a MAO enzim heterogén természetéből és egyenlőtlen eloszlásából adódóan, pld. a központi idegrendszerben olyan magas selegiline koncentráció jöhetne létre, ami a ma szokásos orális dózissnál (10mg/nap) nem specifikusan gátolná a MAO-A enzimet is. Ennek következtében növekedne a selegiline antidepresszív hatása. Ugyanakkor a gyomor-béltraktusban a MAO enzim kisebb mértékű gátlása lehetővé tenné a táplálékkal bejutó biogén aminok metabolikus hatástalanítását. Ennek gyakorlati kivitelezhetőségére szolgál a 3. táblázat.

3. táblázat. A selegiline MAO bénító hatása patkánykísérletekben per os és szubkután adagolás után.

MAO	selegiline			
	per os		subcutan	
	0.5 mg/kg	5 mg/kg	0.5 mg/kg	5 mg/kg
az agy MAO gátlása %-ban				
MAO-B	45.47	92.08	93.75	98.95
MAO-A	5.05	17.99	0.01	84.87
a máj MAO gátlása %-ban				
MAO-B	45.52	92.04	43.06	91.23
MAO-A	24.48	31.59	19.32	33.83
a bél MAO gátlása %-ban				
MAO-B	68.55	84.92	68.29	80.31
MAO-A	36.49	84.13	24.67	61.49

a patkányok kezelése 5 napon keresztül, naponta 0,5 illetve 5,0 mg/kg dózissal az állatok dekapitálása két órával az utolsó kezelés után  
szubsztrátok: MAO-A: 5-HT; MAO-B: PEA

### I/3. A selegiline hatása a periférián

Bár a kísérletek elsősorban a selegiline központi idegrendszeri hatására irányultak, bizonyítottuk egy Ph.D. fokozat keretében végzett tudományos

munkában, hogy a selegiline növeli a sejtek adhézióját PC12 és NIH3T3 sejttenyészetben. A PC12 központi idegrendszeri, az NIH3T3 perifériás modellként került alkalmazásra. Ehhez a selegiline MAO-B gátló koncentrációi szükségesek (Magyar et al., Neurochem Res. 35(12):1922-1932, 2010).

A Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetével (SE) kollaborációban tanulmányozzuk, elsősorban daganatsejtek (leukémia) ősi szabályozó rendszerét, az adhéziót, a kemotaxist és a sejt proliferációt (citotoxicitás), valamint a deprenyl, a deprenyl metabolitok és néhány szintetikus kémiai struktúra hatását ezekre a folyamatokra. Első dolgozatunk Dr. Kőhidai László és munkatársai közreműködésével 80%-os készültségi szinten áll.

**I/4. A selegiline hatása a teljes antioxidáns kapacitásra és a máj zsírtartalmára magas zsírtartalmú tápon tartott patkányokban.**

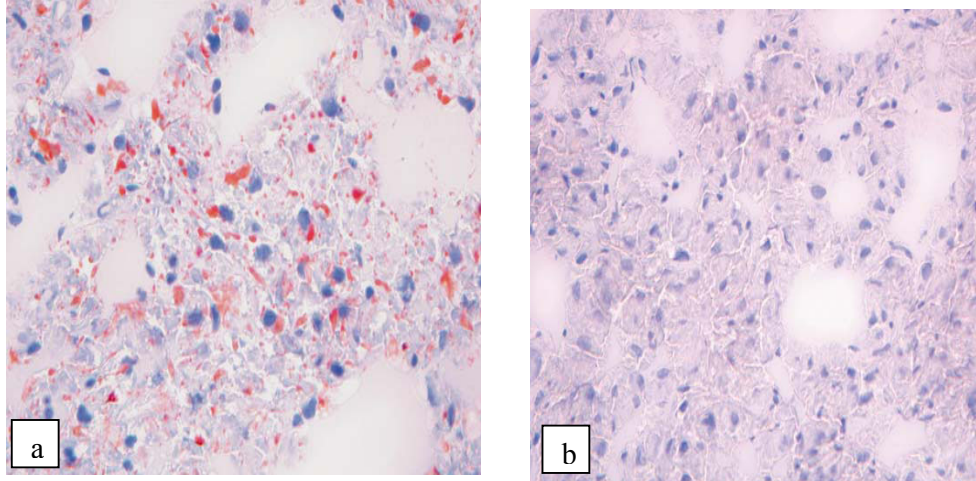
A patkányok négy csoportjában: kontroll, magas zsírtartalmú táp és normál, illetve selegiline tartalmú csapvíz itatása mellett, vizsgáltuk a selegiline hatását az antioxidáns kapacitásra és a máj zsírtartalmára. Szövetteni vizsgálatokkal határoztuk meg a máj zsírtartalmát és kémiai módszerekkel az antioxidáns kapacitás mértékét. A kísérlet időtartama 28 nap volt; kivitelezését a II. Belgyógyászat Klinikán (SE) Dr. Békési Gábor vezette. Az eredményt a 4. táblázat, valamint a J. Neural. Transm. folyóiratba közlésre benyújtott dolgozatunk tartalmazza.

