

Kismolekulás NADPH-oxidáz 4 inhibitorok azonosítása és karakterizálása az, oxidatív stressz kivédésére

Doktori értekezés

Borbély Gábor

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok doktori iskola



Témavezető: Dr. Kéri György egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Tretter László, egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Venekei István, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kecskeméti Valéria egyetemi tanár, M.D., Ph.D.
Tömösköziné dr. Farkas Rita, Ph.D.

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

1.Bevezetés, tudományos háttér	6
1.1. Reaktív oxigén származékok (ROS).....	6
1.1.1. A ROS képződése és hatástalanítása a szervezetben.....	6
1.1.2. ROS fiziológiai szerepe.....	8
1.1.2.1. ROS szerepe a sejt működésében akut változást okozó jelátvitelben.....	9
1.1.2.2. ROS szerepe a sejt működését hosszú távon befolyásoló jelátvitelben.....	10
1.1.2.3. ROS szerepe az immunrendszer működésében.....	11
1.2. NADPH-oxidázok.....	12
1.2.1. A NOX enzimcsalád.....	12
1.2.2. Szerkezet és aktivitás.....	13
1.3. A NOX4 enzim.....	15
1.4. A NOX4 enzim, mint terápiás célpont.....	19
1.4.1. A vese megbetegedései.....	19
1.4.2. Cukorbetegség és diabéteszes nefropátia.....	20
1.4.3. Szív- és érrendszeri megbetegedések.....	21
1.4.3.1. Endotél diszfunkció.....	22
1.4.3.2. Magas vérnyomás.....	24
1.4.3.3. Érelmeszesedés.....	25
1.4.3.4. Angiogenesis.....	27
1.4.4. Fibrózis.....	27
1.5. Ismert NOX gátló vegyületek.....	29
2. Célkitűzések.....	37
3. Módszerek.....	38
3.1. Kémiai háttér.....	38
3.2. Sejtvonalak	39
3.3. H ₂ O ₂ /Tyr/LPO sejtes assay.....	39
3.3.1. Vegyületek minőségellenőrzése.....	40
3.3.2. SDS-PAGE és Western blot.....	40
3.3.3. Amplex Red assay.....	41
3.4. Immunhisztokémia.....	41
3.4.1. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos mérések.....	42
3.5. Az EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának preparálása.....	42
3.5.1. Biokémiai assay.....	43

3.6. Eredmények kiértékelése.....	44
3.7. Lumineszcens sejtvitalitás vizsgálat.....	45
3.7.1. MTT vizsgálat.....	46
3.7.2. Áramlási citometria.....	46
3.7.3. IMAF assay.....	47
3.7.4. Kináz assay.....	47
3.8. NOX2 assay.....	48
3.9. clogP meghatározása.....	49
3.10. Permeabilitás vizsgálat.....	49
4. Eredmények.....	51
4.1. 293 FS sejtvonal transzfekció ellenőrzése.....	51
4.2. A sejtes assay optimalizálása.....	52
4.2.1. Paraméterek beállítása.....	52
4.2.2. A Referencia inhibitor, mint belső kontroll vizsgálata.....	54
4.2.3. A sejtes assay megbízhatóságának ellenőrzése.....	55
4.3. Vegyülettárak tesztelése.....	56
4.3.1. Vegyületek.....	56
4.3.2. Elsődleges szűrés.....	58
4.3.3. Vegyülettár bővítése.....	59
4.3.4. Fókuszált vegyülettárak tesztelése.....	60
4.4. A Nox4 enzim aktivitásának vizsgálata sejtes rendszerből izolált enzim segítségével.....	64
4.4.1. NOX4 és p22 ^{phox} lokalizáció vizsgálata.....	64
4.4.2. Biokémiai assay.....	66
4.4.2.1. Paraméterek beállítása.....	66
4.4.2.2. Szűrés és IC ₅₀ értékek meghatározása.....	68
4.5. Szelektivitás vizsgálata	71
4.6. Szerkezet-hatás összefüggések.....	73
4.7. Sejtek életképességére gyakorolt hatás vizsgálata.....	79
4.8. Lipofilitás és permeabilitás	84
5. Megbeszélés és következtetések.....	85
6. Összefoglalás.....	91
7. Summary.....	92
8. Irodalomjegyzék.....	93
9. Publikációk jegyzéke.....	111
10. Köszönetnyilvánítás.....	113

Rövidítések jegyzéke

ACE: angiotenzin-konvertáló enzim	FI: fluoreszcencia intenzitás
ADME(T): abszorpció, eloszlás, lebomlás, kiürülés, toxicitás	FP: fluoreszcencia polarizáció
Akt: protein kináz B	GABA: gamma-aminovajsav
ALK: aktivin receptor-szerű kináz	Glut: glükóz transzporter
AP: aktivátor fehérje	GR: glutation reduktáz
ATCC: american type culture collection	GSH: redukált glutation
BSA: marha szérum albumin	GSH-Px: glutation-peroxidáz
cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát	GSSG: oxidált glutation
CDK: ciklin-függő kináz	HBSS: Hank's puffereelt sóoldat
CGD: krónikus granulomatózis betegség	HEK 293: humán embrionális vesesejtvonal
CI: konfidencia intervallum	HIF: hipoxia-indukált faktor
COX: ciklooxygenáz	HPLC: nagyfelbontású folyadékkromatográf
CSF: kolónia-stimuláló faktor	HRP: tormaperoxidáz
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium	HSA: humán szérum albumin
DMSO: dimetil-szulfoxid	HTS: nagy áteresztőképességű (molekula) szűrés
DPI: difenil-jodónium	HUVEC: humán köldökvéna endotél sejt
DUOX: kettős oxidáz (dual oxidase)	IC₅₀: 50%-os gátláshoz szükséges koncentráció
DTT: ditriotreitol	IMAP: immobilizált fémion assay
EC: endotél sejt	IL: interleukin
ECM: extracelluláris mátrix	IPF: idiopátiás tüdőfibrózis
EPO: eritropoetin	JNK: c-Jun N-terminális kináz
ER: endoplazmatikus retikulum	LDL: alacsony denzitású lipoprotein
ERK: extracelluláris jellel szabályozott protein-kináz	LPO: laktoperoxidáz
EVL: bővített validációs vegyülettár	LPS: lipopoliszaharid
FACS: áramlási citometria	MAPK: mitogén-aktivált protein-
FAD: flavin-adenin-dinukleotid	
FBS: magzati borjú szérum	

-kináz (MEK)	PTP: protein-tirozin-foszfátáz
MCP: monocita-kemotaktikus fehérje	PVDF: polivinilidén-fluorid
MMP: mátrix metalloproteáz	QSAR: kvantitatív struktúra-aktivitás összefüggés
MPO: mieloperoxidáz	Rb: retinoblasztóma
mRNS: hírvivő RNS	RCC: vesesejt karcinóma
MTT: 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid	RFU: relatív fluoreszcencia egység
NA: numerikus apertúra	RhoGDI: Rho GDP-disszociáció inhibitor
NADPH: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát	RICK: receptor-kölcsönható protein-kináz
NF-κB: nukleáris faktor κB	ROS: reaktív oxigén származékok
NMR: mágneses magrezonancia	SDS-PAGE: nátrium dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
NO: nitrogén-monoxid	SH3: Src-homológia 3 domén
NOS: nitrogén-monoxid-szintáz	siRNS: kis interferáló RNS
NOX: NADPH-oxidáz	SOD: szuperoxid-dizmutáz
NoxA1: NOX aktivátor 1	TBS: tris pufferelt sóoldat
NoxO1: NOX szabályozó 1	TBST: TBS-Tween 20
OPD: o-fenilén-diamin	TGF: transzformáló növekedési faktor
oxLDL: oxidált LDL	TIMP: MMP szöveti inhibitor
PAI: plazminogénaktivátor inhibitor	TLC: vékonyréteg kromatográfia
PAMPA: parallel mesterséges membrán permeabilitás vizsgálat	TNF: tumor nekrosis faktor
PAO: fenilarzin oxid	VEGF: érendotél növekedési faktor
PBS: foszfát-pufferelt sóoldat	VSMC: ér simaizom sejt
PDGF: trombocita-eredetű növekedési faktor	Z': signal window koefficiens
PEDF: pigmentepitélium-eredetű faktor	VHL: Von Hippel Lindau (tumor szupresszor)
PKC: protein-kináz C	
PLC: foszfolipáz C	
PMA: forbol-mirisztoil-acetát	
PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid	

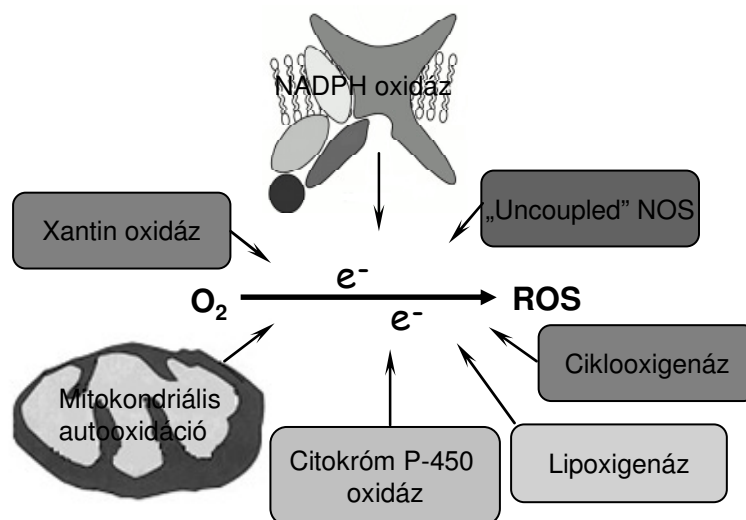
1. Bevezetés, tudományos háttér

1.1. Reaktív oxigén származékok (ROS)

A reaktív oxigén származékok aktív oxigént tartalmazó kis molekulák, melyek két nagyobb csoportba sorolhatók. A szabadgyökök, mint a szuperoxid ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroxil-gyök ($\cdot\text{OH}$), peroxil-gyök ($\text{RO}_2\cdot$) és alkoxil-gyök ($\text{RO}\cdot$) olyan molekulák, melyek egy vagy több párosítatlan elektronnal rendelkeznek, és ennek köszönhetően meglehetősen instabilak és reaktívak. A másik csoportot az oxigén nem gyök típusú származékai képviselik (hipoklórossav (HOCl), ózon (O_3), szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) és hidrogén-peroxid (H_2O_2)), melyek oxidáló tulajdonságúak, és könnyen gyökké alakulhatnak. Ezek azonban hosszabb féléletidővel rendelkeznek, kevésbé reaktívak, és ennek megfelelően stabilabbak, mint a szabadgyökök [1].

1.1.1. A ROS képződése és hatástalanítása a szervezetben.

Mint a későbbiekben látni fogjuk, bizonyos mennyiségű ROS elengedhetetlen, többek között a normális sejtműködés szabályozásához, a sejten belüli jelzések továbbításához, a sejtek szaporodásához, a védekezést szolgáló gyulladásos folyamatokhoz és az apoptózishoz. Fiziológiai körülmények között a ROS, mint a normál aerob metabolizmus mellékterméke jelenik meg a mitokondrium és mikroszómális elektron-transzport láncok, a fagocita sejtek és enzimrendszerek (pl. xantin oxidáz, monoamin oxidáz, peroxisómális citokróm P-450 oxidáz) biológiai reakciói során [2, 3, 4, 5] (**1. ábra**). A NADPH oxidáz (NOX) enzimek voltak ugyanakkor az elsőként azonosított olyan enzimek, melyeknek elsődleges funkciója a szuperoxid termelés.

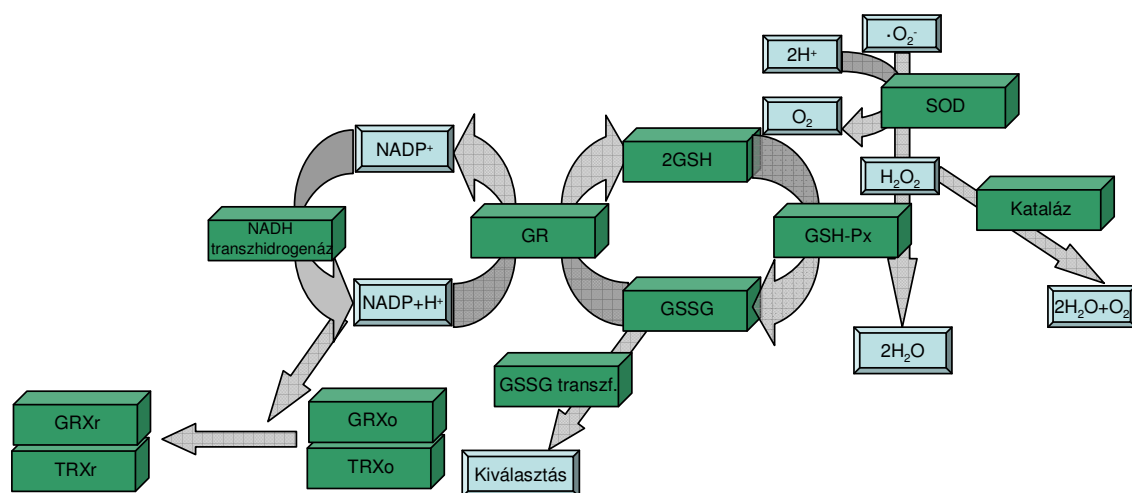


1. ábra. A ROS enzimatis forrásai [1].

Normál esetben a ROS termelést enzimatis és nem enzimatis antioxidáns rendszerek működése ellensúlyozza, és biztosítja ezzel a szervezet redox egyensúlyát a sejtekben és szövetekben. Ezek az enzimatis és nem enzimatis mechanizmusok eltérnek a sejten belüli és kívüli kompartmentekben. A legfontosabb enzimatis antioxidánsok a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a glutation-peroxidáz (GSH-Px), a glutation reduktáz (GR) és a kataláz [6].

A SOD a $\cdot\text{O}_2^-$ dizmutációját katalizálja hidrogén-peroxiddá és oxigénné. A glutation peroxidáz a lipid peroxidokat és hidrogén-peroxidot redukálja vízzé és lipid alkoholokká, miközben a glutationt, glutation diszulfiddá (GSSG) oxidálja. A glutation reduktáz egy flavoprotein, mely az oxidált glutation NADPH függő redukcióját katalizálja glutationná (GSH), fenntartva ezzel a szükséges redukált GSH szintet, amely elengedhetetlen a GSH redox ciklusához. A kataláz egy intracelluláris antioxidáns enzim, mely elsősorban a peroxisómákban és a citoszolban található meg. A hidrogén-peroxid redukcióját katalizálja vízzé és oxigénné, és különösen hatékony magas szintű oxidatív stressz esetében. A keletkező ROS-t semlegesíthetik továbbá a peroxiredoxinok, a citokró-oxidázok vagy közvetlenül a citokró-*c* [7, 1]. A rendszer működésének alapjait a **2. ábrán** bemutatott vázlat szemlélteti. A szervezetben képződő szuperoxid-gyököket az egyik lehetőség szerint a SOD hidrogén-peroxiddá alakítja, amelyet aztán a kataláz vízre és oxigénre bont. Egy másik lehetőség szerint a GSH-Px

vízzé alakítja a hidrogén-peroxidot oly módon, hogy ezzel egyidőben redukált formában jelenlévő glutationt oxidál el. Ez utóbbit aztán a GR alakítja ismét a redukált formává. A GSSG redukálásában közreműködhetnek kéntartalmú fehérjék is. Ilyen szerepet tölthet be például a hemoglobin tiol-csoportja.



2. ábra. A ROS károsító hatásának kivédése a szervezetben. GSH-Px, glutation-peroxidáz; GR, glutation reduktáz; GSH, redukált glutation; GSSG, oxidált glutation, GRXo, oxidált glutaredoxin; GRXr, redukált glutaredoxin; TRXo, oxidált tioredoxin; TRXr, redukált tioredoxin.

Mód van azonban arra is, hogy a GSSG transzferáz enzim közreműködésével a GSSG kiválasztásra kerüljön. Az enzimatis közömbösítő folyamatokat támogatja, kiegészíti, illetve annak hatékonyságát növeli a nem specifikus antioxidánsok jelenléte is, amelyeket elsősorban a táplálkozás során juttatunk szervezetünkbe. A számtalan antioxidáns közül talán a legfontosabbak az alfa-tokoferol (E-vitamin), β -karotin az aszkorbinsav (C-vitamin) és a flavonoidok [8].

1.1.2. ROS fiziológiai szerepe

A ROS fiziológiai szerepei közé tartozik többek között az endotél funkció fenntartása és a vaszkuláris tónus szabályozása, a szervezet védelme, a hormon bioszintézis, a fertilizáció és a celluláris jelátvitel. Ez utóbbival kapcsolatban elmondható, hogy a ROS különböző fajtái különböző jelátviteli utakat képesek aktiválni, melyek aztán eltérő,

esetenként ellenkező funkcionális választ váltanak ki. Ennek jó példája a vérnyomásra gyakorolt közvetett és közvetlen hatása. A szuperoxid reagál a nitrogén-monoxiddal (NO), melynek során peroxinitrit (ONOO^-) keletkezik. A vazodilatátor NO mennyiségének csökkenése endotél diszfunkcióhoz és vazokonstriktióhoz, ezzel magas vérnyomáshoz vezet [9, 10]. Másrészt viszont a H_2O_2 , mint vazodilatátor működik bizonyos érszakaszokon elsősorban az agyi, koronária és mezenterikus artériákban [11, 12]. A hidrogén-peroxid vérnyomás szabályozásában betöltött közvetlen szerepe illetve a makromolekulákkal (lipidek, szénhidrátok, nukleinsavak) és kis molekulákkal (elsősorban a NO) való interakciója mellett egy kémiai ROS jel átalakítása biológiailag releváns eseménnyé bizonyos fehérjék poszttranszlációs kovalens módosításán keresztül is megvalósul, azok funkciójának megváltoztatása révén. Ez lehet egy akut változás (másodpercek, percek) a célmolekula funkciójában (ioncsatornák, kontraktilis fehérjék), vagy okozhat krónikus változást a sejt fenotípusában (órák, napok) amikor a célfehérje egy jelátviteli molekula (pl. protein-kináz, protein-foszfataz vagy redox-szenzitív transzkripciós faktor).

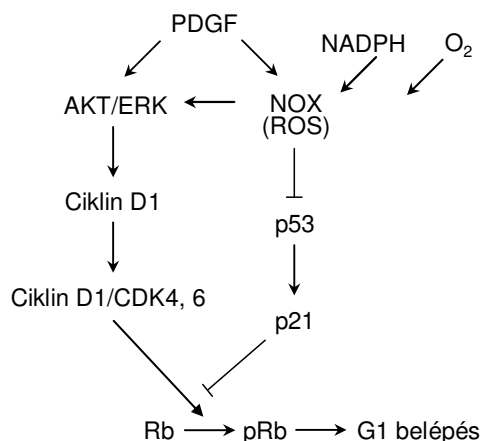
1.1.2.1. A ROS szerepe a sejt működésében akut változást okozó jelátvitelben

Az intracelluláris és plazmamembrán ioncsatornák regulációja mind direkt, mind ROS függő jelátvitel révén megvalósulhat. A NOX eredetű ROS elsősorban a K^+ -csatornák [13], a plazmamembrán Ca^{2+} - [14] és intracelluláris Ca^{2+} -csatornák [15] és pumpák működését képes ily módon befolyásolni, ezzel hatása kiterjed a Ca^{2+} -függő jelátvitelre [45]. Egy másik nagyon fontos akut jelátviteli folyamatban, a sejtek oxigén érzékelésében is nagy jelentőséget tulajdonítanak a ROS-nak. Legalább két sejtben belüli esemény jelzi a sejteknek a hipoxia állapotát: a hipoxia-indukált faktor (HIF) stabilizálódása és a redox-szenzitív K^+ -csatornák aktiválódása [13]. Hipoxiában a HIF prolil-hidroxiláz működése gátolt, ennek következtében nem történik meg a HIF degradációja. Tekintve, hogy a HIF prolil-hidroxiláz egy oxigénfüggő enzim, valószínű, hogy a hipoxiában megnövekedett ROS képződés közreműködik a HIF stabilizálásában. Hipoxiában a K^+ -csatornák inaktiválódnak, ami a plazmamembrán depolarizációjához vezet [16]. Valószínűleg ebben a ROS által kiváltott K^+ -csatorna gátlás is közrejátszik.

1.1.2.2. A ROS szerepe a sejt működését hosszútávon befolyásoló jelátvitelben

A fent leírtak alapján egyértelmű, hogy a ROS és a makromolekulák interakciója nem feltétlenül vezet az utóbbi irreverzibilis oxidatív sérüléshez, úgy ahogy azt korábban gondolták. A legjobban ismert és talán legfontosabb útvonalak, melyeken keresztül a ROS hosszú távon képes szabályozni a sejtfunciót, a protein-tirozin-foszfatazok (PTP) inaktiválása, illetve a protein kinázok (elsősorban mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK), protein kináz B (PKB, Akt), extracelluláris jellel szabályozott protein-kináz (ERK) c-Jun N-terminális kináz (JNK)) aktiválása, a katalitikus régiójukban lévő redox-szenzitív cisztein aminosavak oxidációján keresztül [17]. Hasonló módon, a ROS képes bizonyos transzkripciós faktorok (nukleáris faktor- κ B (NF κ B), aktivátor protein-1 (AP-1) p53 és HIF) aktiválására [18]. A PTP befolyásolja számos jelátviteli fehérje foszforiláltsági állapotát, ennek megfelelően tehát a ROS közvetett módon képes befolyásolni a sejtproliferációt, differenciálódást, túlélést, metabolizmust és mobilitást egyaránt [19]. A hidrogén-peroxiddal kezelt sejtekben a p38MAPK foszforilációja és aktiválása figyelhető meg, amely részben a foszfataz aktivitás gátlásának is köszönhető [20, 21].

A korábban tárgyaltak mellett, a ROS oxigénszint érzékelésben betöltött szerepének egy másik aspektusa a sejt differenciálódás szabályozása a trombocita-eredetű növekedési faktor (PDGF) jelátvitelen keresztül. A megfigyelések szerint többek között a ROS biztosítja a sejtciklus G0-G1 átmenetét a ciklin D expressziójához szükséges jelátviteli útvonalak aktiválásával [22, 23]. A ciklin D szint növekedése biztosítja a ciklin D/CDK4/6 komplex aktiválódását, ami a retinoblasztóma (Rb) fehérje foszforilációján keresztül egy kulcsfontosságú mozzanatot jelent a G1 fázisba való belépéshez [24] (3. ábra).



3. ábra. A ROS feltételezett szerepe a G1 fázisba való belépéshez vezető jelátvitelben.

A ROS a p53 és p21 fehérjék szintjének csökkentésével illetve a p53 DNS kötő doménjén lévő cisztein aminosavak oxidációjával (a DNS-hez való kötődés gátlásával) biztosítja a „p53 ellenőrzőponton” való átjutást [25]. A p53 számos olyan enzimnek a célpontja, amelyek a sejt proliferációjához szükséges prekursorok jelenlétét érzékelik. A feltételezések szerint végeredményben a sejt többek között a ROS-t termelő enzimek működésén keresztül érzékeli a sejtszódáshoz elengedhetetlenül fontos oxigén és NADPH megfelelő szintjét [26].

Összegezve, a génexpresszió regulációja tehát történhet egyrészt a már említett redox-szenzitív másodlagos jelátviteli rendszereken keresztül (pl. a MAPK aktiválása) vagy olyan transzkripciós faktorok révén, mint az NFκB, AP-1 és p53, melyek redox-szenzitív, alacsony pKa-val rendelkező cisztein aminosavakat tartalmaznak a DNS kötő doménjükön. Többek között a tumor nekrosis faktor-α (TNF-α), transzformáló növekedési faktor-β1 (TGF-β1), angiotenzin II, monocita-kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) és a plazminogénaktivátor inhibitor-1 (PAI-1) expressziójának indukciója történik ROS jelenlétében [27, 28]. A feltételezések szerint a ROS ezen kívül talán képes a génexpresszió szabályozására az mRNS stabilitás változtatásával is [29].

1.1.2.3. A ROS szerepe az immunrendszer működésében.

A sejtfunkciók intracelluláris jelátvitelen keresztül megvalósuló szabályozása mellett a NOX enzimek által termelt ROS másik kulcsfontosságú funkciója a „saját védelme”.

Eleinte kizárólag a ROS függő direkt sejtpusztítást gondolták a NOX enzimek szervezet védekezésében betöltött szerepének, de a helyzet ennél sokkal komplikáltabb. Számos más ROS függő mechanizmus növeli a védekezés hatékonyságát. Ezek közé tartozik többek között a mikroorganizmusok virulencia faktorainak inaktivációja [30, 31] ill. a pH és ion koncentrációk szabályozása a fagoszómában [32]. Elmondható tehát, hogy a ROS mind direkt, mind indirekt módon szerepet játszik a mikroorganizmusok elleni védelem biztosításában.

1.2. NADPH-oxidázok

1.2.1. A NOX enzimesalád

NADPH-oxidázok olyan enzimek, melyek elektronokat transzportálnak biológiai membránokon keresztül. Az elektron akceptor az O_2 , az elektron transzfer végterméke pedig szuperoxid, ennek megfelelően, a NOX enzimek biológiai funkciója a ROS generálása. Működésük egyaránt fontos a tüdő szöveteiben, szívben, központi idegrendszerben, vesékben, bélrendszerben, és a csont sejtjeiben, gyakorlatilag mindenhol, még a spermatozoákban is, ahol kritikus a szerepük az élet kezdetén [33]. Jelenleg a NOX enzimesalád hét tagot számlál: NOX1-5 valamint a kettős oxidáz (DUOX) 1 és 2.

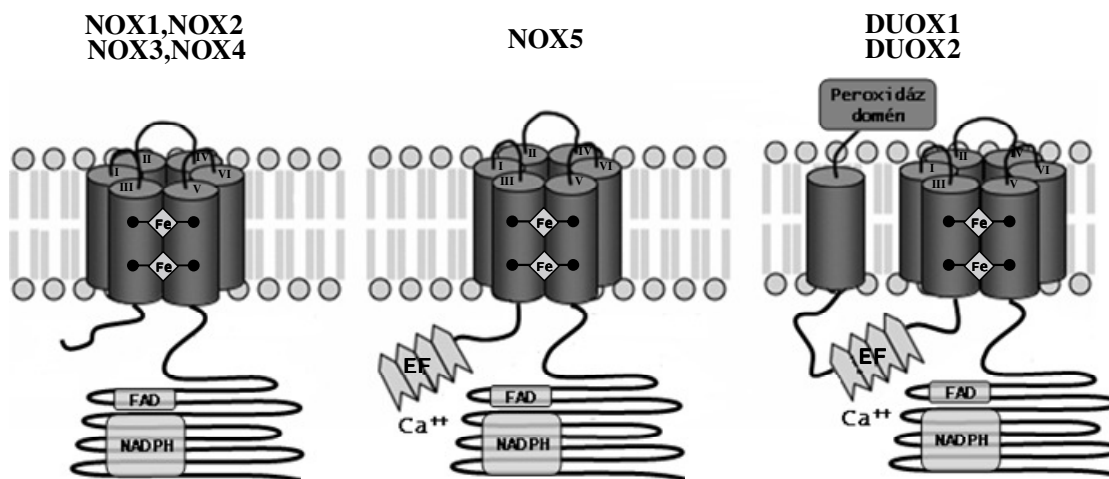
Az elsőként leírt, legtöbbet tanulmányozott és legjobban ismert NOX izoenzim a NOX2 (gp91^{phox}) vagy más néven fagocita oxidáz volt. A fagocitákban ez az enzim felelős a nagy mennyiségű szuperoxid termelésért a fagocitózis során [34]. Az immunrendszer normális működésének fenntartásában betöltött szerepét bizonyítja, hogy a krónikus granulomatózis betegségben (CGD) egy genetikai defektus folytán inaktív enzim képződik, mely életet veszélyeztető fertőzések kialakulását eredményezheti [35].

Az elsőnek azonosított NOX2 homológ a NOX1 volt. Legnagyobb mennyiségben a vastagbél epitéliumában expresszálódik, de számos más sejttypusban is megtalálható, így az érfal simaizom sejtjeiben, endotél sejtekben, méhben, placentában, és a prosztatában [36]. A NOX3, NOX4 és NOX5 mind humán vesesejtekből lettek első alkalommal izolálva [37], ugyanakkor a NOX3 elsődlegesen magzati szövetekben és a felnőtt belső fülben expresszálódik [38], míg a NOX5 nagy mennyiségben található

meg a magzati szövetekben illetve a herében, lépben, ováriumban, placentában és hasnyálmirigyben [39]. A NOX enzimes család fent említett új tagjai 21-59%-os azonosságot mutatnak a NOX2-vel [40]. Az öt NOX izoenzim után két hosszabb fehérje, név szerint a DUOX1 és DUOX2 is azonosításra került humán pajzsmirigy sejtekből, melyek 53% ill. 47% azonosságot mutatnak a NOX2-vel a C-terminális régióban [41]. Ezek az enzimek elsősorban a pajzsmirigyben expresszálódnak, de kisebb mennyiségben, a gyomorban is megtalálhatók [41].

1.2.2. Szerkezet és aktivitás

A NOX izoenzimek családja három csoportba sorolható bizonyos specifikus domének megléte vagy hiánya alapján. A NOX1, NOX2, NOX3 és NOX4 enzimeknek azonos az általános szerkezete: hat transzmembrán alfa hélix, melyek konzervált hem-kötő hisztidineket tartalmaznak, kettőt a harmadik és kettőt az ötödik transzmembrán doménen, valamint FAD- és NADPH-kötő doméneket a citoplazmatikus C-terminálison [42] (4. ábra).

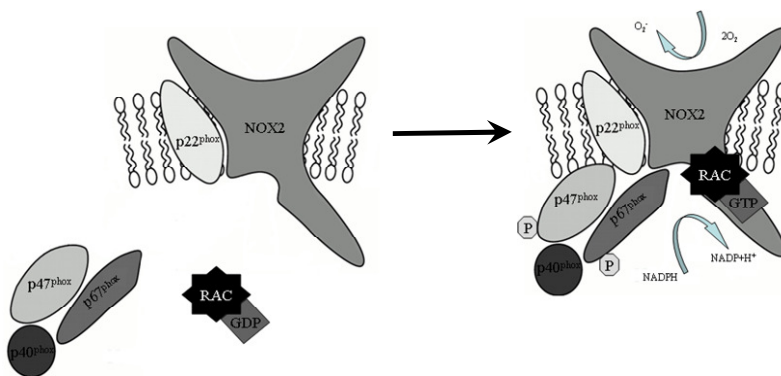


4. ábra. A NADPH oxidáz enzimek általános felépítésének sematikus ábrája.

A NOX5 annyiban tér el az előzőektől, hogy rendelkezik négy N-terminális kalmodulin-szerű EF doménnel, tehát négy darab Ca^{2+} -kötőhelyet tartalmaz, lehetővé téve ezzel a citoszolikus Ca^{2+} jelátvitelen keresztül történő aktivációt [43]. A DUOX

enzimek a NOX5 struktúrális elemein felül még rendelkeznek egy peroxidáz homológ doménnel is az N-terminálison, amelyet egy további transzmembrán szegmens kapcsol a Ca^{2+} -kötő doménhez [41, 44].

Habár a NOX enzimsalád mind a hét tagja a molekuláris oxigén redukcióját katalizálja, az egyes izoenzimek különböznek szöveti megoszlásukban, alegység igényükben, domén struktúrájukban és abban a mechanizmusban, amivel aktiválódnak. A NOX2 aktivációja fehérje-fehérje interakciók komplex sorozatának köszönhető (**5. ábra**). Az enzim konsztitutívan kapcsolt a p22^{phox} fehérjéhez, melynek hiányában instabil, ugyanakkor magához az aktivációjához számos egyéb citoszolikus faktor is szükséges. Az aktiváció során a p47^{phox} regulátor alegység foszforilálódik és a membránba transzlokálódik egy komplex formájában, mely a p67^{phox} és p40^{phox} alegységeket is tartalmazza. A membránban a citoszolikus komplex kapcsolódik a NOX2-t és p22^{phox} -ot magába foglaló heterodimerhez (citokróm b_{558}) [45]. Ezeken túl szükséges, hogy a Rho GDP-disszociáció inhibitor (RhoGDI) disszociáljon a RacGDP-ről, ami ezután GTP-t köt. A Rac, a regulátor alegység hatására aktiválódik egy kétlépéses mechanizmussal, melyben először a NOX2-vel, majd a p67^{phox} -szal lép kölcsönhatásba [46, 47].



5. ábra. A NOX2 aktivációjának folyamata.

