



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

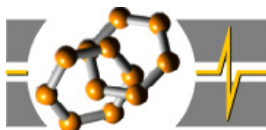
Ph.D. Értekezés Tézisei

Fotoszenzibilizátorok felhalmozódásának nyomonkövetése és mennyiségi szerkezet – hatás összefüggései

Vanyúr Rozália

Témavezető: Dr. Héberger Károly

Konzulens: Dr. Jakus Judit



MTA Kémiai Kutatóközpont
Kémiai Intézet
Bio-oxidációs csoport

2004.

BEVEZETÉS

A porfin-vázis és rokon vegyületek fontos felhasználási területe a fotodinamikus terápia (nemzetközi nevén Photodynamic Therapy, PDT). Ez egy főleg daganatos sejtek elpusztítására kifejlesztett kezelés, melynek során egy szelektíven felhalmozódott fényérzékenyítő vegyület (szenzibilizátor) és a szöveten áthatoló látható fény együttes alkalmazása oxigén jelenlétében olyan biokémiai folyamatokat indukál, amelyek a rákos sejtek pusztulásához vezetnek. A PDT egyéb, nem tumoros megbetegedések (pl. pikkelysömör (psoriasis), érlemezésedés (atherosclerosis), érvisszaszűkülés (vascular restenosis), ízületi gyulladás (rheumatoid arthritis), illetve az időskori vakság egyik fajtája, a makula degeneráció) kezelésére is alkalmas. Ezenkívül vér és vértermékek sterilizálása is használják, de rovar-, illetve baktériumölő hatása is ismeretes.

A PDT széleskörű klinikai bevezetésének egyik legfontosabb akadályja, hogy a forgalomban lévő szenzibilizátorok nem elég tiszták, illetve hatékonyak, ezért a porfin-vázis fotoszenzibilizátor vegyületek fejlesztése a gyógyszerkutatás egyik kiemelt feladata. A világ számos laboratóriumában foglalkoznak új szenzibilizátorok előállításával, de a vegyületek nagyrésznél a biológiai tesztelés a munka bonyolultsága miatt mindeddig nem történt meg.

Munkánk célja, hogy hatékony fotoszenzibilizátor molekulák fejlesztéséhez járjunk hozzá, amelyhez a jövőben nagyobb számú porfin-vázis vegyület fotodinamikus aktivitásának meghatározását tervezzük azonos laboratóriumi körülmények között.

CÉLKITŰZÉSEK

Ebben a munkában a fenti vizsgálathoz kapcsolódó analitikai módszer kifejlesztését és a porfirinek mennyiségi szerkezet – hatás összefüggés vizsgálatára alkalmas kemometriai módszerek kiválasztását tűztük ki célul.

Ezek:

1. egy olyan száloptikás mérőrendszer összeállítása (a kereskedelemben mindeddig nem kapható), amely alkalmas *in situ* a sejtekben illetve állati szövetekben felhalmozódott szenzibilizátor nyomonkövetésére fluoreszcencia detektálással;
2. egy, a fenti száloptikás fluoreszcencia mérésen alapuló, a szenzibilizátorok mennyiségi meghatározására alkalmas módszer kidolgozása, ami lehetővé teszi, hogy nagyszámú porfirin-vázis vegyület szöveti koncentrációját határozzuk meg extrakciós módszereknél jóval egyszerűbben és rövidebb idő alatt, a lehető legkevesebb állat felhasználásával;
3. irodalmi aktivitás adatok alapján, mennyiségi szerkezet – hatás összefüggések vizsgálatával, a fotodinamikus aktivitás, a szelektív felhalmozódás valamint a nem-fotodinamikus anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésére alkalmas modellek építése. Kiszámú, homológ vegyület és nagyobb számú, szerkezetükben jobban eltérő szenzibilizátorok tanulmányozása során lineáris és nemlineáris, változó kiválasztásra és a modellépítésre alkalmas kemometriai módszerek összehasonlítása, illetve a vizsgált aktivitásokat előrejelző tulajdonságai alapján a legmegfelelőbb kiválasztása.