4. táblázat: A selegiline hatása a teljes antioxidáns kapacitásra

táp	ital	0. nap ( $\pm$ SD)	28. nap ( $\pm$ SD)
magas zsírtartalom	csapvíz	0.257 $\pm$ 0.148	0.625 $\pm$ 0.911
normál táp	csapvíz	0.140 $\pm$ 0.039	0.188 $\pm$ 0.140
magas zsírtartalom	selegiline+ csapvíz	0.207 $\pm$ 0.075	0.073 $\pm$ 0.049
normál táp	selegiline+ csapvíz	0.221 $\pm$ 0.082	0.111 $\pm$ 0.045

Mint a táblázatban látható, a selegiline növelte a teljes antioxidáns kapacitást. Szövetteni vizsgálatokkal Sudan festéssel elemezve kimutattuk, hogy

kivédte a magas zsírtartalmú tápon tartott patkányok májának elzsírosodását. Nem ismerünk a deprenyillel kapcsolatosan hasonló jellegű adatokat az irodalomban.



patkánymáj, Sudan festéssel; nagyítás: 50-szeres  
magas zsírtartalmú diéta (a); magas zsírtartalmú diéta + selegiline (b)

Mérlegelve a társadalomban előforduló betegségek (alkoholizmus, elhízás, diabétesz) gyakoriságát, kísérleteink értékes irányvonalat nyithatnak meg.

## II. Az SSAO-val végzett kutatások

### II/1. A benzilamin, az exogén SSAO szubsztrát inzulin-szerű hatásának vizsgálata dyslipidaemiás, elhízásos és diabéteszes állatmodelleken

Vizsgálatainkban a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A benzilamin (BZA; exogén SSAO szubsztrát), inzulinszerű hatása kimutatható-e a különböző diabétesz állatmodelleken?
- A BZA vércukor szintre illetve glükóz toleranciára kifejtett hatása mellett súlyosbítja-e az oxidatív stresszt, illetve növeli-e a nitrogén monoxidból (NO) keletkező citotoxikus termékek koncentrációját?

Az 1-es típusú diabéteszt streptozotocin egyszeri *ip.* beadásával hoztuk létre patkányokban. A 2-es típusú diabéteszre és az elhízásra kétféle állatmodellt használtunk: az egyikben magas zsírtartalmú étrenddel hoztuk létre a

hyperglükémiát és az inzulin rezisztenciát; a másikon genetikai modellt, homozigóta db génhányos állatokat használtunk. Mértük az állatok vércukorszintjét, a glükóz toleranciát, a kezelés hatását a lipolízisre, a testsúly, a táplálék- és vízfogyasztás változásait és még számos biokémiai paramétert a plazmában. Az endothel-diszfunkcióra, a NO megváltozott metabolizmusára a kísérletek végén az állatok aortájában mért nitrit és nitrát meghatározásával nyerünk adatokat.

Az orális BZA kezelés a magas zsírtartalmú diétán tartott állatokban javította a glükóz-toleranciát, vagyis a beadott glükóz nagyobb része került szöveti felvételre, amit a glükóz kisebb vérszint görbe alatti területe (AUC) mutat *ip.* beadás után. A BZA csökkentette továbbá az éhomi vércukorszintet, a testsúlyt és a magas koleszterin szintet anélkül, hogy túlzott oxidatív stresszt okozott volna. A BZA kezelt állatok aortájában mért magasabb nitrit koncentráció a NO mennyiségének növekedésére utal, ami lehet fokozott termelésének, vagy csökkent metabolizmusnak is az eredménye. A BZA kezelésnek tehát nem volt negatív hatása a NO biológiai értékesíthetőségére az aortában.

A homozigóta db génhányos egerekben az orális BZA kezelés késleltette a hyperglükémia kialakulását. A génhányos állatokban a normál heterozigóta állatokhoz képest jelentősen magasabb mind a táplálék, mind a folyadékfelvétel és ez a kezelés hatására csökkent. Az SSAO szubsztrát inzulinszerű hatására utal az is, hogy a kezelés a génhányos állatokban testsúlygyarapodást eredményezett, ami összhangban van a benzilaminnak a zsírsejtek inzulin-rezisztenciáját javító hatásával. A BZA kezelt állatokból nyert zsírszövetben az inzulin jelentősebben gátolta az izoprenalinnal indukált lipolízist. A BZA kezelés glükóz homeosztázisra gyakorolt kedvező hatása mellett az aortában mért nitrit szint is emelkedett, ami a NO hasznosíthatóságának javulására utal. Az 1-es típusú diabéteszes modellen is hasonló hatásokat tapasztaltunk.

Az elhízásos és diabéteszes rágszálómodelleken kapott eredményeink megerősítették a BZA-kezelés kedvező hatását a szénhidrát- és zsíryanycserére, ugyanakkor nem tapasztaltuk a kezelés kedvezőtlen hatását a NO hasznosíthatóságára az aortában, sőt eredményeink szerint az inkább javult.