Hasonlóan a NOX enzimekhez, az azok működését reguláló alegységek (p47^{phox} , p67^{phox}) izoformái is azonosításra kerültek. A 41 kDa tömegű p47^{phox} izoformát NoxO1-nek, az 51 kDa tömegű p67^{phox} izoformát NoxA1-nek nevezték el. A NoxA1 abban tér el a p67^{phox} -tól, hogy hiányzik róla egy N-terminális Src homológia 3 (SH3) domén és a p40^{phox} -kötőhely [48]. A NoxO1 esetében a foszforiláció függő működés elvesztése a legnagyobb eltérés, melynek révén úgy tűnik, folyamatosan képes támogatni a Nox1

konstitutív aktivitását (a $p47^{\text{phox}}$ foszforilációt igényel az oxidáz aktiváláshoz). A NoxO1 és NoxA1 a $p47^{\text{phox}}$ -ot és $p67^{\text{phox}}$ -ot helyettesíti bizonyos sejtekben, valószínűleg a Nox1 aktiváció során *in vivo* [49]. Az enzim komplex harmadik alegységének a Rac izoformáinak expressziója is eltérő a különböző sejtípusokban. A fagocitákban a Rac2 a jellemző izoforma, míg a nem fagocita sejtekben a Rac1 dominál [50]. Ugyanúgy, ahogy a NOX2, a NOX1 és a NOX3 szintén igényli a $p22^{\text{phox}}$, valamint a citoszolikus regulátor komponensek ($p47^{\text{phox}}$ / $p67^{\text{phox}}$ vagy azok homológjai NOXO1/NOXA1 ill. a $p40^{\text{phox}}$) és a Rac asszociációját, míg a NOX4 szintén $p22^{\text{phox}}$ -függetlenül működik, de nincs szüksége citoszolikus faktorokra [45]. A NOX5 és DUOX enzimek az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedés hatására aktiválódnak, mely közvetlenül kötődik az N-terminálison elhelyezkedő kalcium-kötő doménekhez [51].

1.3. NOX4 enzim

Általános háttér

A NOX4 enzimet Geiszt Miklós és munkatársai 2000-ben írták le először [52]. Míg a NOX1, NOX2 és NOX3 egy evolúciósan közel álló alcsoportját alkotják a NOX enzimeknek, addig a NOX4 alacsonyabb, 39%-os szekvencia azonosságot mutat a NOX2-vel. A humán NOX4 gén 18 exonból áll és a 11-es kromoszóma hosszú karján (q14.2-q21) helyezkedik el [53]. NOX4 cDNS-sel transzfektált HeLa sejtek membrán frakciójának vizsgálata során két, egy 75 és egy 66 kDa tömegű fehérje frakció volt elkülöníthető. A nagyobb fehérje feltételezhetően a NOX4 glükozilált formája, mivel négy darab N-glükolizációs hely található az enzim második és harmadik extracelluláris hurokján (Asn129-Phe-Ser, Asn133-Tyr-Ser, Asn230-Arg-Thr és Asn236-Ile-Ser). Azonban már maga a glükoziláltság ténye is sok kérdést vet fel. Elképzelhető, hogy sejtípus függő, tekintve hogy NOX4 transzfektált COS-7 sejtekben a 75 kDa fehérje nem volt kimutatható [53].

Az elektronforrás tekintetében világos, hogy a NOX1, NOX2 és NOX5 specifikusan NADPH-t és nem NADH-t használ, mint elektrondonor. Ugyanakkor a korai kutatások alapján azt feltételezték, hogy az érrendszerben a ROS generáló enzimek a NADH-t részesítik előnyben a NADPH-val szemben, ezért számos szerző még mindig a NAD(P)H oxidáz kifejezést használja. Azóta bebizonyosodott, hogy a fent említett

NOX izoformákhoz hasonlóan, a NOX4 enzim is a NADPH-t használja elektrondonorként [54, 55].

Expresszió

A NOX4 legnagyobb mennyiségben a magzati és felnőtt vesében expresszálódik, ott is elsősorban a kéreg régióban illetve a proximális és disztális tubulus sejtjeiben. Ennek megfelelően valószínűleg, mint oxigén szenzor, jelentős az eritropoetin (EPO) szintézis során [53]. Ezek mellett nagy valószínűséggel fontos szerepe van a vesesejtek növekedésének, proliferációjának és apoptózisának szabályozásában is. A vesében való erős kifejeződése mellett [52, 53] a NOX4 hírvivő RNS (mRNS) megtalálható az oszteoklasztokban [56], endotél sejtekben (EC) [57, 58], ér simaizom sejtekben (VSMC) [59], hematopoetikus őssejtekben [60], fibroblasztokban [61], keratinocitákban [62], melanóma sejtekben [63] és neuronokban [64].

Szerepe van a stressz jelátvitelben a vese [65] és simaizom sejtekben [45], továbbá a TGF- β -indukált differenciálódásban [66], az inzulin-jelátvitelben [67], az oxigénérzékelésben [13] és a transzkripció szabályozásában [63, 68].

Lokalizáció

Különböző NOX enzimek gyakran találhatók meg ugyanabban a sejtben vagy szövetben, de eltérő funkciót töltenek be és eltérő jelátviteli útvonalakat aktiválnak [17]. HEK293 sejtekben a NOX4 enzim az endoplazmatikus retikulumban (ER) volt megfigyelhető [17]. Habár a NOX4 funkcionális szerepe teljes mértékben elképzelhető az ER-ban, egy ilyen lokalizáció szintén jelentheti az enzim felhalmozódását a szintézisének helyén. Kuroda és munkatársai, ér simaizom sejteken és endotél sejteken végzett megfigyelései alapján, a NOX4 a sejtmagban lokalizálódott [68], míg patkány glomeruláris mezangiális sejtekben és szívizom sejtekben a mitokondriumban volt kimutatható [69]. A NOX4-nek feltehetőleg fontos szerepe van az organellek redox állapotának szabályozásában. Ez egy megfelelő magyarázat lehet az ER-ban történő lokalizációra, ahol az oxidáló környezet fenntartása elengedhetetlen a fehérjék megfelelő poszttranszlációs módosítása során. Ezen kívül a NOX4 talán maga is szabályozza a fehérjék oxidáltsági szintjét az ER-közei régióban a hidrogén-peroxid diffúziója révén. Ez utóbbi esetben a NOX4 a kinázok, foszfatázok és transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozása révén játszik szerepet a jelátviteli folyamatokban.

A fent leírtakat összegezve tehát megállapítható, hogy a kiterjedt kutatások ellenére a NOX4 enzim sejten belüli lokalizációjának kérdése korántsem tisztázott megnyugtató módon.

ROS termelése

Egy további érdekes, de szintén sok megválaszolatlan kérdést felvető területe a NOX4 kutatásnak az enzim által elsődlegesen termelt ROS minőségének kérdése. A megfigyelések azt sugallják, hogy a NOX4 aktivitás során inkább hidrogén-peroxid termelődik, nem szuperoxid. A NOX4 enzim harmadik extracitoszolikus hurokja (E-loop) 28 aminosavval hosszabb, és ez a szakasz hiányzik a többi NOX izoenzimből [70]. Ennek a kizárólagosan NOX4 enzimre jellemző szakasznak a kiütése, vagy a benne lévő cisztein aminosavak cseréje nem befolyásolta az expressziót vagy lokalizációt, de a H_2O_2 termelést $\cdot\text{O}_2^-$ termelésre változtatta. Nincs ugyanakkor egyértelmű bizonyíték, hogy az enzim közvetlenül hidrogén-peroxidot állítana elő. Egy lehetséges magyarázat, hogy az enzim sejtorganellekben való lokalizációja révén szuperoxidot termel a sejtszervecskék lumenébe, ahol az gyorsan dizmutálódik hidrogén-peroxiddá. Illeszkedik ebbe az elképzelésbe, hogy a NOX4 E-loop erősen konzervatív hisztidin aminosavakat tartalmaz, melyek protonforrást jelenthetnek a $\cdot\text{O}_2^-$ gyors dizmutációjához [70]. A hidrogén-peroxid az, ami képes átjutni a membránokon és elérni az extracitoszolikus/extracelluláris teret.

Ezzel kapcsolatosan egy szintén megválaszolásra váró kérdés, hogy a NOX függő redox jelátvitel specifikusa hogyan párosul egy olyan diffúzibilis mediátorhoz, mint a hidrogén-peroxid. Elképzelhető, hogy éppen a kompartmentalizált ROS produkció biztosítja a jelátvitel specifikusságát. Míg a NOX2 komplex elsősorban a plazmamembránban foglal helyet, addig a NOX4 inkább a sejtorganellek membránjában (nukleusz, mitokondrium, ER) [68, 71, 72]. Ezenfelül elképzelhető, hogy a lokalizált szuperoxid produkció elérése érdekében a NADPH oxidáz komponensek kölcsönhatnak oxidáz-kötő proteinekkel is.

Aktiváció

Habár a NOX1, NOX2 és NOX3 enzimek működése aktiváló és szervező alegységek jelenlététől függ, a NOX4 olyan sejtekben is aktív, melyek nem expresszálnak ilyen faktorokat. Jelenlegi ismereteink szerint a NOX4 egy kizárólag p22^{phox} -függő enzim, vagyis ROS termelő funkciójához elengedhetetlen a p22^{phox} alegység [73]. A

citoszolikus faktorokat igénylő NOX enzimek aktiválódása során a p47^{phox}, PX (phox) doménjén lévő SH3 régió kapcsolódik a p22^{phox} prolinban gazdag régiójához. A p22^{phox} mutánsok, melyekből hiányzik a prolin gazdag C-terminális régió, képesek teljes mértékben fenntartani a NOX4 általi ROS termelést, míg ugyanez a mutáns nem alkalmas a NOX1, NOX2, és NOX3 aktiválására [52]. A NOX4 nem igényel citoszolikus alegységeket, és aktív minden fajta stimulációtól függetlenül [73]. A szív- és érrendszerben az agonisták stimulációjának hiányában is megfigyelhető folyamatos ROS termelő aktivitás valószínűleg NOX4 alapú. Ezt támasztja alá az is, hogy a NOX4 kiütése redukálta az alap ROS produkciót EC és VSMC sejtvonalakban [74]. Transzfektált humán embrionális vesesejtekben (HEK293), EC és VSMC sejtekben az oxidáz aktivitás független a citoszolikus alegységektől (p67^{phox}, p47^{phox}, NoxA1, NoxO1) azt sugallva ezzel, hogy konstitutívan aktív enzimről van szó [45, 52]. Az enzim Rac függése és stimulálhatósága még mindig ellentmondásos. Habár néhány indirekt adat a Rac szükségességére utal, a számos sejten elvégzett vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy a NOX4 nem igényli a Rac működését sem [73]. Ezeknek megfelelően nagyon valószínű, hogy a NOX4 egy olyan indukálható NOX izoenzim, mely az mRNS szintjén keresztül szabályozott és nem poszttranszlációs fehérje módosítással. A feltételezések szerint a NOX4 enzim gyorsan (néhány óra alatt) szintetizálódik és degradálódik. Ez éles kontrasztban áll a NOX2 több napig tartó aktivitásával [75].

Stimuláció

A NOX4 folyamatos alapszintű aktivitása mellett, a megfigyeléseknek megfelelően, bizonyos stimulusok képesek fokozni az enzim működését, mint a lipopoliszaharidok (LPS) a HEK293 sejtekben [76], az inzulin adipocitákban [67] és az angiotenzin II vagy a magas glükóz szint mezenchima sejtekben [77]. A működés fokozása mellett az enzimaktivitás szintén szabályozható a transzkripció szintjével, így növelve vagy csökkentve az éppen elérhető enzim mennyiségét. A NOX4 esetében, az expresszió szintjében beálló változások talán a legfontosabb reguláló mechanizmusok, melyek felelősek az aktivitás modulálásáért. Egyre több olyan információ érhető el, mely szerint bizonyos jelátviteli útvonalak és/vagy effektorok szerepet játszhatnak a különböző NOX izoformák expressziójában. A NOX4 mRNS szintet csökkenti pl. a trombin, de emeli a humán urotenzin II, 7-ketokoleszterin, és mechanikai stressz [45]. A NOX4 mRNS és

fehérje kifejeződésének emelkedéséről számoltak be angiotenzin II kezelést követően, de az angiotenzin II indukált NOX4 mRNS expresszió, pigmentepitélium-eredetű faktorról (PEDF) gátolható volt [78, 79]. Szintén a NOX4 mRNS expressziójának növekedése figyelhető meg ER-stresszben, karotisz sérülésben, hipoxiában, iszkémiában, valamint TGF- β 1 és TNF- α stimulációt követően simaizom sejtekben és fibroblasztokban [45, 64, 66]. A protein-kináz C (PKC), és elsősorban a PKC α egy fontos vaszkuláris NOX4 aktivátornak tűnik. Azon felül, hogy akut módon regulálja a NOX enzim aktivitását, magát a gén expresszióját is szabályozza [80]. Simaizom sejtekben, angiotenzin II indukált hipertenzióban és spontán hipertenzív patkányokban a PKC egyaránt növelte a NOX izoenzim expresszióját [81, 82].

Fontos kiemelni, hogy a NOX4 enzim aktivitásának és stabilitásának fenntartásában kiemelkedően fontos szerepet játszó p22^{phox} fehérje expressziója is módosulhat. A p22^{phox} expresszióján keresztül ható, azt specifikusan csökkenteni képes anyagok, többek között a dexamethason vagy a sztatinok [83, 84].

Az agonisták és antagonisták által kiváltott, a NOX4 illetve p22^{phox} expressziós szintjében beálló változások molekuláris mechanizmusainak meghatározása nagy jelentőséggel bír. Ezeknek a folyamatoknak a felderítésével olyan információkhoz juthatunk, melyek a későbbiekben segíthetnek egy NOX4 expressziót célzó terápiás stratégia kifejlesztésében.

1.4. NOX4 enzim, mint terápiás célpont

1.4.1. A vese megbetegedései

Legalább három NOX izoforma expresszálódik a vese kortexében: NOX4, NOX2 és NOX1, de a NOX4 a legnagyobb mennyiségben [45]. A kortexen belül elsősorban a tubulus sejtek, de kisebb mennyiségben a glomeruláris mezangiális sejtek is expresszálják [52, 53]. A NOX eredetű ROS alapvetően 3 fő funkciót lát el.

- A vese véráramlásának szabályozását, amelyben a hidrogén-peroxid nitrogén-monoxiddal való reakciója játssza a főszerepet, limitálva annak relaxáló hatásait az afferens arteriolákban [85].

- A vese sejtek életciklusának szabályozását.

- A génexpresszió szabályozását. A transzkripciós faktorok (NF- κ B, c-JUN) NOX4-függő oxidatív aktiválása, bizonyos gének (foszfolipáz A2, MCP-1, kolónia-stimuláló faktor-1 (CSF-1) és ciklooxygenáz-2 (COX-2)) megnövekedett expressziójához vezet [45].

A vesesejt karcinóma (RCC) több mint 60 százalékát a Von Hippel-Lindau (VHL) tumor szupresszor inaktivációja okozza [86]. A VHL az E3 ubikvitin-ligáz komplex szubsztrátfelismerő alegysége, mely a heterodimer transzkripciós faktor, a HIF-2 α degradációját okozza [87]. Hipoxiában a HIF számos gén expresszióját irányítja (EPO, érendotél növekedési faktor (VEGF), glükóz transzporter-1 (Glut-1), TGF- α), melyek többek között az eritropoézisben, angiogenezisben és anaerob metabolizmusban játszanak szerepet [88]. Normál oxigéntenzio esetén a HIF-2 α alegység gyorsan degradálódik a VHL-nek köszönhetően, de a VHL gén mutációja esetén a HIF-2 α által regulált gének megnövekedett expressziója figyelhető meg normál oxigén tenzió esetén is. A HIF útvonal szabályozása mind normoxiás, mind hipoxiás állapotban, ROS közreműködésével, redox jelátvitelen keresztül valósul meg [89]. Számos tanulmány bizonyítja a NOX4 szuperoxid termelésen keresztül megvalósuló szabályozó szerepét a HIF-2 α expressziójára és aktivitására egyaránt [90]. Mint a domináns renális NADPH oxidáz izoforma, a NOX4 egy ígéretes célpontot jelent a HIF aktivitás manipulálására RCC-ban. A NOX4 specifikus gátlása valószínűleg hatékony módszer az összes, az RCC-ben HIF-2 α által regulált gén overexpressziójának gátlására.

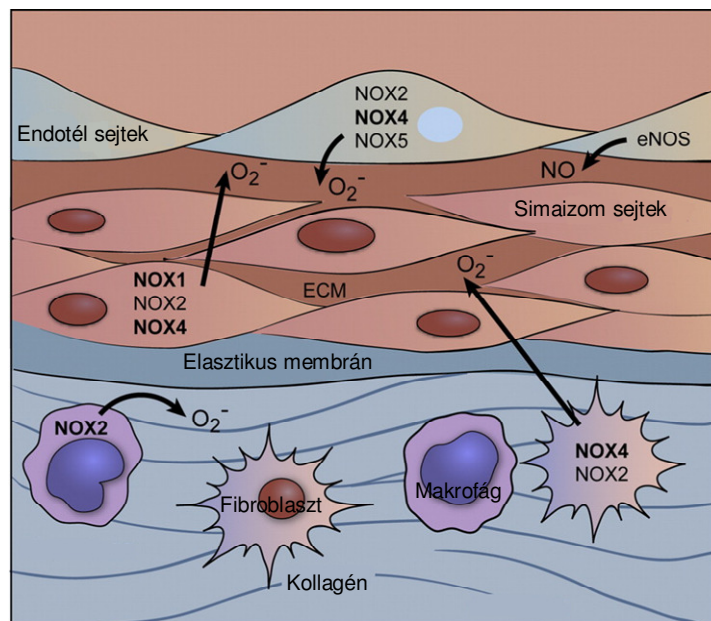
1.4.2. Cukorbetegség és diabéteszes nefropátia

Növekszik azoknak a megfigyeléseknek a száma, melyek szerint a ROS túltermelése az egyik legfőbb faktor a cukorbetegséghez kapcsolt érrendszeri és vese megbetegedések, illetve magának a cukorbetegségnek a kialakulásában [91]. A diabétesssel kapcsolatban a legtöbb bizonyíték azt sugallja, hogy mind a NADPH oxidáz, mind a disszociált nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) szerepet játszik az endotél diszfunkció kialakulásában, pl. streptozotocinnal kezelt patkányok és egerek aortájában [92], és olyan cukorbetegségben szenvedő emberek artériájában is, akik koronáriaartéria-bypass műtéten estek át [93]. A ROS túltermelése diabéteszben a hiperglikémia direkt következménye. Többféle sejt, köztük az EC, VSMC és tubuláris epitél sejtek egyaránt

képesek ROS termelésre hiperglikémiában [91]. A ROS kulcsszerepet játszik a diabétesz kései komplikációinak kifejlődésében is, így az ateroszklerózis [94], valamint a megnövekedett szuperoxid produkció révén az endotél diszfunkció kialakulásban humán diabétesz mellituszban [93, 95], patkány diabétesz modellben [92] és angiotenzin II indukált hipertenzióban [81]. Azon felül, hogy direkt módon károsítja a makromolekulákat, a ROS jelátviteli molekulaként is működik, és számos olyan stresszérzékeny jelátviteli útvonalat aktivál a sejtben, ami végül a sejtek sérülését okozza [28]. Elősegíti a transzkripciós faktorok és szignáltranszdukciós kaszkádok hiperglikémia indukált aktivációját, ezzel többek között profibrotikus gének transzkripciójához is vezet. Az elszabadult ROS képződés nefrotoxikus útvonalak kialakulásában is szerepet játszik [96]. Megnövekedett NOX4 protein és mRNS expresszióról számoltak be többen is diabéteszes nefropátia esetében. Ugyanakkor diabéteszes állatok antiszensz NOX4 RNS-sel való kezelése csökkentette a vese sérülését [65].

1.4.3. Szív- és érrendszeri megbetegedések

Határozott különbség van a fagocita NADPH-oxidáz és az érpreparátumokban megfigyelt NADPH-oxidáz enzimaktivitás között, ami az „érrendszeri NADPH-oxidáz” elnevezés elterjedt használatához vezetett. Fontos megemlíteni ugyanakkor, hogy nem létezik specifikus érrendszeri NADPH-oxidáz, inkább különböző NOX izoformák komplex expressziója az érrendszer különböző sejtjeiben és régióiban. Az endotél sejtekben a NOX4 tűnik a leggyakoribb izoformának (mRNS és enzim szinten), habár a NOX1, NOX2 és a NOX5 szintén megtalálható (**6. ábra**). Az érrendszeri simaizmokban szintén a NOX4 jelenik meg a legnagyobb mennyiségben [45].



6. ábra. Az egyes NOX izoformák megjelenése az érrendszer sejtjeiben [45].

A NOX4 enzim expressziója és aktivitása az agyi artériákban sokkal magasabbnak tűnik, mint a szisztémás artériákban [97]. Az összes NOX izoforma közül, a NOX4 expresszió korrelál legjobban a humán koronária artériák endothél funkciójával és totál NADPH-oxidáz aktivitásával [98].

A ROS relatív fölöslege (oxidatív stressz) számos, a szív- és érrendszert érintő patológiás folyamatban szerepel, beleértve az endothél diszfunkciót, magas vérnyomást, érlemezsedést, angiogenezist, fibrózist, extracelluláris mátrix depozíciót, cukorbetegséget, gyulladást, hipertrófiát, kardiovaszkuláris és vese remodelinget és szívelégtelenséget [8, 45, 99, 100].

1.4.3.1. Endothél diszfunkció

A ROS interakciója nitrogén-monoxiddal kettős hatással bír. Egyrészt csökkenti a NO szintjét, másrészt egy másik reakcióképes molekula a peroxinitrit képződéséhez vezet. Valójában a NO mennyiségének csökkenése több okra vezethető vissza. Egyrészt a NO reakciójára a szuperoxid gyökkel, másrészt a NO képződésének visszaesésére a csökkent NOS expresszió, a NOS szubsztrátjának (L-arginin) vagy kofaktorának

(tetrahidrobiopterin) hiánya és/vagy az endogén módon képződött antagonisták (pl. az asszimmetrikus dimetilarginin) általi NOS gátlás miatt [101, 102].

A ROS által okozott NO inaktiváció, ill. ONOO⁻ képződés az egyik kulcsfontosságú mechanizmus, mely a különböző kardiovaszkuláris megbetegedések hátterében húzódó endotél diszfunkció kialakulásához vezet.

Az endotélium egy vékony, egyetlen sejtrétegből álló felület, ami a teljes szív és érrendszer belső felszínét fedi és elválasztja a keringő vért a szövetektől. Annak ellenére, hogy csak egy sejtréteget alkot, az együttes tömege meghaladja a májét és kiterítve egy teniszpálya méretének felelne meg, ezért számos esetben úgy jelölik, mint a szervezet egyik legnagyobb és legfontosabb szervét [103]. Az endotél sejtek úgy viselkednek, mint egy receptor-effektor struktúra, mely érzékeli a különböző fizikai és kémiai ingereket, és ennek megfelelően módosítja az ér alakját vagy kibocsátja a szükséges faktorokat, hogy reagáljon az adott stimulusra, és fenntartsa a homeosztázist. Funkciója nem csupán autokrin, de parakrin és endokrin is egyben. Az endotélium egyaránt termel vazodilatátorokat és vazokonstriktorokat, prokoagulánsokat és antikoagulánsokat, gyulladásserkentőket és gyulladásgátlókat, fibrinolitikumokat és antifibrinolitikumokat, oxidánsokat és antioxidánsokat [104]. Endotél diszfunkcióban az endotél elveszti a képességét, hogy fenntartsa ezt a finom egyensúlyt. Az endotél diszfunkció tehát egy olyan állapot, melyben a normális vaszkuláris homeosztázis megváltozása endotél-függő vazodilatáció, gyulladásos folyamatok és trombus képződésének tendenciájával karakterizálható [105]. Súlyossága olyan állapotokban, mint az érelmeszesedés, hipertenzió, krónikus szívelégtelenség és diabétesz, fontos indikátora a jövőben bekövetkező kardiovaszkuláris eseményeknek [106].

A megnövekedett mennyiségű érfal NADPH-oxidáz eredetű ROS fontos meghatározója az endotél diszfunkció kialakulásának érelmeszesedésben, kísérletes hiperkoleszterinémiában, diabéteszben, szívelégtelenségben, kísérletes angiotenzin II-indukált hipertenzióban, renovaszkuláris hipertenzióban és genetikailag öröklött hipertenzióban [1].

1.4.3.2. Magas vérnyomás

Számos tanulmány bizonyítja, hogy antioxidáns vitaminokkal, SOD-mimetikumokkal (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidinoxil) vagy szabadgyökfogókkal való kezelés megelőzte vagy elnyomta a hipertenzió kialakulását és az asszociált szervek sérülését [107, 108].

Bizonyított tény az is, hogy az oxidatív stressz magasabb szintű azokban a betegekben, akik esszenciális hipertenzióban, renovaszkuláris hipertenzióban, malignus hipertenzióban, só-érzékeny hipertenzióban vagy ciklosporin-indukált hipertenzióban szenvednek [109]. A hipertenzív betegek jelentősen magasabb hidrogén-peroxid termelést mutatnak, mint a normotenzívek [1]. Továbbá magasabb hidrogén-peroxid termelést figyeltek meg azoknál a normotenzív embereknél, akiknek nagyobb a genetikai rizikója a magas vérnyomásra (családjukban gyakori a magas vérnyomás), mint azoknál, akik családjában nem volt korábban ilyen betegség [110]. Ez arra utal, hogy talán genetikai tényezők is közrejátszanak a ROS termelés növekedésében. Ezen felül, a ROS szint növekedése mellett a csökkent antioxidáns kapacitás erősíti az oxidatív stresszt a hipertenzióval küzdő betegekben. Ezekben az esetekben csökkent az antioxidáns enzimek mennyisége és aktivitása [107, 111]. A vaszkuláris NADPH-oxidáz aktivitás (NOX1, NOX2 és NOX4) valamint p22^{phox} mRNS expresszió is magasabb volt olyan patkányokban, melyeket angiotenzin II infúzióval hipertenzívvé tettek [112]. Hasonlóan, a NOX1 és NOX4 transzkripciós szintjét is magasabbnak találták transzgénikus, Ren2 fehérjét overexpresszáló hipertenzív patkányok aortájában, összevetve a vad típusú kontrollal [78]. Spontán hipertenzív patkány agyi artériáiban a megnövekedett NADPH-oxidáz aktivitás korrelációt mutatott a NOX4 expresszió növekedésével [11]. Számos tanulmány azt sugallja, hogy a cerebrovaszkuláris NADPH-oxidáz eredetű ROS felelős az angiotenzin II indukált hipertenzió kifejlődésében [113].

A fent leírt kísérletes bizonyítékokra alapozva, melyek az oxidatív stressz kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt káros hatásainak szerepét igazolják, hatalmas az érdeklődés olyan stratégiák kifejlesztésére, melyek a ROS-t célozzák a hipertenzió és más kardiovaszkuláris betegségek kezelésében. A lehetséges megközelítések:

1. Az antioxidáns kapacitás növelése.

2. A nitrogén-monoxid szintjének növelése.
3. A ROS képződésének csökkentése az azokat létrehozó enzimek (NOX) aktivitásának csökkentésén keresztül.

1.4.3.3. Érelmeszesedés

Az érelmeszesedést olyan betegségnek tartjuk, melyre a következő négy megállapítás érvényes:

1. Diffúz betegség.
2. Tekintve, hogy a léziók különböző fejlettségi állapotban találhatók meg a test bármely területén, heterogén és multiform.
3. Az ateroszklerózis egy gyulladásos, immunológiai, poligén és multifaktoriális megbetegedés, tekintve, hogy számos klasszikus rizikófaktor játszik szerepet a kifejlődésében.
4. A plakk minősége fontosabb, mint a mérete.

Kétféle lézió különböztethető meg. Az egyik az úgynevezett stabil vagy fibrózus plakk, egy kicsi és általában központi elhelyezkedésű lipid maggal, melyet egy vastag és ellenálló, kollagénben gazdag réteg véd, gyulladás jele nélkül. A másik az úgynevezett „high risk” instabil és sérülékeny plakk, nagy és excentrikus lipid maggal, melyet gyenge és vékony fibrotikus sapka véd kevés kollagénnel, nagy mennyiségű makrofággal és T-limfocitával, aminek következtében a gyulladásos reakció kifejezett.

Az érelmeszesedés komplex folyamatának számos aspektusa köztudottan redox-szenzitív. Ilyen többek között az endotél aktiváció, lipidek oxidatív módosítása, az immunsejtek és VSMC ateroszklerotikus plakkba gyűjtése és a VSMC-proliferáció [40]. A korai ateroszklerotikus plakk progressziójához megnövekedett NOX4 expresszió társul. Elsősorban a NOX2 és NOX4 játszik szerepet az oxidatív stressz kialakulásában humán koronáriaartéria-szklerózisban. Míg a NOX2 expressziója a plakk makrofágtartalmával korrelál, a NOX4 csak a nem fagocita típusú vaszkuláris sejtekben található meg [80].

Az endotél diszfunkció nem csak az érelmeszesedés kezdeti stádiumában, a plakk képződés elején jelentős, de elősegíti a plakk növekedését és karakterisztikájának

kialakítását is. Az érlelmeszesedés léziók mindig endotél diszfunkcióval kezdődnek és a diszfunkció fennmaradásától függ progressziójuk [103].

Az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) akkumulációja az ateroszklerotikus lézió területén kritikus jelentőséggel bír az ateroszklerózis kialakulásában. Az oxidatív stressz állapotában könnyen oxidálódó LDL-koleszterin molekulák (oxLDL) erősen immunogének és erőteljes stimulust jelentenek az EC-ben történő NADPH-oxidáz aktivációhoz, mely aztán közreműködik az adhézis molekulák expressziójában és monociták, valamint egyéb sejtek irányításában [114]. Az oxLDL megtámadja az artéria intimát és toxikus foszfolipidek kibocsátásához vezet, mely aktiválja az endotél sejteket, indukálja az endotél adhézis molekulák képződését és a monociták megjelenését, növeli a sejtnövekedési faktorok és a gyulladásos folyamatokban fontos gének aktivitását, endotél diszfunkciót és lemezke-aggregációt provokál, és kedvez a trombogenezisnek [103, 115]. Ezen felül kimutatták, hogy a NADPH-oxidáz eredetű ROS közrejátsszik az LDL további makrofágok általi oxidációjához, egy ördögi kört alakítva ki ezzel. Ha egyszer a monociták átjutnak az endotél rétegen, makrofággá alakulnak és felveszik az oxLDL-t, majd habos sejtekké alakulnak. A habos sejtek a fő komponensei az úgynevezett zsíros csíkoknak, és az első lépést jelentik az ateroszklerotikus plakk kialakulásában. Az oxLDL a makrofágokban is aktiválja a NADPH-oxidázokat, ami még több ROS-t generál és az egész kezdődik előről [114, 116]. Amellett, hogy megnövekedett $p22^{phox}$ expresszió figyelhető meg ateroszklerózisban a humán koronária erekben, nagyobb szuperoxid mennyiség detektálható a plakk vállánál, ami azt sugallja, hogy a NADPH-oxidázoknak a plakk instabilitásában is szerepe van [40]. A növekvő ateroszklerotikus plakkban nem csak makrofágok, de $CD4^+$ T-limfociták és $CD8^+$ T-limfociták száma is megnövekszik, ami egy specifikus immunválaszra utal [117]. Ugyanakkor a kutatók még nem értenek egyet abban, hogy ez vajon káros vagy előnyös a növekvő plakk szempontjából.

Az oxidatív stressz és endotél diszfunkció szisztematikus természete mellett, a koronária artériák bizonyos részei hajlamosabbak az ateroszklerózisra. Növekedett endotél diszfunkciót és plakk lerakódást figyeltek meg az elágazások területén [80]. Ez valószínűleg az itt kialakuló turbulencia következménye, amely megnövekedett NADPH-oxidáz expresszióhoz és aktivitáshoz vezet [118]. A koronária artéria

megbetegedéshez általános oxidatív stressz társul a koronária cirkulációban, amely nem csak az ateroszklerotikus területekre szorítkozik, így további komplikációkhoz vezet.

1.4.3.4. Angiogenezis

A neovaszkularizációban betöltött szerepe kapcsán szintén elmondható, hogy patológiás események egész sora kötődik a ROS képződéséhez. A folyamatok hátterében valószínűleg az húzódik meg, hogy a már fentebb tárgyaltaknak megfelelően a ROS direkt módon aktiválja a HIF-et és ezen keresztül növeli a különféle angiogén faktorok, például a VEGF expressziós szintjét [45, 119, 120].

1.4.4. Fibrózis

A szövetek gyógyulása az emlősökben növekedési faktorok és a sejt-sejt interakciókban fontos mátrixmolekulák koordinált együttműködését igényli. A különböző szövetek fibrózisa akkor következik be, amikor ez a folyamat nem megfelelően szabályozott, illetve hiányos a reepitelizáció és miofibroblaszt aktiváció. A miofibroblaszt differenciálódás és aktiváció TGF- β 1, mátrix jelátvitel és biomechanikai tenzió függő [121].

TGF- β 1 stimulált humán magzati tüdő mezenchima sejtekben a NOX4 az egyik legnagyobb mértékben indukált gén a teljes genomból, a NOX géncsalád egyéb tagjai egyáltalán nem fejeződnek ki [121]. Az oxidatív stressz a májban, tüdőben, vesében, szívben és érrendszerben egyaránt elősegíti a fibrózis kialakulását, mivel a fibrogenézisben szerepet játszó jelátviteli útvonalak és transzkripciós faktorok jelentős része redox-szenzitív [40, 122]. Ezen felül a ROS szabályozza a fibroblasztok proliferációját és transzformációját matrixtermelő miofibroblasztokká [123].

