

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

# **Gyűrűs kalkonszármazékok citotoxikus és daganatellenes hatása molekuláris mechanizmusának vizsgálata**

**Dr. Rozmer Zsuzsanna**



**Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Pintér Erika

Programvezető: Prof. Dr. Gregus Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Perjési Pál

Konzulens: Prof. Dr. Gregus Zoltán

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
Pécs, 2014.

## I. Bevezetés

A természetes növényi hatóanyagok egyik gyógyászati szempontból is széles körben vizsgált csoportját alkotják a flavonoidok. A flavonoidok jellegzetes szerkezetű csoportját képezik a kalkonok (1). A kalkonok szerkezetüket tekintve 1,3-diaril-2-propén-1-on alapvázal rendelkező vegyületek. A növényekből izolált kalkonok vizsgálata mellett nagyszámú szintetikus származék biológiai vizsgálatáról is beszámoltak az irodalomban.

A szerτεágazó biológiai hatások közül kiemelhető a citotoxikus és kemoprotektív hatás. A szintetikus kalkonszármazékok szintézisének és biológiai vizsgálatainak egyik előnye, hogy a rokon szerkezetű vegyületek összehasonlító vizsgálata során adatok nyerhetők a szerkezet-hatás közötti kapcsolatról. Így a szintetikus származékok kiemelt kutatási célja a természetes vegyületeknél hatékonyabb, főként a daganatterápiában eredményesen alkalmazható analógok előállítása.

Az erre irányuló kutatások kémiai háttérében az áll, hogy a kalkonok, mint  $\alpha,\beta$ -telítetlen karbonilvegyületek lágy elektrofilek, viszonylag könnyen reakcióba léphetnek celluláris tiolokkal (lágy nukleofilek), ugyanakkor kevésbé reakcióképesek amino- és hidroxilcsoportokkal szemben. Mivel fiziológias körülmények között nem reagálnak nukleinsavakkal, nem rendelkeznek genotoxikus hatással, ami a daganatterápiában alkalmazott alkiláló típusú szerek egyik nemkívánt mellékhatása.

A kalkonok citotoxikus hatásának háttérében egyrészt a sejtek glutation (GSH/GSSG)-státuszának a befolyásolása állhat. A konjugált karbonil-funkcióval rendelkező vegyületek jellegzetes Michael-reakciós akceptorok, így könnyen reakcióba lépnek redukált glutationnal. A kalkonok - szerkezetükből adódóan - feltételezhetően szintén reakcióba lépnek GSH-val, főként konjugációs reakció révén. Számos vegyület apoptózist indukál, befolyásolja a sejtciklust, valamint a mitokondriális membránpotenciál összeomlását eredményezi.

A daganatsejtekkel szemben mutatott toxicitásuk mellett, a kalkonok citoprotektív hatása is jól dokumentált. A citoprotektív hatás háttérében egyrészt az állhat, hogy a kalkonok és rokon szerkezetű Michael-reakciós akceptorok egyes, a fázis 2 biotranszformációkban résztvevő enzimeket indukálnak.

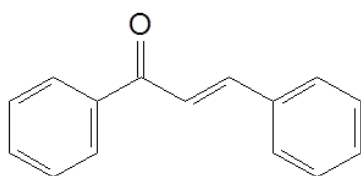
Korábbi kísérleti eredmények szerint a két aromás gyűrű egymáshoz viszonyított térbeli helyzete alapvetően befolyásolja a kalkonok bioaktivitását. Bár a kalkonok konjugált molekulák, eléggé flexibilisek ahhoz, hogy oldatban több konformációt is felvegyenek. A kalkonok vizsgálata így nem teszi lehetővé az optimális térszerkezet és biológiai hatás közötti kapcsolat vizsgálatát.

Ezen kapcsolat alaposabb megismerése céljából történt a kalkonokkal szerkezeti rokonságban álló gyűrűs telítetlen karbonilvegyületek (2-4) szintézise, kémiai reaktivitásának, elektron- és térszerkezetének, valamint biológiai hatásainak vizsgálata.

