

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).

Aminoszázok		
	MAO	SSAO
elsődleges szerepük	a ciklikus transzmitter aminok semlegesítése	az alifás endogén aminok hatástalanítása
szubsztrátok	primer, szekunder, terciér 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) ^{# □}	143 (±4) [◆]

* = $p < 0.001$ 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 dózissal (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.

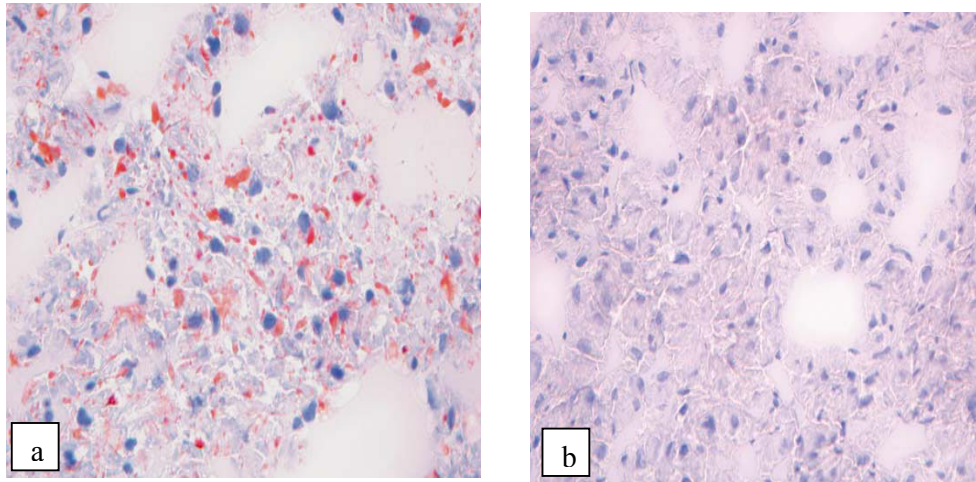
A patkányok négy csoportjában: kontroll, magas zsírtartalmú táp és normál, illetve selegiline tartalmú csapvíz itatása mellett, vizsgáltuk a selegiline hatását az antioxidáns kapacitásra és a máj zsírtartalmára. Szövetteni vizsgálatokkal határoztuk meg a máj zsírtartalmát és kémiai módszerekkel az antioxidáns 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.