Az intersticiális fibrózis jelentős mértékben hozzájárul a balkamra-hipertrófia, miokardiális iszkémia, gyulladásos folyamatok és cukorbetegséghez társuló szív diszfunkció kialakulásához. Ezekben az állapotokban az intersticiális fibroblasztok miofibroblasztokká alakulnak, melyek α -simaizom aktint, angiotenzin-konvertáló enzimet (ACE), nagy mennyiségű angiotenzin II receptort, mátrix metalloproteázt (MMP) és MMP szöveti inhibitor (TIMP) expresszálnak [124]. Végeredményként a

remodeling és fibrózis kialakulásában kulcsszerepet játszó redox egyensúly megbomlása következtében a szív szerkezete megváltozik, kontraktilitása csökken és szívelégtelenség alakul ki.

A tüdő endotél, simaizom és fibroblaszt sejtjeiben a NADPH-oxidázok domináns izoformája a NOX4. Az általa termelt ROS funkciói közé tartozik az NF κ B- és MAPK-aktiváció, valamint a sejtproliferáció szabályozása [45, 59]. Fontos szerepe van az oxigénkoncentráció változására történő válaszadásban is. Paradox módon mind hipoxia, mind hiperoxia esetén a ROS képződés növekedése figyelhető meg [125]. Úgy vélik, a hipoxia-indukált NOX aktiváció ROS függő vazokonstrikcióhoz vezet [126]. Ennek a modellnek megfelelően a NOX aktivációnak fontos szerepe van a tüdő hipertenzió kialakulásában is. A kísérleti eredmények is megerősítik ezt, melyekben NADPH-oxidáz aktiváció volt megfigyelhető olyan stimulusokra, melyeket a pulmonális hipertónia kialakulásában tartanak fontos tényezőnek. Exogén hidrogén-peroxid adagolást követően pulmonális vazokonstrikció, valamint hipoxiás pulmonális hipertenzióban a NADPH-oxidáz expresszió vagy aktivitás fokozódása volt megfigyelhető [127, 128].

A NOX4-nek funkcionális szerepe van a miofibroblaszt differenciálódásban és aktiválódásban *ex vivo* és a fibrózis kialakulásban a tüdő sérülését követően *in vivo*. Differenciálódott miofibroblasztokban a TGF- β 1 specifikusan aktiválja a NOX4 enzim expresszióját és működését. A TGF- β 1 két heterodimer transzmembrán receptoron, az I-es és II-es típusú aktív receptor-szerű kináz (ALK) receptorokon keresztül hat. Az ALK receptor a SMAD2 és SMAD3 enzimeket foszforilálja (fibrózisban a TGF- β 1 többnyire a SMAD3 jelátvitelt használja) [129].

Végző soron a NOX4 aktiváció és azon keresztül megvalósuló extracelluláris hidrogén-peroxid termelés szabályozza a miofibroblasztok differenciálódását, fibronectin és extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék szintézisét illetve kontraktilis funkcióit. Ezt bizonyítja az a kísérlet is, melyben a NOX4 endogén szuppressziója siRNS technikával gátolta a TGF- β 1 által indukált α -aktin, fibronectin és prokollagén-I expresszióját [121]. Hasonló módon, idiopátiás tüdőfibrózisban (IPF) a tüdő mezenchima sejtek proliferációja és TGF- β 1-indukált illetve konstitutív kollagén szekréciója is gátolható volt specifikus kis interferáló RNS (siRNS) technikával történő NOX4 kiütéssel [121]. A NOX4 enzim szerepét bizonyítja, hogy a tüdőfibrózis két egérmodelljében is a NOX4

indukciójának vagy működésének genetikai vagy farmakológiai úton történő gátlása alkalmas volt a fibrózis kialakulásának megelőzésére [121].

Mindezek alapján úgy gondolják, hogy a NOX4 egy olyan enzim, mely a metazoák evolúciója során alakult ki, a soksejtes eukarióták túléléséhez nélkülözhetetlen szöveti javító funkciók ellátására. Ezt látszik alátámasztani az a tény is, hogy a NOX4 izoforma szinte csak gerincesekben expresszálódik [130, 131]. A NOX4 aktiváció és a szöveti fibrogenézis kapcsolata egy további példát szolgáltat az úgynevezett antagonisztikus pleiotrópiára, mely szerint bizonyos gének, melyek elősegítik a túlélést és előnyösek az élet korai, reprodukzív szakaszában, potenciálisan káros hatást fejtenek ki a későbbi élet során. A fibrózis tipikusan a különböző szervrendszerekben elrontott szöveti regenerációból és hiányos epitélium javításából adódó komplikáció, melynek gyakorisága általában korfüggő növekedést mutat [132, 133]. A NOX4 enzim, mint terápiás célpont gátlása hatásos stratégiának tűnik a humán fibrotikus megbetegedések más kezelésekre nem reagáló és végkimenetelét tekintve fatális csoportjával szemben.

1.5. Ismert NOX gátló vegyületek

Az elmúlt évtized során, mióta a NADPH-oxidáz izoenzimek egész sora került felfedezésre, egyre jobban megnőtt az igény a specifikus NOX inhibitorok azonosítására, egyrészt a lehetséges terápiás alkalmazásuk miatt, másrészt mert tökéletes eszközt jelentenek az enzimműködés megismerésében. Az első NOX inhibitorokat a neutrofil granulociták ROS termelésének gátlásán keresztül azonosították és karakterizálták. Ezeknek a korai NOX inhibitoroknak a felhasználhatósága viszont számos szempontból limitált volt.

A NOX enzimek sokféle szövetben expresszálódnak. A nem specifikus NOX inhibitorok alkalmazása esetén a szervezet összes NOX izoformájának gátlásával nem kívánt események egész sorával kell számolnunk. Az izoenzim specifikus NOX gátlás az egyik legnagyobb kihívás jelenleg a NOX enzimek kutatásának területén. Annak ellenére, hogy nagyszámú NOX inhibitor molekula létezik, hiányzik a specifitás. Az inhibitorok vagy nem közvetlenül az enzimet blokkolják, hanem az aktivitáshoz vezető jelátvitellel interferálnak valamilyen módon, vagy mint antioxidánsok, gyökfogók hatnak (mint a SOD és peroxidáz-mimetikumok, az N-acetil-cisztein vagy dimetil-

szulfoxid). Más molekulák ugyan direkt módon az oxidáz komplexre hatnak, de blokkolják mindazon enzimrendszerek működését is, melyek azonos struktúrájú kötőhelyekkel rendelkeznek (többek között citokróm P-450, mitokondriális elektron-transzport lánc, NOS) [51].

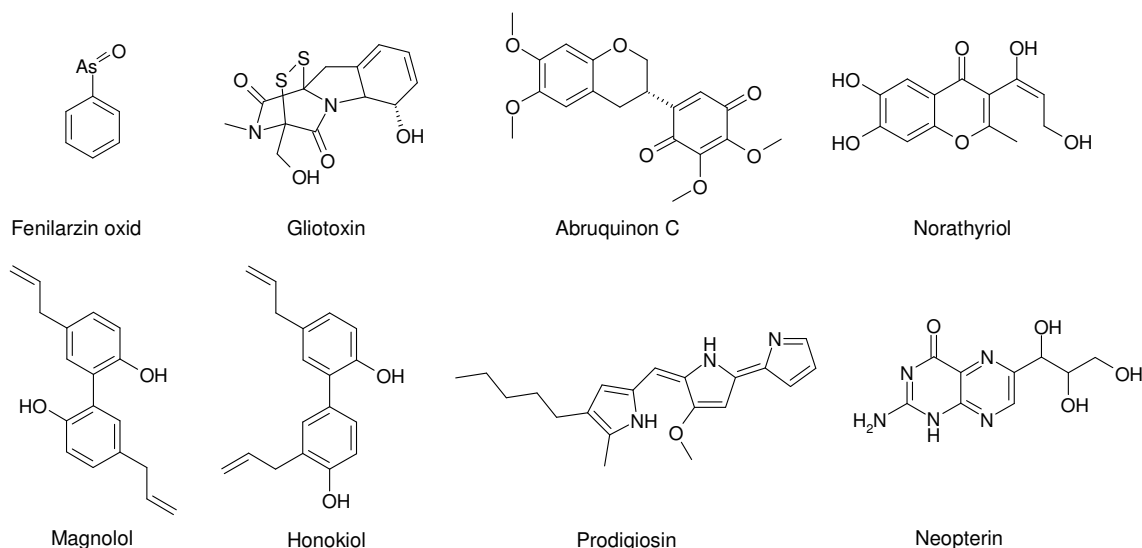
Hogyan képes egy molekula gátolni a ROS termelést anélkül, hogy direkt módon hatást gyakorolna a NOX enzimre? Egy molekula hathat oly módon, hogy az aktivációs mechanizmusokkal interferál, például a NOX2 esetében, annak fiziológiás peptid típusú aktivátora, a formil-metionil-leucil-fenilalanin receptorának a blokkolásával, vagy a NOX1 esetében az angiotenzin II receptor (AT1) blokkolásával [134]. Hasonlóan, azok az anyagok, melyek blokkolják a Ca^{2+} -csatornákat, NOX5 és DUOX aktivitást gátló hatást fejtenek ki, ám nem tekinthetők igazi NOX inhibitoroknak.

Molekulák hathatnak az aktivációs mechanizmus egy későbbi pontján is a protein-kinázok, foszfolipázok, foszfatázok, vagy G-proteinek foszforilációs lépéseinek szintjén.

Az olyan jelátviteli molekulák, mint a Ca^{2+} sejten belüli koncentrációjának csökkentése, gátolja a NOX2 aktivációt, míg azok a molekulák, melyek a ciklikus adenzin monofoszfát (cAMP) szintjét növelik, szintén a jelátviteli folyamaton keresztül fejtenek ki gátlást a NOX2-re [135, 136].

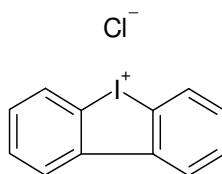
Azok a vegyületek, melyek csökkentik az elektrondonorként szereplő NADPH mennyiségét, úgy mint a pentóz-foszfát útvonal gátlói, végső soron szintén NOX gátlást eredményeznek [137]. Megint mások a sejt ROS elleni endogén védekezőrendszerének (SOD, glutation vagy tioredoxin rendszer) válaszát erősítik fel [138, 139]. Az indirekt NOX gátlás tipikus példái az angiotenzin AT1 receptor gátlói (pl. valsartan), vagy a sztatinok, melyek részben a Rac transzlokáció gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat [140, 141].

Vegyületek százai okozzák a ROS-produkció csökkenését neutrofil granulocitákban, érrendszeri sejtekben, vagy más olyan rendszerekben, ahol a ROS fő forrásai a NOX enzimek. Ezek közül, a NOX katalitikus alegységének direkt gátlása révén hatnak a következő vegyületek: DPI, fenilarzid oxid, gliotoxin, norathyriol, abruquinon C, magnolol, honokiol, prodigiosin, neopterin (**7. ábra**).



7. ábra. NOX enzimek katalitikus alegységének gátlásán keresztül ható molekulák.

- **Difenil-jodónium (DPI) (8. ábra):** A legelterjedtebben használt NOX inhibitor. Az eddig vizsgált NOX enzimeket szubmikromoláris tartományban gátolja (NOX2: $IC_{50} = 0,9 \mu M$, NOX4: $IC_{50} = 0,3 \mu M$, NOX3: $IC_{50} = 0,1 - 0,3 \mu M$) [51].



8. ábra A DPI kétdimenziós szerkezeti ábrája.

A DPI oly módon hat, hogy elvon egy elektront a FAD-ról, majd gyökké alakulva gátolja a FAD, mint elektrontranszporter aktivitását irreverzibilis módon. Habár a DPI nem specifikus, számos más enzimet is gátol, néhányat jelentős mértékben (NOS esetében az $IC_{50} < 100 \text{ nM}$ [142], mégis általánosan elfogadott, hogy sejtes assay-ben, a ROS termelődés gátlása egy rövid DPI-vel történő előinkubáció után (kevesebb mint 30 perc, $< 10 \mu M$), valószínűsíti, hogy NOX enzim volt a ROS forrása. A DPI-vel való inkubáció hosszának növelésével nő a nem specifikus gátlás is [45, 143]. A DPI habár hatásos az *in vitro* NOX vizsgálatokban, nem lehet gyógyszerjelölt molekula, ugyanis irreverzibilis kötődése, mellékhatásai és alacsony oldhatósága miatt toxikusnak találták

rágcsálókban ($LD_{50} < 10 \text{ mg/kg}$) [144]. A DPI mellett egyéb szerves jodónium vegyületek is hatásosnak bizonyultak hasonló gátló mechanizmus révén. A di-2-tienil-jodónium és a fenoxi-jodónium, a neutrofil granulociták NADPH-oxidáz aktivitását $0,5 \mu\text{M}$ ill. $0,75 \mu\text{M}$ koncentrációban a felére csökkentette [145].

Fenilarzin oxid (PAO): Egy hatásos NOX2 inhibitor, de más NOX izoenzimekre gyakorolt hatását eddig még nem vizsgálták. $1 \mu\text{M}$ koncentrációban teljesen gátolja a NOX2 aktivációt neutrofil granulocitákban, bármilyen más celluláris folyamatra (mint a fagocitózis, vagy degranuláció) gyakorolt gátló hatás nélkül [146]. A nyugalmi állapotban lévő NOX alegység a PAO számára hozzáférhető SH-csoportokat tartalmaz a szomszédos cisztein aminosavakon, amely a NOX2 aktivált formájában többé már nem elérhető. Még nem bizonyított egyértelműen, de a fentieknek megfelelően a PAO egy specifikus NOX2 inhibitornak tűnik, mivel a NOX2 az egyetlen izoforma, mely két szomszédos ciszteint tartalmaz [147]. Ugyanakkor általános reaktivitása a cisztein aminosavakkal valószínűsíti, hogy számos más enzim és fehérje működését is gátolja, ezért nem felel meg, mint gyógyszerjelölt, vagy specifikus próba.

Gliotoxin (GTX): Egy *Aspergillus sp.* eredetű mikotoxin, mely gátolja a NOX2 működését neutrofil granulocitákban ($IC_{50} = 8 \mu\text{M}$) [148], de a NOX4-re szinte hatástalan ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) [55]. A feltételezések szerint a PAO-hoz hasonló módon fejti ki hatását, a $p47^{\text{phox}}$ foszforiláció gátlásán keresztül [149]. Ez a gátlás valószínűleg az *Aspergillus* patogenitását támogatja az immunrendszer szuppressziójával. Ezt támasztja alá az is, hogy alacsonyabb, szubmikromoláris koncentrációban gátló hatása van a fagocitózisra [150].

Számos természetes eredetű növényi extraktumból nyert vegyületet teszteltek szisztematikusan főleg a NOX2 gátlás tekintetében. Sajnos egyiket sem vizsgálták más NOX izoenzimre, és arról is igen kevés az információ, milyen a hatásuk más enzimrendszerekre.

A **norathyriol** mind gyökfogó tulajdonsággal, mind NOX2-gátló aktivitással rendelkezik ($IC_{50} = 18 \mu\text{M}$) [151]. Ugyanakkor számos más hatása is van, többek között a xantin oxidáz, a foszfolipáz C (PLC) útvonal és PTP gátlás, valamint a PKC működésének módosítása [151, 152].

Abruquinon C: Egy természetes izoflavánkinon, mely a norathyriolhoz hasonlóan képes gátolni a NOX2 ROS termelését mind neutrofil granulocitákban, mind enzim

assay-ben ($IC_{50} = 1 \mu M$) [151]. A szuperoxid termelésre gyakorolt hatása ugyanakkor részben a PLC és PLD útvonalak gátlásának is köszönhető [151].

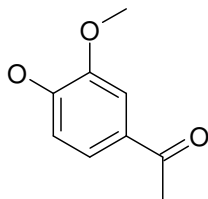
Magnolol: Azon felül, hogy gátolja az izolált neutrofilek ROS termelését (NOX2: $IC_{50} \sim 15,4 \mu M$) [51], egyéb farmakológiai tulajdonságokkal is bír (proapoptotikus hatása van [153] és kötődik a gamma-aminovajsav (GABA) receptorokhoz [154]). Más NOX izoformákon eddig nem tesztelték.

Honokiol: Számos antioxidáns tulajdonsága van és számos *in vivo* aktivitást is mutat, úgy mint a miokardiális infarktus kiterjedésének mérséklése és az aritmiák csökkentése, valamint az agyi iszkémia/reperfúzió csillapítása patkányokban [155]. Neutrofil sejtekben blokkolja a szuperoxid termelést mind ép sejtekben, mind partikulum frakciókban [156]. Teljes mértékben blokkolja a szuperoxid termelést $1 \mu M$ koncentrációban, de csak az enzim aktiválódását követően, ezért lenne használható patológiás állapotokban, ahol az enzim perzisztensen aktiválódott. Alacsony koncentrációban ($0,125 - 1 \mu M$) gátolja a magas glükóz szint indukált humán köldökvéna endotél sejt (HUVEC) apoptózist, feltehetőleg NOX-gátláson keresztül [157].

Prodigiosin: Egy természetes vörös pigment immunszuppresszív és tumorgátló aktivitással. Neutrofil sejtekben a membránhoz való kötődésen keresztül gátolja a Rac és $p47^{phox}$ összekapcsolódását és ezzel a NOX2 aktivitást anélkül, hogy hatást gyakorolna a PKC aktivitására [158, 159].

Neopterin: Egy endogén eredetű vegyület, melyet az aktivált makrofágok szintetizálnak. Gátolja a NOX2 működését mind ép makrofágokban ($IC_{50} = 1,4 \mu M$), mind NOX2 enzim assay-ben ($IC_{50} = 1,2 \mu M$) [160]. Habár a pontos fiziológiai funkciója nem ismert, a feltételezések szerint a NOX2-re gyakorolt fiziológiai gátlása azt a célt szolgálja, hogy a gyulladásos folyamatok során a túlzott mértékű ROS termelést gátolja, és ezzel megelőzi a szöveti károsodást [161].

A NOX katalitikus alegységének indirekt inhibitora az **apocynin (9. ábra)**. Nem hat közvetlenül a katalitikus flavocitokróm szintjére és nem mutat direkt gátlást enzim assay-ben, de a tények azt sugallják, hogy megfelelő körülmények között NOX inhibitoroként működik [162, 163].



9. ábra. Az apocynin kétdimenziós szerkezeti ábrája.

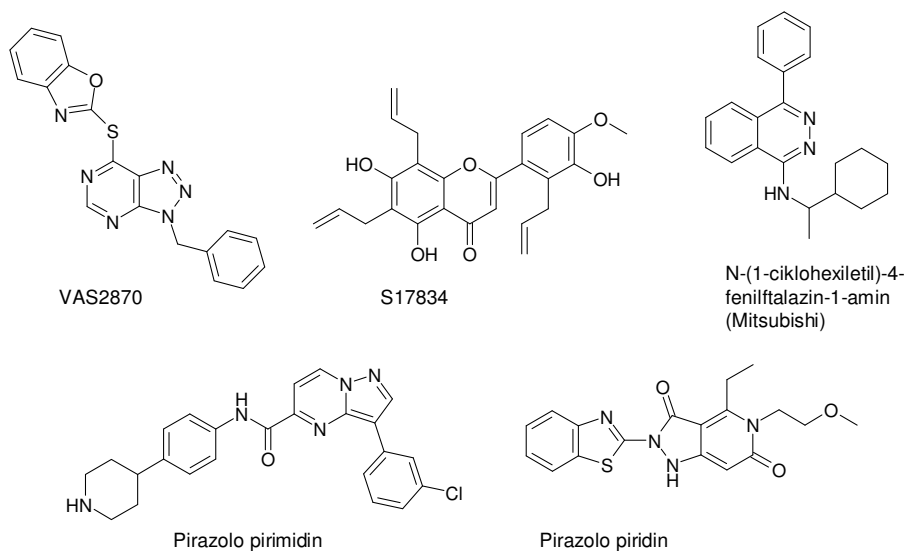
A növényi eredetű apocynin állati modellekben nagyon hatékonynak bizonyult olyan oxidatív stressz eredetű tünetek csökkentésében, mint a hipertenzió, atheroszklerózis és stroke [163]. Az apocynin „kettős” megítélése abból fakad, hogy megfelelő körülmények között egyszerre működik NOX inhibitorként és antioxidánsként. Hatásmódja jelenleg is vita tárgya és számos tanulmány foglalkozik vele [164, 165].

Az apocynin (vagy legalábbis annak aktív változata) a megfigyelések szerint a NOX2 katalitikus része és a p47^{phox} kölcsönhatásának gátlásán keresztül hat. Ha ez igaz, akkor az apocynin bizonyos NOX izoformák (NOX1, NOX2, NOX3) specifikus inhibitora, de hatástalan a NOX4, NOX5 és a DUOX 1 és 2 esetében [164, 166].

Az apocynin farmakológiája igen komplex. Úgy gondolják, hogy egy pro-drug, mely mind hidrogén-peroxidot, mind peroxidázt, elsősorban mieloperoxidázt (MPO) igényel, hogy dimerizálódjon egy apocynin gyökké, ami aztán a NADPH-oxidáz protein komponenseinek tioljait oxidálja [167]. Mivel a neutrofil granulociták és más fagocita sejtek egyaránt rendelkeznek hidrogén-peroxid generáló rendszerrel (NOX2) és MPO-val, az apocynin aktív dimerré tud alakulni. Ugyanakkor a fibroblasztokban, ér simaizomsejtekben vagy transzfektált HEK293 sejtekben, amelyekből hiányoznak ezek a rendszerek, már nem aktív [164]. Tovább bonyolítja a dolgot, hogy nem fagocita sejtekben bizonyos megfigyelések szerint az apocynin (30-300 μ M koncentrációban) növeli a ROS termelést [168].

Összefoglalva, az apocynin nem mutat aktivitást enzim assay-ben, mivel talán az oxidáz enzimkomplex összeépülésével interferál, ami csak ép sejtekben figyelhető meg. *In vivo* egy határozottan hatásos antioxidáns gyógyszer, jó elérhetőséggel, beleértve a vér-agy gát permeabilitást is [51]. Ugyanakkor még mindig nem világos, hogy a gátló hatás mely részei köszönhetőek a gyökkfogó tulajdonságnak és melyek a direkt NOX gátlásnak.

Az eddig tárgyalt, nagyrészt természetes eredetű inhibitorok mellett gyógyszercégek is foglalkoznak NOX gátlók fejlesztésével. Ilyen szintetikus vegyületek többek között a VAS2870, S17834 és a N-(1-ciklohexiletil)-4-fenilftalazin-1-amin (Mitsubishi) (**10. ábra**).



10. ábra. Gyógyszercégek által fejlesztett NOX gátlók.

Forbol-mirisztoil-acetát (PMA) stimulált neutrofilekhez hasonló HL-60 sejtvonalon a **VAS2870** 2 μM -os IC_{50} -nel rendelkezik, míg enzim assay-ben 10,6 μM az IC_{50} értéke NOX2-re [169]. Ezen felül, 10 μM koncentrációban gátolja az oxLDL-indukált ROS képződést endotél sejtekben és a PDGF-indukált ROS képződést simaizom sejtekben [169].

Az **S17834** nevű vegyület gátolja a ROS termelést HUVEC sejtekben és szintén gátolja a NADPH felhasználást endotél sejtmembrán frakciók esetében 2 és 4 órás $\text{TNF-}\alpha$ kezelést követően ($\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$ és $50 \mu\text{M}$) anélkül, hogy a xantin oxidáz rendszer működését befolyásolná [170]. *In vivo* kísérletekben 6 hetes kezelés streptozotocin indukált, diabéteszes, LDL receptor deficiens egerek esetében gátolta az ateroszklerotikus léziók kifejlődését az aortában [171].

N-(1-ciklohexiletil)-4-fenilftalazin-1-amin (Mitsubishi) 50%-os gátlást mutat 6,3 nM koncentrációban a NOX-függő interleukin 8 (IL8) termelésre, magas glükóz szint által stimulált HUVEC sejtekben. Ezen felül azt állítják, hogy nem okoz NOX2 gátlást

leukocitákban, csak az enzim túlműködése esetén. *In vivo* kísérletekben hatásosnak bizonyult ateroszklerózis és iszkémia/reperfúzió kifejlődése ellen az agyban és A szívben [172].

További hatékony vegyületek a **pirazolo pirimidinek** (Shionogi); **tetrahidroindol származékok** (GenKyoTex) és **pirazolo piridinek** (GenKyoTex) (**10. ábra**), ám kevés publikus információ érhető el a biológiai aktivitásukról, mindössze annyi, hogy alacsony mikromoláris IC₅₀ értékkel rendelkeznek NOX gátlás tekintetében [51].

Az elérhető tudományos irodalom, különösen NOX deficiens egereken végzett tanulmányok alapján egyre világosabb, hogy a NOX enzimek gátlása egy ígéretes farmakológiai koncepció az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek kezelésére. Szemben az antioxidánsokkal, melyek hatása kései, csekély hatásfokú és nem specifikus, a szelektív vagy specifikus NOX inhibitorok direkt módon gátolják a ROS produkciót, szemben a már létrejött ROS káros hatásainak csillapításával. Ezen kívül az antioxidánsok hatásfoka arányosan csökken a ROS koncentráció növekedésével, ezért alkalmazásuk kevésbé eredményes olyan patológiás folyamatok esetében, ahol a NOX enzimek túlműködése figyelhető meg. Ez a koncentrációfüggő hatékonyság veszteség nem jelenik meg az enzim inhibitorok esetében. Aggodalomra adhat okot a NOX inhibitorok használata embereken, hisz a NOX2 funkciójának teljes elvesztése CGD-ben az immunrendszer alulműködése révén a baktériumok és gombák fertőzésével szembeni ellenállás csökkenésével jár [173]. Azoknál a CGD-ben szenvedő betegeknél, akiknél a neutrofil sejtek 5-10%-a képes a ROS termelésre, nem figyelhetőek meg súlyos tünetek [174]. Mindez azt sugallja, hogy megfelelő mozgástér áll rendelkezésre a NOX enzimek által megnövekedett ROS termelés gátlására.

Jelenleg egyetlen specifikus NOX inhibitor sem áll készen a klinikai felhasználásra. Az állatkísérletekben legelterjedtebben használt DPI ugyan hatékony, de nem specifikus és toxikus. Az apocynin, pedig nem toxikus, de a NOX enzimekre gyakorolt gátló hatása eddig még nem bizonyított megnyugtató módon. Ezért kiemelkedően fontos az új, gyógyszereszerű NOX inhibitorok felfedezése és kifejlesztése.

2. Célkitűzések

A Semmelweis Egyetem és a Vichem Chemie Kutató Kft. együttműködése és egy közösen elnyert Jedlik Ányos pályázat alapján, a NOX4 klónozását megvalósító SE Élettani Intézet kutatócsoportjával együttműködve, specifikus NOX4 inhibitorokat kívántunk kifejleszteni. Munkánk során a kémikus partnerek segítségével kismolekulás NOX4 gátló hatóanyagok, oxidatív stressz eredetű megbetegedések ellen történő kifejlesztését és hatástani karakterizálását tűztük ki célul. A megfelelő biológiai aktivitással rendelkező, valamint a szakirodalomban eddig nem ismert vegyületek biológiai vizsgálatával potenciális új gyógyszerhatóanyag-jelöltekhez juthatunk. Ezzel reményeink szerint hozzájárulhatunk, és további lökést adhatunk a specifikus NOX4 inhibitorok kifejlesztéséhez.

A fentieknek megfelelően a következő stratégiát állítottuk össze:

- 2.1. A NOX4 gátló vegyületek azonosítására egy egyszerű, de hatékony sejtes alapú rendszer beállítása és optimalizálása. Ezzel kapcsolatban a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetén újonnan kifejlesztett sejtes mérési rendszer optimalizálása volt az elsődleges feladatom.
- 2.2. Hatóanyagok tesztelése a fent leírt sejtes alapú rendszerben, majd az eredmények alapján történő vezérmolekula optimalizáció.
- 2.3. A NOX4 enzim lokalizációjának vizsgálata (NOX4 enzimet endogén módon expresszáló) endotél sejtekben, majd az így kapott eredmények felhasználásával egy enzim alapú mérési rendszer beállítása és optimalizálása a molekulák hatékonyságának ellenőrzésére.
- 2.4. Az esetlegesen hibásan azonosított vezérmolekulák kiszűrése.
- 2.5. A NOX4 gátlás szelektivitásának ellenőrzése.
- 2.6. Szerkezet-aktivitás összefüggés felállítása.
- 2.7. Az ígéretes molekulák korai ADME paramétereinek vizsgálata.

3. Módszerek

3.1. Kémiai háttér

A NOX4 inhibitorok, vezérmolekulák kutatása során kis fókuszált könyvtárak létrehozásának és tesztelésének technológiáját alkalmaztuk. Vezérmolekuláknak azokat a hatóanyag molekulákat tekintjük, amelyek $IC_{50} < 1 \mu M$ értékkel gátolnak egy adott validált célmolekulát.

A kémikus partnerek által rendelkezésünkre bocsájtott validációs vegyülettár, ill. kiterjesztett validációs vegyülettár (EVL-Extended Valiadion Library) a 108 „alapváz” köré tervezett összesen több mint 900 molekulából álló molekulakönyvtár. Az EVL egy olyan diverz vegyülettár, mely biológiai célmolekulák publikált, klinikailag bevezetett vagy pre-klinikailag releváns inhibitorait tartalmazza. Alkalmazása lehetővé teszi, egyrészt a célmolekula kórfolyamatokban játszott döntő szerepének kémiai úton történő validálását annak szelektív gátlása révén, másrészt, az egyes inhibitorok esetében mért biológiai adatok felhasználásával egy farmakofor modell hozható létre, mely újabb vezérmolekulák kiválasztását teszi lehetővé.

A vezető molekulák optilamizálása két módon történt. A tradicionális orvosi-kémiai megközelítést követve a vegyészek analógokat szintetizáltak a kiválasztott molekulák köré. Másrészt egy olyan számítógépes módszert alkalmaztunk kvantitatív struktúra-aktivitás összefüggés (QSAR) vizsgálatokhoz, melynek során a vegyületek mérhető és számítható, kvantum-mechanikai és fizikai-kémiai paramétereinek, (pl. lipofilitás, oldékonyság), molekuláris deskriptorainak és az ezekkel korreláló biológiai hatásoknak a leírására törekedtünk. A kvalitatív szerkezet-hatás összefüggéshez a számítások elvégzését farmakofor modell generálása illetve új, hatékony molekulastruktúrák predikálása majd, tervezése követi. Az EVL lehetőséget ad arra, hogy bonyolultabb tesztrendszerekben, ahol nem áll módunkban ún. HTS (high throughput screening: nagy hatékonyságú szűrés) teszteléseket végezni és több 10000 molekulát vizsgálni, a kémiai diverzitás maximális megtartásával vezérmolekulákat kutassunk.

A molekulák tisztasága nagyobb, mint 98%, melyet mágneses magrezonancia (NMR), és analitikai nagyfelbontású folyadékkromatográfia (HPLC) vizsgálatokkal igazoltak.

3.2. Sejtvonalak

A sejtes assay-ben a vegyületek teszteléséhez a NOX4 enzimet magas szinten expresszáló 293 FS sejtvonalat használtuk. A sejtvonalat Dr. Geiszt Miklós bocsátotta rendelkezésünkre. A sejtvonal pcDNA3.1 vektorral történő stabil transzfekcióját a Semmelweis Egyetem Élettani Intézete végezte és ellenőrizte. A transzfektált sejtvonal NOX4 overexpresszióját illetve H_2O_2 -termelő képességét mi magunk is megvizsgáltuk. Az EA.hy926 (ATCC, crl-2229) egy hibrid sejtvonal, melyet a HUVEC és az A549 sejtvonalak fúziójából hoztak létre. Felhasználásával egy, a fiziológiához közelebb álló rendszert kívántunk vizsgálni az inhibitorok hatásának modellezésére.

A sejteket DMEM médiumban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük. A médium 4,5 g/l glükózt, 110 mg/l Na-piruvátot, 2 mM L-glutamint, 10% magzati borjú szérumot (FBS) és 1% penicillin-streptomycin antibiotikumot tartalmazott. A sejteket felhasználásig 37°C-on, 5%-os CO_2 -termosztátban tartottuk.

3.3. H_2O_2 /Tyr/LPO sejtes assay

A NOX4 enzim H_2O_2 -termelő aktivitását a leírtaknak megfelelően végeztük [175]. A 75 cm^2 -es flaskában konfluenssé vált sejteket tripszines inkubációt követően 260 g fordulaton, 5 percig centrifugáltuk. A leülepedett sejtekről leszívtuk a médiumot, 10 ml foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS) szuszpendáltuk fel, majd Bürker kamrában megszámoltuk őket. Ezután ismét centrifugáltuk (260 g, 5 perc), és H-médiumban (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0,8 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 5 mM glükóz, pH 7,4) szuszpendáltuk fel oly módon, hogy a sejtszám 5×10^5 /ml legyen. A mérések során a 384-lyukú mikrotiter lemez (Greiner 781076, Sigma-Aldrich) lyukaiba 10-10 μ l tesztelendő vegyületet mértünk 50 μ M koncentrációban, majd 40-40 μ l H-médiumban szuszpendált 293 FS sejtet adtunk hozzá. Így a sejtszám 2×10^4 lett, a tesztelendő vegyületek koncentrációja pedig 10 μ M az ötszörös hígulásnak köszönhetően.