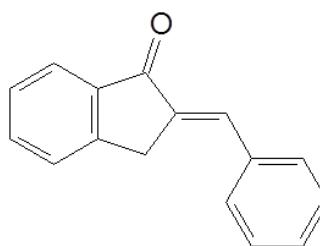
A különböző szubsztituensekkel bíró gyűrűs kalkonszármazékok *in vitro* citotoxicitásának vizsgálata P388, L1210 leukémia sejtekkel, valamint Molt 4/C8 és CEM T-limfocitákkal szemben történt. A négy teszt alapján számított ún. átlagos potenciál értékek

összehasonlítása alapján megállapították, hogy a 7-tagú gyűrűs (*E*)-2-(*X*-benzilidén)-1-benzoszuberon (**4**) származékok a leghatékonyabb citotoxikus analógok.

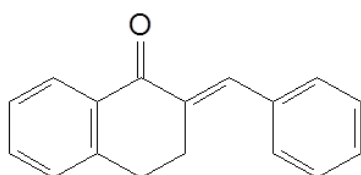
A vegyületek térszerkezete mellett az *in vitro* citotoxikus hatás nagymértékben függ a cinnamoil molekulafragmenszen található szubsztituens természetétől és helyzetétől. Ezt támasztja alá, hogy minden vizsgált tumorsejtvonallal szemben a 4-es, vagyis *para*-helyzetben metoxi-, valamint dimetilamino-szubsztituens hordozó 2-(*X*-benzilidén)-1-benzoszuberonok bizonyultak a sorozat leghatékonyabb származékainak.



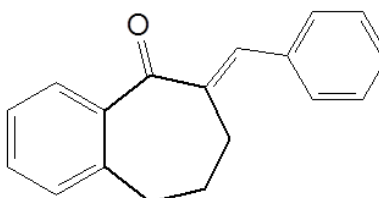
kalkon (**1**)



(*E*)-2-benzilidén-1-indanon (**2**)



(*E*)-2-benzilidén-1-tetralon (**3**)



(*E*)-2-benzilidén-1-benzoszuberon (**4**)

## II. Célkitűzések

Munkánk során fő célul a gyűrűs kalkonszármazékok fizikai-kémiai tulajdonságainak és a citotoxikus/citoprotektív hatás hátterében álló molekuláris mechanizmusoknak alaposabb megismerését tűztük ki.

- Célunk az **1-4** sorozat különböző szubsztituenseket hordozó tagjai  $\log P$  értékének meghatározása fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiás technika alkalmazásával. A  $\log P$  értékek ismeretében a molekulák lipofilitása és szerkezete közötti esetleges összefüggések vizsgálata.

A korábbi *in vitro* toxicitásvizsgálatok során kiemelkedő hatást mutató 7-tagú gyűrűs (*E*)-2-(4-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberont (**4a**) és kevésbé toxikus 4-metilszubsztituált analógját (**4b**) választottuk a tervezett hatásmechanizmus-vizsgálatok elvégzéséhez. Célunk:

- A vegyületek *in vitro* sejtszaporodást gátló hatásának vizsgálata humán Jurkat T sejtekkel szemben a vegyületek közel ekvitoxikus dóziséval történő kezelést követően, tripánkékkal történő festési eljárással. Az élő, a korai apoptotikus fázisban levő és az apoptotikus/nekrotikus sejtek mennyiségének/arányának meghatározása áramlási citometriai módszerrel.

- A vegyületek sejtsztódásra, sejtciklusra gyakorolt hatásainak áramlási citometriai módszerrel történő vizsgálata Jurkat T sejtekben, a vegyületekkel történő 8, 24 és 48 órás kezelést követően.
- A vizsgált kalkonanalógok *in vitro* antioxidáns (hidroxilgyök „scavenger”), illetve esetleges prooxidáns hatásának vizsgálata, annak időbeli függése a Fenton-reakció inicializálta dezoxiribóz degradációs teszt alkalmazásával.
  - A vegyületek antioxidáns/prooxidáns jellegének tanulmányozása céljából Jurkat T sejtekben is vizsgáljuk az analógok ROS-aktivitásra, vagyis a celluláris redox-státuszra gyakorolt hatását. A vizsgálatokhoz a diklórfluoreszcín-tesztet alkalmazzuk.
- A kalkonanalógok mitokondriális respirációra és ATPáz-aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- A vegyületek SH-szintre, majd glutation-szintre gyakorolt hatásának vizsgálata Jurkat T sejtekben. A redox-státusz jellemzésére a sejtek redukált és oxidált glutation arányának, illetve azok mennyiségének a meghatározása.
- A vegyületek redukált glutationnal szemben mutatott reaktivitásának vizsgálata mind sejtmentes, mind sejtes körülmények között. Az esetlegesen képződő konjugátumok jelenlétének igazolása vékonyréteg-kromatográfias módszerrel, ún. „kettős-előhívást” alkalmazva. A konjugátumok szerkezetének igazolása RP-HPLC-hez csatolt tömegspektrometriás eljárással.

