

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Farmakognóziai Intézet

Bioaktív oxidált hidroxifahéjsav-származékok előállítása

Doktori értekezés tézisei

dr. Fási Laura

Szeged

2021

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Farmakognózia Ph.D. program
Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit D.Sc.

Farmakognóziai Intézet

Témavezető:

Dr. Hunyadi Attila Ph.D.

Társ-témavezető:

Prof. Dr. Chang Fang-Rong

Bioaktív oxidált hidroxi-fahéjsav származékok előállítása

Doktori értekezés tézisei

dr. Fási Laura

Szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Máthé Imre D.Sc.

Tagok: Dr. Ilisz István Ph.D., Dr. Horváth Györgyi Ph.D.

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Révész Piroska D.Sc.

Opponensek: Dr. Kursinszki László Ph.D., Dr. Szatmári István Ph.D.

Tag: Dr. Janicsák Gábor Ph.D.

Titkár: Dr. Szakonyi Gerda Ph.D.

Szeged

2021

Bevezetés

A hidroxifahéjsavak, mint a fenolos savak egyik fő csoportja, elterjedt másodlagos növényi anyagcseretermékek. Ezek a vegyületek széles körben előforduló étrendi antioxidánsok, amelyek megtalálhatók gyümölcsökben, gabonafélékben, zöldségekben, fűszerekben, diófélékben és italokban, mint például teában, kávéban és borban.

A hidroxifahéjsavak alapváza egy fenilpropanoid szerkezet, amely kilenc szénatomból (C₆C₃) áll. A hidroxifahéjsavak leggyakoribb képviselői a *p*-kumársav, kávé-, ferula- és szinapinsav. A természetben előfordulhatnak szabad formájukban vagy észterekként, vagy bonyolultabb származékokat is képezhetnek, mint például dimereket, trimereket stb.

Az utóbbi néhány évtized során az antioxidánsok egyre növekvő tudományos érdeklődést váltottak ki, köszönhetően változatos, vélhetőleg jótékony élettani hatásaiknak és az étrendi növényekben való bőséges előfordulásuknak. Az antioxidánsok képesek befogni, ill. semlegesíteni a reaktív oxigén és nitrogén fajtákat (ROS, RNS), és ebből a kölcsönhatásból lehetséges bioaktív metabolitok is keletkezhetnek. A biomimetikus oxidatív kémiai reakciók a ROS és RNS befogás releváns modelljeinek tekinthetők, ezáltal értékes eszközkészletet kínálnak az ilyen metabolitok felfedezéséhez.

Számos korábbi tanulmány készült a hidroxifahéjsavak biomimetikus oxidatív átalakításairól. Példaként említve, amikor fahéjsavak észter-származékait katalitikus mennyiségű ezüst-oxid (Ag₂O) jelenlétében oxidálták, dihidrobenzofurán lignánok keletkeztek, amelyek erős tumorellenes aktivitással rendelkeztek, mint például antiproliferatív hatás, antiangiogén és antitubulin aktivitás.

Kutatócsoportunk korábban beszámolt a protoapigenon egy egyszerű és gyors félszintéziséről apigeninből egy hipervalens jódreagenssel, PIFA-val. A PIFA szintén „biomimetikus-szerű” -nek tekinthető, mivel egyelektron transzfer révén képes oxidálni fenolos vegyületet, amely természetes antioxidánsok, így hidroxifahéjsav származékok szabadgyök-befogási reakcióinak egyik fontos mechanizmusa.

Antioxidánsokból ROS és RNS befogás során képződő metabolitok bizonyos esetekben erősebb bioaktivitásokkal rendelkezhetnek, mint a kiindulási vegyületeik.

Ezen doktori munka célja a hidroxifahéjsav metabolitok szabadgyök-fogás során való képződésének vizsgálata volt különböző oxidatív kémiai megközelítések alkalmazásával, és ígéretes bioaktivitással rendelkező vegyületek felfedezése.

Célkitűzések

Jelen disszertáció tárgyát képező Ph.D. munka céljaiként a következőket tűztük ki:

- 1. Fél szintetikus oxidált hidroxifahéjsav-származékok előállítása.** A hidroxifahéjsav metabolitok keletkezését különböző biomimetikus és biológiai ihletésű oxidálószerekkel való reakciókban vizsgáltuk, pl.: hipervalens jódvegyületekkel (PIFA, PIDA), AAPH-val és peroxinitrittel.
- 2. Az izolált oxidált hidroxifahéjsav származékok biológiai hatásvizsgálata.** Az oxidált metabolitok bioaktivitását a kiindulási vegyületükkel összevetve kutatási együttműködések keretében terveztük vizsgálni.
- 3. Hidroxifahéjsav metabolitok bioreleváns környezetben való keletkezésének vizsgálata.** Az azonosított metabolitok hidroxifahéjsavakból szabadgyökfogással való lehetséges keletkezését különböző *in vitro* és *in silico* technikákkal tanulmányoztuk.

Anyagok és módszerek

Kiindulási vegyületek: A kávéssavat, a *para*-kumársavat, *p*-kumársav metilésztert, az AAPH-t valamint a hipervalens jódvegyületet, a PIFA-t (Bisz [trifluor-acetoxi]-jód)-benzol) és a PIDA-t (Diacetoxi-jód)-benzol) a Sigma Aldrich-tól (München, Németország) vásároltuk.

Kromatográfiai tisztítási eljárások: A különböző oxidált metabolitokat kombinált kromatográfiai módszerekkel; fordított fázisú Flash kromatográfias, és/vagy fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (RP-HPLC), illetve szuperkritikus folyadékkromatográfias (SFC) módszerekkel tisztítottuk meg.

Szerkezet-meghatározási módszerek: A kapott vegyületek kémiai szerkezetét többféle spektroszkópiai módszerrel, 1D és 2D-NMR, HR-MS, és MS-MS segítségével derítettük fel.

Oxidált fahéjsav-származékok biológiai hatásvizsgálatai: Az előállított *p*-kumársav metilészter (**pcm**) származékok bioaktivitását kutatási együttműködésben vizsgáltuk. Az *in vitro* citotoxikus aktivitást MTT módszerrel vizsgáltuk egy egér T-sejt limfóma sejtvonalon (L5178) és annak pHa MDR1/A retrovírussal transzfektált, multidrog rezisztens párján (L5178_{B1}). Két metabolit citotoxikus aktivitását különféle humán rákos sejtvonalakon is vizsgáltuk. Ezek a következők tumor típusokat jelenítették meg: onkológiai (HeLa, SiHa, MCF-7), tüdőkarcinóma (egy erősen áttétképző nagysejtes tüdőkarcinóma sejtvonal, NCI-661, egy nem-kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonal, NCI-H460 és ennek 3 hónapos doxorubicines adaptációval nyert multidrog rezisztens párja, NCI-H460/R), és egy adenokarcinóma (A549). Az IC₅₀

értékeket GraphPad Prism segítségével számoltuk ki, nemlineáris regressziós analízis alkalmazásával.

Vizsgáltuk a fent említett két metabolit által kiváltott sejthalál típusát is humán tüdőkarcinóma sejtvonalakon (NCI-H460, NCI-H460/R, A549, NCI-H661) és normál humán keratinocitákon (HaCaT). Az apoptotikus, nekrotikus és élő sejtek százalékos meghatározására AV/PI jelöléses módszert használtunk.

E két vegyület DNS károsító hatását Hiszton 2A.X relatív expressziós módszerrel vizsgáltuk, a reaktív oxigéngyök (ROS) szintekre kifejtett hatásukat pedig dihidroetídium fluoreszcencia szerint detektáltuk, és áramlási citométerrel mértük.

A *p*-kumársav metilészter (**pcm**) és a leghatásosabb származéka (gravikinin) DNS károsodásra adott válasza kifejtett hatását Western blot technikával vizsgáltuk UV besugárzást (10 J/m^2) követően MCF-7 sejteken. A képeket lumineszcens képelemző rendszerrel rögzítettük.

A kávésav metilészter (**cm**) és oxidált származékának citotoxikus aktivitását humán adherens nőgyógyászati daganatos sejtvonalakon; HeLa, SiHa, MCF-7, MDA-MB-231 vizsgáltuk, MTT módszer segítségével.