Eredményeink alapján az SSAO-szubsztrát aminok ez irányú hatásainak vizsgálata további figyelmet érdemel annál is inkább, mert az elhízás és a következtében kialakuló inzulin rezisztencia egyre több embert érint, lassan járványos méreteket ölt. Jelentős egészségügyi probléma, mert számos betegség, így kardiovaszkuláris- és májbetegségek, bizonyos rákbetegségek, valamint az Alzheimer-kór kialakulása szempontjából fokozott kockázatot jelent.

## **II/2. Citodegeneratív és citoprotektív folyamatok vizsgálata**

### ***II/2a. A sejtkárosodás in vitro vizsgálata***

Neurodegeneratív betegségek során az idegsejtek pusztulása elsődlegesen apoptózissal történik, melynek kiváltásában számos tényező játszik szerepet, mint a trófikus faktorok hiánya, a mitokondriumok energiatermelő funkciójának károsodása, az oxidatív stressz és az excitotoxicitás.

Mivel a transzformált sejteket tartalmazó sejtvonalakban a túlélést és sejthalált szabályozó folyamatok eltérnek a normál sejtektől, vizsgálatunkhoz primer fibroblaszt sejt kultúrát használtunk. A sejtkárosodás egyes lépéseinek nyomon követésére számos biokémiai mérési módszert állítottunk be; fluoreszcens technikával vizsgáltuk a mitokondriumok membránpotenciálját, a sejtek szabadgyök-termelését és az apoptózis kivitelezésében központi szerepet játszó kaszpáz-3 enzim aktivitását. A sejtek életképességét propídium-jodid és XTT festéssel vizsgáltuk. A sejtkárosodást szérummegvonással váltottuk ki.

A sejtek életképességének meghatározására irányuló módszerek beállításával az volt az elképzelésünk, hogy távlatilag a témakörben egy jól működő laboratórium alakuljon ki. A módszerek zömét Ph.D. disszertációján dolgozó tehetséges fiatal végezte. Sajnos számos objektív akadály nehezítette az eredeti terv teljes végrehajtását, így a módszerek beállítási szintjén fejeződött be a munka a pályázat időtartama alatt. 2011-ben a Ph.D.-s fiatal munkahelyet változtatott.

***II/2b. Az excitátoros aminosavak meghatározása agyi mikrodializátumban***

A glutamát és az aszpartát a központi idegrendszer regulációjában meghatározó szerepet játszik, de túlzott mértékű felszabadulásuk excitotoxicitást vált ki. A központi idegrendszert érintő ingerek hatására optimális koncentrációjuk jelentősen megváltozhat, neurotoxikus vagy neuroprotektív hatás irányába. Kapilláris elektroforézis módszert dolgoztunk ki a glutamát és aszpartát transzmitterek kvantitatív meghatározására agyi mikrodializátumból. A megfelelő érzékenységet a lézer-indukálta fluoreszcens detektálás biztosítja. A módszer érzékenységének és robusztusságának meghatározására több származékképzőt hasonlítottunk össze. Jelenleg a módszerek közül az optimális kiválasztása történik.

**II/3. A szérum SSAO aktivitás változása Parkinson kóros betegek Sinemettel történő kezelése során.**

A szemikarbazid-szenzitív aminoxidáz (SSAO) enzim kémiai szerkezetéről, az enzimfehérje aminosav összetételéről és sorrendjéről szinte teljes információval rendelkezünk, de a fiziológiai, vagy a különböző betegségek pathomechanizmusában játszott szerepéről alig állnak adatok rendelkezésünkre. A Parkinson kóros betegek levodopa kezelése a betegség leghatékonyabb terápiáját jelenti, különösen perifériás dekarboxiláz gátlóval (carbidopa, benserazid) együttadva. Ilyenkor hosszantartó lényeges javulást érhető el a betegek állapotában. A Sinemet (kombinált gyógyszer) egyik hatóanyaga a carbidopa, mely jelentős SSAO gátló hatással is rendelkezik. Frissen diagnosztizált parkinsonos betegek Sinemettel történő kezelésekor azt tapasztaltuk, hogy az enzim 70-80%-os gátoltsága mellett egyensúlyi állapot jön létre. A világszerte nagyszámú kezelt beteg ellenére nem ismerjük, hogy az SSAO gátlásának van-e szerepe akárcsak a Parkinson kór terápiájában, vagy a kísérő betegségekre más co-morbid állapotokban. Tizennyolc Sinemettel kezelt beteg vérében követtük a naponta adagolt carbidopa enzimgátló hatását. A kezelés abbahagyása akár 1-2

napra, jelentős enzimregenerációval jár. A részletekről készülõben lévõ dolgozatunkban számolunk be. A munka a SE Neurológiai Klinikájával kollaborációban történt. A betegek kezelését Dr. Takáts Annamária végezte. Értékes információt adhatna a tartósan Sinemettel kezelt betegek kórelõzményének retrográd analízise is.