### III. Vizsgálati módszerek és eredmények

#### III.1. Kalkonszármazékok $\log P$ értékeinek meghatározása

A 1-4 sorozat különféle szubsztituensekkel bíró tagjai  $\log P$  értékének meghatározása fordított-fázisú vékonyréteg-kromatográfias technika alkalmazásával történt. A meghatározáshoz szilanizált szilikagél 60F<sub>254</sub> (20 cm x 20 cm) réteget használtunk. A vizsgálandó anyagokat, valamint a kalibrációs és validációs sorozat tagjait metanol-kloroform 1:1 arányú elegyében oldottuk (2 mg/ml), majd vittük fel a lemezre. Mozgófázisként metanol-víz (60+40) elegyet használtuk. A kifejlesztést követően a foltok előhívása UV-fényben ( $\lambda = 254$  nm), valamint jód-gőzben történt.

A módszer lényege, hogy az eljárás során a lipofilitástól függő kromatográfias paramétert (a retenciós faktorról közvetlenül összefüggésben álló ún.  $R_M$  értéket:  $R_M = \log(1/R_f - 1)$ ) határozzuk meg, majd kalibrációs egyenes felhasználásával  $\log P$  értéket számolunk ( $\log P = aR_M + b$ ).

A vegyületek igen lipofilek,  $\log P$  értékük viszonylag széles tartományba ( $\log P = 2,53 - 5,35$ ) esik, a gyűrű tagszámának valamint a szubsztituens minőségének, jellegének és helyzetének függvényében.

A gyűrű tagszámának növekedése a ciklikus kalkonanalógok lipofilitásának növekedésével jár. Egy további metilén csoport beépülése a gyűrűbe átlagosan 0,4 egységgel

növelte meg a  $\log P_{\text{TLC}}$  értéket. Az **1** és **2** sorozat tagjai, valamint a **3** és **4** sorozat tagjai közötti lipofilitásbeli különbség kisebb, mint a **2** és **3** sorozat tagjai között. Mindezek arra utalnak, hogy az intra- és intermolekuláris interakciók, valamint a térszerkezet is befolyással vannak a lipofilitásra.

A szubsztituens minőségének vizsgálatokor megfigyelhető, hogy a *para*-helyzetben szubsztituált származékok esetén a lipofilitás a következők szerint változik:



A 7-tagú gyűrűs benzoszuberón származékok (**4**) esetén megállapítható, hogy adott szubsztituens *orto*-, *meta*-, illetve *para*-helyzetben tartalmazó vegyületek  $\log P$  értéke a következők szerint változik:  $\log P_{\text{TLC}}(\text{orto}) \leq \log P_{\text{TLC}}(\text{para}) \leq \log P_{\text{TLC}}(\text{meta})$ . A **2** és **3** sorozat tagjainál azonban a különböző helyzetben szubsztituált analógok  $\log P_{\text{TLC}}$  értékeiben nem figyelhető meg hasonló szabályszerűség. Ez a megfigyelés szintén arra utal, hogy a tér- és elektronszerkezet, amit a szubsztituensek minősége és helyzete is nagyban befolyásol, jelentős hatással van a molekulák lipofilitására.

## III.2. Gyűrűs kalkonszármazékok hatásmechanizmusának vizsgálata

A vizsgálni kívánt gyűrűs kalkonszármazékok (**4a** és **4b**) szintézise és tisztítása a korábban leírtak szerint történt. A használt vegyszerek mindegyike analitikai tisztaságú volt. A humán Jurkat T limfocita sejtek (ATCC, E6-1 klón) az LGC Promochemtől (Teddington, UK) származnak. A Jurkat T sejtek tenyésztése 37 °C-on, megfelelő pára- és 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú környezetben, RPMI 1640 tápoldatban (pH = 7,4) történt, amit kiegészítettünk 10% FCS-el (magzati borjú szérum, Gibco), penicillinnel (100 U/ml) és sztreptomocinnel (100 µg/ml).