A kimutatási reakcióhoz 2 mM tirozint és 2 μ g/ml LPO-t tartalmazó H-médium oldatot készítettünk. A fél óra inkubációs idő leteltével 50-50 μ l-t mértünk ebből az oldatból minden lyukba. Ezáltal a mikrotiter lemez minden üregében 100 μ l összterfogatban a tirozin végkoncentrációja 1 mM, az LPO végkoncentrációja pedig 1 μ g/ml lett. A

fluoreszcenciát újabb fél órás inkubációt követően határoztuk meg ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \pm 40\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 405 \pm 10\text{nm}$). Mivel a mérés során az LPO-t és a tirozint is feleslegben alkalmazzuk, ezért a ditirozin képződés limitáló tényezője a NOX4 enzim által termelt H_2O_2 volt.

3.3.1. Vegyületek minőségellenőrzése

A vegyületeket a Vichem Chemie Kutató Kft. dolgozói szintetizálták, illetve re-szintetizálták. A termékek szerkezetének igazolása spektroszkópiás módszerekkel (HPLC-MS, NMR) történt. A vegyületek tisztaságát vékonyréteg-kromatográfiával (TLC), HPLC-vel, HPLC-MS-sel és kapilláris-elektroforézissel határozták meg.

3.3.2. SDS-PAGE és Western blot

A sejteket PBS-sel mostuk, majd nátrium dodecil-szulfát (SDS) mintapufferben felkapartuk és összegyűjtöttük. A mintákat 200 μl Laemli pufferben vettük fel (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% w/v SDS, 10% glicerin, 50 mM DTT, 0,01% w/v brómofenol kék), majd 6 percig forralva denaturáltuk a gélbe való felvitel előtt. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) 10% akrilamid koncentrációjú gélen (Tris-HCl Gel 10% Linear Gradient, BioRad) végeztük SDS-PAGE standard jelenlétében (low range, Biorad) 90V-on 90 percig.

A fehérjéket a gélről PVDF vagy nitrocellulóz membránra (Millipore) blottoltuk mini trans blot blottoló készülékkel (BioRad) 1 órán keresztül (400 mA). A membrán nem specifikus kötőhelyeinek blokkolására 5%-os marha szérum albumint (BSA) (BioRad) és 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-t (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 136 mM NaCl, 2 mM KCl) használtunk 1 órán át. A membránt 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS mosópufferrel mostuk, majd anti-NOX4 vagy anti-p22^{phox} antitesttel (1:2500, Santa Cruz) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Négyeszeri mosó pufferrel történő mosást követően az elsődleges antitesthez kötöttük a HRP-hez kapcsolt anti-nyúl IgG-t (DAKO) 1:10000 hígításban 1 órán át. Végül többszöri mosást követően ECL Advanced Western Blotting Detection kit (Amersham Biosciences) protokollja szerint detektáltuk a jelölt fehérjét. Az előhívás autoradiográfiás filmen (Kodak) történt.

3.3.3. Amplex Red assay

Az Amplex Red assay-t, az Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit (Invitrogen) leírása alapján végeztük. Az assay futtatása során termelt H_2O_2 mennyiségének kimutatása 50 μM Amplex Red reagenst és 0,1 U/ml HRP-t tartalmazó H-médium vagy KRPG oldat (145 mM NaCl, 5,7 mM Na_2HPO_4 , 4,86 mM KCl, 0,54 mM CaCl_2 , 1,22 mM MgSO_4 , 5,5 mM glükóz, pH 7,35) felhasználásával történt. A HRP enzim katalizálta reakcióban az Amplex Red reagens 1:1 arányban reagál a H_2O_2 -vel, melynek során vörösen fluoreszkáló rezofurin képződik. A 30 perces, 37°C-on történő inkubációs idő elteltével a rezofurin fluoreszcenciát 590 nm-en detektáltuk.

3.4. Immunhisztokémia

24 lyukú szövettenyésztő edényekben, fedőlemezekben tenyésztett sejteket (5×10^4 sejt/well) egy éjszakán át inkubáltuk CO_2 inkubátorban (Hera cell) (37°C, 5% CO_2). Másnap háromszor mostuk PBS-sel és 10 percig fixáltuk, illetve permeabilizáltuk PETMF-ben (0,2% TritonX-100, 0,02 M PIPES pH 6,8, 1 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, és 4% formaldehid). Újabb háromszori mosást követően elsődleges antitestekkel inkubáltuk 1:400 hígításban, 5% BSA tartalmú PBS-ben egy éjszakán át 4°C-on. Ismét háromszor mostuk PBS-sel, majd másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1:2000 hígításban, 5% BSA tartalmú PBS-ben 2-3 órán keresztül. Az antitestek a következők voltak: nyúl poliklonális NOX4 antitest (Santa Cruz), nyúl poliklonális p22^{phox} antitest (Santa Cruz), Cy3-konjugált kecske anti-egér IgG (Jackson Immuno Research), Cy3-konjugált szamár anti-nyúl IgG (Jackson Immuno Research). Hoechst 33342-t (Invitrogen) használtunk az elsődleges antitestekkel a sejtmag specifikus festésére 1:10000 hígításban. A másodlagos antitestekkel való kezelést követően a mintákat négyszer mostuk PBS-sel, majd a fedőlemezeket 12,5 mg/ml DAPCO-tartalmú moviollal (Invitrogen) tárgylemezekhez ragasztottuk és egy éjszakán át hagytuk őket száradni 4°C-on. Az eredmények vizualizálása 'LSM 510 META' (Zeiss) konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal történt.

3.4.1. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos mérések

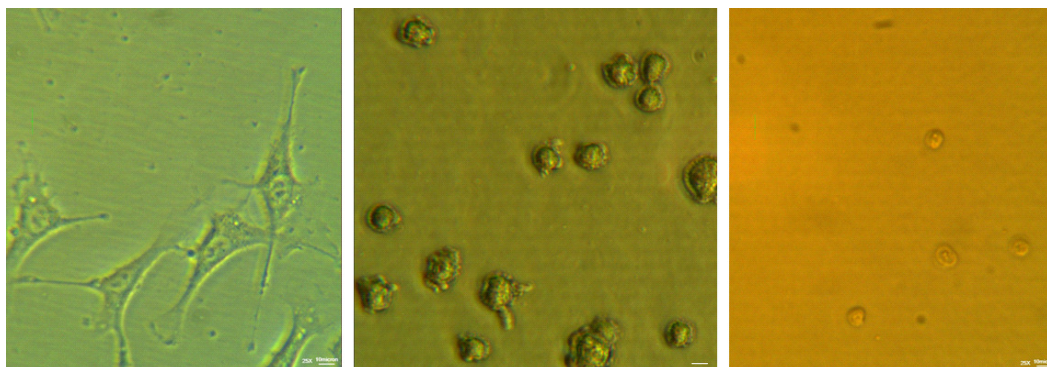
A mintákról 'Zeiss LSM 510 META' konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) készítettük a felvételeket 63x (NA = 1.4) és 100x (NA = 1.4) olajimmerziós objektívvel. A Cy3 fluoreszcens festéket a He-Ne lézer 543 nm-es hullámhosszával gerjesztettük, emisszióját egy 560 nm-es longpass szűrőn keresztül detektáltuk. A Hoechst 33342 fluoreszcens festéket, melyet a DNS festésére használtunk, higanygőz lámpa UV emissziójával gerjesztettük 405 nm-en. Emisszióját egy 420-480 BP sávszűrőn keresztül detektáltuk. A gerjesztő és emittált fotonokat egy 405/488/543 háromszoros dikroikus szűrővel választottuk el.

A konfokális képek készítését és elemzését 'Zeiss LSM Image Browser' (version 4.2.0.121, Carl Zeiss MicroImaging) programmal végeztük.

3.5. EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának preparálása

A 75 cm²-es flaskában konfluenssé vált EA.hy926 endotél sejteket PBS-sel mostuk, majd tripszines inkubációt követően 260 g-vel 5 percig centrifugáltuk. A leülepedett sejtekről leszívtuk a médiumot, 10 ml PBS-ben szuszpendáltuk, majd Bürker kamrában megszámoltuk őket. Ezután ismét centrifugáltuk (260 g, 5 perc), és a pelletet tízszeres térfogatban (2-3 ml) N-pufferben (sejtmag puffer) (10 mM PIPES pH 7,4, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, teljes proteáz inhibitor koktél, 1% NP40) szuszpendáltuk. A sejteket 20-30 percig hagytuk állni jégen ebben a hipotóniás pufferben, folyamatosan ellenőrizve állapotukat fénymikroszkóp alatt

(11. ábra).



11. ábra. Az EA.hy926 endotél sejtek sejtmag frakciójának preparálása. Az első képkockán az érintetlen letapadt sejtek, a másodikon a hipotóniás pufferben megduzzadt sejtek, a harmadikon a preparált és tisztított sejtmag frakció látható. A felvételeket fénymikroszkóppal 25x nagyítású objektívvel készítettük. A fehér csík 10 µm-t jelöl.

Az inkubációs idő leteltével a sejteket Dounce homogenizátorral óvatosan tártuk fel szintén folyamatosan mikroszkóppal ellenőrizve az eljárást. Az így kapott lizátumot 30%-os (0,88 M) szaharóz oldatra rétegeztük, majd 800 g fordulaton centrifugáltuk 4°C-on 10 percig. A felülúszót eltávolítottuk, a pelletet ismét N-pufferben szuszpendáltuk fel, és a nagyobb tisztaság elérése érdekében az utolsó lépést még egyszer megismételtük. Végül mosásként a pelletet ismét felsuszpendáltuk N-pufferben, és 800 g fordulaton centrifugáltuk 4°C-on 10 percig. A felülúszót leöntöttük, a pelletet pedig NS-pufferben (10 mM PIPES pH 7,4, 5 mM EGTA, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 50% glicerol, 250 mM szaharóz, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF és teljes proteáz inhibitor koktél) szuszpendáltuk maximum 1×10^7 sejtmag/ml koncentrációban és -70°C-on tároltuk maximum 1 hétig.

3.5.1. Biokémiai assay

A mérések során a 384-lyukú mikrotiter lemez (Greiner 781076, Sigma-Aldrich) lyukaiba 10-10 µM tesztelendő vegyületet mértünk, majd K RPG pufferben szuszpendált sejtmagokat adtunk hozzá úgy, hogy a sejtmagok száma $1,5 \times 10^4$ / well legyen. A kimutatási reakcióhoz 25 mM NADPH, 20 mM FAD, 100 µM Amplex Red és 0,2 U/ml

HRP enzimet tartalmazó K RPG-oldatot készítettünk és adtunk minden üregbe. Fél órás inkubációt követően a fluoreszcenciát 590 nm-en detektáltuk.

3.6. Eredmények kiértékelése

A vegyületek tesztelése minden esetben minimum triplikátumban történt. A mérések során a vegyületek NOX4-gátló hatását, a kontrollokhoz viszonyított gátlási százalék ill. IC_{50} értékkel jellemeztük. Utóbbi kalkulálásához az XLfit (IDBS) szoftvert alkalmaztuk. Az eredményeket átlaguk és szórásuk feltüntetésével ábrázoltuk. Az assay megbízhatóságát a jel/háttér (S/B) és a jel/zaj (S/N) arány megállapításával határoztuk meg a következő egyenletek alapján.

$$S/B = AV_{\max} / AV_{\min}$$

ahol $AV_{\max}$ a pozitív kontroll esetében kapott abszorbancia értékek átlaga és $AV_{\min}$ a negatív kontroll esetében kapott abszorbancia értékek átlaga.

$$S/N = (AV_{\max} - AV_{\min}) / SD_{\min}$$

ahol $SD_{\min}$ a negatív kontroll szórása.

A sejtes assay uniformitását, elfogadhatóságát és robosztus jellegét a signal window koefficiens, vagy más néven Z'-faktor segítségével határoztuk meg. A Z'-faktor egy egyszerű, dimenzió nélküli statisztikai adat, mely egyaránt kifejezi az assay-ben kapott jel dinamikus tartományát (ΔS) és a mért jel szórását, ennél fogva kiváló eszköz egy assay optimalizálására és validálására, valamint HTS mérések minőségi összehasonlítására és kiértékelésére.

A Z'-érték meghatározása a következő egyenlet alapján történt:

$$Z' = 1 - ((3SD_{\max} + 3SD_{\min}) / (AV_{\max} - AV_{\min}))$$

ahol $SD_{\max}$ a pozitív kontroll szórása.

A Z' -faktor értéke alapján az **1. táblázatban** megadott következtetések vonhatók le az assay minőségét illetően [176].

1. táblázat. Az assay minőségi besorolása a Z' -faktor értéke alapján.

Z'-faktor értéke	Assay minősége
1	Ideális
$1 > Z' \geq 0,5$	Kiváló
$0,5 > Z' > 0$	Bizonytalan
0	„Igen/nem” típusú
< 0	Nem megbízható

Minden esetben meghatároztuk az adott mérésre vonatkozó Z' -értéket és az eredményeket csak akkor fogadtuk el, ha Z' -értéke 0,5 és 1 közé esett.

3.7. Lumineszcens sejtvitalitás vizsgálat

A sejteket megszámoltuk és 5% FBS-sel és 1% antibiotikummal (penicillin-streptomycin) kiegészített DMEM-ben szuszpendáltuk fel. A szuszpenziót 96-lyukú sejtkultúra edény (Nunc) lyukaiba mértük, hogy a sejtszám 2×10^4 sejt/ml legyen. Egy napos, 37°C -on, 5% CO_2 jelenlétében történő inkubációt követően a sejteket különböző inhibitorokkal kezeltük $10 \mu\text{M}$ végkoncentrációban, 72 órán keresztül. Három nap leteltével a sejtek életképességét, 'CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay' (Promega Corp., Madison, USA) kit segítségével határoztuk meg a gyártó leírásának megfelelően. Az assay az életképes sejtek számát határozza meg az ATP jelenlétének közvetett kimutatása révén. A reakció során a luciferáz enzim Mg^{2+} , és ATP jelenlétében a luciferin mono-oxigenációját katalizálja, melynek során oxiluciferin keletkezik. A kimutatás során az oxiluciferin lumineszcenciáját detektáltuk.

3.7.1. MTT vizsgálat

Az EA.hy926 endotél sejtek 10% FBS-t, 10000 U/ml penicillint, 200 mM L-glutamint és 10 mg/ml streptomycint (Gibco, Life Sci.) tartalmazó DMEM sejttenyésztő médiumban 96-lyukú sejtkultúra edényekre ültettük ki (1×10^4 sejt/well) egy nappal a kezelés megkezdése előtt. A sejteket a vegyületek $10 \mu\text{M}$ végkoncentrációjával kezeltük, majd 72 órán keresztül inkubáltuk. Az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid), mitokondriális dehidrogenázok hatására redukálódik, és formazán kristályokat képez az aktívan metabolizáló sejtekben. A kísérletekhez 5 mg/ml MTT oldatot alkalmaztunk, melyet 2 órán keresztül inkubáltunk a sejteken 37°C -os CO_2 inkubátorban. A formazán kristályok feloldására MTT oldószert (10% Triton X-100, 0,1 N HCl, izopropanolban) használtunk 30-60 percig, majd 650 nm-en mértük.

3.7.2. Áramlási citometria

A sejteket 24 lyukú szövettenyésztő edényekbe (Nunc) ültettük ki (5×10^4 sejt/well), majd egy éjszakán át hagytuk őket letapadni. Másnap hozzáadtuk a megfelelő gátló vegyületeket 1 és $10 \mu\text{M}$ végkoncentrációban. A sejteket 72 órán keresztül inkubáltuk az inhibitorokkal CO_2 inkubátorban, majd tripszines kezelést követően a üregek teljes tartalmát FACS csövekbe töltöttük. Centrifugálást követően (260 g, 5 perc) a felülúszót leöntöttük és a pelletet 70%-os etanolban szuszpendáltuk fel. Az így fixált mintákat -20°C -on tároltuk felhasználásig (maximum 1 hétig).

A citometriás mérést közvetlenül megelőzően a sejteket lecentrifugáltuk 4°C -on, 260 g fordulaton 5 percig, az alkoholt leöntöttük róluk és $0,5 \text{ mg/ml}$ ribonukleázzal kiegészített, 200 mM Na_2HPO_4 (pH 7,8) oldatban szuszpendáltuk. Ezt 20 perc inkubáció követte szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő leteltével $50 \mu\text{g/ml}$ propidium-jodiddal (Sigma-Aldrich) festettük meg a nukleinsavat, majd áramlási citométerben vizsgáltuk a mintákat (FACS Calibur, BD biosciences). Az eredményeket a WinList 32 szoftver segítségével értékeltük ki.

3.7.3. IMAP assay

A módszer alapelve, hogy nanorészecskéken rögzített fémionokhoz (M^{III}) nagy affinitással kötődik a foszfát csoport. Az IMAPTM reagens (nanorészecske) komplexet képez az 5-karboxifluoreszcein festékkel megjelölt fehérje szubsztrátra kötődő foszfát csoporttal. A kötődés lecsökkenti a jelölt szubsztrát molekuláris mozgását, ami a mért fluoreszcencia polarizáció (FP) értékének növekedésével detektálható. A tesztek során 384-lyukú mikrotiter lemez (Corning) lyukaiba tesztelendő vegyületeket mértünk 14 μ M koncentrációban, majd 100 nM Akt szubsztrátot (5FAM-GRTGRRNSI-NH2) (Genecust), 7,42 μ M ATP-t és 4 nM Akt kinázt tartalmazó kináz puffert (20 mM MOPS pH 7,0, 1 mM DTT, 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM $MnCl_2$, 0,01% Triton X-100) adtunk hozzá és 1 órán keresztül inkubáltuk. A MEK/ERK mérés esetében 400nM szubsztrátot (5FAM-IPTTPITTTTYFFFK-NH2) (Genecust) és 9,33 nM ERK2 enzimet (Upsate) egészítettünk ki 12,5 μ M ATP-t (Sigma-Aldrich) tartalmazó kináz pufferrel (20 mM Hepes pH 7,5, 1 mM DTT, 2 mM $MgCl_2$, 0,4 mM $MnCl_2$, 0,01% Brij), majd hozzáadtunk 4nM Mek enzimet (ProQuinase) és 1 órán keresztül inkubáltuk. A kimutatást 'IMAPTM Evaluation' kit (Molecular Devices) felhasználásával végeztük, a gyártói leírásainak megfelelően. A puffer oldat és a nanorészecskék aránya 1:400, illetve 1:600 voltak. Az fluoreszcens jel detektálása fél óra inkubációs idő után történt ($\lambda_{ex} = 458 \pm 30$ nm, $\lambda_{em} = 530 \pm 25$ nm).

3.7.4. Kináz assay

A tirozin kináz gátló vegyületek tesztelését, módosított Sigma kit (PTK-101) segítségével végeztük. PBS pufferben oldott 250 μ g/ml poly-(Glu,Tyr-1:4) szintetikus szubsztráttal (Sigma-Aldrich) vontuk be egy 96-lyukú mikrotiter lemez (Costar) lyukait. Egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-on, majd mosó pufferrel (PBS, 0,05% Tween 20) mostuk. Két órás 37°C-on történő szárítás után hozzáadtuk a tesztelendő vegyületeket, az enzimet és 0,3 mM ATP-t (Sigma-Aldrich), kináz reakció pufferben (50 mM Hepes pH 7,4, 20 mM $MgCl_2$, 0,1 mM $MnCl_2$, 0,2 mM Na_3VO_4). Harminc percig 37°C-on rázatva inkubáltuk, majd mosó pufferrel mostuk. Hozzáadtuk a monoklonális egér HRP-konjugált anti-foszfotirozin antitestet (13 mg/ml, 1:5000) (HRP-AB, Sigma-

Aldrich, Clone PT-66) és a mikrotálcát újabb 30 percig inkubáltuk 37°C-on. A kimutatási reakcióhoz foszfát/citrát pufferben (50 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 100 mM NaH_2PO_4 pH 5,0) OPD-t (0,2 mg/ml) (Sigma-Aldrich) és H_2O_2 -t (0,015% w/w) (Sigma-Aldrich) oldottunk és mértünk a lyukakba. Sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk 7 percig, majd 2,5 N H_2SO_4 segítségével állítottuk le a reakciót. A foszforilált szubsztrát mennyiségétől (enzimaktivitás) függően az antitesthez kötött peroxidáz enzim jelenlétében sárga színű termék keletkezett, melynek abszorbanciáját 495 nm-en mértük. Kontrollként (szubsztrát nélküli) és autofoszforilációs (enzim nélküli) méréseket is végeztünk.

3.8. NOX2 assay

A humán neutrofil sejteket egészséges önkéntesek vénás keringéséből nyertük. A mintákat dextrán (GE Healthcare) szedimentációnak és Ficoll-Paque (GE Healthcare) gradiens centrifugálásnak vetettük alá, amit a megmaradó eritrociták hipotóniás lízise követett a korábban közölteknek megfelelően [177]. A sejteket szobahőmérsékleten tartottuk Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes médiumban további felhasználásig, és 37°C-ra melegítettük az aktiváció előtt.

A neutrofil sejteket kétféle módon aktiváltuk.

- Immunkomplex-szel történő aktiválás esetében a mérések során a 384-lyukú mikrotiter lemez (Nunc MaxiSorp) felületét 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (50 mM karbonát/bikarbonát pufferben (pH 9,6) oldott) humán szérum albuminnal (HSA) kezeltük 30 percig. Ezt 30 perc blokkolás követte 10% FBS-ben, majd újabb 30 percig inkubáltuk HSA antitesttel (hígítás 1:400). A kezelést 0,5 mM CaCl_2 -vel és 10 mM MgCl_2 -vel kiegészített HBSS oldatban végeztük. Kontrollként HSA antitesttel nem kezelt lyukakat is alkalmaztunk.

- PMA aktiválás esetében a plate lyukainak felületét 10% FBS-el blokkoltuk. Ezt követte a neutrofil granulociták aktiválása 100 nM PMA-val, melyet 0,5 mM CaCl_2 -vel és 10 mM MgCl_2 -vel kiegészített HBSS-ben oldottunk. Kontrollként PMA-val nem aktivált, illetve inhibitorral nem kezelt mintákat alkalmaztunk. A kísérletek során a neutrofil granulocitákat különböző inhibitorok 1 vagy 10 μM koncentrációjú oldatával inkubáltuk 20 percen keresztül.

A szuperoxid-produkciót citokróm-c redukciós teszttel (Sigma-Aldrich) detektáltuk a korábban leírtaknak megfelelően [177]. Röviden, az inhibitorokkal történő kezelést és a sejtszuszpenzió felmelegítését követően, de az aktivációt megelőzően 100 μM citokróm-c-t adtunk a szuszpenzióhoz. Az ily módon előkezelt sejteket pipettáztuk át az FBS-sel blokkolt felületű lyukakba, hogy a sejtszám 1×10^5 vagy 3×10^4 legyen. Spektrofotometriás készülékkel (Thermo Labsystems Multiskan Ascent) mértük az abszorbanciát 550 nm és 540 nm hullámhosszokon (utóbbit referencia hullámhosszként használtuk).

3.9. clogP meghatározása

A számítógépes kalkulációhoz fragmens alapú számítást alkalmaztunk. Az alkalmazott program neve 3DNET4W (Vichem Kft., 1022 Budapest, Herman O. u. 15., istvan.kovesdi@eqnet.hu, 2002). [178]

3.10. Permeabilitás vizsgálat

- Mintaelőkészítés:

A minták 5 mM-os tömény dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldott törzsoldatát PBS pufferben hígítottuk a kívánt 200 μM (vagy a molekula rosszabb oldékonysága esetén 50 μM) eléréséig. Az így kapott oldatokkal végeztük a permeabilitási vizsgálatokat. Az oldatok DMSO koncentrációja nem haladta meg a 2%-ot, aminek a sejtes vizsgálatok során van jelentősége.

- Mérés menete:

A méréseket BD Gentest 96-lyukú PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) mikrotiter lemez (sorszám: 353015-G) felhasználásával végeztük a gyártó ajánlásainak figyelembevételével.

Az előre gyártott, mesterséges membránnal ellátott PAMPA lemezeket felhasználás előtt fél órát hagytuk állni szobahőmérsékleten. A donor (alsó) mikrotiter lemez lyukaiba pipettáztuk a 200 μM koncentrációjú mintaoldatot 300 μl térfogatban. Az akceptor mikrotiter lemez üregeibe pedig 200 μl PBS-oldat került. Az akceptor lemez donor lemezbe való helyezését követően 5 órás inkubáció következett. Az inkubációs idő

leteltével, a donor és akceptor mikrotálcák szétválasztását követően az oldatok abszorbanciájának detektálása UV/VIS spektrofotometriával történt.

- Permeabilitás számítása:

A mért abszorbancia értékekből elsőként a donor és akceptor mikrotálcán levő oldatkonzentrációkat (C_d és C_a) határoztuk meg:

$$C_d = C_0 \times (A_d - A_p / A_0 - A_p)$$

$$C_a = C_0 \times (A_a - A_p / A_0 - A_p)$$

ahol C_0 a kezdeti mintakonzentrációt, A_d és A_a a donor és az akceptor üregekben lévő oldat abszorpciójának értéke, A_p pedig a tiszta puffer abszorpcióját jelöli.

A fentiek ismeretében kiszámolva az egyensúlyi koncentrációt,

$$C_{eq} = (C_d \times V_d + C_a \times V_a) / (V_d + V_a)$$

megadható a permeabilitás (P_e):

$$P_e = -\ln \times (1 - C_a / C_{eq}) / S \times (1 / V_d + 1 / V_a) \times t$$

Ahol V_d a donor térfogat (0,3), V_a az akceptor térfogat (0,2), S a membrán szűrőfelülete négyzetcentiméterben, t pedig az inkubációs idő másodpercben mérve.

A kapott permeabilitás értékek alapján a vegyületeket két csoportba sorolhatjuk az alsó (donor) mikrotálcára pipettázott mintaoldal esetén:

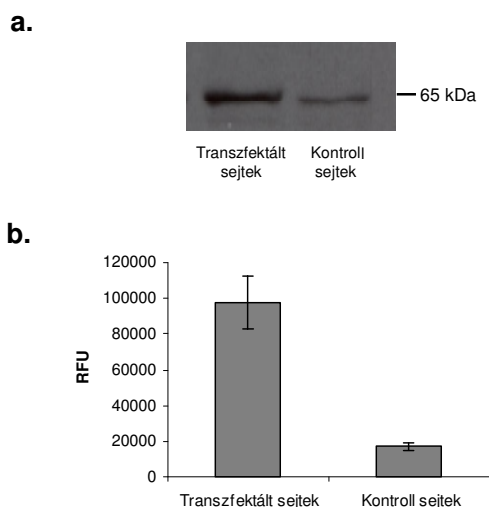
$P_e > 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s (vagyis $\log P_e > -5,82$): nagy permeabilitású molekula

$P_e < 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s (vagyis $\log P_e < -5,82$): kis permeabilitású molekula

4. Eredmények

4.1. 293 FS sejt vonal transzfekció ellenőrzése

A sejtes assay alapját egy transzfektált 293 FS sejt vonal képezte, mely overexpresszálja a konstitutívan hidrogén-peroxidot termelő NOX4 enzimet. A NOX4 overexpressziója kettős jelentőséggel bír. Egyrészt a fiziológiásnál magasabb, patológiás állapotot szimuláló ROS túltermelést eredményez, másrészt a NOX4 enzim jelenős túlsúlyát okozza a sejtben a többi NADPH-oxidáz izoenzimhez, illetve ROS termelő rendszerhez képest. A kísérletei rendszer megbízhatóságának biztosítása érdekében Western blot módszerrel ellenőriztük a NOX4 fehérje expresszióját a transzfektált és nemtranszfektált sejt vonalakban. A NOX4 poliklonális antitest szignifikánsan magasabb NOX4 enzim expressziót mutatott ki a transzfektált sejt vonalban (**12. a ábra**).



12. ábra. a. A NOX4 enzim expressziós szintjének összehasonlítása transzfektált és nemtranszfektált 293 FS sejt vonalakban Western blot módszerrel **b.** A NOX4 enzim aktivitásának vizsgálata a transzfektált és nemtranszfektált 293 FS sejt vonalakban Amplex Red hidrogén-peroxid/peroxidáz módszer alkalmazásával (átlag $\pm$ szórás, $n=3$).

Amplex Red módszerrel vizsgáltuk a termelődött H_2O_2 mennyiségét azzal a céllal, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy ez a magasabb NOX4 expressziós szint nagyobb mennyiségű, a kimutatási reakció alapját képező hidrogén-peroxid termelést eredményez. A **12. b ábrán** látható, hogy a transzfektált sejtvonal H_2O_2 termelése jelentősen magasabb, mint a kontrollé.

4.2. A sejtes assay optimalizálása

4.2.1. Paraméterek beállítása

Az irodalomból ismert, egyszerűen kivitelezhető és költséghatékony vizsgálatra alkalmas sejtes alapú módszer beállítását tűztük ki célul a tesztelések hatékonyságának növelése érdekében. Ennek során egy nagyszámú minta vizsgálatát lehetővé tévő HTS rendszer felállításával, szabadalmaztatható, specifikus hatóanyag kifejlesztésére alkalmas tesztrendszert állítottunk be.

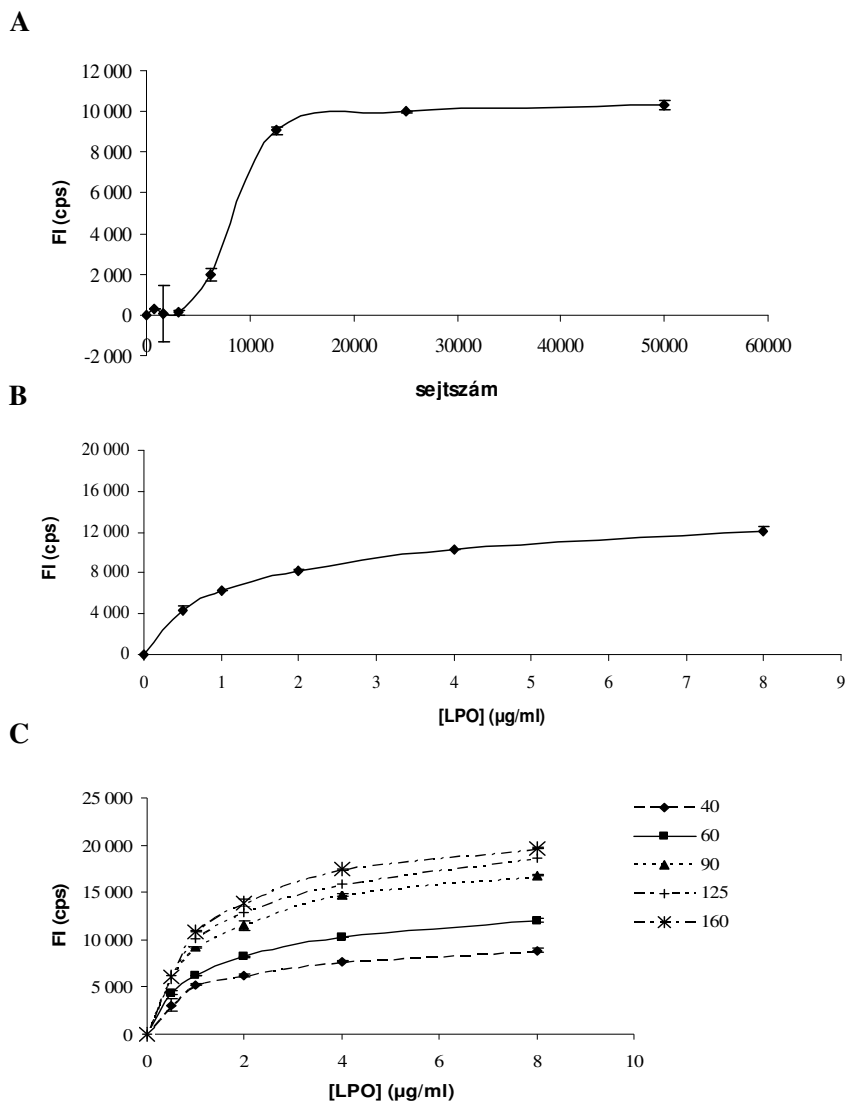
A 293 FS sejtek a plazmamembránban lokalizálódó NOX4 enzimet túltermelik a NOX4 enzim génjét hordozó pCDNA3.1 vektor stabil kifejeződésének köszönhetően. A kimutatási reakció során a NOX4 enzim által előállított H_2O_2 mennyiségét határoztuk meg közvetett módon. Az LPO enzim H_2O_2 jelenlétében, az L-tirozinból o,o'-ditirozint állít elő. Ennek a o,o'-ditirozinnak a mennyiségét határoztuk meg fotometriásan.

Ahol a rendszer mindhárom kritikus komponense: az LPO, a tirozin és a hidrogén-peroxid is jelen volt (pozitív kontroll), magasabb értékek mérhetők, mint a háttér megadó negatív kontroll esetében. Mivel a mérés során a LPO-t és a tirozint is feleslegben alkalmaztuk, ezért a ditirozin képződés limitáló és a számunkra is kritikus tényezője a NOX4 enzim által termelt H_2O_2 . Az assay optimalizálása során a sejtszámot, a kimutatási reakció idejét és a kimutatási reakcióban fontos LPO enzim koncentrációját vizsgáltuk és állítottuk be.

A mérési rendszert úgy módosítottuk, hogy 384-lyukú mikrotiter lemez felhasználásával is kivitelezhetővé váljon. Célunk a vegyülettár-tesztelés hatékonyságának növelése és az overexpresszálo sejtvonal gazdaságosabb felhasználása volt.