Ezek a mérési technikák és vizsgálati módszerek alapozzák meg a nagyobb számú (35-40) molekulát magába foglaló, nemzetközi együttműködés keretein belül tervezett saját kísérleti méréseinket, s az ezt követő szerkezet – hatás vizsgálatot.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A szenzibilizátor koncentráció *in situ* meghatározásához fejlesztett mérőműszerhez a holland AVANTES által gyártott egységeket (optikai szálak, reflexiós szonda, AVS S2000 detektor, SPECTRAWIN 4.2 szoftver) építettük be.

Az állatkísérleteket az MTA Kémiai Kutatóközpont Állatkísérleti Etikai Kódexe szerint, a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélyével, 20 ± 1 grammos NMRI hím fehér egereken (Toxicoop Kft., Budapest) végeztük.

A porfirinek háromdimenziós szerkezetének geometria-optimalizálását és konformációanalízisét a ChemPlusTM 2.0 programmal (kiterjesztés a HyperChem 4 programhoz, HyperCube Inc., Canada, 1997), azon belül az MM⁺ nevű molekula mechanikai módszer felhasználásával végeztük. Az adatokat az IsisBase 2.3 programmal (Molecular Design Limited, USA, 1996) rendeztük adatbázisba. Az MLR és PLS modellek építését a StatisticaTM program-csomaggal (Statsoft, USA, 1999), míg az ANN modellek építését a 3DNET 1.0 programmal (CompElit Kft., Magyarország, 1998) végeztük.

EREDMÉNYEK

Munkánkban a fotodinamikus aktivitással rendelkező vegyületek biológiai hatásának teszteléséhez és elemzéséhez elengedhetetlen metodikák beállítását és optimalizálását írtuk le:

1. Egy, a porfin-vázás és rokon vegyületek fluoreszcenciájának *in situ* detektálására alkalmas készüléket állítottunk össze. Megfelelő optikai elemek (szűrők, lencsék, optikai szálak) segítségével elértük, hogy a szervekben az általunk fejlesztett, reflexiós elven működő szondával kapott spektrumok minősége megközelíti az oldószerben felvett spektrumok minőségét. Alkalmazásával gyorsan és megbízhatóan mérhetjük az *in situ* felhalmozódott szenzibilizátor koncentrációjával arányos fluoreszcenciás intenzitást.
2. Kidolgoztunk egy új módszert az *in situ* mért fluoreszcencia intenzitás és az adott szervben felhalmozott szenzibilizátor mennyisége közötti összefüggés kalibrálására, amivel az általánosan

alkalmazott extrakciós eljárásoknál könnyebben és gyorsabban határozható meg az egyes szövetek szenzibilizátor tartalma. Az eljárás során, szenzibilizátorral nem kezelt állatok szerveiből különböző szövettartalmú szervhomogenizátumokat készítettünk s ismert mennyiségű porfirin-vázis vegyület hozzáadásával, kalibrációs görbéket vettünk fel. A kezelt állatok szerveiből készített homogenizátumok szenzibilizátor-tartalmát a fenti görbék alapján határoztuk meg. Máj- és tumormintákon bizonyítottuk, hogy a teljes szervre vonatkoztatott szenzibilizátor-tartalom az 50% szervtartalmú homogenizátumból legalább olyan jól becsülhető, mint a bonyolultabb, különböző koncentrációjú homogenizátumból lineáris extrapolációval kapott mérésekből.