A Jurkat T sejtek kezelése ( $5 \times 10^5$  db sejt / 1,0 ml RPMI 1640 tápoldat) a **4a** (5,6 µM), illetve **4b** (23,3 µM) vegyületekkel a vizsgálati módszereknek megfelelően 1, 4, 8, 24 illetve 48 órán keresztül történt. A koncentrációértékek az előzetesen meghatározott IC<sub>80</sub> dózisértékeknek felelnek meg. A kalkonszármazékokat DMSO-ban oldottuk, és az elkészült DMSO-oldatból 10 µl-t adtunk 1,0 ml sejteket tartalmazó tápoldathoz, így mindig 1% DMSO-t tartalmazott a kezelt sejtuszpenzió. A kontroll sejtuszpenziókat nem kezeltük, illetve minden esetben készítettünk egy olyan kontrollt is, ami csak 1% DMSO-t tartalmazott, kalkon nélkül.

### III.2.1. A vegyületek sejtproliferációra és sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata

A kalkonszármazékok Jurkat T sejtek sejtproliferációjára gyakorolt hatásának megismeréséhez elsőként a teljes sejtszám, valamint az élő sejtek arányának az alakulását a vegyületekkel történő 8, 24 illetve 48 órás kezelést, majd tripánkéssel történő festést követően, hemocitóméterrel határoztuk meg.

A kezeletlen sejtek, valamint az 1% DMSO-t tartalmazó inkubátumban levő sejtek száma 24 óra alatt megkétszereződik, ami megfelel a Jurkat T sejtek duplikációs idejének. A kalkonok oldószereként használt DMSO tehát ekkora mennyiségben (1%), önmagában nem

befolyásolja a sejtszámot. A két vizsgált vegyület egymáshoz hasonló módon csökkenti a sejtek számát a 8, 24 és 48 órás időpontokban, gátló hatásuk a sejtek proliferációjára kifejezett.

Az életképes sejtek aránya a kontroll sejtekhez képest mindkét kalkonanalóg esetén hasonlóan alakul. 8 órás inkubációs időt követően az élő sejtek mennyisége még közel annyi, mint a kezeletlen sejtek esetében, de 24 órás, illetve 48 órás inkubációs idő után már csaknem felére csökken a számuk. Nagy valószínűség szerint már a 8 órás kezelési időtartam alatt is lejátszódnak olyan folyamatok, amelyek hatással lesznek a sejtproliferáció további alakulására.

A **4a** és **4b** vegyületek citotoxikus hatásának további vizsgálata céljából meghatároztuk a vegyületekkel történő 8, 24 és 48 órás kezelési időtartamokat követően az inkubátumokban levő élő, korai apoptotikus fázisban levő, és apoptózis (és/vagy nekrozis) során elpusztult sejtek mennyiségét. A sejteken minden időpontban kettős jelölést hajtottunk végre, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC)-kötött annexin V-t és propídium-jodidot használva, majd áramlási citometriai módszerrel mértük a két festék fluoreszcencia-intenzitását.

8 órás kezelés alatt sem a **4a**, sem a **4b** vegyület nem mutat kifejezett toxikus hatást. 24 órás kezelési időtartam után azonban az élő sejtek száma sokkal kisebb a metoxiszármazék (**4a**) esetén (57,7%), mint a **4b** vegyülettel történő kezelést követően (71,7%). A sejtek jelentős része korai apoptotikus fázisban (**4a**: 22,8%; **4b**: 7,8%), illetve késői apoptotikus/nekrotikus fázisban van (**4a**: 16,8%; **4b**: 17,1%).

48 órás kezelést követően csak propídium-jodidot használtunk az élő (PI-negatív) és a késői apoptotikus/nekrotikus fázisban levő (PI-pozitív) sejtek mennyiségének meghatározására. Ebben az időpontban az élő sejtek száma jelentősen lecsökken, a **4a** vegyület esetén 40,2%-ra, a **4b** analóg esetén pedig 48,5%-ra.