A sejtszám optimalizálásához egy felező hígítási sort készítettünk (**13. A ábra**) 384-lyukú mikrotálcnán 5×10^4 sejt / well sejtszámról indulva, és azt vizsgáltuk, hol kapjuk azt

a jelkülönbséget, melynél a termelődött H_2O_2 által generált fluoreszcenciaintenzitás (FI) már nagy biztonsággal elkülöníthető a háttértől. A kísérletek optimális működéséhez minimálisan 1×10^4 sejtre volt szükség, ezért kis biztonsági ráhagyással 2×10^4 sejtet alkalmaztunk a későbbi kísérleteinkben.



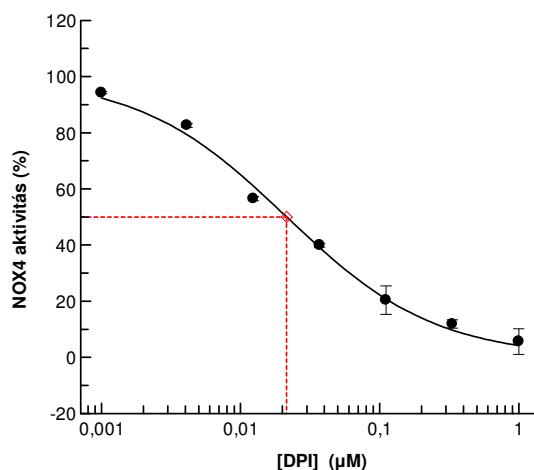
13. ábra. Sejtes assay paramétereinek beállítása. **A.** A vizsgálataink során továbbiakban használt, optimális 293 FS sejtszám meghatározása, egy óra reakcióidő esetében. **B.** és **C.** A LPO enzim optimális koncentrációjának és a kimutatási reakció időtartamának hatása a mért abszorbanciára (átlag $\pm$ szórás, $n=3$).

Az LPO enzim optimális koncentrációjának meghatározása egy 8 µg/ml-ről induló felező hígítási sor tesztelésével történt. A **13. B ábrának** megfelelően a kísérletekben alkalmazott LPO koncentráció alsó határa 1 µg/ml volt.

Az LPO hígítási sor mérése során időfüggést is vizsgáltunk, hogy a kimutatási reakció hosszát meghatározzuk. A kapott jel nem változik számottevő módon az inkubációs idő hosszának változtatásával. A **13. C ábra** alapján kijelenthető, hogy az általunk választott 2 µg/ml LPO koncentráció alkalmazása esetén nincs akkora jelkülönbség a 40 perc és akár a 160 perc időtartamú kimutatási reakció között, mely indokolná a hosszú inkubációt. Ezek alapján a 40 perc inkubációs időt találtuk optimálisnak a kimutatási reakcióhoz. A sejtes assay optimalizálása során a reakciókörülmények beállításának fontos kritériuma volt az assay robosztus jellegének, standardizálhatóságának és könnyű megvalósíthatóságának kialakítása.

4.2.2. A referencia inhibitor, mint belső kontroll vizsgálata

Az assay optimalizálása során a DPI-t is teszteltük, hogy a későbbiekben, mint belső kontrollt alkalmazhassuk kísérleteinkben. A DPI az irodalmi adatok szerint nM-os koncentrációban gátolja a NOX enzimeket. Ennek megfelelően 4 nM és 3 µM közötti koncentrációtartományban vizsgáltuk a DPI hatását a már beállított sejtes assay-ben. Mérési eredményeink szerint (**14. ábra**) a DPI IC₅₀ értéke 0,02 µM, ami megegyezik az irodalomban közölt, de más módszerrel mért adatoknak. További kísérleteink során a DPI-t az általunk tesztelt vegyületek mindenkor koncentrációjának megfelelően hígítottuk és alkalmaztuk, mint belső kontrollt.



14. ábra. A DPI referencia inhibitor gátló hatásának vizsgálata a beállított sejtes assay-ben 4 nM-3 μM koncentrációtartományban. $IC_{50} = 0,02 \mu M$ (átlag $\pm$ szórás, $n=3$).

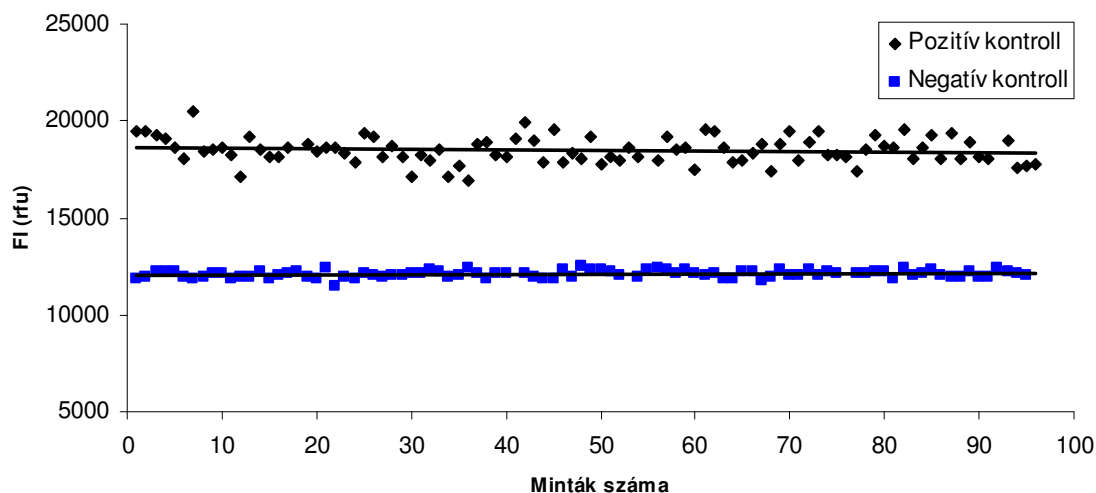
4.2.3. A sejtes assay megbízhatóságának ellenőrzése

A leginkább használatos két paraméter, melyek alapján egy assay minőségét megítélhetjük, a jel/zaj illetve a jel/háttérzaj arányai. A problémát az jelenti, hogy habár ezeknek az értékeknek a megadása hasznos, mégsem elégséges, mivel egyik sem veszi figyelembe egyidejűleg a mérés összes fontos paraméterét, így a minták, a kontrollok és a háttér mért értékeinek szórását, illetve a maximum és minimum jel közötti különbség (ΔS) értékét.

Az általunk alkalmazott sejtes assay működésének és megbízhatóságának ellenőrzésére, nagyszámú kontroll alkalmazásával meghatároztuk a signal window koeficiens vagy Z' -faktor értékét. Ha Z' értéke negatív vagy 0 közeli, az azt jelenti, hogy az assay nincs megfelelően optimalizálva és nem alkalmas megbízható biológiai adatok kinyerésére.

A már beállított H_2O_2 /Tyr/LPO assay Z' érték meghatározását két 96-lyukú mikrotálcán futtatott, egymástól teljesen független vizsgálat keretében végeztük. Mindkét mikrotiter lemez 48-48 pozitív és negatív kontrollt tartalmazott. A pozitív és negatív kontrollreakciók ugyanazokat az összetevőket tartalmazták, de a negatív kontrollokból kihagytuk a kimutatáshoz szükséges ditirozint előállító LPO-t. A vegyületek tesztelésénél alkalmazott fél óra inkubációs idő leteltével meghatároztuk az egyes lyukakban a fluoreszcenciaintenzitás értékeit (**15. ábra**). Ezeknek az átlaga a pozitív kontrollok esetében 18500 rfu, míg a negatív kontrolloknál 12000 rfu volt. Kiszámolva

a Z'-faktor értékét 0,6-et kaptunk, amely egy megfelelően robosztus mérési rendszerre utal.



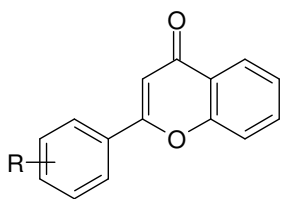
15. ábra. Z'-faktor meghatározása során mért fluoreszcenciaintenzitás értékek a pozitív (felül) és negatív (alul) kontrollok esetében.

4.3. Vegyülettárak tesztelése

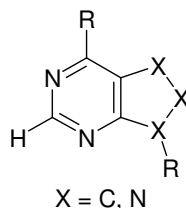
4.3.1. Vegyületek

A szakirodalmat áttekintve megállapíthatjuk, hogy NOX4 enzimet specifikusan gátló anyagok még nem ismertek, ellenben számos vegyületcsaládról írtak le NOX gátló hatást. Ezek a vegyületek képezték az egyik kiindulási alapot a NOX4 enzimet gátló vegyületek szintéziséhez, és a tesztelni kívánt vegyülettár bővítéséhez.

A kémiai partnerscsoport a korábban említett struktúrák közül az **S17834** és a **VAS2870** alapvázát választotta ki, mint kiindulási alapot, a potenciális NOX4 gátlószerek szintéziséhez. A két kiválasztott kémiai szerkezetet számos helyen módosítva (**16. ábra**), fókuszált vegyülettárak kerültek előállításra.



**S17834-
analógok**

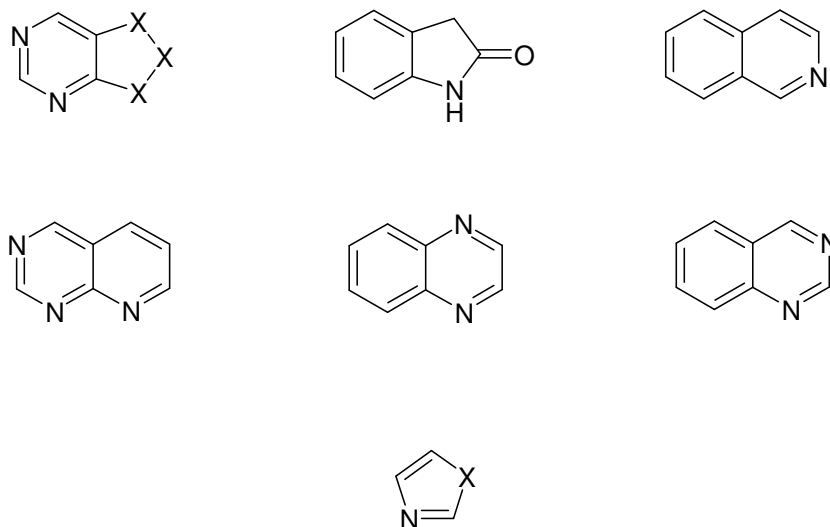


**VAS2870-
analógok**

16. ábra. Az előállított fókuszált vegyülettárak általános képlete.

A VAS2870 és analógjai azért érdemelnek különös figyelmet, mivel az EVL vegyülettár tesztelése során is azonosítottunk rokonszerkezetű, hatékony vegyületeket. A sejes assay beállítását követően több mint 1100 vegyület gátló hatását vizsgáltuk meg.

A vegyülettárak tesztelése négy lépcsőben történt. Első lépésben a bővített validációs vegyülettár anyagainak tesztelését végeztük el (elsődleges szűrés). Az EVL alapszerkezetei közül néhányat a **17. ábra** tartalmaz.



17. ábra. Az EVL alapszerkezetei.

Ezt követően a 60% ($IC_{50} < 10 \mu M$) felett gátló vegyületek köré fókuszált vegyülettárak tesztelését végeztük el szintén $10 \mu M$ végkoncentrációban (másodlagos szűrés). A hatékony molekulák gátlási értékeinek validálása 3 független méréssel történt. Végül

meghatároztuk a 10 μM koncentrációban stabilan 80% felett gátló molekulák IC_{50} értékeit.

4.3.2. Elsődleges szűrés

Az EVL maximális kémiai diverzitása kiválóan alkalmas, hogy kiindulópontként szolgáljon hatékony molekulák azonosításához, illetve a további fejlesztésekhez. Az elsődleges szűrés keretében az EVL közel 900 molekuláját teszteltük az optimalizált $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Tyr}/\text{LPO}$ sejtes assay-ben 10 μM végkoncentrációban. A tesztelések során minden egyes esetben három párhuzamos mérés eredményét átlagoltuk, és viszonyítottuk a pozitív és negatív kontrollokhöz. Referencia inhibitorként a DPI-t használtuk a mindenkor (maximum 10 μM -os) gátlóvegyület-koncentrációknak megfelelően. Az elsődleges tesztelések során 47 olyan vegyületet azonosítottunk, melyek jelentős (80-100 %) gátló hatást fejtettek ki 10 μM koncentrációban a 293 FS sejtek (NOX4 enzim) H_2O_2 termelésére. A 47 vegyület nagyrészt a következő hat vegyületcsalád képviselőiből állt: oxalil-hidrazidok, kinazolinok, flavonoidok, oxindolok, benzo-quinolinok és benzo-tiofének. A vegyületek 10 μM koncentrációban elért NOX4 enzimaktivitás gátlási értékeit a **2. táblázat** tartalmazza. Minden gátlási értéknél megadtuk a konfidencia intervallum (CI) értékét is. A CI segítségével létrehozható a statisztikai sokaság várható értékének megbízhatósági intervalluma. Tehát adott biztonsággal (esetünkben 95%) adja meg az átlagtól való maximális eltérést.

$$\frac{h1 \quad | \quad \Delta \quad | \quad \Delta \quad | \quad h3}{h2}$$

h1: alsó valószínű határ

h2: minta becsült értéke

h3: felső valószínű határ

Δ : hibahatár, maximális eltérés adott biztonsággal

Számítása:

$$\text{CI} \pm 1,96 \text{ (sd}/\sqrt{n})$$

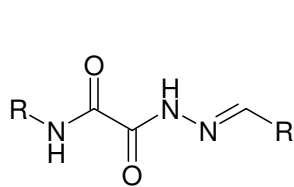
Ahol sd a standard hiba, n pedig a minták száma.

2. táblázat. Az elsődleges szűrés során azonosított molekulák 10 μ M koncentrációban mért gátlási értékei a NOX4 enzim H_2O_2 termelését mérő sejtes assay-ben (átlag $\pm$ CI95%, n=3).

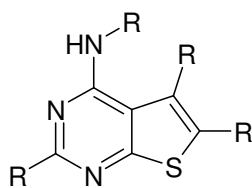
Vegyület sorszáma	Gátlás (%) $\pm$ CI 95%	Vegyület sorszáma	Gátlás (%) $\pm$ CI 95%
1	108 $\pm$ 9	25	105 $\pm$ 7
2	104 $\pm$ 3	26	104 $\pm$ 7
3	104 $\pm$ 8	27	103 $\pm$ 2
4	102 $\pm$ 3	28	102 $\pm$ 4
5	102 $\pm$ 4	29	101 $\pm$ 1
6	101 $\pm$ 3	30	100 $\pm$ 1
7	100 $\pm$ 3	31	100 $\pm$ 5
8	100 $\pm$ 8	32	99 $\pm$ 2
9	98 $\pm$ 9	33	97 $\pm$ 3
10	96 $\pm$ 8	34	96 $\pm$ 10
11	96 $\pm$ 10	35	95 $\pm$ 2
12	95 $\pm$ 10	36	94 $\pm$ 6
13	93 $\pm$ 8	37	93 $\pm$ 8
14	93 $\pm$ 5	38	92 $\pm$ 8
15	92 $\pm$ 2	39	91 $\pm$ 8
16	91 $\pm$ 7	40	91 $\pm$ 11
17	90 $\pm$ 3	41	90 $\pm$ 10
18	89 $\pm$ 9	42	89 $\pm$ 3
19	88 $\pm$ 2	43	87 $\pm$ 4
20	87 $\pm$ 2	44	86 $\pm$ 5
21	85 $\pm$ 9	45	84 $\pm$ 8
22	84 $\pm$ 23	46	83 $\pm$ 7
23	82 $\pm$ 7	47	82 $\pm$ 4
24	80 $\pm$ 20		

4.3.3. Vegyülettár bővítése

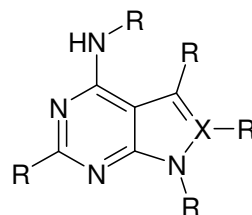
A molekulák tesztelése során számos hatékony, korábbi ismereteink szerint új típusú molekulát azonosítottunk, amelyek újabb kiindulópontot kínáltak a további fókuszált vegyülettárak tervezéséhez és szintéziséhez. Ezen felül a már rendelkezésre álló vegyületek közül további analóg struktúrákat választottunk ki. Az így nyert információk alapján a **18. ábrán** látható általános szerkezetű vegyületeket vizsgáltuk.



Oxalil-hidrazidok



Tieno-pirimidinek



Pirrolo-pirimidinek és pirazolo-pirimidinek

18. ábra Az elsődleges tesztelés eredményei alapján további tesztelésre kiválasztott fókuszált vegyülettárak

A már korábban is említett, egyik legfontosabb vegyületcsalád a kondenzált pirimidin gyűrűt tartalmazó pirrolo- illetve pirazolo-pirimidinek. A vegyületcsoport azért is kiemelt fontosságú, mert képviselőik egyaránt megtalálhatóak az irodalomban leírt, kisszámú NOX4 enzimet is gátló vegyület között, és az általunk azonosított hatékony molekulák között is.

4.3.4. Fókuszált vegyülettárak tesztelése

Összesen 200 analóg molekulát választottunk ki az oxalil-hidrazidok, flavonoidok, benzotiofének, pirrolo-, illetve pirazolo-pirimidinek közül, és teszteltünk le 10 μ M végkoncentrációban sejtes assay-ben. A fókuszált vegyülettárak tesztelése során azonosított molekulák 10 μ M koncentrációban elért NOX4 gátlási értékeit a **3. táblázatban** foglaltuk össze.

3. táblázat. A fókuszált vegyülettárak tesztelése során azonosított molekulák 10 μM koncentrációban mért gátlási értékei a NOX4 enzim H_2O_2 termelését mérő sejtes assay-ben (átlag $\pm$ CI95%, $n=3$).

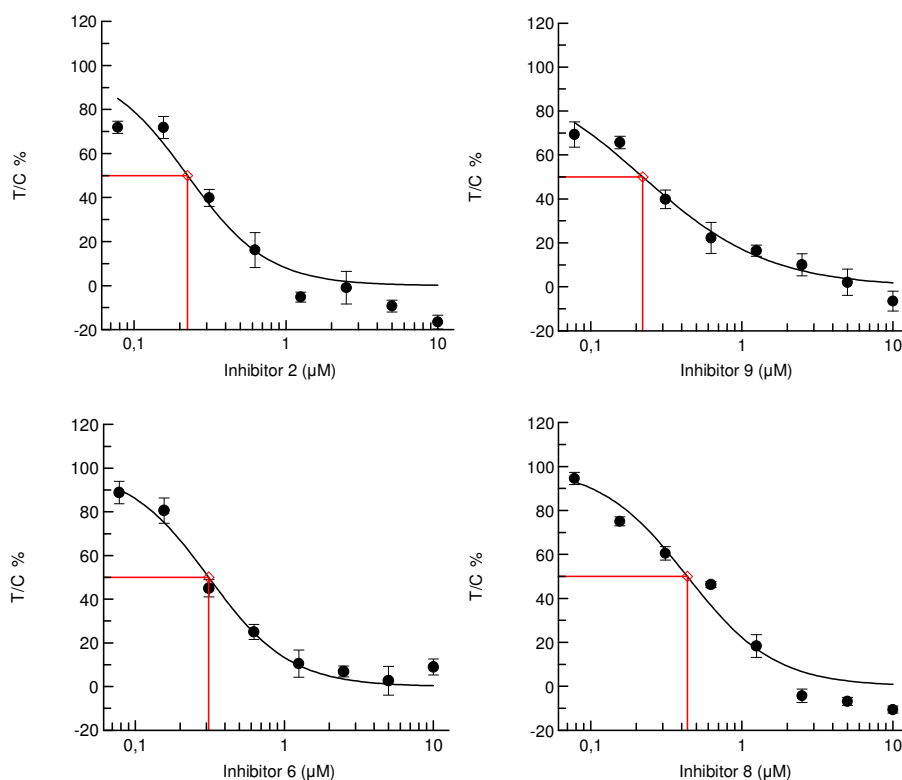
Vegyület sorszáma	Gátlás (%)
48	106 $\pm$ 1
49	105 $\pm$ 2
50	105 $\pm$ 1
51	105 $\pm$ 1
52	100 $\pm$ 1
53	97 $\pm$ 14
54	97 $\pm$ 13
55	93 $\pm$ 16
56	93 $\pm$ 16
57	93 $\pm$ 14
58	93 $\pm$ 12
59	92 $\pm$ 21
60	92 $\pm$ 20
61	91 $\pm$ 18
62	91 $\pm$ 1
63	90 $\pm$ 11
64	88 $\pm$ 12
65	82 $\pm$ 16
66	81 $\pm$ 1
67	80 $\pm$ 9
68	80 $\pm$ 8

Összességében tehát 68 vegyületet találtunk hatásosnak, melyek pontos IC_{50} értékeit is meghatároztuk egy 10 μM koncentrációról induló, 8 pontos felező hígítási sor tesztelésével. IC_{50} értékeiket az **4. táblázatban** láthatjuk.

4. táblázat. A sejtes assay-ben tesztelt hatásos vegyületek IC_{50} értékei. Az IC_{50} értékek meghatározását az inhibitorok 10-0.078 μM koncentrációtartományban készített felező hígítási sorának tesztelésével végeztük. A görbék illesztése és IC_{50} értékek meghatározása az XLfitTM (IDBS) szoftver felhasználásával történt (átlag $\pm$ CI95%, n=3).

Vegyület sorszáma	IC_{50} (μM)	Vegyület sorszáma	IC_{50} (μM)
2	0,17 $\pm$ 0,03	9	0,24 $\pm$ 0,14
6	0,26 $\pm$ 0,01	8	0,46 $\pm$ 0,05
1	0,52 $\pm$ 0,15	33	0,59 $\pm$ 0,36
27	0,63 $\pm$ 0,41	28	0,63 $\pm$ 0,61
36	0,68 $\pm$ 0,48	52	0,74 $\pm$ 0,14
44	0,79 $\pm$ 0,05	50	0,83 $\pm$ 0,12
48	0,85 $\pm$ 0,31	31	0,86 $\pm$ 0,44
14	0,93 $\pm$ 0,98	60	0,91 $\pm$ 0,09
30	1 $\pm$ 0,17	18	0,96 $\pm$ 0,13
34	1,02 $\pm$ 0,54	64	1,02 $\pm$ 0,75
40	1,04 $\pm$ 0,14	29	1,07 $\pm$ 0,48
38	1,1 $\pm$ 0,86	5	1,13 $\pm$ 0,46
51	1,13 $\pm$ 0,68	25	1,16 $\pm$ 0,71
57	1,16 $\pm$ 1,05	49	1,2 $\pm$ 0,27
39	1,27 $\pm$ 0,03	56	1,27 $\pm$ 0,53
53	1,3 $\pm$ 0,19	23	1,34 $\pm$ 0,48
3	1,4 $\pm$ 0,42	7	1,35 $\pm$ 0,21
13	1,58 $\pm$ 0,66	35	1,58 $\pm$ 0,71
47	1,59 $\pm$ 0,1	59	1,64 $\pm$ 0,78
41	1,67 $\pm$ 0,14	15	1,7 $\pm$ 0,57
43	1,85 $\pm$ 1,14	42	1,86 $\pm$ 0,03
63	2 $\pm$ 0,02	12	2,1 $\pm$ 0,81
32	2,11 $\pm$ 0,61	16	2,2 $\pm$ 1,93
17	2,25 $\pm$ 0,63	11	2,31 $\pm$ 1,11
45	2,37 $\pm$ 0,3	20	2,38 $\pm$ 1,58
55	2,4 $\pm$ 1,63	54	2,43 $\pm$ 0,26
19	2,44 $\pm$ 0,1	21	2,62 $\pm$ 2,2
65	3,04 $\pm$ 0,99	10	3,02 $\pm$ 0,09
67	3,22 $\pm$ 0,37	61	3,1 $\pm$ 0,09
24	3,29 $\pm$ 0,16	62	3,28 $\pm$ 0,06
68	3,38 $\pm$ 0,56	22	3,31 $\pm$ 0,57
66	3,84 $\pm$ 0,16	46	3,59 $\pm$ 0,72
4	5,7 $\pm$ 0,59	58	3,86 $\pm$ 0,1
26	6,64 $\pm$ 0,12	37	6,17 $\pm$ 0,06

A **19. ábra** a sejtes assay-ben azonosított, leginkább hatásos inhibitorok hatástani görbéit mutatja. Az IC_{50} értékek meghatározását követően a hatékony molekulák nagy száma miatt úgy döntöttünk, hogy az irodalom alapján is maximálisan elfogadható 2 μM alatti IC_{50} értékekkel rendelkező molekulákat vetjük alá további vizsgálatoknak. A hatékony molekulák ily módon szűkített csoportja még mindig tökéletes alapot szolgáltatott a további szelektáláshoz.

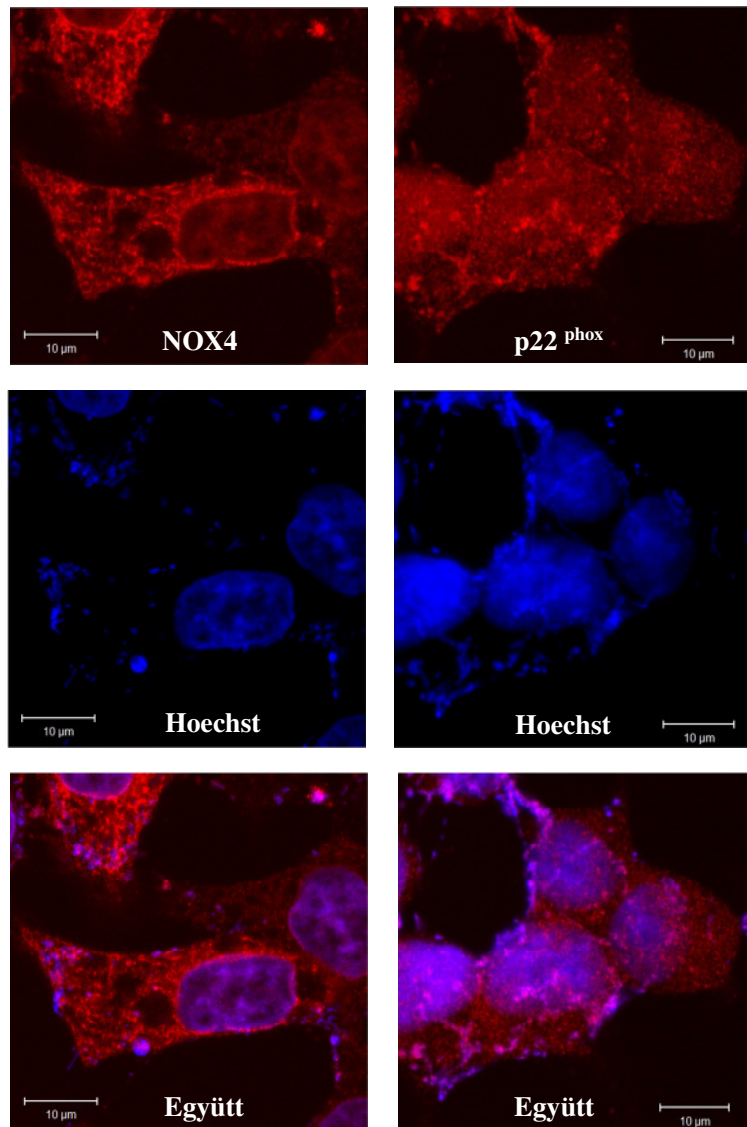


19. ábra. Az 4. táblázatban szereplő 2, 9, 6 és 8 számú, a sejtes assay-ben leginkább hatékony vegyületek ($IC_{50} < 500$ nM) IC_{50} görbéi. Az IC_{50} értékek meghatározását az inhibitorok 10-0,078 μM koncentrációtartományban készített felező hígítási sorának tesztelésével végeztük. A görbék illesztése és IC_{50} értékek meghatározása az XLfitTM (IDBS) szoftver felhasználásával történt (átlag $\pm$ szórás, $n=3$).

4.4. A NOX4 enzim aktivitásának vizsgálata, sejtes rendszerből izolált enzim segítségével

4.4.1. NOX4 és p22^{phox} lokalizáció vizsgálata

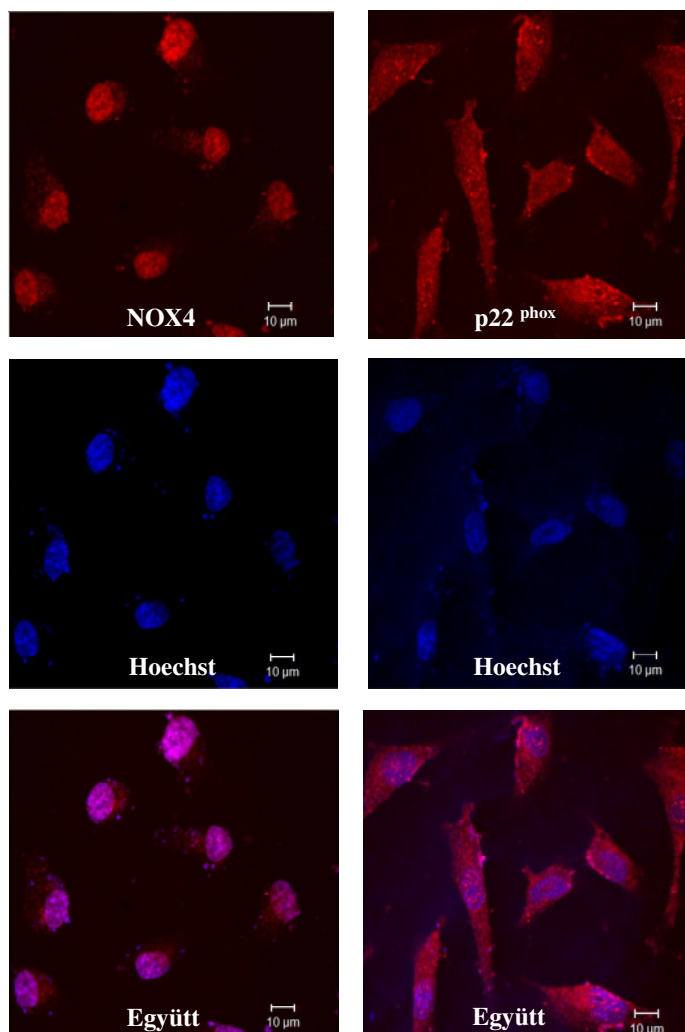
Az elérhető irodalmat áttekintve a NOX4 enzim sejten belüli kifejeződése rendkívül ellentmondásos, ennél fogva nagyon valószínű, hogy nagymértékben függ a sejtípustól, illetve az adott sejten belül betöltött funkciótól, valamint az expressziós szinttől. A NOX4 és p22^{phox} fehérjék sejten belüli megjelenését két eltérő eredetű: egy epitel (293 FS) és egy endotél sejtvonalon (EA.hy926) vizsgáltuk. A vizsgálatokat nem csak azzal a céllal végeztük, hogy megnyugtató választ kapjunk a NOX4 enzim sejten belüli kifejeződésére az általunk használt sejtvonalakban. A NOX4 lokalizációjának ismerete szükséges feltétele volt annak a tervünknek is, hogy beállítsunk egy biokémiai assay-t a NOX4 enzim aktivitásának mérésére. A **20. ábra** alapján megállapíthatjuk, hogy az epitel sejtvonala esetében a NOX4 enzim ugyan nagyobb koncentrációban volt megtalálható a perinukleáris régióban, elsősorban mégis a periférián fejeződik ki.



20. ábra. A NOX4 és $p22^{phox}$ fehérjék lokalizációjának vizsgálata transzfektált 293 FS epitél sejtvonalban. A kísérleteket háromszor ismételtük meg azonos eredménnyel. A felvételeket konfokális lézer pásztázó mikroszkópal készítettük 100x (NA=1,4) olajimmerziós objektívvel.

Ezzel szemben az endotél sejtvonal esetében a NOX4 enzim egyértelműen a sejtmagban expresszálódik (**21. ábra**). A $p22^{phox}$ kofaktor mindkét esetben az irodalomban közölteknek megfelelően a sejtben mindenhol megtalálható volt. Ezeket az eredményeket felhasználva kísérletet tettünk egy biokémiai assay megtervezésére és beállítására az EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának felhasználásával.

21. ábra. A NOX4 és p22^{phox} fehérjék lokalizációjának vizsgálata EA.hy926 endotél sejtvonalonban. A kísérletek háromszori ismétlése azonos eredményt hozott. A felvételeket konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettük, 63x (NA=1,4) olajimmerziós objektívvel.



4.4.2. Biokémiai assay

4.4.2.1. Paraméterek beállítása

A NOX4 egy transzmembrán enzim, mely csak a membránba történő transzlokációját és a p22^{phox}-szal történő összekapcsolódást követően válik aktívvá. Az enzim sejten belüli lokalizációjának meghatározásával lehetőség nyílt egy biokémiai assay beállítására.