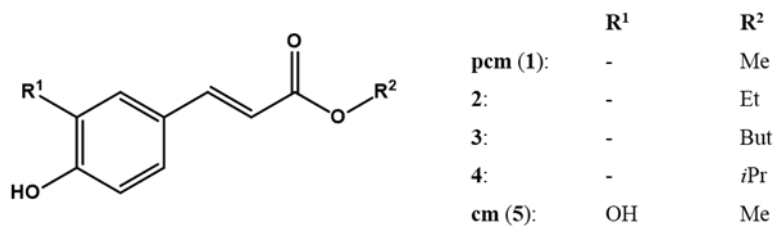
A kávésav metilészter (**cm**) citotoxikus aktivitását egy oxidatív stressz-indukáló anyag, tercier-butyl-hidroperoxid (*t*-BHP) jelenlétében vagy anélkül is megvizsgáltuk, MTT módszerrel. A sejteket 24 órás előkezelésnek vetettük alá, tisztán médiummal, vagy olyannal, amely $1/3 \text{ IC}_{50}^{(72\text{h})}$ vagy $\text{IC}_{50}^{(72\text{h})}$ koncentrációban tartalmazott *t*-BHP-t.

In silico vizsgálati módszerek: A sűrűségfüggő elméleti számításokat Gaussian 09-es (Rev. A) csomaggal végeztük kutatási együttműködés keretein belül. A Mulliken spin sűrűség megjelenítés VMD program segítségével történt.

Eredmények és értékelésük

Hidroxifahéjsav-észterek, mint kiindulási vegyületek előállítása

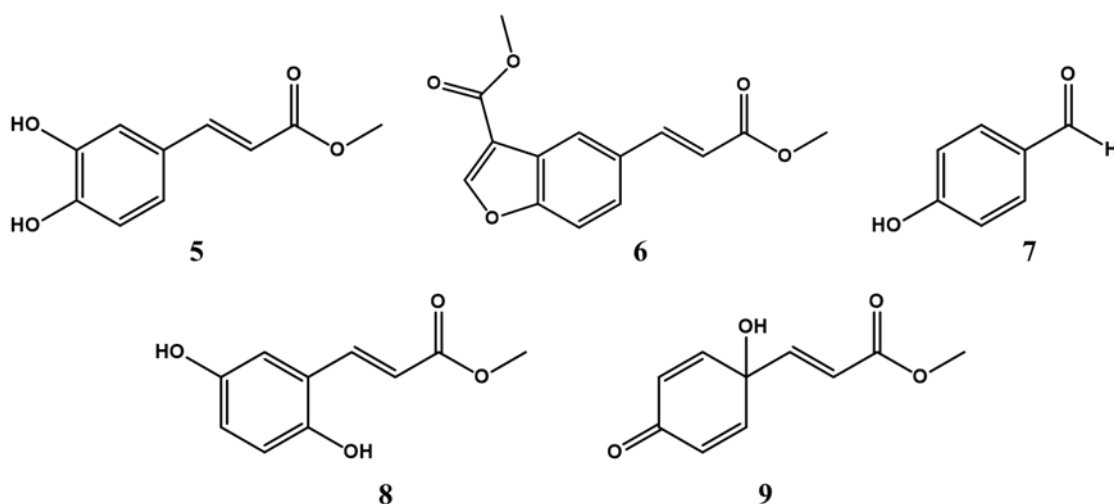
A bomlás és a savfunkcióhoz köthető lehetséges kromatográfiai kihívások elkerülése érdekében a hidroxifahéjsavakból észterszármazékokat állítottunk elő, és ezeket használtuk az oxidációs reakciók során. Előállítottuk a *p*-kumársav metil-, etil-, butil- és izopropil-észtereit (**1-4**) Fisher-észterezéssel, valamint a kávésav metilészterét (**5**) Dowex kationcserélő gyanta segítségével. Az **1-5** vegyületeket kiindulási anyagokként használtuk a reakcióinkban; szerkezetüket az 1. ábra mutatja be. A *p*-kumársav metilészter (**1**) esetében a **pcm**, a kávésav metilészter (**5**) esetében a **cm** rövidítéseket használtuk a könnyebb áttekinthetőség érdekében.



1. ábra: Hidroxifahéjsav észterek előállítása.

A *p*-kumársav metilészter oxidációja

Vizsgáltuk különböző oxidációs körülmények hatását a **pcm** citotoxikus aktivitására, annak eldöntésére, hogy vajon keletkezhetnek-e a *p*-kumársav metilésztertől hatásosabb vegyületek. Előállítottunk egy sorozat reakciókeveréket a **pcm** hipervalens jód (III) reagenssel, PIFA-val való oxidációjával acetonitrilben, acetonitril és víz (9:1, v/v) keverékében, metanolban, és metanol és víz (9:1, v/v) keverékében, valamint piridínium-klórkromáttal (PCC) diklórmetánban. A kapott termékelegyek (OX1-5) és a kiindulási vegyület, **pcm** citotoxikus aktivitását egér limfóma sejtvonalon (L5178 és L5178_{B1}) teszteltük. Az OX1 és OX2 keverékek megnövekedett citotoxikus aktivitást mutattak a **pcm**-hez képest, így ezeket a reakciókörülményeket választottuk a méretnövelt reakciókban való alkalmazáshoz. Összesen 5 oxidált metabolitot (**5-9**) izoláltunk a három méretnövelt reakcióból kombinált kromatográfiás eljárásokkal. Az oxidált **pcm** metabolitok szerkezeteit a 2. ábra mutatja be.



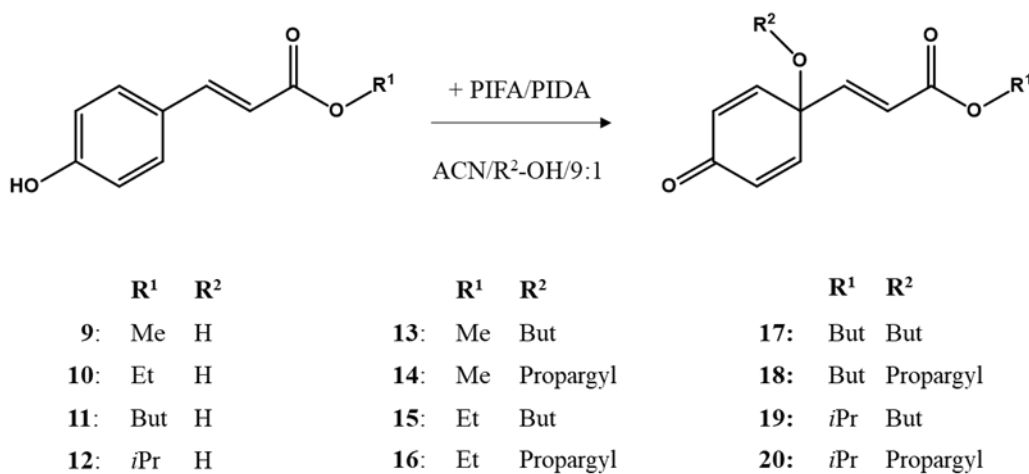
2. ábra: A **pcm** hipervalens jódvegyületekkel való reakciójából izolált oxidált metabolitjainak kémiai szerkezete.

A **6**-os vegyület keletkezése valószínű, hogy hasonlóan zajlik, mint a dihidrobenzofurán dimerek keletkezése, ahogy azt korábban leírták, amelyet egy fenol csoport eliminációja és a benzofurán váz kialakulása követ. A **8**-as vegyületben (metil-grevillát), amelyet korábban a

Grevillea robusta-ból A. CUNN és a *Murraya paniculata*-ból izoláltak, a hidroxilcsoport váratlan módon a *para* pozícióból a *meta* pozícióba vándorolt. A **9**-es vegyületet (gravikinin) először szintén a *G. robusta*-ból izolálták, amelynek *in vitro* citotoxikus hatását MCF-7, NCI-H460 és SF-268 sejtvonalakon publikálták.

Dearomatizált *p*-kumársav származékok, *p*-kinolok és *O*-alkil éterek előállítása hipervalens jódvegyületekkel

Kutatócsoportunk korábban egy sor tumorellenes 1'-*O*-alkil-protoflavon analógot állított elő, amelyek közül egy butil-éter származék erősebb aktivitást mutatott egyes daganatos sejtvonalakon (Hep3B, MCF-7 és MDA-MB-231), mint maga a protoapigenon. Megfontolva ezeket a kedvező eredményeket, valamint a **9**-es vegyület erős tumorellenes hatását, egy sor *p*-kinol és *O*-alkil származékot állítottunk elő *p*-kumársav észterekből hipervalens jódvegyületekkel (PIFA, PIDA) acetonitril és víz keverékében (9:1, v/v), vagy acetonitril és *n*-butanol vagy propargil-alkohol keverékében (9:1, v/v). A 4 nem-szubsztituált *p*-kinol (**9-12**), valamint a 4-4 *O*-szubsztituált butil- és propargil-éter analóg (**13-20**) szerkezetét a 3. ábra mutatja be.