A vizsgált kalkonszármazékok, ezen koncentrációértékek mellett, gátolják a sejt szaporodást, és apoptózist indukálnak.

A kísérletekbe bevont kalkonanalógok Jurkat T sejtek sejtciklusára gyakorolt hatásának vizsgálata a vegyületekkel történt kezeléseket követően, a DNS mennyiségi analízise által valósult meg. A Jurkat T sejtek kezelése során különböző: 8, 24 és 48 órás időpontokban vizsgáltuk a sejteket, hogy időben is láthassuk a kalkonok sejtciklusra gyakorolt hatását.

A DNS mennyiségi analíziséhez a sejtek jelölése minden időpontban propídium-jodiddal (PI) történt. A PI a sejtekben a kettősszalú DNS-hez kötődik, ezért a megkötött PI mennyisége, így az áramlási citometriai eljárás során látható fluoreszcens jel erőssége is arányos a sejtek DNS-mennyiségével. A sejtciklus egyes fázisaiban levő sejtek egymástól való megkülönböztetése a kezeletlen kontroll sejtek esetén felvett ábra alapján történt-

A **4a** és **4b** vegyületek sejtciklusra gyakorolt hatásában eltérések mutatkoznak, különösen nagyfokú a változás a metoxiszubsztituált (**4a**) származék esetén. A **4a** vegyület korai hatása (8 óra) abban nyilvánul meg, hogy megnöveli a G<sub>2</sub>/M fázisban levő sejtek arányát (36,9%), ami együtt jár a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázisban levő sejtek mennyiségének csökkenésével (18,6%). A metilszármazék esetén (**4b**) a sejtek legnagyobb hányada, a kontroll sejtekhez hasonlóan, a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázisban található (36,8%). Hosszabb, 24 órás inkubációs időt követően a **4a** vegyület

hatására tovább csökken a  $G_0/G_1$  fázisban levő sejtek mennyisége (7,3%), és nő a  $G_2/M$  fázisban (44,8%), valamint a Sub- $G_0$  (apoptotikus/nekrotikus sejtek) fázisban (22,4%) levő sejtek aránya. Ebben az időpontban (24 óra), a **4b** származékkal kezelt sejtek esetén mérsékelt csökkenés következik be a  $G_0/G_1$  fázisban levő sejtek mennyiségében (31,7%), ami együtt jár a  $G_2/M$  fázisban (27,1%), illetve a Sub- $G_0$  fázisban (14,5%) levő sejtek arányának kismértékű növekedésével. A **4a** és **4b** vegyületek eltérő hatása a  $(G_2/M)/(G_0/G_1)$  aránnyal is kifejezhető, ami 0,51 a kontroll, 6,1 a metoxi- (**4a**), és 0,85 a metilszármazék (**4b**) esetén. 48 órás kezelést követően mindkét kalcionanalóg esetén további növekedés tapasztalható a Sub- $G_0$  fázisban, vagyis jelentősen megnő az apoptotikus/nekrotikus sejtek aránya (**4a**: 40,8%; **4b**: 36,5%), valamint ún. poliploid sejtek kialakulása figyelhető meg.

Mivel a 8 órás időtartam körülbelül harmada egy sejtciklus időtartamának Jurkat T sejtekben, a kísérleti eredmény arra utal, hogy a **4a** vegyület esetén nem működik megfelelően a  $G_1$  ellenőrző pont, aminek egyébként meghatározó szerepe van genetikai problémák kiküszöbölésében. A vegyület tulajdonképpen felfüggeszti a  $G_1$  ellenőrzőpont „munkáját”. A **4a** vegyület  $G_2/M$  fázisú blokkot is okoz. A sejtciklusban bekövetkező ilyen jellegű zavar, mint egyes flavonoidok és kalcionok lehetséges hatásmechanizmusa, az irodalomban is dokumentált. Az észlelt változások arra utalnak, hogy a metoxiszármazék (**4a**) viszonylag gyorsan DNS károsodást okozhat, aminek gyakori velejárója a  $G_2/M$  fázisú blokk.