3. A kezelt állat szervében *in situ* mért fluoreszcenciás intenzitás és a szervből készített mintákban meghatározott szenzibilizátor koncentráció alapján *in situ* kalibrációs görbét készítettünk. A kapott kalibrációval, az *in situ* mért fluoreszcenciás intenzitásból azonnal becsülhetjük a felhalmozott porfirin mennyiségét. A módszerrel máj, bőr, tumor és vérplazma szenzibilizátor-tartalmát kalibráltuk. Mivel az azonos családba tartozó tetrapirrol-vázis vegyületek fotofizikai tulajdonságai közötti eltérés (szubsztituens hatás) elenyésző, az adott család egy tagjára elkészített *in situ* kalibráció várhatóan a család többi tagjára is alkalmazható. Ezt egy általunk kifejlesztett szenzibilizátor példáján mutatjuk be. PDT aktivitás mérésnél rövid időn belül, minimális állat felhasználásával meghatározható a szenzibilizátor gerjesztés optimális ideje. Az abszolút koncentrációk meghatározása lehetővé teszi az egyes vegyületek felhalmozódásának összehasonlítását nem csak egy szervben belül, hanem szervek között is.
4. Egy egynemű pirofeoforbid sorozat háromdimenziós szerkezete és a tumorban való felhalmozódása, valamint fotodinamikus aktivitása közötti kapcsolat mennyiségi szerkezet – hatás összefüggés vizsgálata során épített modellek aktivitást leíró, valamint előrejelző

képességeit összehasonlítva kimutattuk, hogy a vizsgált szenzibilizátor sorozat felhalmozódásának mértéke mind a többszörös lineáris regresszióval (MLR), mind a mesterséges ideghálózattal (ANN) épített modelljeinkkel jól leírható és előrejelezhető. A felhalmozódás előrejelzésének legfontosabb paramétere a $\log P$, ami mesterséges ideghálózatot alkalmazva egy egyedül is elégséges leíró változó.

5. Számításaink szerint lineáris módszerrel, a felhalmozódás leírásától és előrejelzésétől eltérően, nem építhető a PDT-aktivitás leírására és előrejelzésére alkalmas modell, míg a mesterséges ideghálózattal nagyon jó modelleket építettünk a tumornövekedés késleltetés előrejelzésére. Ebben az esetben az aktivitás előrejelzésére a $\log P$ egyedül nem alkalmas. A Wiener indexszel illetve a molekulaméretre jellemző WHIM deskriptorokkal (AMASS, AVDW, AEN) kiegészített modellek sokkal megbízhatóbb előrejelzést szolgáltatnak.
6. Egy nagyobb számú, egymástól szerkezetileg jobban eltérő porfin-vázis fotoszenzibilizátorokból álló vegyületcsoport nem fotodinamikus anti-HIV-1 aktivitását három módszerrel (többszörös lineáris regresszióval, parciális legkisebb négyzetek (PLS) módszerével és mesterséges ideghálózattal) modellezve megállapítottuk, hogy a lineáris módszerekkel (MLR, PLS) épített modellek is jól leírják a vizsgált aktivitást, de a több-elem-kihagyásos vagy a külső-mintás ellenőrzés alapján, előrejelzésre nem alkalmasak. A belső és külső ellenőrzések szerint megbízható előrejelzést csak a mesterséges ideghálózattal épített modellekkel kaptunk.
7. Az anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésének legfontosabb paramétere mindegyik ANN modell szerint a kémiai kötés forgási szabadság foka (DF). Ez a változó önmagában nem alkalmas a vizsgált aktivitás becslésére, legalább még egy, a kettőskötés ekvivalens deskriptor (DBE) vagy az elektrosztatikus teljes hidrogénkötés savasság deskriptor (ESTA) hozzájárulása szükséges. A

belső ellenőrzési mutatók még jobban javíthatók egy harmadik változó alkalmazásával (HOMO vagy KMASS).