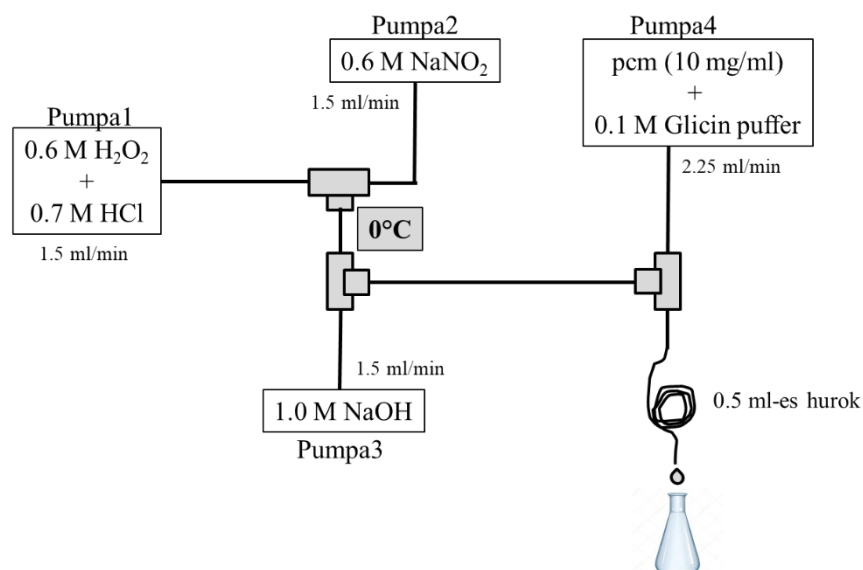


3. ábra: *p*-Kumársav észterek oxidatív dearomatizálása hipervalens jódvegyületekkel *p*-kinolokat vagy étereket eredményez

Peroxinitrit- és AAPH-oxidált hidroxifahéjsav származékok előállítása

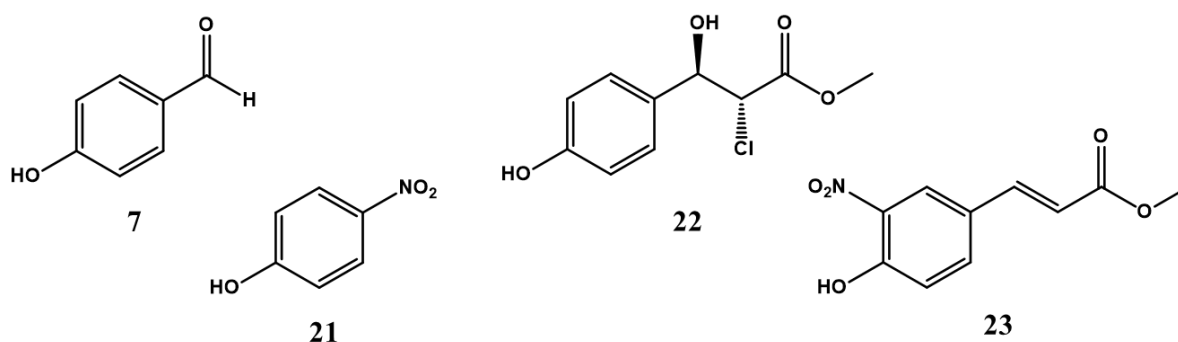
Fahéjsav metilészterek *in situ* folyamatos áramú oxidációja peroxinitrittel

Először egy folyamatos áramú reakció (CFR) rendszert állítottunk fel, melyben a peroxinitrit (ONOO⁻) előállítható *in situ* nitritből és hidrogén-peroxidból egy korábban leírt módszerhez hasonlóan. Az így előállított peroxinitritet reagáltattuk HCA észterekkel (**pcm** vagy **cm**); a reakciót a CFR rendszerben egy sematikus ábrán mutatjuk be a 4. ábrán.



4. ábra: A CFR rendszer kísérleti felépítése

Ezzel a módszerrel a **pcm** 4 oxidált termékét (**7**, **21-23**) állítottuk elő és tisztítottuk preparatív HPLC-vel, amelynek szerkezeteit az 5. ábra mutatja be.



5. ábra: A **pcm** peroxinitrit-oxidált metabolitjainak (**7**, **21-23**) szerkezete. A racém **22**-es vegyületnek csak egy enantiomerjét mutatjuk az érthetőség kedvéért.

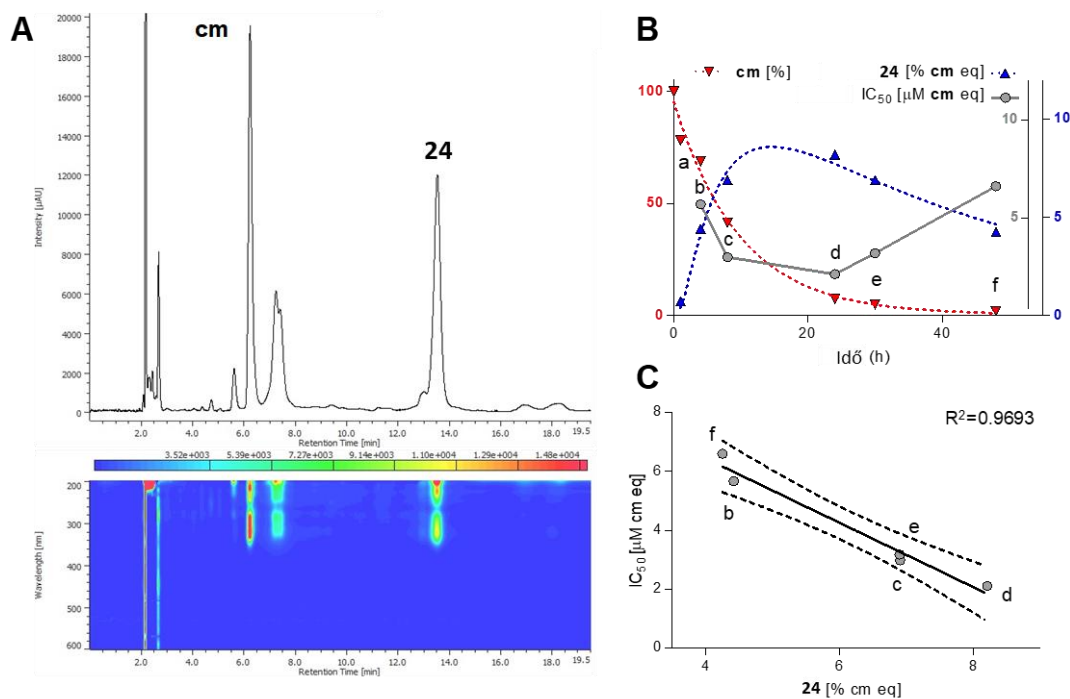
A **7**-es vegyületet, azaz a *p*-hidroxi-benzaldehidet szintén megkaptuk itt is, hasonlóan a **pcm** PIFA-val vagy $\cdot\text{OH}$ gyökkel való reakciójához. A **21**-es vegyület (*p*-nitrofenol) keletkezése hasonló fragmentációval és azt követően az aromás gyűrűn végbemenő, peroxinitrittel való gyökös reakcióval magyarázható. A **22**-es vegyületről, amely egy váratlan termék, elsőként számoltunk be. A **pcm** egy reaktív köztitermékéből képződhetett másodlagos reakcióban, a *transz*-olefin oxidációján keresztül, kloridionnal reagálva, amely az ONOO^- előállításából származó szennyező. A **23**-as vegyület képződése, hasonlóan a **21**-es vegyülethez, mutatja, hogy irreverzibilis szerkezeti változásként nitrálás is történhet, amikor egy kismolekulás antioxidáns ONOO^- gyököt fog be.

Peroxinitrit- vagy AAPH-oxidált nyers termékkeverékek előállítása bioaktivitás szűrésre

Megcélzottuk olyan ROS/RNS szabadgyökfogással keletkező oxidált tumorellenes hatású **pcm** vagy **cm** metabolitok előállítását, amelyek peroxinitrittel vagy AAPH-val való reakciókban keletkeznek. Minden egyes termékkeveréket előtisztítottunk és teszteltük citotoxikus aktivitásukat humán nőgyógyászati tumoros sejtvonalakon (HeLa, SiHa, MCF-7, MDA-MB-231). A **pcm** reakciókeverékei inaktívak voltak ebben a vizsgálatban, azonban a **cm** AAPH-val oxidált reakciókeveréke erős citotoxikus aktivitást mutatott, különösen HeLa sejtvonalon.