A metilvegyület (**4b**) ekvitoxikus dóziséval történő sejtkezelés esetén nem figyelhető meg hasonlóan jelentős változás a  $G_1$  ellenőrzőpontot illetően, és a  $G_2/M$  blokk sem kifejezett.

A **4a** származékkal történő hosszútávú (24 és 48 órás) expozíciót követően mind a  $G_0/G_1$ , az S, valamint a  $G_2/M$  fázisban levő sejtek mennyisége szignifikánsan csökken. Egyidejűleg nagymértékben megnő a Sub- $G_0$  fázisban levő (apoptotikus/nekrotikus) sejtek, valamint a poliploid sejtek mennyisége, ami a  $G_2$  ellenőrzőpont működési zavarára utal. Az ilyen jellegű késleltetett sejthalál, amit „mitotikus halál”-nak is neveznek, jellegzetessége a p53 mutáns tumoroknak.

### III.2.2. A kalcionszármazékok *in vitro* antioxidáns hatásának vizsgálata

A kalcionanalógok *in vitro* antioxidáns (hidroxilgyök scavanger), esetleges prooxidáns hatását, illetve annak időfüggését, a Fenton-reakció inicializálta dezoxiribóz degradációs tesztet alkalmazva vizsgáltuk. A módszer lényege, hogy a vas(II)-ionok és  $H_2O_2$  reakciójában keletkező hidroxilgyökök a 2-dezoxi-D-ribózt eloxidálják. A láncszakadással járó oxidáció eredményeképpen savas közegben tiobarbitursavval 532 nm körüli abszorpciós maximummal rendelkező karbonilvegyületek keletkeznek. Ha a vizsgálatot hidroxilgyök- scavanger tulajdonságú vegyület jelenlétében végezzük, akkor kompetitív reakció eredményeként az 532 nm körüli abszorpciós maximummal rendelkező fragmens vegyületek mennyisége csökken. A vizsgálatokat etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) jelenlétében és EDTA hozzáadása nélkül is elvégeztük. EDTA hozzáadása vas(II)-EDTA-komplex kialakulását eredményezi, aminek Fenton-reakcióban való részvétele az EDTA degradációjához vezethet. EDTA hiányában a vas(II)-ionok egy része a dezoxiribózzal képez komplexet. Az ún. „hely-specifikus” Fenton-reakcióban a hidroxilgyökök képződésük helyén azonnal elreagálnak. Tehát azok a vegyületek, amelyek ligandként szerepelhetnek (jelen esetben az EDTA), versengenek a

deoxiribózzal a vas(II)-ionokért, ezáltal csökken a vas(II)-ion katalizálta reakcióban keletkező hidroxilgyök okozta degradáció.

A kontroll inkubátumok esetén a keletkező TBA-reaktív anyagok mennyisége (a mért abszorbancia) időben viszonylag állandónak mondható. Az EDTA-t nem tartalmazó rendszerben mindkét vizsgált kalkonszármazék folyamatos antioxidáns aktivitást mutat a 240 perces kísérleti időtartam alatt. Bár a **4a** vegyület antioxidáns kapacitása az inkubációs idő 120-adik perce körül minimumot mutat, az inkubációt folytatva a két vegyület hasonló mértékben csökkentette a deoxiribóz oxidációja során keletkező TBA-reaktív termékek mennyiségét.

EDTA jelenlétében a reakció során keletkező TBA-reaktív termékek mennyisége jelentősen kisebb (alacsonyabb a mért abszorbancia), mint EDTA nélkül. A **4a** vegyület esetén a TBA-reaktív anyagok mennyisége megnő a 80-120 percig tartó periódus alatt, majd jelentős csökkenésnek indul. A metilszármazék (**4b**) ezen kísérleti körülmények között is mindvégig antioxidáns aktivitást mutatott.

A teszt eredményeként azt láthatjuk, hogy a vizsgált vegyületek rövidtávon antioxidáns aktivitást mutatnak, de hosszútávú inkubációjuk során kapott eredmények függnek az alkalmazott kísérleti körülményektől.