8. Bemutattuk, hogy az anti-HIV-1 aktivitást befolyásoló molekuláris tulajdonságok figyelembevételével új vírusellenes vegyületek tervezhetők. Modelljeink alapján alacsony és magas aktivitású vegyületeket terveztünk, illetve elemeztünk. A számítások megfeleltek a várakozásnak, a tervezett magas aktivitású molekulák aktivitását a modellek magasra becsülték, míg az alacsonyabbra tervezett aktivitású molekulákét alacsonyabbra. A módszerrel egy hiányos vegyületsor hiányzó tagjainak aktivitását is becsültük. Megállapítottuk, hogy a karboxilált tetrafenilporfirinek esetében valóban legalább három karboxil csoport szükséges a megfelelő aktivitás eléréséhez, amit irodalmi ismeretek is megerősítenek.
9. Az általunk vizsgált adatkészlet alapján az MLR és a PLS nem, míg mesterséges ideghálózat alkalmas módszer kisebb és nagyobb számú tetrapirrol-vázis molekulák mennyiségi – szerkezet hatás összefüggés vizsgálatára egynemű és nem egynemű vegyületek, és a szerkezeti paramétereiktől lineárisan és nem-lineárisan függő biológiai aktivitások esetén is.

LEGFONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Sikeresen összeállítottunk egy fotoszenzibilizátorok *in situ* kimutatására alkalmas fluoreszcenciás detektáló mérőberendezést, amit, az eddigiektől eltérően, nem lézeres fényforrásra alapoztunk.
2. Az alkalmazott reflexiós elven működő szondával gyorsan és megbízhatóan mérhetjük a felhalmozott szenzibilizátor koncentrációjával arányos fluoreszcenciás intenzitást.

3. A szervhigítási módszerrel nyert kalibrációs egyenesek segítségével a máj, a bőr, a tumor és a vérplazma szenzibilizátor-tartalma azonnal becsülhető. Ezzel a pusztán intenzitásváltozás nyomonkövetéséhez képest megbízhatóbb értékelést kaphatunk az egyes szervekben mért szenzibilizátor koncentrációk arányairól.
4. A fotoszenzibilizátorok felhalmozódásának nyomonkövetése rövid idő alatt, minimális állat felhasználásával elvégezhető.
5. Kis számú pirofeoforbid molekula tanulmányozásánál a mesterséges ideghálózat alkalmazásával mind a felhalmozódás, mind a PDT aktivitás igen jól előrejelezhető.
6. Tetrapirrol-vázú molekulák nem-fotodinamikus anti-HIV-1 aktivitásának vizsgálatánál is megbízható előrejelzést csak a mesterséges ideghálózattal épített modellekkel kaptunk.
7. Az egy-elem-kihagyásos keresztellenőrzés önmagában nem ad megbízható képet egy modell aktivitást előrejelző képességéről. Sokkal megbízhatóbb eredményt kapunk, ha egy több-elem-kihagyásos ellenőrzésen alapuló modell-kiválasztás után külső mintákon is elvégezzük az ellenőrzést.
8. Bemutattuk, hogy az anti-HIV-1 aktivitást befolyásoló molekuláris tulajdonságok figyelembevételével új vírusellenes vegyületek tervezhetők.

LEHETSÉGES HASZNOSULÁS

1. A kifejlesztett, szállítható fluorométer akár a humán gyógyászatban is alkalmazható *in vivo*, a felületi tumorok és az egészséges bőr szenzibilizátor-tartalmának nyomonkövetésére.
2. Az anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésére épített ANN modellekkel porfirin adatbázisok molekulái közül kiválaszthatjuk a lehetséges gyógyszerjelölteket illetve kizárhatjuk az előreláthatóan hatástalanokat.
3. A kifejlesztett és kiválasztott módszerek alkalmazásával egy olyan szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatot végezhetünk el, amely várhatóan széles körben alkalmazható a porfirin származékok PDT aktivitásának előrejelzésére.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

1. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Prediction of Photosensitizers Activity in Photodynamic Therapy Using Artificial Neural Networks: A 3D-QSAR Study
ANNIMAB-1 Conferencia, konferencia kiadvány p. 295-300, Göteborg, Svédország, 2000
Május 13-16
If.: 0
2. Jakus J. és Vanyúr R.:
A fotodinamikus aktivitás mérése
Anyagvizsgálók lapja, **1**: 14-15, 2001.
If.: 0
3. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok fotodinamikus aktivitásának és felhalmozódásának előrejelzése mennyiségi szerkezet-hatás összefüggések segítségével
Magyar Kémiai Folyóirat, **107** (4): 167-172, 2001.
If.: 0,215
4. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Prediction of Tumoricidal Activity and Accumulation of Photosensitizers in Photodynamic Therapy Using Multiple Linear Regression and Artificial Neural Networks.
Photochem. Photobiol., **75** (5): 471-478, 2002.
If.: 2,278
5. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Prediction of anti-HIV-1 Activity of a Series of Tetrapyrrole Molecules
J. Chem. Inf. Comput. Sci., **43**: 1829-1836, 2003.
If.: 2,900
6. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Különböző szerkezetű porfirin származékok anti-HIV-1 aktivitásának modellezése
Magyar Kémiai Folyóirat, 2004, elfogadva
If.: 0,207
7. Vanyúr R., Szabó B., Jakus J.:
Kinetics of photosensitizer clearance in murine organs
Reaction Kinetics and Catalysis Letters, 2004, elfogadva
If.: 0,398

Az értekezéshez kapcsolódó saját előadások

1. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus, J.:
Prediction of Photosensitizers Activity in Photodynamic Therapy Using Artificial Neural Networks: A 3D-QSAR Study
First international conference on Artificial Neural Networks in Medicine and Biology, Göteborg, Sweden, 13-16 May, 2000.
Angol nyelvű előadás
2. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok fotodinamikus aktivitásának és felhalmozódásának előrejelzése mennyiségi szerkezet-hatás összefüggések segítségével
MTA SZAB Kemometria és Molekulamodellzés Munkabizottsága és MKE QSAR és Modellzési Szakcsoport közös tudományos ülése, Szeged, 2000. november 15-16.
Magyar nyelvű előadás
3. Vanyúr R., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok koncentrációjának *in vivo* meghatározása
Avantes felhasználói klub, TESTOR Kft., Budapest, 2002. március 26.
4. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Porfirin származékok anti-HIV aktivitásának előrejelzése mennyiségi szerkezet - hatás összefüggések alkalmazásával
MTA Kémiai Kutatóközpont, V. Doktori Kémiai Iskola, Szokolya - Királyrét, 2002. május 21-22.
5. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok fotodinamikus aktivitásának és felhalmozódásának előrejelzése mennyiségi szerkezet - hatás összefüggések segítségével
MTA Kémiai Kutatóközpont, Kutatóközponti Tudományos Napok, Budapest, 2002. május 27-28.

Az értekezés témájában született egyéb közlemények:

1. Kriska T., Jakus J., Keszler Á., Vanyúr R., Németh A., Gál D.:
Type III photosensitization: attempt for quantification and a way to new sensitizers.
Proc. SPIE **3563**: 11-17, 1999. If.: 0
2. Németh A., Jakus J., Kriska T., Keszler Á., Vanyúr R., Gál D.:
Physico chemical modeling of the role of free radicals in photodynamic therapy. IV.
Quantitative aspects of photodynamic effects on free radicals generated in cell cultures.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **255**: 360-366, 1999. If.: 2,780
3. Németh A., Jakus J., Kriska T., Keszler Á., Vanyúr R., Gál D.:
Szabad gyökök kimutatásának és mennyiségi elemzésének lehetősége *in vitro* rendszerben.
Magyar Kémiai Folyóirat, 105 évf. 2. sz. 71-77, 1999. If.: 0,215

Az értekezéshez nem közvetlenül kapcsolódó közlemények:

1. Jakus J., Kriska T., Vanyúr R.:
Effect of multivitamins in an effervescent preparation on the respiratory burst of peritoneal macrophages in mice.
British Journal of Nutrition **87**: 501-508, 2002. If.: 1,937