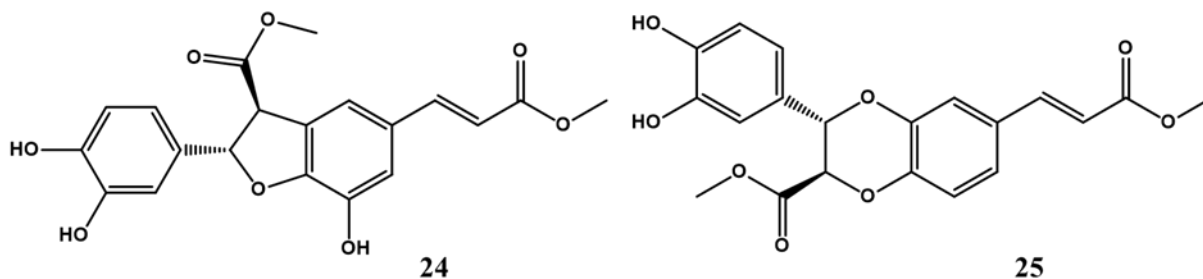
Longitudinális vizsgálat és AAPH-oxidált kávésav metilészter metabolitok bioaktivitás-vezérelt izolálása

A kávésav metilészter AAPH-val való oxidációját választottuk longitudinális vizsgálat elvégzésére, hogy megtaláljuk a legmegfelelőbb reakcióidőt a citotoxikus vegyület(ek) izolálására. Meghatározott időpontokban (a 0., 1., 4., 8., 24., 30. és 48. órában) mintákat vettünk a reakcióelegyből, s ezeket HPLC-vel, valamint SFC-vel elemeztük. Az analitikai mérésekkel párhuzamosan teszteltük a minták citotoxikus aktivitását HeLa sejtvonalon. Ahogy a kiindulási vegyület (**cm**) mennyisége csökkent és a termékek mennyiségei növekedtek, a citotoxikus aktivitás fokozatosan növekedett a 24. óráig, majd utána csökkent. A citotoxikus hatás korrelált az egyik termék (**24**) csúcsának görbe alatti területével. A vizsgálat legfontosabb eredményeit a 6. ábra összegzi.



6. ábra: A **cm** AAPH-val való reakciójának longitudinális vizsgálata. **(A)** A reakcióidő 24. órájában vett minta szuperkritikus folyadékkromatográfia-fotodióda sor (SFC-PDA) ujjlenyomata. **(B)** A reakció időfüggése és a minták (0. (t_0), 1. (a), 4. (b), 8. (c), 24. (d), 30. (e) és 48. (f) órában vett) IC_{50} értékei HeLa sejteken. **(C)** Lineáris korreláció a **24**-es vegyület relatív görbe alatti területe (AUC) és az IC_{50} értékek között. A regressziós vonal 95%-os konfidenciaintervalluma szaggatott vonallal van jelölve; az AUC-t %-ban adjuk meg a **cm**-hez viszonyítva t_0 -nál.

A 24 órás reakcióidőt választottuk ki méretnövelésre, hogy izolálhassuk a hatásos vegyület(ek)et, és egy bioaktivitás-vezérelt tisztítási stratégiát alkalmaztunk. Először a reakcióelegyet fő frakciókra választottuk szét HPLC-vel, és vizsgáltuk a citotoxikus aktivitásukat HeLa sejteken. A 3. frakcióból, amely ~80 %-os gátlást mutatott 1.8 μ M-os koncentrációban (**cm** ekvivalensben kifejezve), a **24**-es vegyületet nyertük HPLC segítségével. Az 5. frakcióból a **25**-ös vegyületet, mint fő komponenszt preparatív SFC-vel nyertük. A **24**-es és **25**-ös vegyületek szerkezeteit a 7. ábra illusztrálja.



7. ábra: A **cm** és AAPH közötti reakcióban keletkezett oxidált termékek (**24.**, **25.**) szerkezetei. Mindkét vegyületet racém formában nyertük ki; az egyszerűség kedvéért csak az egyik enantiomert ábrázoltuk.

Érdeemes kihangsúlyozni, hogy a **24**-es vegyület a **cm** peroxinitrittel való reakciójában is jelen volt.

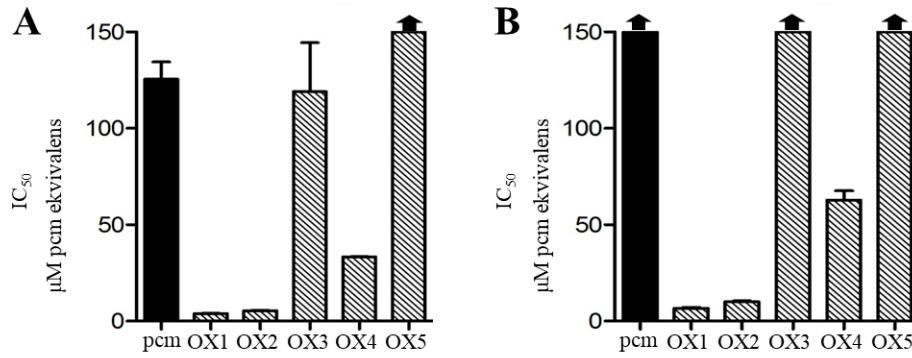
Az előállított oxidált hidroxifahéjsav-származékok biológiai hatásvizsgálata

Oxidált *p*-kumársav metilészter származékok tumorelles potenciálja

In vitro citotoxicitás

A *p*-kumársav metilészter (**pcm**) egy sor oxidált reakcióelegyét (OX1-5) előtisztítottuk és teszteltük a citotoxikus aktivitásukat egér limfóma sejtvonalon (L5178), és annak multidrog rezisztens párján (L5178_{B1}). Két termékkeverék, az OX1 és OX2-es emelkedett citotoxikus aktivitást mutatott **pcm**-mel összehasonlítva.

A **pcm** és méretnövelt reakciókból izolált oxidált származékainak (**5-9**) *in vitro* citotoxikus aktivitását szintén teszteltük az egér limfóma sejtvonal páron (L5178 és L5178_{B1}). Továbbá a **8**-as és **9**-es vegyületeket teszteltük egy sor különböző emberi rákos sejtvonalon (MCF-7, HeLa, SiHa, A549, NCI-H661), és egy gyógyszer-szenzitív/multidrog rezisztens kissejtes tüdő karcinóma sejtvonal páron is (NCI-H460 és NCI-H460/R). A citotoxicitás vizsgálatok eredményeit a 8-as ábra összegzi.



C

	IC ₅₀ ± SEM (µM)									
	L5178	L5178 _{B1}	NCI-H460	NCI-H460/R	A549	NCI-H661	HaCaT	MCF-7	HeLa	SiHa
pcm	125.60 ± 8.89	> 150	120.01 ± 2.14	1043.13 ± 59.36	322.92 ± 8.09	289.21 ± 8.42	311.22 ± 3.75	> 400	> 150	> 150
8	5.23 ± 0.29	12.38 ± 0.23	3.77 ± 0.07	7.05 ± 0.13	4.14 ± 0.09	4.19 ± 0.11	9.69 ± 0.18	-	8.51 ± 1.54	-
9	0.46 ± 0.09	0.62 ± 0.08	1.85 ± 0.03	2.06 ± 0.03	4.32 ± 0.09	1.44 ± 0.02	4.05 ± 0.10	6.22 ± 1.07	9.85 ± 1.03	8.89 ± 1.09
Dox	0.41 ± 0.07	11.83 ± 0.64	0.04 ± 0.01	1.89 ± 0.25	0.55 ± 0.16	0.35 ± 0.12	0.03 ± 0.01	1.08 ± 0.01	1.21 ± 0.05	0.76 ± 0.01

8. ábra: A pcm és oxidált metabolitkeverékeinek (OX1-5) citotoxicitás aktivitása egér limfóma sejtvonalon: L5178 (A) és L5178_{B1} (B). A pcm és izolált oxidált metabolitjainak (8, 9.) *in vitro* citotoxikus aktivitása (C). Az IC₅₀ értékek µM-ban vannak megadva átlag ±SEM értéként három párhuzamos kísérletből; Dox: doxorubicin. Az 5-7. vegyületek nincsenek a táblázatba foglalva; az egér limfóma sejtvonalonon mért >100 µM-os IC₅₀ értékek következtében.

Az MDR egér limfóma sejtvonalon 2,4-szeres keresztrezisztenciát mutatott a 8-as vegyülettel szemben, és kevesebb mint 2-szeres keresztrezisztenciát figyeltünk meg az NCI-H460/R sejtvonalonban. A 9-es vegyület képes volt megkerülni mindkét MDR sejtvonalon rezisztenciáját. Jó szelektivitást mutatott rákos sejtekkel szemben, összehasonlítva a hatását immortalizált humán keratinocitákon.