### III.2.3. A kalkonszármazékok celluláris redox homeosztázisra gyakorolt hatásának vizsgálata

A vizsgált kalkonanalógok reaktív oxigéngyök (ROS) termelésre gyakorolt hatását, a vegyületekkel történő 1 és 4 órás sejtkezelést követően, 2',7'-diklórfluoreszcin-diacetátot (DCFH-DA) használva vizsgáltuk. A DCFH-DA egy nem-fluoreszkáló molekula, amely képes a sejtek membránján áthatolni, és az intracelluláris térbe kerülni. A jelen levő észteráz enzimek lehasítják a molekuláról az acetilsoportokat és 2',7'-diklórfluoreszcin (DCFH) keletkezik, amely még nem fluoreszkál. Reaktív oxigénszármazékok (főként  $H_2O_2$ ) jelenlétében azonban fluoreszcens 2',7'-diklórfluoreszceinné (DCF) oxidálódik. A fluoreszcens jel intenzitása – többek között – áramlási citométerrel detektálható. Az FL-1 csatornán mért jelintenziás tehát végső soron az intracelluláris ROS-koncentrációval arányos. A **4b** vegyület szignifikánsan csökkentette a DCF jelének intenzitását, mind az 1 órás, mind a 4 órás kezelést követően ( $80,20 \pm 10,35\%$  és  $71,35 \pm 16,51\%$  a kontrollhoz viszonyítva). A **4a** származék esetén nem figyelhető meg szignifikáns változás.

A **4a** és **4b** vegyületek ROS termelésre gyakorolt hatását azért vizsgáltuk, hogy vajon oxidatív stresszt is okozva indukálnak apoptózist. A vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy a vegyületek nem növelik meg az intracelluláris ROS aktivitást, sőt a metilszubsztituált analóg (**4b**) szignifikánsan csökkenti a ROS-szintet és antioxidáns aktivitást mutat. Ez utóbbi eredmény összhangban áll az *in vitro* antioxidáns hatást vizsgáló deoxiribóz teszt eredményével, ami szerint a vegyületek *in vitro* hidroxilgyök-scavenger aktivitással rendelkeznek.



A kalkonanalógok mitokondriális respirációra, ATPáz enzim aktivitásra, ezáltal a mitokondriális redox státuszra gyakorolt hatásának vizsgálatai izolált patkánymáj mitokondriumokon történtek.

Az izolált mitokondriumok oxigénfogyasztás sebességének meghatározása 25 °C-on, polarográfiás módszerrel, oxigénelektóddal történt. Az ún. respirációs médumhoz adtuk a kalkonanalógokat, ADP-t, respirációs szubsztrátként nátrium-szukcinátot, valamint a mitokondriumot. Az oxigénfogyasztás  $\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{fehérje mg}^{-1}$  formában került kifejezésre, ADP hozzáadásakor (3-as állapot; state 3), illetve ADP hozzáadása előtt (4-es állapot; state 4). A vizsgált kalkonszármazékok nem befolyásolják az oxigénfogyasztást a 3-as állapotban, de szignifikánsan megnövelik azt a 4-es állapotban (a **4a** vegyület 50,7 %-al), vagyis ADP-mentes körülmények között. A **4a** vegyület szignifikánsan csökkenti az RCR-értéket (RCR = respiratory control ratio, az „oxigénfogyasztás a 3-as állapotban” és az „oxigénfogyasztás a 4-es állapotban” hányadosa). Mivel a vegyületek autooxidációja nem lehet felelős a megnövekedett oxigénfogyasztásért, az „elfogyasztott” oxigén a mitokondriális elektron-transzfer reakciók szubsztrátja lehet, ami a mitokondriális redox-státusz megváltozásával járhat.

Annak tisztázása érdekében, hogy az oxigénfogyasztás összefüggésben áll-e az ATP szintézis esetleges megváltozásával, az ATP szintáz (ATPáz) aktivitását vizsgáltuk, a *Meissner*-féle módszer szerint. A kísérlet eredménye szerint a metoxiszármazék (**4a**) szignifikánsan megnöveli a mitokondriális ATPáz aktivitást, anélkül, hogy hatással lenne az oxigénfogyasztásra a 3-as állapotban. Az észlelt szétkapcsoló hatás főként egyes lipofil, gyengén savas karakterű kismolekulára jellemző, amikor a megnövekedett  $\text{O}_2$ -fogyasztás ellenére nem történik ATP szintézis. Miután a vizsgált vegyületek lipofil molekulák, de nem bírnak gyenge savi karakterrel, további vizsgálatok szükségesek a szétkapcsoló hatás mechanizmusának kiderítésére.