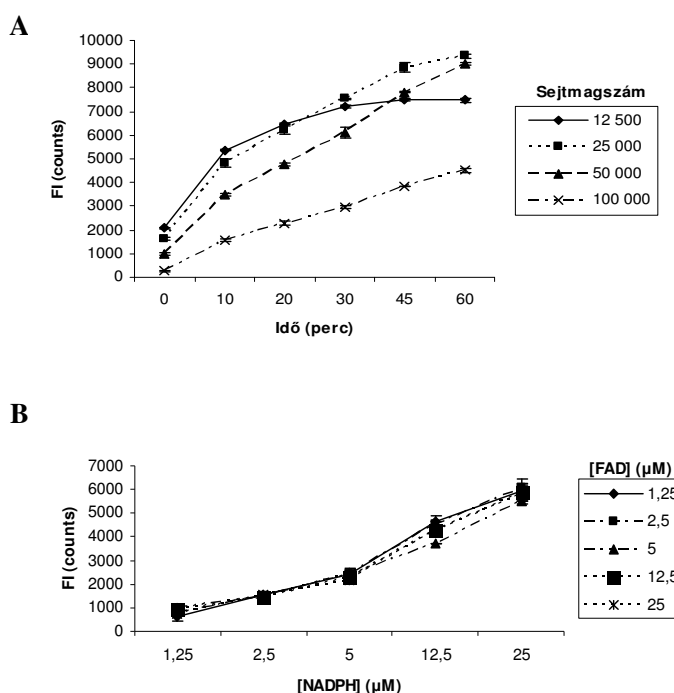
A fent leírt eredményeink és a fellelhető irodalom alapján két lehetőség kínálkozott a NOX4 enzim izolálására. Az egyik a 293 FS sejtek plazmamembrán frakciójának, a másik az EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának felhasználása. A 293 FS sejtekben történő NOX4 overexpresszió biztosítéka volt annak, hogy a hatékony vegyületek gátolják a NOX4 enzimműködést, de nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a sejtben lejátszódó esetleg még ismeretlen NOX4 gátlást okozó folyamatokon fejtik ki hatásukat.

Fő célunk tehát az "off-target" aktivitás kizárása volt, de szeretnénk volna a korábban kapott eredményeket is megerősíteni. Az EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának felhasználása mellett döntöttünk, ezzel ugyanis nem csupán egy, a NOX4 enzimet endogén módon expresszáló sejtvonalon volt módunk vizsgálni a gátlómolekulákat, de egy, a korábbtól eltérő és széles körben alkalmazott kimutatási reakció (Amplex Red assay) alkalmazásával az újonnan kifejlesztett H_2O_2 /Tyr/LPO kimutatási reakciót is validálhattuk.

A korábbi méréseinknél alkalmazott módon, minden esetben három párhuzamos, független mérés alapján határoztuk meg a vegyületek hatékonyságát a pozitív és negatív kontrollok abszorbancia értékei alapján. Minden esetben meghatároztuk az adott mérésre vonatkozó Z' értéket és az eredményeket csak akkor fogadtuk el, ha Z' -faktor értéke 0,5 és 1 közé esett.

Az EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának izolálását követően a biokémiai assay egyes paramétereit (sejtmagszám, reakcióidő, NADPH- és FAD-koncentráció) hasonló módon optimalizáltuk, mint a sejtes assay esetében.

A sejtmagszám optimalizálására egy felező hígítási sort készítettünk (**22. A ábra**) 384-lyukú mikrotálcán 1×10^5 sejtmag / well koncentrációról indulva, és a sejtmagszám, illetve a kapott jel (fluoreszcenciaintenzitás) összefüggéseit vizsgáltuk, a reakcióidő függvényében. A **22. A ábrán** látható módon, a kísérletek optimális működéséhez és a megfelelő jelkülönbség eléréséhez már a 12 500 sejtmag/well érték is elégségesnek bizonyult, ezért a további kísérleteinkben ezt használtuk.



22. ábra. Biokémiai assay paramétereinek beállítása: **A.** Az optimális EA.hy926 sejtmagszám meghatározása a reakcióidő függvényében. **B.** A FAD és NADPH optimális koncentrációjának meghatározása (átlag $\pm$ szórás, $n=3$).

A NOX4 enzim működéséhez NADPH szubsztrátot és FAD kofaktort igényel. Az irodalomban leírtaknak megfelelően a 10 μ M FAD- és 12.5 μ M NADPH-koncentrációk használata mellett döntöttünk. Az **22. B ábrán** látható, hogy a koncentrációk növelésével gyakorlatilag lineárisan növekszik a kapott jel értéke is. A 10 μ M FAD- és 12.5 μ M NADPH-koncentrációk alkalmazásával elért jelkülönbség nem indokolta a magasabb koncentrációk használatát, tehát mi is ennyit alkalmaztunk a továbbiakban.

4.4.2.2. Szűrés és IC₅₀ értékek meghatározása

Az optimalizálási lépéseket követően minden olyan molekulát leteszteltünk a biokémiai assay-ben, amelyet a sejtes assay-ben vizsgálva hatékornak találtunk (összesen 54 vegyületet). Első lépésben 10 μ M végkoncentrációban vizsgáltuk a vegyületeket (**5. táblázat**). A tesztek során, mint eddig is, minden esetben három párhuzamos mérés eredményét átlagoltuk és viszonyítottuk a pozitív és negatív kontrollokhoz. Referencia

inhibítorként aszkorbinsavat alkalmaztunk, minden esetben 100 μM végkoncentrációban.

5. táblázat. A korábban azonosított hatékony molekulák 10 μM koncentrációban mért gátlási értékei a NOX4 enzim H_2O_2 termelését mérő biokémiai assay-ben (átlag $\pm$ CI95%, $n=3$).

Vegyület sorszáma	Gátlás (%) $\pm$ CI 95%	Vegyület sorszáma	Gátlás (%) $\pm$ CI 95%
55	126 $\pm$ 12	6	114 $\pm$ 7
33	111 $\pm$ 19	54	105 $\pm$ 7
36	105 $\pm$ 15	43	104 $\pm$ 3
38	102 $\pm$ 9	42	102 $\pm$ 2
31	101 $\pm$ 8	7	99 $\pm$ 8
41	98 $\pm$ 8	14	98 $\pm$ 7
25	98 $\pm$ 20	44	97 $\pm$ 13
2	94 $\pm$ 17	13	94 $\pm$ 11
34	93 $\pm$ 7	35	89 $\pm$ 13
49	85 $\pm$ 16	18	84 $\pm$ 13
3	82 $\pm$ 10	8	82 $\pm$ 14
21	81 $\pm$ 13	45	80 $\pm$ 13
30	79 $\pm$ 13	52	77 $\pm$ 16
32	77 $\pm$ 5	16	76 $\pm$ 17
1	76 $\pm$ 10	50	74 $\pm$ 3
63	71 $\pm$ 14	17	70 $\pm$ 8
48	69 $\pm$ 17	5	68 $\pm$ 4
15	63 $\pm$ 16	39	58 $\pm$ 7
56	58 $\pm$ 4	27	58 $\pm$ 11
10	55 $\pm$ 6	28	55 $\pm$ 5
12	54 $\pm$ 4	29	53 $\pm$ 11
51	50 $\pm$ 13	59	43 $\pm$ 12
64	40 $\pm$ 12	53	40 $\pm$ 9
20	35 $\pm$ 8	60	30 $\pm$ 6
23	24 $\pm$ 10	47	16 $\pm$ 15
19	7 $\pm$ 9	11	4 $\pm$ 7
9	2 $\pm$ 9	40	0 $\pm$ 20

Az 50% fölött gátló 43 vegyület mindegyikének meghatároztuk az IC_{50} értékét is egy 2,5 μM , illetve 10 μM koncentrációról induló, 6 pontos felező hígítási sor felvételével. A vegyületek IC_{50} értékeit a **6. táblázat** összegzi.

6. táblázat A biokémiai assay-ben tesztelt hatásos vegyületek IC_{50} értékei. Az IC_{50} értékek meghatározását az inhibitorok 10 μM -310 nM illetve 2,5 μM -78 nM koncentrációtartományokban készített felező hígítási sorának tesztelésével végeztük. A görbék illesztése és IC_{50} értékek meghatározása az XLfitTM (IDBS) szoftver felhasználásával történt (átlag $\pm$ CI95%, n=3).

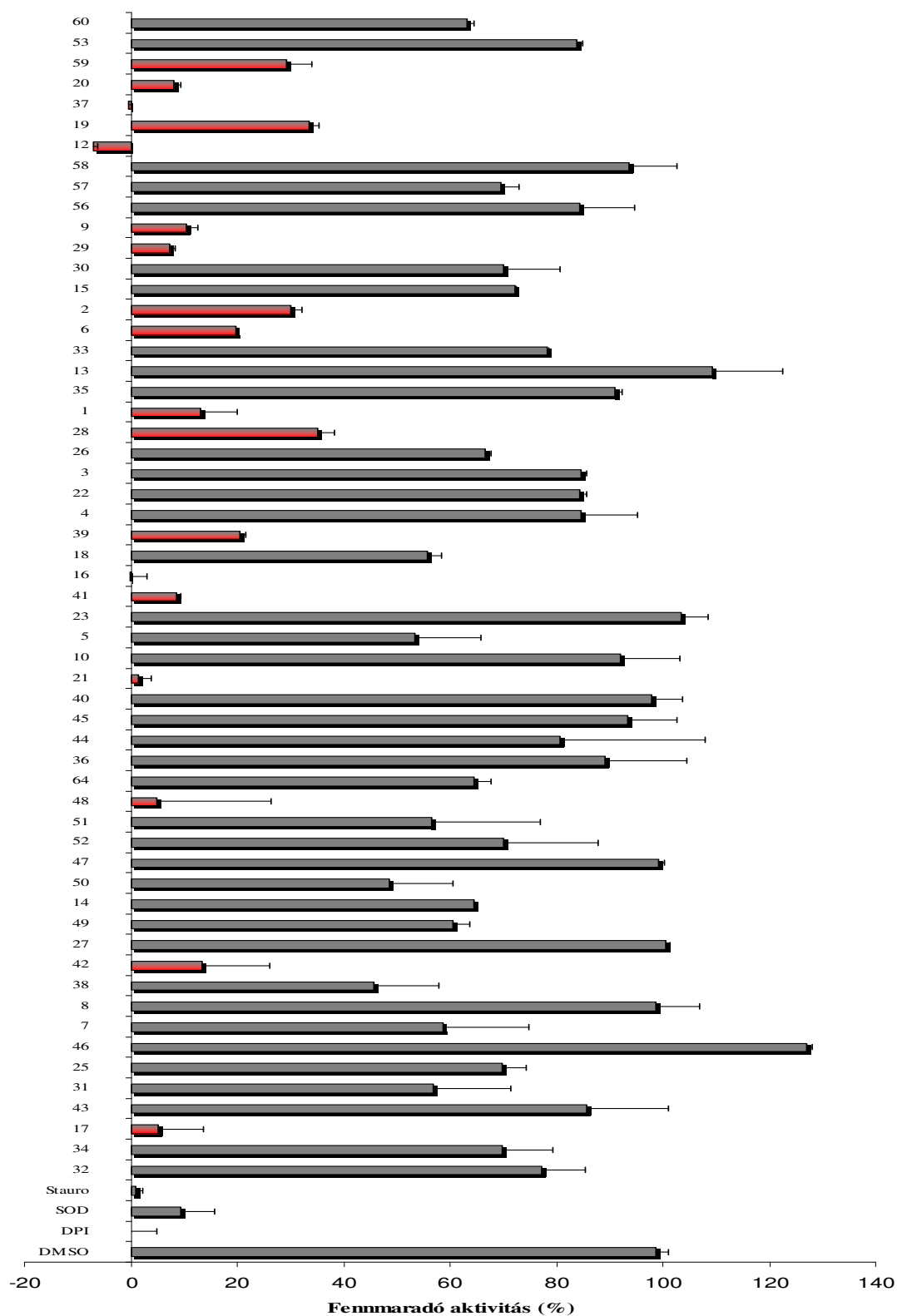
Vegyület sorszáma	IC_{50} (μM)	Vegyület sorszáma	IC_{50} (μM)
38	0,22 $\pm$ 0,24	8	0,38 $\pm$ 0,03
55	0,38 $\pm$ 0,14	31	0,41 $\pm$ 0,1
34	0,45 $\pm$ 0,06	25	0,46 $\pm$ 0,27
44	0,53 $\pm$ 0,09	50	0,59 $\pm$ 0
43	0,6 $\pm$ 0,12	7	0,82 $\pm$ 0,48
32	0,93 $\pm$ 0,17	39	0,93 $\pm$ 0,33
41	0,96 $\pm$ 0,37	6	1,1 $\pm$ 0,09
45	1,28 $\pm$ 0,39	42	1,32 $\pm$ 0,7
18	1,33 $\pm$ 0,92	33	1,35 $\pm$ 1
2	1,6 $\pm$ 0,91	35	1,61 $\pm$ 0,38
13	1,75 $\pm$ 1,29	30	2,37 $\pm$ 1,53
54	2,38 $\pm$ 1,71	1	2,84 $\pm$ 0,71
16	3,31 $\pm$ 2,27	15	3,4 $\pm$ 0,59
49	3,78 $\pm$ 1,49	3	3,95 $\pm$ 0,65
36	3,97 $\pm$ 1,65	17	4,16 $\pm$ 1,54
56	4,59 $\pm$ 2,22	52	4,67 $\pm$ 1,39
63	4,72 $\pm$ 2,89	5	4,88 $\pm$ 1,58
21	5,69 $\pm$ 1,88	14	7,23 $\pm$ 1,51
28	8,55 $\pm$ 2,74	12	9,05 $\pm$ 2,9
29	10,11 $\pm$ 0,21	48	10,38 $\pm$ 0,47
27	11,49 $\pm$ 2,93	51	12,49 $\pm$ 4,88
64	15 $\pm$ 9,8		

A tesztelések során 12 olyan vegyületet azonosítottunk, amelyek a sejtes assay-ben mérve hatékonyak bizonyultak, de a biokémiai assay-ben 10 μM koncentrációban mérve, a hatékonyságuk 50%-ra vagy az alá csökkent. Csak elméleteink vannak arról, hogy miért csökken ezeknek a molekuláknak a hatékonysága. Elképzelhető, hogy az amúgy inaktív molekulát maga a sejt alakítja aktív formává (pro-drug), vagy a sejtben elérhető szubsztrát, a NADPH mennyiségét csökkentik egy metabolikus útvonal, pl. a pentóz-foszfát ciklus gátlásával. De az is lehet, hogy ezek a molekulák az ép sejtekben valamilyen természetes antioxidáns rendszer működését erősítik, és ezzel csökkentik a H_2O_2 mennyiségét.

4.5. Szelektivitás vizsgálata

A sejtes és biokémiai rendszerekben egyaránt hatékony molekulák NOX4 enzim iránti specifitásának vizsgálatára a NOX2 enzimet választottuk. A NOX2 enzim több okból is ideális jelölt erre a célra, hiszen nem csupán a NOX enzimek legkorábban felfedezett és ezért legismertebb tagja, de sejtes rendszerben történő vizsgálata is egyértelmű, mivel neutrofil sejtekben ez az egyedüli NOX izoforma. Mindezek mellett a NOX2 enzim (nem kóros) működésének gátlása élettani szempontból is komoly problémát jelentene ismerve kiemelkedően fontos szerepét az immunrendszer működésében.

Az ígéretesnek tűnő molekulák mindegyikét (összesen 57 vegyület) leteszteltük egy NOX2 gátlást vizsgáló sejtes rendszerben. A vizsgálatokat a NOX4-et hatékonyan gátló vegyületek 10 μ M, illetve 1 μ M koncentrációjának jelenlétében is elvégeztük. 1 μ M koncentrációban a vegyületek egyike sem okozott szignifikáns változást a neutrofil granulociták szuperoxid termelésében, ugyanakkor 10 μ M koncentrációban már 18 vegyület okozott 50%-ot meghaladó gátlást (**23. ábra**).



23. ábra. A vegyületek hatása a neutrofil granulociták szuperoxid termelésére.

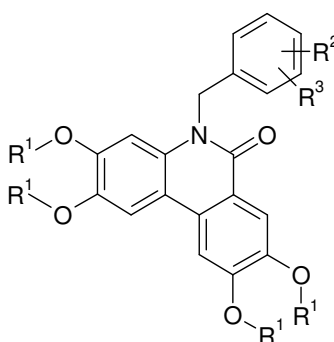
Kontrollok: Staurosporin, SOD, DPI és DMSO (átlag $\pm$ szórás, $n=3$).

A NOX2 vizsgálat eredményeinek egy másik irányból történő értelmezésével a molekulák antioxidáns jellegét kívántuk vizsgálni. A **23. ábrán** látható eredmények nem csupán a molekulák specifitását bizonyítják a NOX2 enzimmel szemben. Abból a tényből kiindulva, hogy mind a NOX4, mind a NOX2 sejtes assay azonos alapelv szerint méri a képződött ROS mennyiségét, annak a lehetőségét is kizárja, hogy a számottevő aktivitást nem mutató molekulák jelentős antioxidáns hatással rendelkezzenek.

4.6. Szerkezet-hatás összefüggések

A NOX4 enzim 3D szerkezetének hiánya és a biológiailag aktív vegyületek szerkezeti eltérései miatt a szerkezet-aktivitás összefüggés megállapítása nagyon nehéz. Ugyanakkor, az egyes vegyületcsoportokon belül észlelhetők bizonyos közös sajátosságok. A tesztelések során azonosított leginkább hatékony molekulák a következő 8 vegyületcsoportba tartoztak:

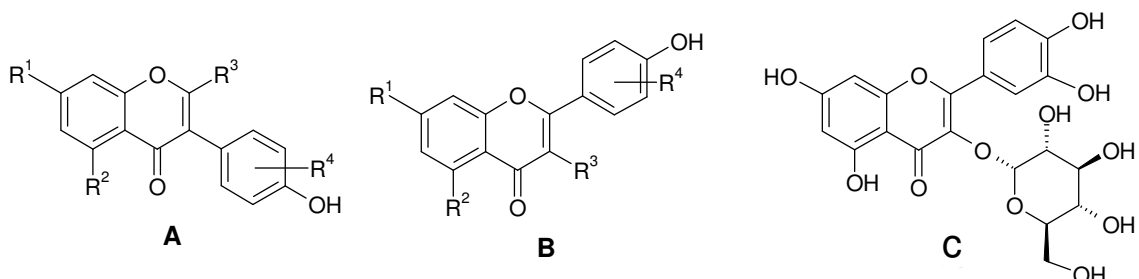
1. Fenantridinon származékok



Vegyület	R ¹	R ²	R ³	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
33	H	2-CN	H	0,6±0,4	1,3±1
13	H	4-NO ₂	H	1,6±0,6	1,7±1,3
35	H	2-SO ₂ -Ph	H	1,5±0,7	1,6±0,4
15	H	4-(2-CN-fenil)	H	1,4±0,1	3,4±0,6
69	H	3-Cl	H	<10	N/A
70	H	3-F	H	>10	N/A
71	Me	3-Cl	H	>10	N/A

A fenantridinon származékok között a hatáshoz szükséges, de nem elégséges feltétel a négy darab fenolos hidroxi-csoport megléte, mivel ezen túlmenően a benzil részen elektronszívó (nitro, nitril) csoportra is szükség van a jó hatás eléréséhez (33-15, kontra 69-70).

2. Flavonoidok



Vegyület	Alapváz	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
36	B	OH	OH	OH	3-OH	4-OH	0,7±0,5	3,9±1,6
52	B	OH	OMe	OH	3-OH	4-OH	0,7±0,1	4,6±1,4
44	A	OH	H	OH	3-OH	4-OH	0,8±0,1	0,5±0,1
50	C						0,8±0,1	0,6±0
64	B	OMe	OH	OMe	3-OH	4-OH	1±0,7	15±9,8
49	B	OH	OH	OH	2-OH	4-OH	1,2±0,3	3,78±1,5
54	B	OH	OH	OH	H	4-OH	2,5±0,1	2,3±1,7
14	B	OH	H	OH	3-OH	4-OH	0,9±0,9	7,2±1,5
72	B	OMe	OH	OMe	3-OH	4-OMe	>10	N/A
73	B	OMe	H	OH	3-OMe	4-OMe	>10	N/A
74	B	OH	OH	H	H	4-OMe	>10	N/A
75	A	H	H	H	H	4-NO ₂	>10	N/A
76	A	OMe	H	H	H	OH	>10	N/A
77	B	H	H	H	2-NH ₂	3-OMe	>10	N/A

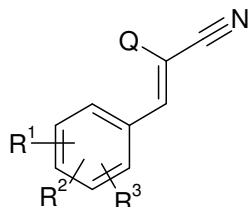
A sejtes vizsgálatokban leginkább hatékony vegyület öt darab hidroxi-csoportot tartalmaz (36).

A vizsgált vegyületekben ezen hidroxi-csoportok hidrogén atommal vagy metoxi-csoporttal lettek helyettesítve, ami az alábbiak szerinti módosította a hatást.

Egyetlen hidroxi-csoport pozíciójának változtatása (R⁴ meta helyett orto) a sejtes assay-ben egyértelműen növelte az IC₅₀ értéket (36-49). Hasonló módon, egyetlen hidroxi-csoport metilezése nem befolyásolja a hatást, de a két vagy több metoxi-csoporttal rendelkező vegyületek határozottan csökkentették a vegyületek hatékonyságát a hidroxi származékokhoz viszonyítva (36-52-64-72). Ez a hatás független volt a metoxi-

csoportok pozíciójától. Úgy tűnik, fontos a hidroxci-csoportok megléte, ahol más a szubsztituens vagy nincs szubsztituens, a gátló hatás is elmarad (75-77).

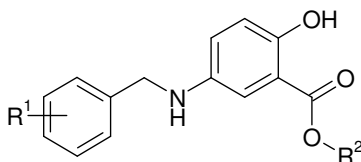
3. Fenil-propénitril származékok



Vegyület	R ¹	R ²	R ³	Q	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
8	3-OH	4-OH	H	CSNH ₂	0,4±0	0,4±0
38	3-OH	4-OH	H	CN	1±0,8	0,2±0,2
78	3- ^t Bu	4-OH	5- ^t Bu	CSNH ₂	>10	N/A
79	3-NO ₂	4-OH	H	CN	>10	N/A
80	4-OH	H	H	CN	>10	N/A
81	3-OMe	4-OH	H	CN	>10	N/A

A leghatékonyabb vegyületek a 3,4-dihidroxci-fenil-csoportot tartalmazó analógok (8, 38). A fenilgyűrűn hármas helyzetben lévő-OH csoport esszenciális a hatáshoz. Cseréjével drasztikusan lecsökken a molekula gátló hatása (78-81). A ciano-csoportot tioamid-csoportra cserélve jelentős gátlásnövekedést tapasztaltunk.

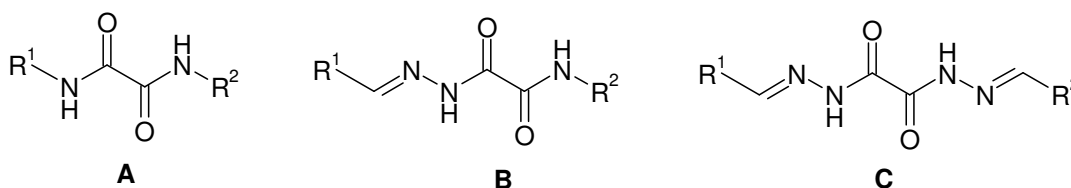
4. Aminoszalicilsav származékok



Vegyület	R ¹	R ²	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
18	2-OH	H	0,9±0,1	1,3±0,9
23	2,5-di-OH	H	1,3±0,5	N/A

Mindössze két molekula került tesztelésre ebből a csoportból, de mindkettő aktívnak bizonyult (habár az egyik (23) csak 10 μM -t meghaladó IC_{50} értékkel rendelkezett a biokémiai assay-ben). A 23-as molekula aktivitása kismértékben csökkent a második hidroxi-csoport bevitelével.

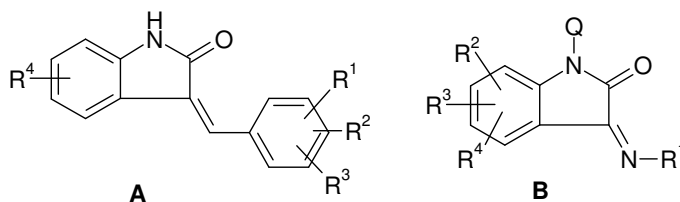
5. Oxalilamid származékok



Vegyület	Alapváz	R ¹	R ²	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
31	B	3,4-di-OH-fenil	3-OH-fenil	0,6±0,2	0,4±0,1
34	B	3,4-di-OH-fenil	3-NO ₂ -fenil	1±0,5	0,4±0,1
25	C	3,4-di-OH-fenil	3,4-di-OH-fenil	1,2±0,7	0,5±0,3
32	B	3,4-di-OH-fenil	4-OEt-fenil	2±0,8	0,9±0,2
82	C	2-(4-OH-3-OMe-fenil)-etil	2-(4-OH-3-OMe-fenil)-etil	<10	N/A
83	A	2-(3,4-di-OMe-fenil)-etil	3-NH ₂ -fenil	>10	N/A
84	A	2-(4-OH-3-OMe-fenil)-etil	3-NO ₂ -fenil	>10	N/A
85	B	2,3,4-tri-OH-fenil	3-NO ₂ -fenil	>10	N/A
86	B	3-Indolil	3-Br-fenil	>10	N/A
87	A	2-(4-NH ₂ -fenil)-etil	3-NO ₂ -fenil	>10	N/A

Az **A** alapstruktúrával rendelkező származékok (83, 84, 87) nem aktívak, de az R¹ szubsztituenst 3,4-di-OH-fenillel helyettesítve a **B** és **C** alapvázalal rendelkező vegyületek (31-32) aktívvá válnak. Nem állapítható meg egyértelműen, hogy a **B** és **C** alapváz közül melyik képviseli a leghatékonyabb vegyületeket, mivel mindkét vegyületcsalád tartalmazott egyaránt aktív és inaktív molekulákat. Megállapítható viszont, hogy a dihidroxi-fenil és hidroxi-fenil szubsztituensek előnyösek, különösen a szimmetrikus esetekben.

6. Oxindol származékok

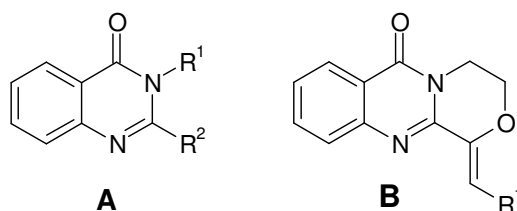


Vegyület	Alapváz	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Q	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
30	B	N(CS)N(allil) ₂	4-Me	5-OH	6-Me	H	1±0,1	2,4±1,5
5	A	3-OH	4-OH	H	5-NO ₂	-	1,1±0,5	4,9±1,6
16	A	3-OH	4-OH	H	5-Br	-	1,2±0,5	3,3±2,3
3	A	3-OMe	4-OH	H	5-NHAc	-	1,4±0,4	3,9±0,6
88	B	N(CS)N(allil) ₂	5-OCF ₃	H	H	H	<10	N/A
89	A	4-OH	H	H	5-Me	-	<10	N/A
90	A	3-Br	4-OH	5-Br	COCH ₂ Cl	-	<10	N/A
91	B	N-(3-NO ₂ -Ph)	4-Me	5-OH	6-Me	H	<10	N/A
92	B	N(CS)NMe ₂	H	H	H	H	>10	N/A
93	B	N-Ph	5-Me	H	H	H	>10	N/A
94	A	4-OMe	H	H	H	-	>10	N/A
95	B	N-(4-(CH ₂ -SO ₂ -NMe)-Ph)	4-Me	5-OH	6-Me	H	>10	N/A
96	B	N(3-Cl-Ph)	4-Me	5-OH	6-Me	-	>10	N/A
97	A	3- ⁱ Pr	4-OH	5- ⁱ Pr	5-Cl	-	>10	N/A
98	B	N(CS)N(allil)	H	H	H	H	>10	N/A
99	B	N(CS)N(allil) ₂	H	H	H	Allil	>10	N/A
100	B	N-Ph	H	H	H	H	>10	N/A
101	A	4-OH	H	H	5-NHAc	-	>10	N/A
102	B	N-(2-NO ₂ -Ph)	4-Me	5-OH	6-Me	H	>10	N/A
103	B	N-(4-(CH ₂ -SO ₂ -NMe)-Ph)	5-OCF ₃	H	H	H	>10	N/A
104	B	N-(4-(CH ₂ -SO ₂ -NMe)-Ph)	4-Cl	6-Cl	H	H	>10	N/A
105	B	N-(2-Cl-Ph)	4-Me	5-OMe	6-Me	Allil	>10	N/A
106	A	4-OH	3-NO ₂	H	NHAc	-	>10	N/A

A leghatékonyabb vegyületeknél 3,4-diszubsztituált fenilgyűrűt találunk (kivéve 30). A 4-hidroxi fenilgyűrűt tartalmazó analógok szintén hatékonyak bizonyultak (3, 16), de az elektronszívó nitrocsoport bevitele a hidroxi-csoport mellé a fenilgyűrűn teljesen

elrontotta a hatást 106. Ugyanakkor az 3, 5 és 16 vegyületek esetében az indolon alapváz szubsztitúciója nem befolyásolta a hatást jelentős mértékben. Az izatingyűrűn megszüntetve a trisubsztitúciót, különösen a hidroxci-csoportot, a gátlás csökkent (88). A megfelelő izatin-hidrazonja (91, 95, 102) hatásban elmaradt a tioszemikarbazonjának hatásától (30).

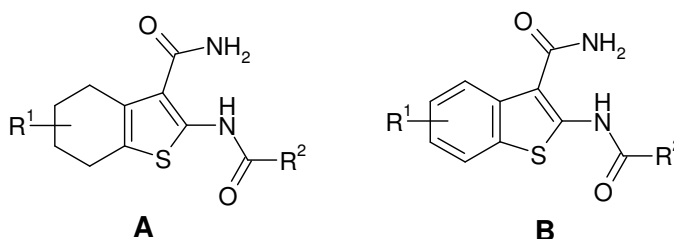
7. Kinazononok



Vegyület	Alapváz	R ¹	R ²	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
7	A	3,4-di-OH-sztiril	2-Etoxikarbonil-etil	1,3±0,2	0,8±0,5
43	A	3,4-di-OH-sztiril	2-OH-etil	1,8±1,1	0,6±0,1
107	B	3,4-di-OH-fenil	-	>10	N/A
109	A	Etil	2-Etoxikarbonil-etil	>10	N/A
110	B	4-Cl-fenil	-	>10	N/A
111	A	4-CF ₃ -sztiril	2-Etoxikarbonil-etil	>10	N/A
112	B	3,4-di-Cl-fenil	-	>10	N/A

Az **A** alapváz esetében a 3,4-dihidroxi-fenil csoport elengedhetetlen az aktivitáshoz, módosítása az aktivitás elvesztéséhez vezet (7 kontra 109, 111). A **B** alapvázal rendelkező vegyületek egyike sem mutat aktivitást (még a 107 sem), a 3,4-dihidroxi-fenil csoport megléte ellenére.

8. Benzotiofén származékok



Vegyület	Alapváz	R ¹	R ²	Sejtes assay IC ₅₀ (μM)	Biokémiai assay IC ₅₀ (μM)
57	B	6-OH	CONH ₂	1,1±1	N/A
63	A	6-Oxo	(4-OMe-fenil)-amino	2±0	4,7±2,9
114	B	7-Cl-6-OH	(4-OCHF ₂ -fenil)-amino	<10	N/A
115	A	6-OH	(4-OCF ₃ -fenil)-amino	<10	N/A
116	A	6-OH	(3,4-Metiléndioxi-fenil)-amino	<10	N/A
117	B	6-OH	(4-OCF ₃ -fenil)-amino	<10	N/A
118	A	6-COOEt	(3,4-Metiléndioxi-fenil)-amino	<10	N/A
119	A	6,6-Etiléndioxi	(4-OEt-fenil)-amino	<10	N/A
120	A	6-OH	(4-OCHF ₂ -fenil)-amino	<10	N/A
121	A	6-OH	(4-OEt-fenil)-amino	<10	N/A
122	A	6,6-Etiléndioxi	(4-OCHF ₂ -fenil)-amino	>10	N/A
123	A	H	(4-OMe-fenil)-amino	>10	N/A
124	B	6-OEt	(4-OEt-fenil)-amino	>10	N/A
125	B	6-OH	(4-OEt-fenil)-amino	>10	N/A
126	A	6-COOEt	(4-OMe-fenil)-amino	>10	N/A
127	B	7-Br-6-OH	(4-OCF ₃ -fenil)-amino	>10	N/A
128	A	H	(4-OCF ₃ -fenil)-amino	>10	N/A
129	A	6-Me	(4-OCF ₃ -fenil)-amino	>10	N/A

Az **A** alapvázal rendelkező vegyületek (63, 123, 126) esetében egy oxigén bevitele a hatos gyűrűbe, növeli a hatást. A **B** alapvázat képviselő 57-es vegyület szintén aktívnak bizonyult, de az R¹ és R² szubsztituens változtatása az aktivitás elvesztésével járt. Talán az 57-es vegyület az összekötő kapocs az oxálamid és benzotiofén vegyületcsaládok között.