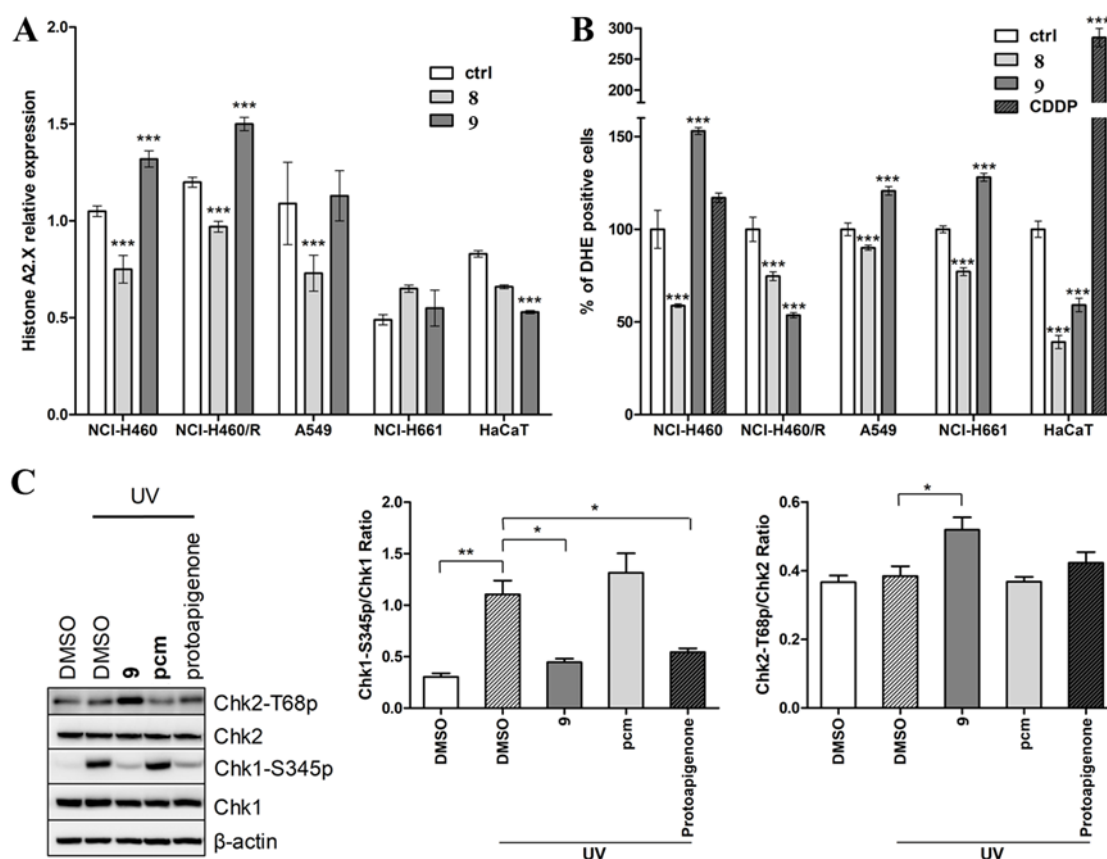
Sejthalál analízis

Meghatároztuk humán tüdőcarcinóma sejtvonalakban (NCI-H460, NCI-H460/R, A549, NCI-H661) és normál humán keratinocitákban (HaCaT) az apoptotikus, nekrotikus és élő sejtek százalékos arányait a 8-as és 9-es vegyületekkel való kezelést követően Annexin V/PI festés alkalmazásával. A tesztelt HCA metabolitok közül mindkettő előidézték celluláris nekrozist. A 9-es vegyület a késő apoptotikus NCI-H661 sejtek százalékos arányát 0,95 %-ról (kezeletlen kontroll) 9,57 %-ra (kezelt), a nekrotikus NCI-H661 sejtek százalékos arányát pedig 2,58 %-ról (kezeletlen kontroll) 44,82 %-ra (kezelt) csökkentette. A 9-es vegyület azonos dózissal

való kezelést követően az élő HaCaT sejtek százalékos aránya 91,50 % volt, mely a **9**-es vegyület tumorsejtek iránti szelektivitását sugallja.

DNS károsodás vizsgálatok

Miután tüdőrák sejt vonalakat kezeltünk a **8**-as vagy **9**-es vegyületekkel, vizsgáltuk a Hiszton 2A.X (H2A.X), mint DNS sérülés jelző expresszióját. A ROS termelődést dihidroetídium fluoreszcencia alapján detektáltuk. A **9**-es vegyület potenciális hatását a DNS sérülésre adott válaszmechanizmusokra Western-blot technikával végeztük MCF-7 sejteken UV besugárzást követően. A DNS károsodás vizsgálatok eredményeit a 9. ábra mutatja be.



9. ábra: DNS károsító hatás (A) és intracelluláris ROS termelődés (B) a **8**-as vagy **9**-es vegyülettel történő kezelés esetén. Mindkét analízist áramlási citometriával végeztük, az eredmények három független kísérlet átlagaként \pm s.d. vannak feltüntetve. ***: $p < 0.001$. CDDP: ciszplatin. A **9**-es vegyület hatása DNS sérülésre adott válaszokra (C). A pozitív kontroll protoapigenon volt. Az adatok három független kísérlet átlagát \pm SD reprezentálják; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

A **9**-es vegyület DNS sérülést indukált az NCI-H460 sejt vonal párban emelkedett H2A.X expresszió alapján, azonban a normál sejteket modellező HaCaT sejtekben kiváltott ellenkező hatás DNS protektív hatásra utal, amely az anyag rákos sejtekkel szembeni szelektivitására utal.

A **9**-es vegyület növelte a ROS szinteket A549, NCI-H460 és NCI-H661 sejtekben, de csökkentette NCI-H460/R és HaCaT sejtekben. A **8**-as vegyülettel történő kezelést követően a legtöbb rákos sejtvonal esetében csökkent H2A.X expresszió és csökkent ROS szint volt megfigyelhető, sugallva az anyag DNS-védő hatását.

A **pcm**-mel ellentétben, a **9**-es vegyület képes volt modulálni a DNS sérülésre adott választ a Chk1-S345 foszforilációjának gátlásán keresztül, jelezve azt, hogy ez a vegyület képes megcélózni a magas szintű endogén DNS károsodással rendelkező rákos sejteket.

A dearomatizált *p*-kumársav észter származékok tumorelles potenciálja

A **8**-as vegyület analógjaiként előállított *p*-kinolok (**9-12**) és *O*-alkil éter analógjaik (**13-20**) *in vitro* citotoxikus aktivitását egyelőre előkísérlet szintjén vizsgáltuk az L5178/L5178_{B1} egér limfóma sejtvonal páron, és humán nőgyógyászati rákos sejtvonalakon (HeLa, SiHa, MCF-7, MDA-MB-231). A *p*-kumársav izopropil észterének *p*-kinol analógja (**12**) hasonlóan erős citotoxikus aktivitást mutatott az egér limfóma sejtvonalakon, mint a **9**-es vegyület. A butil-éter analógok rezisztenciaprofilja jobbnak bizonyult, mint a propargil analógoké az egér limfóma sejtvonal páron. A *p*-kinol analógok az összes tesztelt rákos sejtvonalon erősebb citotoxikus hatást fejtettek ki, mint az *O*-alkil analógok, utalva arra, hogy ez a típusú szubsztitúció csökkenti ezen anyagok citotoxikus potenciálját.

A kávéssav metilészter egy oxidált metabolitjának citotoxicitás vizsgálata

A **24**-es vegyület *in vitro* citotoxikus aktivitását teszteltük egy sor humán nőgyógyászati rákos sejtvonalon (HeLa, SiHa, MCF-7, MDA-MB-231). A citotoxicitás vizsgálat eredményeit az 1. táblázat mutatja be.

1. Táblázat: A **24**-es vegyület citotoxikus aktivitása humán nőgyógyászati rákos sejtvonalakon összehasonlításban **cm**-mel, a kiindulási vegyületével. Pozitív kontrollként ciszplatint használtunk; az eredményeket két biológiai ismétlésből kaptuk.

IC ₅₀ [95% C.I.] (μM)				
	HeLa	SiHa	MCF-7	MDA-MB-231
cm	450 [396,7-551,2]	> 500	175,4 [162,3-189,7]	139,3 [116,5-166,6]
24	1,1 [1,0-1,2]	> 30	1,1 [0,9-1,4]	3,9 [3,1-4,9]
cisplatin	11,7 [10,3-13,1]	13,6 [12,6-14,7]	5,2 [4,6-5,8]	25,8 [24,4-27,4]

Hidroxifahéjsav metabolitok bioreleváns környezetben történő keletkezésének vizsgálata

A p-kumársav metilészter in vitro antitumor aktivitásának vizsgálata H₂O₂ jelenlétében

Azzal a céllal, hogy megvizsgáljuk külsőleg indukált oxidatív stressz hatását a **pcm** által kifejtett citotoxikus hatásra, MCF-7 sejteket kezeltünk **pcm** és H₂O₂ kombinációjával. A **pcm** H₂O₂ jelenlétében kémiaiilag stabil volt. A vizsgálat eredményeit a 2. Táblázat összegzi.

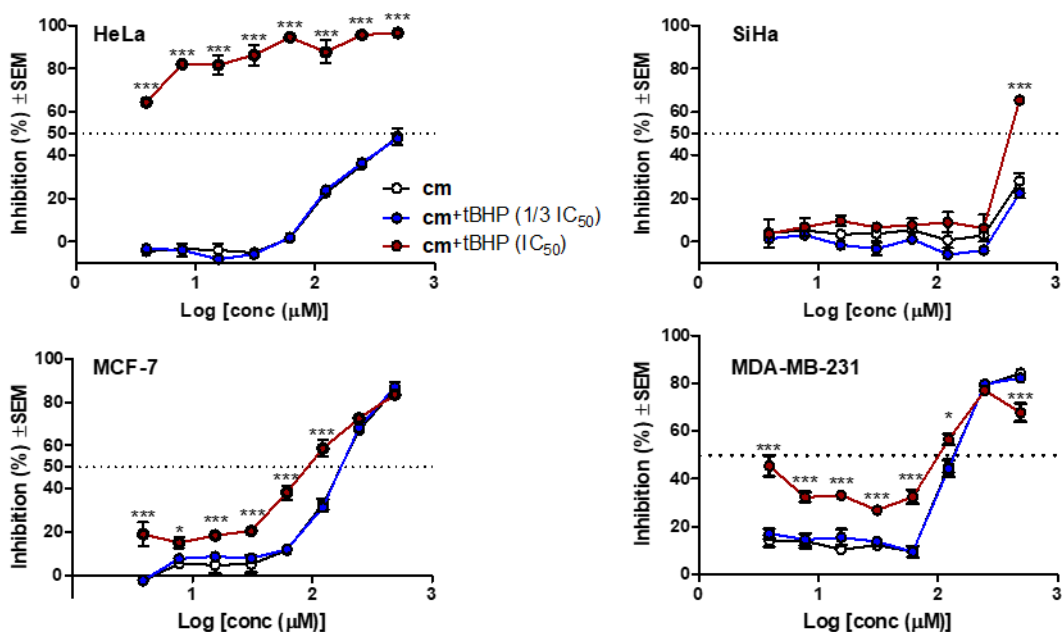
2. Táblázat: A **pcm** és H₂O₂ közötti interakció az MCF-7 sejtekre gyakorolt citotoxicitás szempontjából. CI_{avg}: súlyozott átlag CI érték; $CI_{avg} = (CI_{50} + 2 CI_{75} + 3 CI_{90})/6$. CI < 1, CI = 1 és CI > 1 rendre szinergizmust, additivitást és antagonizmust jelöl. Dm, m és r rendre az x-metszet inverz logaritmusát, a meredekséget és a medián-hatás görbe lineáris korrelációs együtthatóját jelenti.

	CI ₅₀	CI ₇₅	CI ₉₀	Dm	m	r	CI _{avg}
2,5:1	0,79	0,60	0,45	247,66	2,109	0,985	0,556
1,25:1	0,93	0,60	0,39	250,18	3,197	0,988	0,550
0,625:1	1,06	0,68	0,44	222,79	3,610	0,974	0,623

Az eredmények azt mutatják, hogy **pcm** és H₂O₂ között szinergizmust lehet megfigyelni, különösen magasabb gátlási mértékek esetén.

A kávéssav metilészter citotoxicitás vizsgálata t-BHP által indukált oxidatív stressz jelenlétében vagy anélkül

Célunk volt, hogy megvizsgáljuk, hogy van-e esélye annak, hogy oxidatív stressztől függő módon, sejten belül **cm**-ből in situ keletkező **24**-es vegyület modulálja a **cm** kezelés során megfigyelt citotoxikus hatást. Miután meghatároztuk a *t*-BHP citotoxicitását egy sor humán nőgyógyászati rákos sejtvonalon (HeLa, SiHa, MCF-7, MDA-MB-231) MTT módszerrel, egy kétlépéses kombinációs vizsgálatot végeztünk el. A sejteket előkezeltük *t*-BHP-val 1/3 IC₅₀^(72h) vagy IC₅₀^(72h) koncentrációkban 24 órára, majd **cm**-mel kezeltük frissen adott médiumban és 72 órára inkubáltuk. A sejtek életképességét a sejtkontrollokkal – amelyek **cm** nélküli médiummal lettek kezelve - összehasonlítva értékeltük. Az eredményeket a 10. ábra mutatja be.

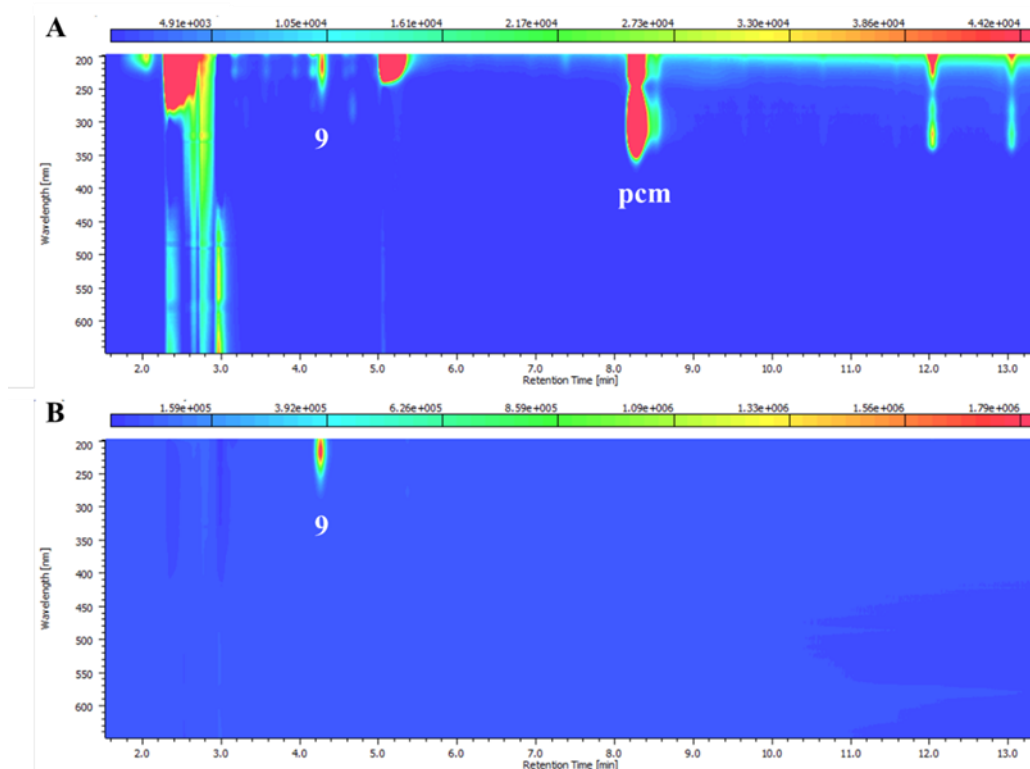


10. ábra: A **cm** citotoxikus aktivitása humán nőgyógyászati rákos sejtvonalakon *t*-BHP által indukált oxidatív stressz jelenlétében vagy anélkül. * és ***: $p < 0.05$ és $p < 0.001$, rendre, összehasonlítva a csak **cm**-mel történő kezeléssel; $n = 3$.

A tesztelt sejtvonalakat a *t*-BHP által indukált oxidatív stressz jelentősen érzékenyebbé tette a **cm** citotoxicitására, kivéve a SiHa sejteket, amelyek a **24**-es vegyületre is a leginkább rezisztensek voltak. A legnagyobb növekedést a **cm** citotoxikus aktivitásában HeLa sejteken figyeltük meg, s a **cm** és a leghatásosabb feltételezett metabolitja közti különbség is ezen a sejtvonalon volt a legnagyobb. Antagonizmust figyeltünk meg ugyanakkor minden sejtvonalnál abban az esetben, amikor azokat **cm**-mel és *t*-BHP-val egyidejűleg kezeltük.