4.7. Sejtek életképességére gyakorolt hatás vizsgálata

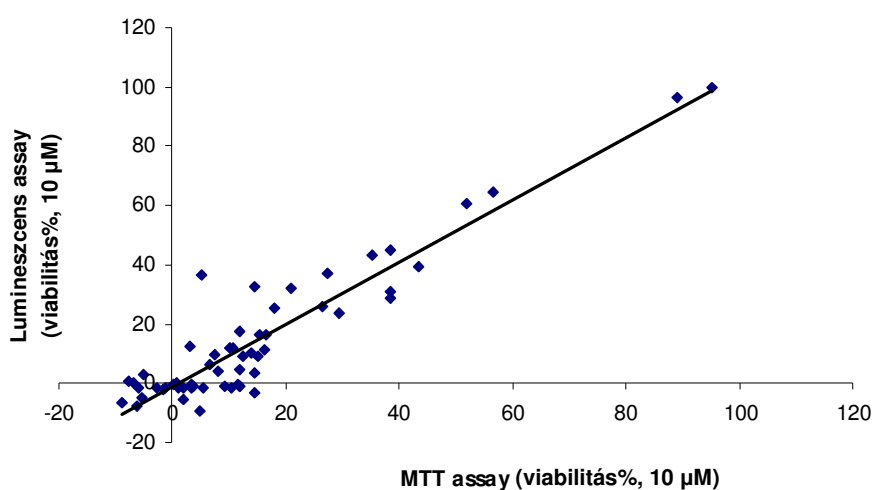
A vegyületek biokémiai és sejtes assay-ben történő tesztelését követően, illetve azzal párhuzamosan, a molekulákat MTT és lumineszcens sejtviabilitás vizsgálatoknak vetettük alá 293 FS és EA.hy926 sejt vonalakon. A vegyületek nagyobb része semmilyen hatással nem volt a sejtek életképességére. A **7. táblázat** a 10 μM koncentrációban alkalmazott inhibitorok hatását mutatja, 72 órás kezelést követően. A tesztelt 58 vegyület közül mindössze 17 okozott 25%-ot meghaladó életképesség gátlást mindkét tesztelési rendszerben.

7. táblázat. A vegyületek hatása a transzfektált 293 FS és EA.hy926 sejtek életképességére. ^a: a lumineszcens sejtviabilitás módszerrel mért életképesség gátlás értékei a 293 FS sejtek 72 órás kezelését követően (inhibitor koncentráció: 10 μ M). ^b: az MTT módszerrel mért viabilitás gátlás értékei az EA.hy926 sejtek 72 órás kezelését követően (inhibitor koncentráció: 10 μ M). Kontrollként staurosporint, triton X-100 detergenst és DMSO-t használtunk (átlag $\pm$ CI95%, n=3).

Vegyület sorszáma	^a Viabilitás gátlása ($\pm$ 95% CI)	^b Viabilitás gátlása ($\pm$ 95% CI)
34	-9 $\pm$ 6	5 $\pm$ 4
17	9 $\pm$ 1	12 $\pm$ 4
43	12 $\pm$ 3	3 $\pm$ 8
31	0 $\pm$ 11	12 $\pm$ 7
11	0 $\pm$ 3	3 $\pm$ 7
25	0 $\pm$ 11	-8 $\pm$ 10
7	4 $\pm$ 7	8 $\pm$ 9
8	-10 $\pm$ 10	12 $\pm$ 0
38	-9 $\pm$ 12	2 $\pm$ 4
42	12 $\pm$ 8	10 $\pm$ 6
27	6 $\pm$ 6	7 $\pm$ 15
49	-9 $\pm$ 12	-3 $\pm$ 9
14	-3 $\pm$ 10	14 $\pm$ 12
50	-1 $\pm$ 13	3 $\pm$ 13
47	5 $\pm$ 5	12 $\pm$ 7
52	-4 $\pm$ 4	9 $\pm$ 5
54	-5 $\pm$ 5	-5 $\pm$ 10
51	-7 $\pm$ 7	-16 $\pm$ 2
48	-10 $\pm$ 5	1 $\pm$ 10
36	16 $\pm$ 2	16 $\pm$ 7
44	-10 $\pm$ 10	12 $\pm$ 8
40	12 $\pm$ 6	11 $\pm$ 1
10	-1 $\pm$ 12	-1 $\pm$ 2
5	-15 $\pm$ 15	2 $\pm$ 8
23	0 $\pm$ 5	1 $\pm$ 1
41	2 $\pm$ 12	-5 $\pm$ 10
18	-1 $\pm$ 8	10 $\pm$ 3
39	-6 $\pm$ 7	-9 $\pm$ 3
3	-10 $\pm$ 6	6 $\pm$ 12
35	-9 $\pm$ 10	0 $\pm$ 13
13	-11 $\pm$ 13	4 $\pm$ 2
33	3 $\pm$ 5	14 $\pm$ 2
6	9 $\pm$ 1	15 $\pm$ 7
2	9 $\pm$ 12	7 $\pm$ 7
15	-2 $\pm$ 5	-1 $\pm$ 3
30	10 $\pm$ 3	14 $\pm$ 4

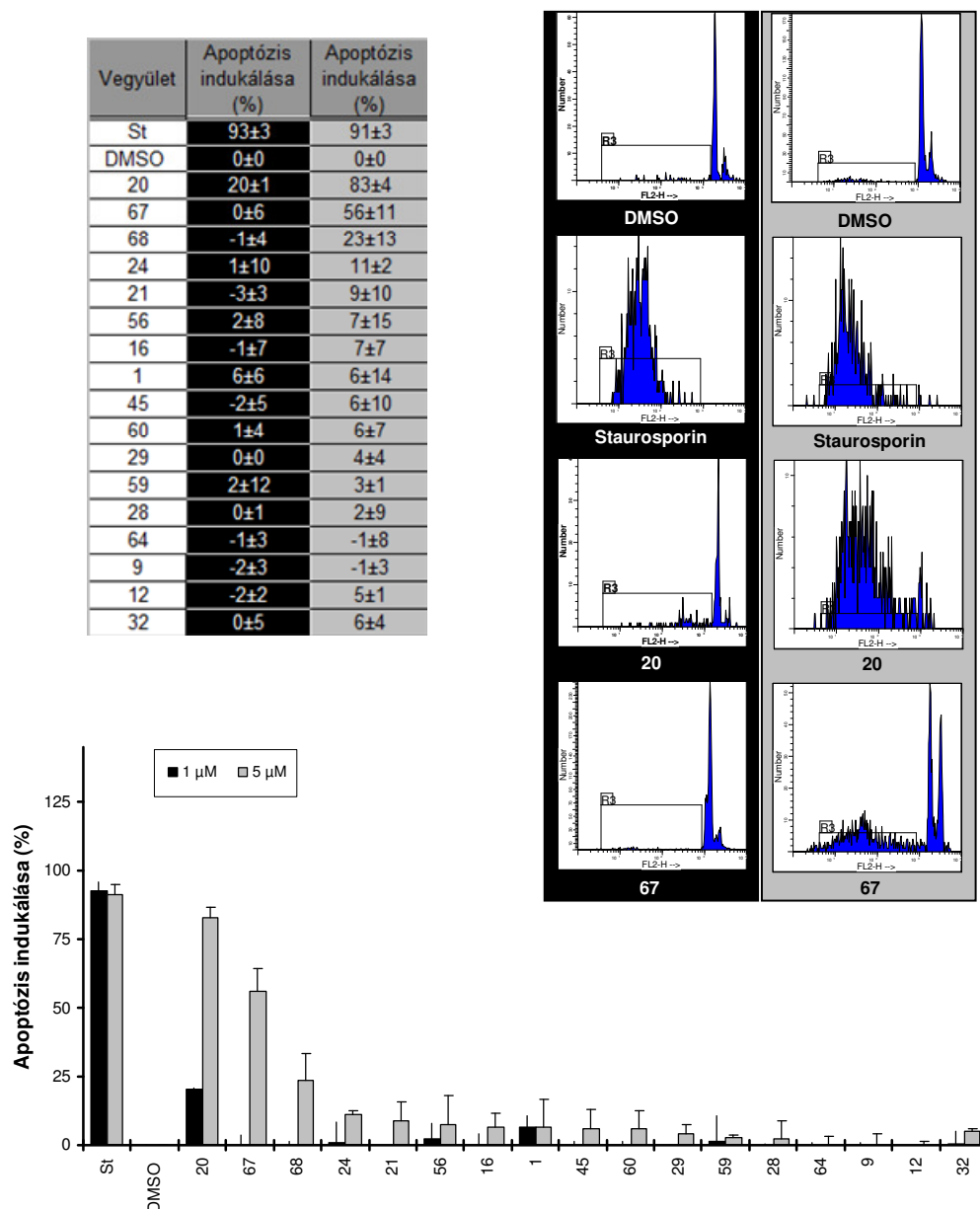
63	16±5	15±9
57	15±5	x
19	-2±6	-16±11
55	11±2	16±3
53	18±0	12±3
59	25±3	18±4
32	29±6	38±1
64	43±5	35±15
45	37±6	9±11
21	24±1	29±11
16	37±4	27±7
28	34±9	-7±8
1	32±3	21±16
29	39±2	43±4
9	45±5	38±8
56	37±3	5±9
67	64±18	57±14
68	60±5	52±15
12	26±6	26±0
20	97±1	89±3
24	31±9	38±11
60	33±8	14±10
Staurosporin	100±0	95±7
Triton X-100	x	101±2
DMSO	x	7±12

Összehasonlítottuk a kétféle assay-ben vizsgált 58 vegyület %-os gátló értékeit. Ahogy az a **24. ábrán** is látható, a két különböző sejtvonal és eltérő kimutatási koncepció ellenére az eredmények jól korrelálnak ($R^2 = 0,87$).



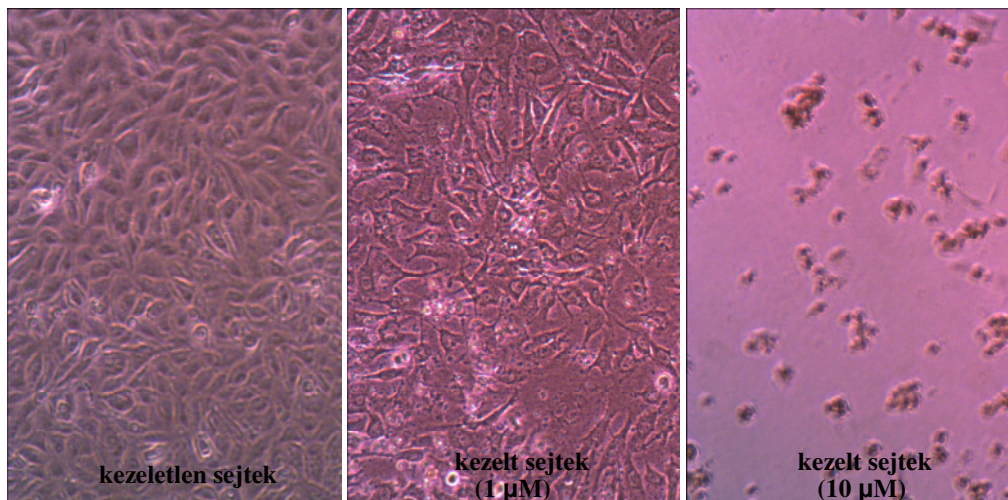
24. ábra. Az MTT és a lumineszcens sejtvitalitás vizsgálatok korrelációs vizsgálata ($n=58$).

Sem az MTT, sem a lumineszcens sejtvitalitás assay nem teszi lehetővé, hogy megállapítsuk egy molekuláról, hogy a proliferáció gátlása vagy toxikus hatás révén okozza a sejtek életképességének csökkenését. Hogy el tudjuk dönteni az inhibitorokról, hogy a proliferáció gátlásával, vagy apoptózis indukálásával fejtik ki hatásukat, a 7. táblázatban 25%-nál nagyobb életképesség csökkenést okozó molekulákat áramlási citometria analízissel vizsgáltuk. A **25. ábra** a tesztelt vegyületek apoptózist indukáló hatását mutatja 72 órás kezelést követően.



25. ábra A FACS módszerrel kapott gátlási értékek (átlag ± szórás, n=3).

Mint az látható (**25. és 26. ábra**), a tesztelt vegyületek közül mindössze kettő indukált apoptózist, és azok is csak hosszú idejű és nagy dózisu kezelést követően.



26. ábra. EA.hy926 sejtek fénymikroszkópos felvétele a 20-as molekula 1 és 10 μM koncentrációjú oldatával történő kezelést követően, 72 óra elteltével.

Mivel a NOX4 enzim aktivitása olyan jelátviteli útvonalakat (elsősorban MAPK) képes szabályozni, melyek a sejtek differenciálódását, növekedését, proliferációját és apoptózist irányítják, megvizsgáltuk az életképességet gátló vegyületek hatását négy olyan enzim esetében, melyek ezekben az útvonalakban szerepelnek (EGFR, Akt, RICK, ERK). 10 μM koncentrációban tesztelve, a vegyületek egyike sem rendelkezett kiemelkedő aktivitással ezekben a vizsgálatokban. Ugyanakkor egy érdekes vonatkozása ezeknek a méréseinknek, hogy kiemelkedően hatékony RICK gátlókat azonosítottunk a kinazolin molekulacsaládba tartozó vegyületek között, melyek a gyulladásos megbetegedések kezelésének közismert célpontjai [179].

Összességében megállapíthatjuk, hogy a három életképesség gátlást vizsgáló módszer segítségével összesen 17 olyan molekulát azonosítottunk, melyek a NOX4 enzimen mért IC_{50} értékeiknél jóval nagyobb, annál egy nagyságrenddel magasabb koncentrációban mutatnak csak életképesség gátlást. Két molekula kivételével valószínűleg az összes többi a sejtproliferáció gátlásán keresztül fejti ki hatását, ahogy az látható az áramlási citometriás mérésekből.

4.8. Lipofilitás és permeabilitás

Az eddigi eredmények és a szabadalmaztathatóság, fejleszthetőség szempontjait figyelembe véve, kutatócsoportunk 11 olyan molekulát választott ki, melyeket további vizsgálatoknak vetettünk alá. Két kiemelkedően fontos korai ADME(T) paramétert határoztunk meg ezeken a molekulákon.

A lipofilitás, a molekulák abszorpciós képességének jellemzésére legrégebb óta használt és egyik legfontosabb paraméter. Egy molekula membránoldékonysága ($\log P$) akkor tekinthető optimálisnak, ha a Lipinski-szabályoknak megfelelően 0 és 5 közötti értéket vesz fel. A lipofilitás meghatározását a 3DNET4W (Vichem Kft., 1022 Budapest, Herman O. u. 15., istvan.kovesdi@eqnet.hu, 2002) számítógépes programmal végeztük [180]. Ahogy az a **8. táblázatban** látható, a kiválasztott vegyületek közül mindössze 4 van (31, 34, 25 és 57), amelyeknek gyógyszerfejlesztési szempontból nem optimális a lipofilitása.

8. táblázat. A kiválasztott vegyületek permeabilitás ($\log P_e$) és kalkulált lipofilitás ($clogP$) értékei.

Vegyület	$\log P_e$	$clogP$
31	-7,84	1,025
34	-7,39	-0,05
5	-6,43	2,26
25	-6,4	-1,06
57	x	-1,4
7	-5,14	2,45
3	-6,1	1,43
43	-6,91	2,37
30	-5,55	3,06
63	-6,35	1,22
55	-5,21	2,77
caffeine	-5,26	x
verapamil	-5,09	x

A molekulák permeabilitásra vonatkozó jellemzőit PAMPA módszerrel vizsgáltuk. Ezzel az eljárással a kutatások kezdeti szakaszában lehet kiválóan modellezni egy adott molekula bizonyos koncentrációjú oldatának, passzív transzporttal történő átjutását a sejtmembránon. Ebből a szempontból a molekulák nem mutatnak egységes képet.

Három vegyület kivételével (7, 30, 55), minden anyag esetében a $\log P_e$ alacsonyabb, mint -5,82, vagyis mérsékeltnek mondható a permeabilitásuk. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a molekulák nagy része csak korlátozott mértékben képes átjutni a plazmamembránon, és mégis hatásos volt a sejtes assay-ben. A sejtes vizsgálatokban használt vesesejtvonal esetében a NOX4 enzim nagyrészt a plazmamembránban volt megtalálható. Elképzelhető, hogy az alacsony permeabilitású molekulák egy része a sejtmembránban maradt, így inhibíciós hatását, ha kisebb koncentrációban is, de kifejthette. Mindamellet, annak a lehetőségét sem vethetjük el, hogy a molekulák aktív transzport révén jutnak be a sejtekbe.

5. Megbeszélés és következtetések

Egy adott betegség kilakulásában igazoltan szerepet játszó enzimet célzó új hatóanyagok azonosításának és tervezésének folyamata elengedhetetlenné teszi a HTS kompatibilis rendszerek alkalmazását. Munkánk első részében a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetén újonnan kifejlesztett sejtes alapú assay optimalizálását, és a kémiai partnercsoport által rendelkezésünkre bocsátott vegyülettár hatástani vizsgálatát végeztük el.

Donkó és munkatársai kidolgoztak egy módszert, mellyel az LPO enzim ditirozin képzést katalizáló aktivitása révén, közvetett módon kis mennyiségű H_2O_2 is kimutatható [175, 181]. A jelenleg alkalmazásban lévő ROS detektálási módszerekkel szemben ez a kimutatási módszer olyan kétségtelen előnyökkel rendelkezik, mint a költséghatékonyság és az egyszerű megvalósíthatóság. Mindezek alapján ideálisnak találtuk a NOX4 enzimet vizsgáló HTS vizsgálatban történő felhasználásra. Mivel még soha nem alkalmazták ilyen jellegű szűrésben, az assay optimalizálása során a rendszer három kritikus komponensének, az LPO, tirozin és a sejt szám (H_2O_2) beállítását nagy körültekintéssel végeztük el. Az optimalizált sejtes assay felhasználásával egy olyan validációs molekulakönyvtárat (1100 vegyület) teszteltünk le több lépésben, amely Kéri és munkatársai szerint, szerkezeti diverzitása alapján ideális, mind új típusú, mind az irodalomból már ismert (NOX4) inhibitorok azonosítására [183]. Egy megfelelő méretű és kémiai diverzitású vegyülettár tesztelése során arra számítottunk, hogy a vegyületek túlnyomó többsége semmilyen hatást nem gyakorol a gátolni kívánt enzimre. Az enzimet gátló vegyületek

száma általában nagyon alacsony, többnyire a tesztelt vegyületek 1%-át sem haladja meg [182]. A tesztelések szűrési szakaszában 68 hatékony vegyületet azonosítottunk, amely több mint 6%-a a szűrés tárgyát képező vegyülettárnak. A validációs vegyülettár tehát igazolta a hozzá fűzött reményeinket és az azonosított NOX4 gátló molekulák megfelelő alapként szolgáltak a további vizsgálatokhoz.

Munkánk következő részében a molekulák hatásosságának validálását és karakterizálását végeztük el. Jaquet és munkatársai munkájukban leírják azokat a szelekciós kritériumokat és technikákat, melyek alkalmasak a NOX gátlók aktivitásának igazolására [51]. Minden esetben az a cél, hogy olyan hatóanyagot azonosítsunk, amely kizárólag azt az enzimet gátolja, amely a betegség kialakulásában szerepet játszik. Ennek érdekében olyan molekulaszűréseket szoktak futtatni, melyek segítségével megállapítható, hogy a gátló vegyület interferál-e valamely másik, a mérés végkimenetelét befolyásoló folyamattal. Ezeknek az úgynevezett keresztszűréseknek kettős szerepük van. Az egyik, hogy validálják a korábbi mérések eredményeit, a másik, hogy csökkentik annak a kockázatát, hogy egy valójában hatástalan (más célpontra ható) esetleg toxikus vegyület költséges vizsgálatát folytassák.

A hatékony molekulák sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata a korai ADME(T) karakterizálás szempontjából jelentős, mivel ily módon képet kapunk arról, hogy mely molekulák képesek a sejtek metabolikus aktivitásának módosítására. Ahogy azt korábban megállapítottuk a sejtes assay beállításánál, a kapott fluoreszcens jel közvetett módon, de jelenős mértékben függ a sejtszám változásaitól, elsősorban annak csökkenésétől. Ennek megfelelően egy olyan molekula is hatékonynak tűnhet, amely valamilyen módon a sejtszám csökkenését okozta. Más szóval, egy életképességet befolyásoló vegyület, valójában nem a NOX4 enzim gátlásával, hanem a sejtszám csökkentésén keresztül is kifejtheti hatását és okozhatja ezzel a H_2O_2 szint csökkenését. A vegyületek sejtes assay-ben történő tesztelésével párhuzamosan illetve azt követően egy további szűrési lépést is beiktattunk a vegyületek életképességre és proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatára. A hatékony molekulák mindegyikét MTT assay, lumineszcens viabilitás assay és FACS módszerekkel vizsgáltuk. A három életképességet vizsgáló módszerrel összesen 17 olyan molekulát azonosítottunk, melyek a NOX4 enzimén mért IC_{50} értékeiknél jóval magasabb, egy nagyságrendet meghaladó koncentrációban mutattak csak sejtvitalitás gátlást. Arra a következtetésre jutottunk,

hogy a hatékony vegyületek keresése során alkalmazott kísérleti paraméterek (40 perc inkubációs idő, 0,15 μM -10 μM koncentráció) mellett egyértelmű, hogy a vegyületek antiproliferatív, esetleg toxikus hatása nem érvényesülhetett, legalábbis olyan mértékben, hogy kétségbe kéne vonnunk a mérési eredményeket. Ugyanakkor a későbbi fejlesztéseknél mindenképpen érdemes figyelembe venni a molekuláknak ezen tulajdonságait is.

Jelenlegi tudomásunk szerint nem ismert olyan jelátviteli mechanizmus, mely a NOX4 enzim működését „upstream” foszforiláció révén gátolná. A vizsgált vegyülettár egyes vegyületeinek bizonyított és több helyen leírt kináz gátló tulajdonságai folytán azonban mindenképpen szerettük volna kizárni annak a lehetőségét, hogy az inhibitorok valamilyen más célmolekulán hatva okozzák a NOX4 enzim aktivitásának csökkenését [183]. Erre a célra egy biokémiai assay beállítását találtuk a legmegfelelőbbnek. A NOX4 enzim tisztított, biokémiai assay-ben közvetlenül alkalmazható formája jelenleg nem érhető el a kereskedelmi forgalomban. Kuroda és munkatársai, HUVEC sejteken végzett kísérleteik során kimutatták, hogy a NOX4 enzim a sejtmagban lokalizálódik. A sejtmag frakciót felhasználva, a NOX4 gén siRNS technikával történő elcsendesítését követően a ROS termelés jelentős visszaesését tapasztalták [68]. A szintén érendotél eredetű EA.hy926 sejteken végzett vizsgálataink során mi is csaknem kizárólagosan a sejtmagban találtuk meg a NOX4 enzimet. Mindezen felül, Xu és munkatársai HUVEC és EA.hy926 sejteken végzett genetikai vizsgálatai, a NOX4 enzim szinte kizárólagos jelenlétéről (a NOX4 expresszió százszor magasabb, mint a NOX1, NOX2 vagy NOX5) számoltak be ezekben a sejtvonalakban [80]. Az EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának használatán alapuló biokémiai tesztekben vizsgálva az inhibitorokat, 14 molekula még 10 μM koncentrációban sem mutatott semmilyen aktivitást, míg újabb 11 molekulát a biokémiai assay-ben végzett IC_{50} értékek meghatározása után találtunk alacsony aktivitásúnak a további vizsgálatokhoz. Fontos kiemelni, hogy ezeknek a molekuláknak a további kísérletekből történő kizárását nem csupán az indokolta, hogy a biokémiai kísérletekben hatástalannak bizonyultak, hanem hogy a további fejleszthetőségi szempontoknak (pl. szabadalmaztathatóság) sem feleltek meg. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy ezeknek a molekuláknak lehetnek olyan érdekes vonatkozásai, amelyek jelentőséggel bírhatnak a NOX enzimek kutatásának szempontjából, hisz valamilyen módon a sejtes rendszerben csökkentették az enzim aktivitását (pl.

valamilyen NOX4 enzimet gátló mechanizmus aktiválása, sejten belüli antioxidáns rendszer működésének erősítése vagy magának a vegyületnek a sejtben történő metabolizációja következtében).

Nagyon ritka, hogy a korai szűrési folyamatok eredményeként azonnal egy tökéletes gyógyszerjelölt molekulához jutunk. Inkább az szokott történni, hogy számos vegyület rendelkezik hasonló fokú gátló aktivitással. Ha ezek az aktív vegyületek rendelkeznek valamilyen közös kémiai tulajdonsággal, akkor szerkezet-aktivitás összefüggés állítható fel róluk. Ez megfelelő alapot biztosít a további fejlesztésekhez, melyek elősegítik a:

- a célpont hatékonyabb gátlását,
- a mellékhatások csökkentését,
- a vegyület gyógyszeryszerűségének vagy ADME(T) paramétereinek tökéletesítését.

Sajnos a NOX4 enzimet gátló vegyületek szerkezeti sokfélesége miatt a pontos struktúra-aktivitás összefüggés megállapítása igen nehéz feladat. A leginkább feltűnő tulajdonsága az eddig leírt és az általunk azonosított molekuláknak a kiterjedt konjugált kettőskötés-rendszer, mely képes az elektroncserére [51]. Ez a redox reakciókban ugyanúgy fontos jellemző, mint a ROS termelésben. Tekintve, hogy a NOX4 enzim 3D szerkezete nem ismert, a gátló molekulák hatásmódjáról is csak feltételezések vonhatóak le. A hatásos molekulák szerkezeti diverzitása vagy egy nagy kötőzsebet feltételez, mely a molekulaszervezetek széles spektrumának teszi lehetővé az interakciót, vagy diszkrét kötőhelyeket. Atkins és munkatársai egy hasonlóan nagy kötőzsebet írtak le a cytochróm P-450 enziménél is, amely szintén az aktivitáshoz elengedhetetlen hem csoportokat tartalmaz, és amellyel köztudottan nagyszámú molekula hat kölcsön, még távoli pozíciókból is [184].

A szív és érrendszerben elsősorban a NOX2 a NOX4 és a NOX5 enzimek jelenléte a meghatározó. Woodman és munkatársai kimutatták, hogy a CGD X-kromoszómához kötődő változatában, azoknál a nőknél, akiknél a neutrofil sejtek egy része képes a ROS termelésre, nem jelennek meg súlyos tünetek [174]. Ez azt jelenti, hogy a NOX2 részleges gátlása esetén nem kell súlyos következményekkel számolnunk. Ugyanakkor a NOX2 hiányos működése esetén, lassul a fagocitózis során a fagoszómákba került „hulladék” lebomlása, a gyulladásos sejteknek ROS jelátvitel függő apoptózisa (IL-8 termelés és Ca^{2+} jelátvitel gátlása) és nem működik megfelelően a gyulladást serkentő faktorok oxidatív inaktiválása. Mindezek együttese egy elnyújtott gyulladásos

folyamatot eredményez [45]. Fontos tehát szem előtt tartanunk, hogy míg a NOX4 és NOX5 enzimek együttes gátlása akár előnyös is lehet, addig a NOX2 enzim normális működése elengedhetetlen a megfelelő immunfolyamatok fenntartásában. A neutrofil granulocitákon végzett sejtes vizsgálattal, a hatékony molekulák ezirányú szelektivitásának ellenőrzését valósítottuk meg. Megállapítottuk, hogy a kiválasztott, NOX2 enzimet nem, vagy csak kis mértékben gátló molekulák esetében minimum egy nagyságrend az eltérés a NOX4 enzimen és a NOX2 enzimen mért IC_{50} értékek között. Ez elegendő mozgásteret biztosít ahhoz, hogy ezeket a vegyületeket NOX2 gátlás tekintetében szelektívnek tekinthessük.

Ahogy azt már láthattuk, a NOX4 enzim sejten belüli lokalizációja még számos ponton tisztázásra vár, de az bizonyos, hogy a NOX4 enzim által termelt H_2O_2 az intracelluláris térből, a membránokon átdiffundálva eléri az extracelluláris teret. Ennél fogva a ROS szintjének csökkentése a NOX enzimek gátlása nélkül is elérhető antioxidáns hatás révén. Egy korábban (szelektív) NOX gátlóként leírt vegyületről sokszor csak későbbi vizsgálatok során derül ki, hogy valójában antioxidáns, ami jelentősen alááshatja a molekula megítélését. Jó példa erre az apocynin sok szempontból kérdéses hatásmódja, mellyel az 1980-as évek óta (felfedezése) a mai napig számos szerző foglalkozik [51, 164, 185]. Heumüller és munkatársai azt állítják cikkükben, hogy az apocynin csak a fehérvérsejtekben működik NOX gátlóként, míg a szív- és érrendszeri sejtekben megfigyelt ROS szintet csökkentő aktivitása valójában csak antioxidáns hatásának köszönhető [164]. Kísérleteinkben mi is vizsgáltuk a sejtes és biokémiai vizsgálatokban hatékonynak bizonyuló vegyületeket, hogy minimalizáljuk az antioxidáns hatásmód valószínűségét. A NOX2 tesztben 50%-ot meghaladó gátlást okozó 18 vegyületről ugyan nem tudtuk eldönteni, hogy nem szelektív NOX gátlók és/vagy antioxidánsok, de ez nem is volt célja kísérleteinknek. A neutrofil granulocitákon végzett mérések eredményeként egy lépésben zártuk ki azokat a molekulákat a további fejlesztések folyamatából, amelyek nem eléggé specifikusak és/vagy antioxidánsként működhetnek.

Az ADME(T) paraméterek közül manapság egyre nagyobb hangsúlyt kap az abszorpció jellemzésére használt mennyiség, a permeabilitás. Már a kutatások korai fázisában tudnunk kell az adott gyógyszerjelölt komponensről, hogy orálisan adagolható-e, képes-e felszívódni a bélben keresztül. A permeabilitás az egyik

legfontosabb, biológiai hozzáférhetőségről információt adó paraméter [186]. A 11 legígéretesebb molekula esetében megvizsgáltunk két fontos korai ADME(T) paramétert a lipofilitást és a permeabilitást. Míg a lipofilitás szempontjából a molekulák nagyobb része optimálisnak volt mondható, addig mindössze három molekula rendelkezett optimálisnak mondható permeabilitással. Mivel a PAMPA vizsgálat csak az anyagok passzív transzportjáról szolgáltat információkat, nem zárhatjuk ki annak a valószínűségét, hogy az alacsony permeabilitású molekulák is képesek bejutni a sejtbe valamilyen aktív transzport mechanizmussal. Sokkal valószínűbb azonban, hogy az enzim 293 FS sejtekben való diffúz megjelenése a meghatározó ebből a szempontból.

Mivel a különböző NOX izoformák és alegységek akár ugyanabban a sejtben is különböző szinten és eltérő lokalizációval expresszálnak egyértelmű, hogy egyéni feladatuk van. Az ezirányú kutatások kapcsán egyre több alapvető kérdés merül fel. Azt sem tudjuk még, mi a NOX4 (vagy a többi NOX enzim) alapaktivitásának pontos funkciója, ill. hogy melyek azok a speciális molekuláris útvonalak, amelyeket az egyes izoformák céloznak. Szintén megválaszolásra váró kérdés, hogy a NOX függő redox jelátvitel specifikációja hogyan párosul egy olyan diffúzibilis mediátorhoz, mint a hidrogén-peroxid. Gyógyszerfejlesztési szempontból ennyi többszörösen tesztelt, és eltérő szerkezeti családokba tartozó hitmolekula közül valószínűleg jó eséllyel tudunk szabadalomképes molekulát kiválasztani és fejleszteni. A szelektív NOX4 gátlók alkalmazása továbbá segíthet a NOX4 enzimet érintő kérdések megválaszolásában, az enzimfunkció és a hidrogén-peroxid függő redox jelátvitel pontosabb megismerésén keresztül.

6. Összefoglalás

A tudományos irodalom, különösen a NOX4 deficiens egereken végzett tanulmányok alapján egyre világosabb, hogy a NOX4 enzim gátlása, egy ígéretes farmakológiai koncepció az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek kezelésére. Jelenleg egyetlen specifikus NOX4 inhibitor sem áll készen a biokémiai és/vagy klinikai felhasználásra. Munkánk során a NOX4 enzim gátlására, új típusú kis-molekulás inhibitorokat azonosítottunk és fejlesztettünk, a napjainkban már széles körben elfogadott racionális hatóanyagtervezés nyújtotta lehetőségeket felhasználva.

- Beállítottunk és több mérési paraméter figyelembevételével optimalizáltunk egy sejtes alapú mérési rendszert, melyben egy közepes áteresztőképességű hatástani szűrés keretében közel 1100 molekulát vizsgáltunk a NOX4 enzim gátlás tekintetében.

- A NOX4 enzim érendotél (EAhy.926) sejtekben való kifejeződésének vizsgálatát követően a molekulák specifitásának ellenőrzésére egy sejtfrakció alapú biokémiai assay-t állítottunk be, melyben meghatároztuk a hatékony vegyületek IC₅₀ értékeit, és kizártuk azokat, amelyek valószínűleg nem a NOX4 enzim gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat.

- Hasonló céllal, a gátló vegyületek szelektivitását egy NOX2 enzim alapú sejtes rendszerben is vizsgáltuk. Ennek eredményeként nem csupán a NOX2 gátlókat (nem szelektív NOX4 gátlókat) azonosítottuk, de az antioxidáns vegyületeket is.

- Három életképességet vizsgáló módszerrel (lumineszcens sejtvitalitás-, MTT- és FACS assay), két sejtvonalon (293 FS és EAhy.926) teszteltük a vegyületek toxicitását és antiproliferatív hatását.

- A korai ADME(T) karakterizálás részeként megvizsgáltuk az egyes molekulák lipofilitását és penetrációs képességét.