Fenton-reakció

Elvégeztük a Fenton-reakciót, hogy modellezzük az oxidatív stressz **pcm**-re való hatását, és megkapjuk az $\cdot\text{OH}$ gyökök befogásával képződő lehetséges metabolitokat. A **pcm** Fenton-reakciójában a **9**-es vegyület detektálható volt RP-HPLC-vel és LC-MS-sel. A 11. ábra mutatja be a HPLC ujjenyomat kromatogramokat.



11. ábra: A **pcm** Fenton-reakciójának HPLC-PDA ujjlenyomata (**A**) a **9**-es vegyületével összehasonlításban (**B**).

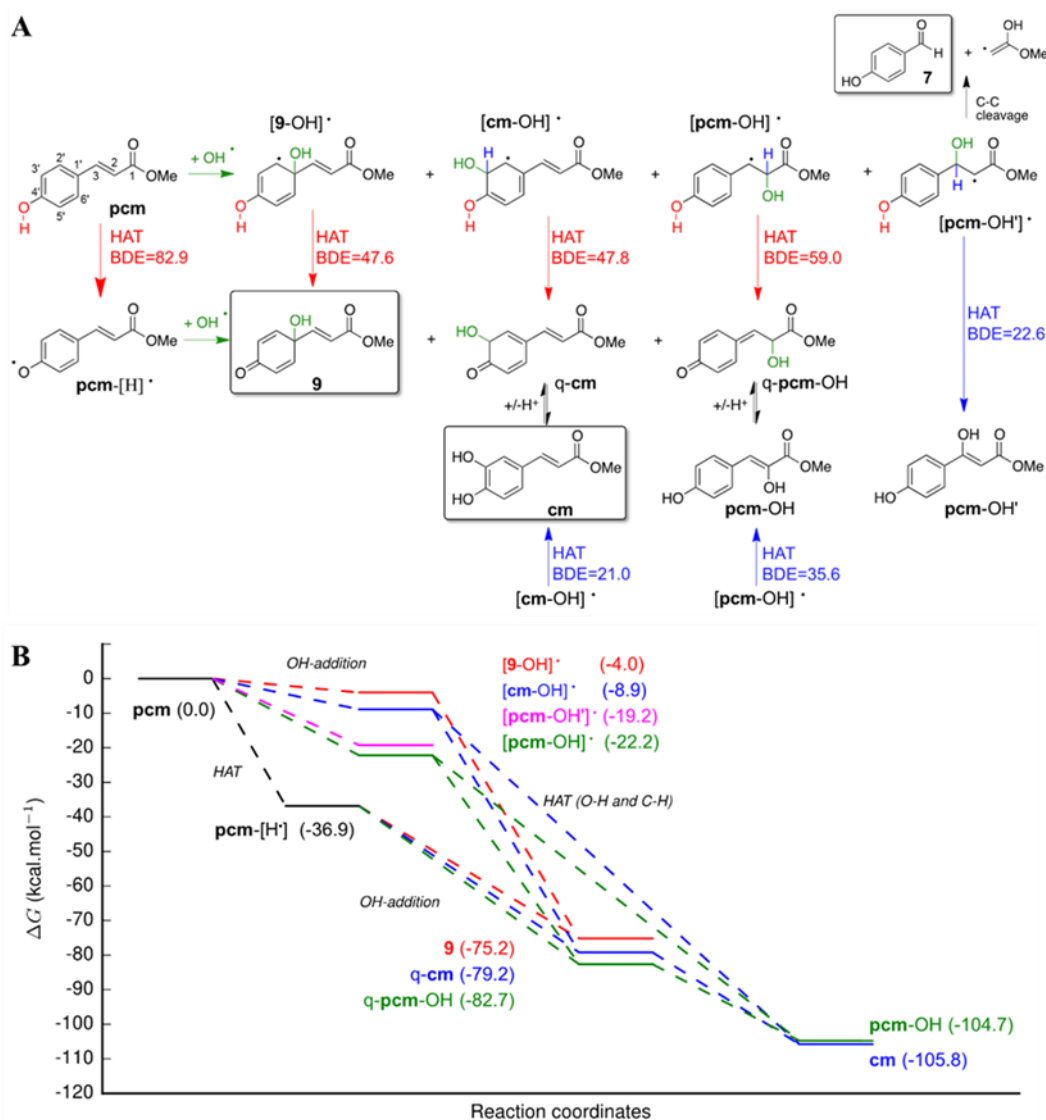
A p-kumársav metilészter hidroxil gyökfogó aktivitása

A **pcm** $\cdot\text{OH}$ gyökfogó kapacitását a 2-dezoxi-D-ribóz Fenton-reakció által okozott oxidatív károsodás gátlásának mérésével vizsgáltuk. A **pcm** gyengébb gyökfogónak bizonyult, mint a Trolox, azonban hasonlóan erős kapacitást mutatott, mint a diszulfenton-nátrium, egy szabadgyökfogó antioxidáns, mely elérte a klinikai vizsgálatok III. fázisát.

In silico vizsgálatok a p-kumársav metilészter metabolitok $\cdot\text{OH}$ gyökök jelenlétében történő keletkezéséről

Tudományos együttműködés keretein belül *in silico* vizsgálatokat végeztünk sűrűség-funkcionál elméleti (DFT) számításokkal, azzal a céllal, hogy mélyebb betekintést kapjunk a **9**-es vegyület gyökfogással való képződésébe. A **pcm** $\cdot\text{OH}$ gyökök jelenlétében két lehetséges szekvenciális reakciómechanizmus úton oxidálódhat. Az 1-es mechanizmus különböző pozíciókra történő $\cdot\text{OH}$ gyök addícióval indul, és H-atom elvonással stabilizált gyök-adduktok képződésével folytatódik. A 2-es mechanizmus H-atom elvonással indul, és egy olyan gyök képződésével folytatódik, amely OH-addíción megy keresztül különféle pozíciókban a megfelelő adduktokat eredményezve. A **9**-es vegyület az 1-es és a 2-es mechanizmusban

egyaránt keletkezhet, azonban a **7**-es vegyület csak a 2-es mechanizmusban. A 12. ábra bemutatja a két utat és az oxidáció termodinamikai elemzését.



12. ábra: A **pcm** oxidációs átalakulása •OH gyökök jelenlétében (**A**) és a reakciólépések termodinamikája (**B**).

Mivel minden egyes lépés negatív Gibbs energiákat mutat, minden megjósolt vegyület termodinamikailag kedvező a **pcm**-re vonatkozóan (12B ábra). A **cm** és a **pcm-OH** a legkedvezőbb vegyületek a számított globális termodinamika szerint (rendre $\Delta G = -105.8$ és -104.7 kcal.mol⁻¹), míg a **9**-es vegyület kevésbé bizonyult stabilnak ($\Delta G = -75.2$ kcal.mol⁻¹) a dearomatizáció eredményeképp. Érdekes módon csak a **7**-es vegyületet, **cm**-et és **9**-es vegyületet azonosítottuk be kísérletesen. A **cm** a globális termodinamikai termék, a **9**-es vegyület pedig egy kinetikai termék.

Összefoglalás

- Összesen 21 oxidált hidroxifahéjsav származékot (**5-25**) állítottunk elő különböző oxidálószerrel használatával, mint például hipervalens jódvegyületekkel (PIFA, PIDA), egy bioreleváns reaktív nitrogén fajtával, peroxinitrittel, és egy peroxil gyök iniciátorral, AAPH-val. Az anyagokat kombinált kromatográfiás módszerekkel izoláltuk.
- A **pcm** két oxidált metabolitja (**8, 9**) erős tumorellenes hatást mutatott. A **9**-es vegyület 2-3-szor erősebb *in vitro* tumorellenes aktivitást mutatott, mint a **pcm**, valamint megkerülte az ABCB1 transzporter által, ill. a doxorubicinhez adaptált nem-kissejtes tüdőkarcinóma sejtvonal összes mechanizmusa által kialakított multidrog rezisztenciát. Ez a vegyület kedvező tumorszelektivitást mutatott; DNS sérülést indukált tüdőkarcinóma sejtekben, míg DNS védő aktivitást fejtett ki normál humán keratinocitákban, valamint modulálta a DNS sérülésre adott válaszokat MCF-7 sejtekben.
- Bioaktivitási előkísérleteink azt sugallják, hogy a vonatkozó hidroxifahéjsav származékok 1'-O-alkil éterei szintén ígéretes tumorellenes vegyületek lehetnek, a **9**-es vegyülettől eltérő sejtvonal-specifitással.
- Egy erős tumorellenes hatású vegyületet (**24**), egy dimerizációs terméket azonosítottunk a kávéssav metilészter (**cm**) AAPH-val vagy peroxinitrittel történő oxidációs reakciójában, ez az anyag tehát biológiai körülmények között is keletkezhet, amikor a **cm** peroxil gyököket vagy peroxinitritet fog be.
- Szinergizmust figyeltünk meg MCF-7 sejtek **pcm**-mel és H₂O₂-vel történő kombinációs kezelése során, azaz a **pcm** *in vitro* tumorellenes aktivitása növekedett H₂O₂ által indukált oxidatív stressz jelenlétében.
- Megerősítettük a **9**-es vegyület H₂O₂ által indukált oxidatív stresszel összefüggő képződését **pcm**-ből Fenton-reakcióval. Kutatási együttműködésben elvégzett *in silico* számítások szerint a **9**-es vegyület a **pcm** •OH gyök fogásának kinetikai terméke, míg a kávéssav metilészter (**cm**) a termodinamikai termék.
- A *t*-BHP-val való előkezelés által indukált oxidatív stressz jelenléte növelte a **cm** citotoxikus aktivitását oly módon, hogy az aktivitás változása különböző sejtvonalakban egybeesett a sejtek érzékenységevel a **24**-es vegyülettel szemben. Antagonizmust figyeltünk meg a sejtek **cm**-mel és *t*-BHP-val való együttes egyidőben történő kezelése során, utalva ezzel arra, hogy a megnövekedett citotoxikus aktivitás nem a kettő közötti kémiai reakció következtében alakult ki.

- Az eredményeink azt sugallják, hogy lehetséges antioxidánsokból új bioaktív metabolitok oxidatív stresszel összefüggő *in situ* keletkezése biológiai környezetekben, és ez a jelenség felhasználható új bioaktív vegyületek felfedezésének alapjául kismolekulájú antioxidánsokból végzett diverzitás-orientált oxidatív átalakításokon keresztül.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek, Dr. Hunyadi Attilának, a folyamatos szakmai támogatásért, a motivációért és a türelméért. Külön köszönetet szeretnék mondani társtémavezetőmnek is, Prof. Fang-Rong Chang-nak, hogy irányította és támogatta doktori munkámat a 6 hónapos cserediák tanulmányaim alatt a Graduate Institute of Natural Products-nál (Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Tajvan).

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Hohmann Juditnak, a Farmakognóziai Intézet vezetőjének a lehetőséget, hogy az intézetében tanulhattam.

Hálás vagyok Dr. Béni Zoltánnak az NMR vizsgálatokért, és Dr. Dékány Miklósnak a tömegspektrometriás mérésekért.

Őszinte köszönet illeti Dr. Ana Martins-t az oxidált metabolitok tumorellenes aktivitásának teszteléséért. Szeretném megköszönni Dr. Milica Pešić-nek és Dr. Sonja Stojković Burić-nak a sejthalál analízis elvégzését, valamint a DNS károsodás vizsgálatát áramlási citométerrel. Hálás vagyok Prof. Hui-Chun Wang-nak és Dr. Ching-Ying Kuo-nak a DNS sérülésre adott válaszmechanizmusok vizsgálatának elvégzéséért. Szeretném megköszönni Prof. Zupkó Istvánnak és Dr. Ahmed Dhahir Latif-nak a sejtek életképességének vizsgálatát nőgyógyászati rákos sejtvonalakon, valamint az összehasonlító citotoxicitási vizsgálatok elvégzését *t*-BHP által indukált oxidatív stressz jelenlétében vagy anélkül.

Külön köszönettel tartozom Prof. Patrick Trouillas-nak és Dr. Florent Di Meo-nak az *in silico* számításokért.

Hálás vagyok Dr. Balogh György Tibornak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy csatlakozzam a csapatához a Szintézistámogató Laboratóriumnál a Richter Gedeon Nyrt.-nél, és támogatott a folyamatos áramú reakciók elvégzésében, valamint ismeretet szerezhettem az LC-MS mérések terén. Szeretném megköszönni Lévai Sándornak, aki segített a preparatív HPLC-s tisztításokban a Richter Gedeon Nyrt.-nél.

Külön köszönetet szeretnék mondani Hevérné Herke Ibolyának a laboratóriumi munkám során nyújtott sok segítségével, a tudományos tanácsaiért és a bátorításért.

Hálás vagyok továbbá minden kollégámnak a Farmakognóziai Intézetnél, különösen labortársaimnak a támogatásukért és az együtt töltött időért.

Szeretném megköszönni a családomnak, a vőlegényemnek és a barátaimnak, hogy folyamatosan támogattak a doktori tanulmányom alatt.

Ez a munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, Magyarország (NKFIH; K119770), az Emberi Erőforrások Minisztériuma, Magyarország (20391-3/2018/FEKUSTRAT), valamint a Magyar Tudományos Akadémia és a Tajvani Tudományos és Technológiai Minisztérium kétoldalú mobilitási támogatása által valósult meg.

Az értekezés alapját képező közlemények:

I. **Fási L**, Di Meo F, Kuo C-Y, Stojkovic Buric S, Martins A, Kúsz N, Béni Z, Dékány M, Balogh GT, Pesic M, Wang H-C, Trouillas P, Hunyadi A, Antioxidant-inspired drug discovery: antitumor metabolite is formed in situ from a hydroxycinnamic acid derivative upon free-radical scavenging, *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, 62: 3, 1657-1668.

IF: 6.205 (2019) / Drug discovery: **D1**

II. **Fási L**, Latif AD, Zupkó I, Lévai S, Dékány M, Béni Z, Könczöl Á, Balogh GT, Hunyadi A, AAPH or peroxy-nitrite-induced biorelevant oxidation of methyl caffeate yields potent antitumor metabolite, *Biomolecules* **2020**, 10: 11 1537.

IF: 4.082 (2019-2020) / Biochemistry: **Q1**

Egyéb publikációk:

I. Háznagy-Radnai E, **Fási L**, Wéber E, Pinke Gy, Király G, Sztojkov-Ivanov A, Gáspár R, Hohmann J, Anti-inflammatory Activity of Melampyrum barbatum and Isolation of Iridoid and Flavonoid Compounds, *Natural Product Communications* **2018**, 13:(3) 235-236.

IF: 0.58 (2018) / Complementary and Alternative Medicine: **Q2**

II. **Fási L**, Hunyadi A, Cephalotaxus harringtonia – homoharringtonin, *Gyógyszerészet* 2016, 60:8, 469-471.

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások és poszterek:

I. **Fási L**, Vágvölgyi M, Issaadi M, Zoofishan Z, Zupkó I, Spengler G, Martins A, Hunyadi A Natural product inspired chemical approaches against MDR cancer *New Diagnostic and Therapeutic Tools against Multidrug-Resistant Tumours: First-Working Group Meeting WG 1- WG 4* pp. 12-13. (2019)

II. **Fási L**, Gyovai A, Zupkó I, Nové M, Spengler G, Chang F-R, Hunyadi A Semi-synthetic preparation of antitumor p-coumaric acid derivatives *GA2018: The 66th Annual Meeting of the*

Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA): Sanghaj, Kína (2018) Paper PO-43. – poszter prezentáció

III. **Fási L**, Martins A, Kúsz N, Földi T, Ignác G, Béni Z, Balogh Gy T, Hunyadi A Oxidized derivatives of p-coumaric acid methyl ester with antitumor effect: preparation of new protoflavone analogs *First Training School of COST Action CM1407*: Belgrád, Szerbia (2016) – poszter prezentáció

IV. **Fási L**, Martins A, Kúsz N, Földi T, Ignác G, Béni Z, Balogh Gy T, Hunyadi A A p-kumársav-metilészter antitumor hatású oxidált származékainak előállítása *Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma*: Budakalász, Magyarország (2016) – szóbeli prezentáció

V. **Fási L**, Martins A, Kúsz N, Földi T, Ignác G, Béni Z, Balogh Gy T, Hunyadi A Antitumor hatású oxidált fahéjsav származékok előállítása *MTA Alkaloid- és Flavonoidkémiai Munkabizottsága ülése*: Mátrafüred, Magyarország (2016) – szóbeli prezentáció

VI. Hunyadi A, Dankó B, Csábi J, Vágvölgyi M, Issaadi M, **Fási L**, Zoofishan Z What we can provide for collaboration: an overview of our available compound library *2nd meeting of COST Action CM1407*: Madrid, Spanyolország (2016) – poszter prezentáció

VII. Hunyadi A, Dankó B, Csábi J, Vágvölgyi M, Issaadi M, **Fási L**, Zoofishan Z A brief overview of our compound library available for collaborative studies *4th Workshop of COST Action CM1106*: Chioggia, Olaszország (2016) – poszter prezentáció