- Végül, a rendelkezésre álló adatok alapján az egyes molekulacsaládok és a hatékony molekulák fiziko-kémiai sajátosságainak figyelembevételével felállítottunk egyfajta szerkezet-hatás összefüggést, mellyel megadtuk a NOX4 enzimet gátló vegyületek szerkezet-keresésének lehetséges irányait.

Mindezek eredményeként olyan, alacsony (mikromoláris) koncentrációtartományban hatékony vegyületeket azonosítottunk, melyek segíthetnek a NOX4 enzim funkciójának, valamint oxidatív stressz eredetű betegségekben betöltött szerepének pontosabb megismerésében és kezelésében.

7. Summary

Based on the scientific literature, in particular on studies with NOX4 deficient mice models, it is increasingly clear, that the inhibition of NOX4 is a promising pharmacologic concept for the treatment of oxidative stress-related diseases. At present no specific NOX4 inhibitor is available for biochemical and/or clinical applications. In our work we aimed to identify and develop novel small-molecule inhibitors of NOX4 enzyme based on the widely accepted strategy of rational drug design.

- A cellular assay measuring NOX4 mediated H₂O₂ production was developed and optimized. About 1100 compounds were tested in this assay for NOX4 inhibition in the frame of a medium high throughput screening.
- Following the examination of the intracellular localization of the NOX4 enzyme in vascular endothelial (EA.hy926) cells, a broken cell assay was developed to check the specificity of the compounds. In this assay we have determined the IC₅₀ values and excluded the compounds with potential off-target activity.
- For the same reason, the selectivity of the molecules was also tested in a NOX2 based cellular assay. As a result of this assay we could identify not only the NOX2 inhibitors (not selective NOX4 inhibitors), but also the ROS scavengers.
- The toxicity and antiproliferative effects of the compounds were successfully characterized in three different assays (luminescence cell viability-, MTT- and FACS assay) using two different cell lines (293 FS and EA.hy926).
- As a part of early ADME(T) characterization, we also tested the lipophilicity and permeability of the compounds.
- Last but not least, applying the physico-chemical properties of the effective NOX4 inhibitor compound families, eventually structure-activity relationship (SAR) model was developed. Based on the SAR model, we could show the possibly beneficial structural properties of a NOX4 inhibitor.

As a result of our scientific work, promising NOX4 inhibitory compounds with low micromolar IC₅₀ values were selected. These compounds might help to puzzle out the function of NOX4 enzyme and treat the oxidative stress-mediated diseases.

8. Irodalomjegyzék

-
- [1] Paravicini TM, Touyz RM. (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities, *Diabetes Care*, 31: 170-180.
- [2] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants, aging, *Cell*, 120: 483-495.
- [3] Gonzalez FJ. (2005) Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1, *Mutat. Res.*, 569: 101-110.
- [4] Harrison R. (2004) Physiological roles of xanthine oxidoreductase, *Drug Metab. Rev.*, 36: 363-375.
- [5] Schrader M, Fahimi HD. (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species, *Histochem. Cell Biol.*, 122: 383-393.
- [6] Sindhu RK, Ehdaie A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Vaziri ND. (2005) Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal *insufficiency*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1743: 86-92.
- [7] Cai H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences, *Cardiovasc Res.*, 68: 26-36.
- [8] Shimokawa H, Matoba T. (2004) Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor, *Pharmacol Res.*, 49: 543-549.
- [9] Cai H, Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress, *Circ. Res.*, 87: 840-844.
- [10] Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. (2004) Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 44: 200-208.
- [11] Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG. (2004) Increased NAD(P)H-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NAD(P)H in vivo, *Stroke*, 35: 584-589.

-
- [12] Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. (2003) Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries, *Circ. Res.*, 93: 573-580.
- [13] Lee YM, Kim BJ, Chun YS, So I, Choi H, Kim MS, Park JW. (2005) NOX4 as an oxygen sensor to regulate TASK-1 activity, *Cell Signal*, 18: 499-507.
- [14] Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C. (2004) NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius, *J. Neurosci.*, 24: 5516-5524.
- [15] Yi XY, Li VX, Zhang F, Yi F, Matson DR, Jiang MT, Li PL. (2006) Characteristics and actions of NAD(P)H oxidase on the sarcoplasmic reticulum of coronary artery smooth muscle, *Am. J. Physiol.*, 290: 1136-1144.
- [16] Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 7987-7992.
- [17] Brown DI, Griending KK. (2009) Nox proteins in signal transduction, *Free Radical. Biol. Med.*, 47: 1239-1253.
- [18] Sun Y, Oberley LW. (1996) Redox regulation of transcriptional activators, *Free Radical Biol. Med.*, 21: 335-348.
- [19] Hunter T. (2000) Signaling-2000 and beyond, *Cell*, 100: 113-127.
- [20] Furst R, Brueckl C, Kuebler WM, Zahler S, Krotz F, Gorlach A, Vollmar AM, Kiemer AK. (2005) Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation, *Circ. Res.*, 96: 43-53.
- [21] Torres M, Forman HJ. (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways, *Biofactors*, 17: 287-296.
- [22] Burch PM, Heintz NH. (2005) Redox regulation of cell-cycle re-entry: cyclin D1 as a primary target for the mitogenic effects of reactive oxygen and nitrogen species, *Antioxid. Redox. Signal*, 7: 741-751.
- [23] Burhans WC, Heintz NH. (2009) The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate, *Free Radic. Biol. Med.*, 47: 1282-1293.
- [24] Yao G, Lee TJ, Mori S, Nevins JR, You L. (2008) A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point, *Nat. Cell Biol.*, 10: 476-482.

-
- [25] Sun XZ, Vinci C, Makmura L, Han S, Tran D, Nguyen J. (2003) Formation of disulfide bond in p53 correlates with inhibition of DNA binding and tetramerization, *Antioxid. Redox Signal*, 5: 655-665.
- [26] Velu CS, Niture SK, Doneanu CE, Pattabiraman N, Srivenugopal KS. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress, *Biochemistry*, 46: 7765-7780.
- [27] Qin L, Liu Y, Qian X, Hong JS, Block ML. (2005) Microglial NADPH oxidase mediates leucine enkephalin dopaminergic neuroprotection, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1053: 107-120.
- [28] Ha H, Lee HB. (2005) Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney, *Nephrology*, 2: 7-10.
- [29] Zhou C, Ziegler C, Birder LA, Stewart AF, Levitan ES. (2006) Angiotensin II and stretch activate NADPH oxidase to destabilize cardiac Kv4.3 channel mRNA, *Circ. Res.*, 98: 1040-1047.
- [30] Clark RA. (1986) Oxidative inactivation of pneumolysin by the myeloperoxidase system and stimulated human neutrophils, *J. Immunol.*, 136:4617-4622.
- [31] Clark RA, Leidal KG, Taichman NS. (1986) Oxidative inactivation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin by the neutrophil myeloperoxidase system, *Infect. Immun.*, 53: 252-256.
- [32] Savina A, Jancic C, Hugues S, Guernonprez P, Vargas P, Moura IC. (2006) Lennon-Dumenil AM, Seabra MC, Raposo G, Amigorena S, NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells, *Cell*, 126: 205-218.
- [33] Baker MA and Aitken RJ. (2004) The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 216: 47-54.
- [34] Lambeth JD. (2004) Nox enzymes and the biology of reactive oxygen, *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 181-189.
- [35] Dinanuer MC, Orkin SH. (1992) Chronic granulomatous disease, *Annu. Rev. Med.*, 43: 117-124.
- [36] Suh Y-A, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, and Lambeth JD. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1, *Nature*, 401: 79-82.

-
- [37] Chen XL, Zhang Q, Zhao R, Medford RM. (2004) Superoxide, H₂O₂, and iron are required for TNF- α -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 286: 1001-1007.
- [38] Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, and Krause KH. (2004) NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear, *J. Biol. Chem.*, 279:46065-46072.
- [39] Cheng G, Cao Z, Xu X, Van Meir EG, and Lambeth JD. (2001) Homologs of gp91^{phox}: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5, *Gene*, 269: 131-140.
- [40] Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease, *Antioxid. Redox. Signal*, 8: 691-728.
- [41] De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, and Miot F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family, *J. Biol. Chem.*, 275: 23227-23233.
- [42] Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, and Edens WA. (2000) Novel homologs of gp91^{phox}, *TIBS*, 25: 459-461.
- [43] Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH, and Cox JA. (2004) Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5), *J. Biol. Chem.*, 279: 18583-18591.
- [44] Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, and Lambeth JD. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peoxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91^{phox}, *J. Cell. Biol.*, 154: 879-892.
- [45] Bedard K and Krause KH. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev.*, 87: 245-313.
- [46] Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67^(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase, *J. Biol. Chem.*, 274: 25051-25060.
- [47] Diebold BA, Bokoch GM. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase, *Nat. Immunol.*, 2: 211-215.

-
- [48] Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. (2005) Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338: 677-686.
- [49] Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, and Sumimoto H. (2003) Novel human homologues of p47^{phox} and p67^{phox} participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases, *J. Biol. Chem.*, 278: 25234-25246.
- [50] Groemping Y, Rittinger K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective, *Biochem. J.*, 386: 401-416.
- [51] Jaquet V, Scapozza L, Clark RA, Krause KH, Lambeth JD. (2009) Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets, *Antioxid. Redox Signal.*, 11: 2535-2552.
- [52] Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 8010-8014.
- [53] Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H. (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney, *J. Biol. Chem.*, 276: 1417-1423.
- [54] Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.*, 74: 1141-1148.
- [55] Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, Sienkiewicz A, Forro L, Schlegel W, and Krause KH. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation, *Biochem. J.*, 406: 105-114.
- [56] Yang S, Zhang Y, Ries W, Key L. (2004) Expression of Nox4 in osteoclasts, *J. Cell. Biochem.*, 92: 238-248.
- [57] Ago T, Kitazono T, Kuroda J, Kumai Y, Kamouchi M, Ooboshi H, Wakisaka M, Kawahara T, Rokutan K, Ibayashi S, Iida M. (2005) NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells, *Stroke*, 36: 1040-1046.
- [58] Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. (2005) Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells, *Antioxid. Redox. Signal.*, 7: 308-317.

-
- [59] Hoidal JR, Brar SS, Sturrock AB, Sanders KA, Dinger B, Fidone S, Kennedy TP. (2003) The role of endogenous NADPH oxidases in airway and pulmonary vascular smooth muscle function, *Antioxid. Redox. Signal.*, 5: 751-758.
- [60] Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D, Falzetti F, Tabilio A, Capitanio N. (2005) Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity, *J. Biol. Chem.*, 280: 26467-26476.
- [61] Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, Turner RB, NADPH oxidase in human lung fibroblasts, *J. Biomed. Sci.*, 11: 617-622.
- [62] Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Wingler K, Schmidt HH, Schmidt R. (2004) A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91^{phox} homologs in human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, 122:1000-1009.
- [63] Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR, Hoidal JR. (2002) An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282: 1212-1224.
- [64] Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F, Michel JP, Szanto I. (2005) Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, its regulation in mouse experimental brain ischemia, *Neuroscience*, 132: 233-238.
- [65] Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. (2005) Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney, *J. Biol. Chem.*, 280: 39616-39626.
- [66] Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, Sorescu D. (2005) NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta 1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts, *Circ. Res.*, 97: 900-907.
- [67] Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. (2004) The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction, *Mol. Cell. Biol.*, 24: 1844-1854.
- [68] Kuroda J, Nakagawa K, Yamasaki T, Nakamura K, Takeya R, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Igarashi K, Shibata Y, Sueishi K, Sumimoto H. (2005) The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells, *Genes Cells*, 10: 1139-1151.

-
- [69] Blocka K, Gorina Y, Abbouda HE. (2009) Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 106: 14385-14390.
- [70] Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP. (2011) The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4, *J. Biol. Chem.*, 286: 13304-13313.
- [71] Li JM, Shah AM. (2002) Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, 277: 19952-19960.
- [72] Yang B, Rizzo V. (2007) TNF-alpha potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 292: 954-962.
- [73] Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. (2005) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases, *Cell Signal.*, 18: 69-82.
- [74] Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, and Iida M. (2004) Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H Oxidase, *Circulation*, 109: 227-233.
- [75] Borregaard N. (1997) Development of neutrophil granule diversity, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 832: 62-68.
- [76] Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. (2004) Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B, *J. Immunol.*, 173: 3589-3593.
- [77] Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: 227-232.
- [78] Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. (2001) Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo, *Free Radical. Biol. Med.*, 31: 1456-1464.
- [79] Yamagishi S, Nakamura K, Ueda S, Kato S, Imaizumi T. (2005) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks angiotensin II signaling in endothelial cells via

suppression of NADPH oxidase: a novel anti-oxidative mechanism of PEDF, *Cell Tissue Res.*, 320: 437-445.

[80] Xu H, Goettsch C, Xia N, Horke S, Morawietz H, Förstermann U, Li H. (2008) Differential roles of PKC α and PKC ϵ in controlling the gene expression of Nox4 in human endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 44: 1656-1667.

[81] Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K and Münzel T. (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling, *Circ. Res.*, 90: 58-65.

[82] Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze M, Münzel T and Förstermann U. (2007) Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47: 2536-2544.

[83] Marumo T, Schini-Kerth VB, Brandes RP, and Busse R. (1998) Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22^{phox} mRNA expression in human aortic smooth muscle cells, *Hypertension*, 32: 1083-1088.

[84] Inoue I, Goto Si, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, and Katayama S. (2001) The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR α) and PPAR γ increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22^{phox} message expressions in primary endothelial cells, *Metab. Clin. Exp.*, 50: 3-11.

[85] Wilcox CS. (2003) Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback, *Acta Physiol. Scand.*, 179: 217-223.

[86] Gnarr JR, Tory K, Weng Y. (1994) Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma, *Nat. Genet.*, 7: 85-90.

[87] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature*, 399: 271-275.

[88] Maranchie JK, Zhan Y. (2005) Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2- α transcriptional activity in von Hippel–Lindau-deficient renal cell carcinoma, *Cancer Res.*, 65: 9190-9193.

-
- [89] Kietzmann T, Gorlach A. (2005) Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 16: 474-486.
- [90] Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG. (2003) Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth, *PLoS Biol.*, 1: 83.
- [91] Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ and Packer L. (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a congress series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society, *Diab./Met. Res. Rev.*, 17: 189-212.
- [92] Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaïss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Förstermann U and Münzel T. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Circ. Res.*, 88: 14-22.
- [93] Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R and Channon KM. (2002) Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase, *Circulation*, 105: 1656-1662.
- [94] Rask-Madsen C and King GL. (2005) Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25: 487-496.
- [95] Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA and Creager MA. (2002) Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans, *Circ. Res.*, 90: 107-111.
- [96] Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N. (2005) NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 288: 1144-1152.
- [97] Miller AA, Drummond GR, Schmidt HH, Sobey CG. (2005) NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries, *Circ. Res.*, 97: 1055-1062.
- [98] Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybylowski P, Wierzbicki K, Korb R, Harrison DG and Channon KM. (2006) Coronary artery superoxide

production and Nox isoform expression in human coronary artery disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26: 333-339.

[99] San Martin A, Du P, Dikalova A, Lassegue B, Aleman M, Gongora MC, Brown K, Joseph G, Harrison DG. (2007) Taylor WR, Jo H, Griendling KK, Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in type 2 diabetes, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 292: 2073-2082.

[100] Pawlak K, Naumnik B, Brzosko S, Pawlak D, Mysliwiec M. (2004) Oxidative stress: a link between endothelial injury, coagulation activation, and atherosclerosis in haemodialysis patients, *Am. J. Nephrol.*, 24: 154-161.

[101] Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, and Harrison DG. (1995) Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance, *J. Clin. Invest.*, 95: 187-194.

[102] Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, and Cohen RA. (1998) Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide, *Circ. Res.*, 82: 810-818.

[103] Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. (2006) Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal, *Cardio. Diabetol.*, 23: 4-5.

[104] Vanhoutte PM. (1999) How to assess endothelial function in human blood vessels, *J. Hypertension*, 17: 1047-1058.

[105] Gimbrone MA Jr. (1995) Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis, *Am. J. Cardiol.*, 75: 67-70.

[106] Cai H, Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress, *Circ. Res.*, 87: 840-844.

[107] Houston MC. (2005) Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 47: 396-449.

[108] Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. (2001) Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR, *Hypertension*, 38: 606-611.

[109] Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. (2002) Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension, *N. Engl. J. Med.*, 346: 1954-1962.

-
- [110] Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW. (1998) Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension, *J. Hypertens.*, 16: 291-303.
- [111] Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. (2003) Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension, *Hypertension*, 41: 1096-1101.
- [112] Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q, Taylor WR, Harrison DG, Wilcox JN, and Griendling KK. (1997) p22^{phox} mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats, *Circulation*, 80: 45-51.
- [113] Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma RV, Engelhardt JF, and Davisson RL. (2004) Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain, *Circ. Res.*, 95: 532-539.
- [114] Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, and Galle J. (2000) Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11: 1819-1825.
- [115] Tsimikas S, Witztum JL. (2001) Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk, *Circulation*, 103: 1930-1932.
- [116] Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, and Morawietz H. (2001) Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy, *Circulation*, 104: 1767-1772.
- [117] Mackay IR, Rosen FS. (2001) Autoimmune disease, *N. Eng. J. Med.*, 345: 340-350.
- [118] McLenachan JM, Vita J, Fish DR, Treasure CB, Cox DA, Ganz P and Selwyn AP. (1990) Early evidence of endothelial vasodilator dysfunction at coronary branch points, *Circulation*, 82: 1169-1173.
- [119] Lelkes PI, Hahn KL, Sukovich DA, Karmiol S, Schmidt DH. (1998) On the possible role of ROS in angiogenesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 454: 295-310.
- [120] Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo KT, Adamis AP. (1996) Reactive oxygen

intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo, *J. Clin. Invest.*, 98: 1667-1675.

[121] Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. (2009) NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury, *Nat. Med.*, 15: 1077-1081.

[122] Poli G, Parola M. (1997) Oxidative damage and fibrogenesis, *Free Radic. Biol. Med.*, 22: 287-305.

[123] Arnold RS, Shi J, Murad E, Whalen AM, Sun CQ, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petros JA, and Lambeth JD. (2001) Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1, *PNAS*, 98: 5550-5555.

[124] Swynghedauw B. (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling, *Physiol. Rev.*, 79: 215-262.

[125] Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE. (1996) Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 15: 633-644.

[126] Chowdhury AK, Watkins T, Parinandi NL, Saatian B, Kleinberg ME, Usatyuk PV, Natarajan V. (2005) Src-mediated tyrosine phosphorylation of p47^{phox} in hyperoxia-induced activation of NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species in lung endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, 280: 20700-20711.

[127] Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, Oishi P, Azakie A, Fineman JR, Black SM. (2006) Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 290: 1069-1077.

[128] Liu JQ, Folz RJ. (2004) Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 287: 111-118.

[129] Bonniaud P. (2004) Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis, *J. Immunol.*, 173: 2099-2108.

[130] Thannickal VJ. (2009) Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 40: 507-510.

[131] Sumimoto H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species, *Febs. J.*, 275: 3249-3277.

-
- [132] Lambeth JD. (2007) Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy, *Free. Radic. Biol. Med.*, 43: 332-347.
- [133] Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. (2006) Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 174: 810-816.
- [134] Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. (2001) Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways, *Circ. Res.* 88: 888-894.
- [135] Hwang TL, Yeh SH, Leu YL, Chern CY, and Hsu HC. (2006) Inhibition of superoxide anion and elastase release in human neutrophils by 3'-isopropoxychalcone via a cAMP-dependent pathway, *Br. J. Pharmacol.*, 148: 78-87.
- [136] Liou KT, Shen YC, Chen CF, Tsao CM, and Tsai SK. (2003) The anti-inflammatory effect of honokiol on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production, *Eur. J. Pharmacol.*, 475: 19-27.
- [137] Gupte SA. (2008) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases, *Curr. Opin. Invest. Drugs.*, 9: 993-1000.
- [138] Vlessis AA, Bartos D, Muller P, and Trunkey DD, Role of reactive O₂ in phagocyte-induced hypermetabolism and pulmonary injury, *J. Appl. Physiol.*, 78: 112-116.
- [139] Tanito M, Agbaga MP, and Anderson RE. (2007) Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro, *Free. Radic. Biol. Med.*, 42: 1838-1850.
- [140] Yamamoto E, Tamamaki N, Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Dong YF, Fukuda M, Matsuba S, Ogawa H, and Kim-Mitsuyama S. (2008) Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation, *Stroke*, 39: 3049-3056.
- [141] Chen W, Pendyala S, Natarajan V, Garcia JG, and Jacobson JR. (2008) Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition, *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 295: 575-583.

-
- [142] Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, and Nathan CF. (1991) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs, *FASEB*, 5: 98-103.
- [143] Aldieri E, Riganti C, Polimeni M, Gazzano E, Lussiana C, Campia I, and Ghigo D. (2008) Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific, *Curr. Drug. Metab.*, 9: 686-696.
- [144] Gatley SJ and Martin JL. (1979) Some aspects of the pharmacology of diphenyleneiodonium, a bivalent iodine compound, *Xenobiotica*, 9: 539-546.
- [145] Moulton P, Martin H, Ainger A, Cross A, Hoare C, Doel J, Harrison R, Eisenthal R, and Hancock J. (2000) The inhibition of flavoproteins by phenoxaiodonium, a new iodonium analogue, *Eur. J. Pharmacol.*, 401: 115-120.
- [146] Le Cabec V and Maridonneau-Parini I. (1995) Complete and reversible inhibition of NADPH oxidase in human neutrophils by phenylarsine oxide at a step distal to membrane translocation of the enzyme subunits, *J. Biol. Chem.*, 270: 2067-2073.
- [147] Doussiere J, Poinas A, Blais C, and Vignais PV. (1998) Phenylarsine oxide as an inhibitor of the activation of the neutrophil NADPH oxidase: identification of the beta subunit of the flavocytochrome b component of the NADPH oxidase as a target site for phenylarsine oxide by photoaffinity labeling and photoinactivation, *Eur. J. Biochem.*, 251: 649-658.
- [148] Yoshida LS, Abe S, and Tsunawaki S. (2000) Fungal gliotoxin targets the onset of superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268: 716-723.
- [149] Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, and Shimoyama T. (2004) Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase, *Infect. Immun.*, 72: 3373-3382.
- [150] Comera C, Andre K, Laffitte J, Collet X, Galtier P, and Maridonneau-Parini I. (2007) Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils, *Microbes. Infect.*, 9: 47-54.
- [151] Hsu MF, Raung SL, Tsao LT, Lin CN, and Wang JP. (1997) Examination of the inhibitory effect of norathyriol in formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced respiratory burst in rat neutrophils, *Free. Radic. Biol. Med.*, 23: 1035-1045.

-
- [152] Wang JP, Raung SL, Tsao LT, and Lin CN. (1997) Evidence for the involvement of protein kinase C inhibition by norathyriol in the reduction of phorbol ester-induced neutrophil superoxide anion generation and aggregation, *Eur. J. Pharmacol.*, 336: 81-88.
- [153] Ikai T, Akao Y, Nakagawa Y, Ohguchi K, Sakai Y, and Nozawa Y. (2006) Magnolol-induced apoptosis is mediated via the intrinsic pathway with release of AIF from mitochondria in U937 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 2498-2501.
- [154] Ai J, Wang X, and Nielsen M. (2001) Honokiol and magnolol selectively interact with GABAA receptor subtypes in vitro, *Pharmacology*, 63: 34-41.
- [155] Tsai SK, Huang SS, and Hong CY. (1996) Myocardial protective effect of honokiol: an active component in *Magnolia officinalis*, *Planta. Med.*, 62: 503-506.
- [156] Liou KT, Shen YC, Chen CF, Tsao CM, and Tsai SK. (2003) Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production, *Brain. Res.*, 992: 159-166.
- [157] Sheu ML, Chiang CK, Tsai KS, Ho FM, Weng TI, Wu HY, and Liu SH. (2008) Inhibition of NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered signaling by honokiol suppresses high glucose-induced human endothelial cell apoptosis, *Free. Radic. Biol. Med.*, 44: 2043-2050.
- [158] Pandey R, Chander R, and Sainis KB. (2007) Prodigiosins: a novel family of immunosuppressants with anti-cancer activity, *Indian. J. Biochem. Biophys.*, 44: 295-302.
- [159] Nakashima T, Iwashita T, Fujita T, Sato E, Niwano Y, Kohno M, Kuwahara S, Harada N, Takeshita S, and Oda T. (2008) A prodigiosin analogue inactivates NADPH oxidase in macrophage cells by inhibiting assembly of p47^{phox} and Rac, *J. Biochem.*, 143: 107-115.
- [160] Kojima S, Nomura T, Icho T, Kajiwarra Y, Kitabatake K, and Kubota K. (1993) Inhibitory effect of neopterin on NADPH-dependent superoxide-generating oxidase of rat peritoneal macrophages, *FEBS Lett.*, 329: 125-128.
- [161] Decoursey TE and Ligeti E. (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 62: 2173-2193.
- [162] Touyz RM. (2008) Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter, *Hypertension*, 51: 172-174.

-
- [163] Stefanska J and Pawliczak R. (2008) Apocynin: molecular aptitudes, *Mediators Inflamm.*, 2008: 106507.
- [164] Heumuller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schroder K, and Brandes RP. (2008) Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant, *Hypertension*, 51: 211-217.
- [165] Williams HC and Griendling KK. (2007) NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 50: 9-16.
- [166] Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, and Verhoeven AJ. (1994) Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 11: 95-102.
- [167] Vejrazka M, Micek R, and Stipek S. (2005) Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1722: 143-147.
- [168] Riganti C, Costamagna C, Doublier S, Miraglia E, Polimeni M, Bosia A, and Ghigo D. (2008) The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 228: 277-285.
- [169] Freyhaus H, Huntgeburth M, Wingler K, Schnitker J, Baumer AT, Vantler M, Bekhite MM, Wartenberg M, Sauer H, and Rosenkranz S. (2006) Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation, *Cardiovasc. Res.*, 71: 331-341.
- [170] Cayatte AJ, Rupin A, Oliver-Krasinski J, Maitland K, Sansilvestri-Morel P, Boussard MF, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, and Cohen RA. (2001) S17834, a new inhibitor of cell adhesion and atherosclerosis that targets NADPH oxidase, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 1577-1584.
- [171] Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, and Cohen RA. (2006) Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice, *Diabetes*, 55: 2180-2191.
- [172] Yamamoto T and Yamada K. (2006) Specific NAD(P)H oxidase inhibitor WO 2004=089412. Osaka-shi, Japan: Mitsubishi Pharma Corporation.

-
- [173] Schappi MG, Jaquet V, Belli DC, and Krause KH. (2008) Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and antiinflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase, *Semin. Immunopathol.*, 30: 255-271.
- [174] Kume A and Dinanuer MC. (2000) Gene therapy for chronic granulomatous disease, *J. Lab. Clin. Med.*, 135: 122-128.
- [175] Borbély G, Szabadkai I, Horváth Z, Markó P, Varga Z, Breza N, Baska F, Vántus T, Huszár M, Geiszt M, Hunyady L, Buday L, Orfi L, Kéri G. (2010) Small-molecule inhibitors of NADPH oxidase 4, *J. Med. Chem.*, 53: 6758-6762.
- [176] Ji-Hu Zhang, Thomas DY, Chung and Kevin R. (1999) Oldenburg, A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *J. Biomol. Screen.*, 4: 67.
- [177] Jakus Z, Németh T, Verbeek JS, Mócsai A. (2008) Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes, *J. Immunol.*, 180: 618-629.
- [178] Huszár M, Varga A, Horváth A, Loránd T, Agócs A, Idei M, Mandl J, Vántus T and Kéri G. (2010) Comparative Characterization of Experimental and Calculated Lipophilicity and Anti-Tumour Activity of Isochromanone Derivatives, *Curr. Med. Chem.*, 17: 321-333.
- [179] Breza N, Pato J, Orfi L, Hegymegi-Barakonyi B, Banhegyi P, Varkondi E, Borbely G, Petak I, Keri G. (2008) Synthesis and characterization of novel quinazoline type inhibitors for mutant and wild-type EGFR and RICK kinases. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 28: 361-373.
- [180] Huszár M, Varga A, Horváth A, Loránd T, Agócs A, Idei M, Mandl J, Vántus T and Kéri G. (2010) Comparative Characterization of Experimental and Calculated Lipophilicity and Anti-Tumour Activity of Isochromanone Derivatives, *Curr. Med. Chem.*, 17: 321-333.
- [181] Donkó A, Orient A, Szabó PT, Németh G, Vántus T, Kéri G, Orfi L, Hunyady L, Buday L, Geiszt M. (2009) Detection of hydrogen peroxide by lactoperoxidase-mediated dityrosine formation. *Free. Radic. Res.*, 43:440-445.
- [182] Copeland RA. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005: 83-110.

-
- [183] Kéri G, Székelyhidi Z, Bánhegyi P, Varga Z, Hegymegi-Barakonyi B, Szántai-Kis C, Hafenbradl D, Klebl B, Muller G, Ullrich A, Erös D, Horváth Z, Greff Z, Marosfalvi J, Pató J, Szabadkai I, Szilágyi I, Szegedi Z, Varga I, Wácsek F and Örfi L. (2005) Drug Discovery in the Kinase Inhibitory Field Using the Nested Chemical Library™ Technology, ASSAY and Drug Development Technologies, 3: 5.
- [184] Atkins WM. (2006) Current views on the fundamental mechanisms of cytochrome P450 allostereism, *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, 2: 573-579.
- [185] Laleu B, Gaggini F, Orchard M, Fioraso-Cartier L, Cagnon L, Houngninou-Molango S, Gradia A, Duboux G, Merlot C, Heitz F, Szyndralewicz C, Page P. (2010) First in class, potent, and orally bioavailable NADPH oxidase isoform 4 (Nox4) inhibitors for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, *J. Med. Chem.*, 53: 7715-7730.
- [186] Kansy M, Senner F, and Gubernator K. (1998) Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes, *J. Med. Chem.*, 41: 1007-1010.

9. Publikációk jegyzéke

9.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények:

- **Borbély G**, Szabadkai I, Horváth Z, Markó P, Varga Z, Breza N, Baska F, Vántus T, Huszár M, Geiszt M, Hunyady L, Buday L, Órfi L, and Kéri Gy. (2010) Small-Molecule Inhibitors of NADPH Oxidase 4, *Journal of Medical Chemistry*, 53: 6758-6762. IF: 5,207
- Breza N, Pató J, Órfi L, Hegymegi-Barakonyi B, Bánhegyi P, Várkonyi E, **Borbély G**, Peták I and Kéri Gy. (2008) Synthesis and characterization of novel quinasoline type inhibitors for mutant and wild type EGFR and RICK kinases, *Journal of Receptor and Signal Transduction*, 28: 361-373. IF: 1,540
- **Borbély G**, Huszár M, Varga A, Futosi K, Mócsai A, Órfi L, Idei M, Mandl J, Kéri Gy, Vántus T. (2012) Optimization of important early ADME(T) parameters of NADPH oxidase-4 inhibitor molecules, *Medicinal Chemistry*, (megjelenés alatt). IF: 1,603

9.2. Az értekezés témájától független közlemények:

- Hegymegi-Barakonyi B, Székely R, Varga Z, Kiss R, **Borbély G**, Németh G, Bánhegyi P, Pató J, Greff Z, Horváth Z, Mészáros Gy, Marosfalvi J, Erős D, Szántai-Kis Cs, Garavaglia S, Perozzi S, Rizzi M, Hafenbradl D, Ko M, Av-Gay Y, Klebl BM, Órfi L, Kéri Gy. (2008) Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* – early days of a new therapeutic concept in tuberculosis, *Current Medicinal Chemistry*, 15: 2760-2770. IF: 4,823

Szabadalmak:

- Earle M, Seddon K, Gilea M, **Borbély G**, Gilmore B, Gorman S, McLaughlin M. (2010) Antimicrobial system, U.S. Patent Application Serial No. 12/937149.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kéri Györgynek, aki bevezetett a tudományos gondolkodás módszertanába, végig türelemmel irányította, támogatta munkámat és lehetővé tette, hogy ez az értekezés megszülethessen. Külön köszönettel tartozom azért, hogy még külföldi tanulmányaim és munkám alatt is folyamatosan számíthattam rá.

Köszönöm Dr. Horváth Anikónak, Dr. Vántus Tibornak, Dr. Örfi Lászlónak és Dr. Szántai-Kis Csabának a cikkeimhez nyújtott szakmai segítséget.

Hálásan köszönöm munkatársaimnak és barátaimnak, Dr. Huszár Mónikának, Székely Edina Ritának, Breza Nórának, Sípos Annának, Bökönyi Györgyinek, Tanai Henriettenek, Varga Attilának, Zdravicsné Szabó Editnek, Bránné Németh Beatrixnak és Gyulavári Pálnak a szakmai és emberi téren nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Jean Crabtree, Dr. Kieran Bransfield, Dr. Martyn J. Earle, Dr. Panu M. Jaakkola és Dr. Päivi Ojala csoportvezetőknek, hogy hosszabb-rövidebb ideig a csoportjukban dolgozhattam, ami alatt sokat tanultam.

Köszönöm a Vichem Chemie Kutató Kft. dolgozóinak együttműködését és az általuk szintetizált vegyületeket, valamint kollaborációs partnereinknek, a Geiszt-, és a Mócsai-labor dolgozóinak minden segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm a türelmet és kitartást családomnak, akik lélekben támogatták e vállalkozásomat.