A **4a** és **4b** vegyületek celluláris tiol-csoportokkal kialakuló lehetséges kölcsönhatását első lépésben a vegyületek celluláris SH-szintre gyakorolt hatása révén vizsgáltuk, tápanyagmentes és tápanyagokat tartalmazó környezetben.

Az 1 (PBS-pufferben), 4 illetve 8 óráig (RPMI tápoldatban) tartó kezeléseket követően, Ellmann-reagenssel történő meghatározások eredményeit a sejtek fehérjemennyiségére vonatkoztattuk. A **4a** vegyülettel történő 1 órás, tápanyagokat nem tartalmazó PBS-pufferben történő kezelés alatt a celluláris SH-szint szignifikánsan csökkent az 1% DMSO-val kezelt kontroll sejtekhez képest. **4b** vegyület nem okozott ilyen jellegű változást. A hosszabb ideig (4, illetve 8 óra) tartó, RPMI-tápoldatban történő inkubáció már lehetőséget teremt a sejteknek, hogy reagáljanak a GSH-szintet érintő esetleges változtatásokra. A metoxivegyület (**4a**) ezen körülmények között is szignifikánsan csökkentette az SH-szintet, ugyanakkor **4b** vegyület nem változtatta meg szignifikáns mértékben az SH-szintet.

Sejtes körülmények között a gyűrűs kalkonszármazékok egyrészt enzim-katalizált konjugációs reakciók révén és/vagy a redukált SH-csoportok diszulfiddá történő oxidációja révén képesek a tiol-státuszt befolyásolni. A kísérlet eredményei arra utalnak, hogy a **4a** vegyület, glutation-S-transzferáz enzim katalízise mellett, nagyobb reaktivitást mutat SH-csoportokkal, mint **4b** vegyület.

A kalkonanalógok SH-reaktivitásának vizsgálatát tovább folytatva, a Jurkat T sejtek **4a** és **4b** vegyületekkel történő kezelését követően, a redukált glutation-szintet (GSH) és az oxidált glutation-szintet (GSSG) *orto*-ftálaldehiddel történő derivatizálást követően, fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel határoztuk meg.

Az önmagában nem fluoreszkáló *orto*-ftálaldehid, mint bifunkcionális reagens egyszerre reagál a GSH molekula tiol- és primer aminocsoportjával, fluoreszkáló izoindolszármazékot képezve. A keletkező termék 348 nm gerjesztési hullámhossz, valamint 450 nm emissziós hullámhossz mellett detektálható. A reakció pH-függő, a redukált glutation OPA-val lejátszódó reakciójának optimális pH-értéke 8,0. Ezen a pH-értéken az OPA nem reagál oxidált glutationnal, vagyis a GSH szelektíven mérhető. Magas pH-érték mellett ( $\approx$  pH 12) azonban a GSSG is reakcióba lép OPA-val. Így pH 12 mellett a GSSG-tartalom is meghatározható.

Annak érdekében, hogy az oxidált glutationmennyiség is szelektíven mérhető legyen, a GSSG mérésekor a mintákban levő redukált glutationt *N*-etilmaleimiddel (NEM) reagáltatjuk, amely a GSH tiolcsoportjához kapcsolódik. Ezáltal a GSH nem tud reakcióba lépni OPÁ-val, illetve a konjugáció megvédi az oxidációtól is.

A redukált és oxidált glutation-koncentráció meghatározása a GSH-t és GSSG-t tartalmazó standard sorozat mintáinak mérése során felvett kalibrációs egyenesek segítségével történt. A meghatározott redukált és oxidált glutation-szinteket a minták fehérjemennyiségére vonatkoztattuk.

A kísérleti eredmények alapján a metoxi- (**4a**), és a metilszubsztituált (**4b**) kalkonzármazék eltérő módon befolyásolja a Jurkat sejtekben a glutation-szintet 4 órás kezelést követően. A **4a** vegyület nem befolyásolja jelentősen a szabad glutation-szintet (GSH), de szignifikáns mértékben megnöveli az oxidált glutation (GSSG) mennyiségét ( $0,67 \pm 0,26$  nmol/mg fehérje a kontroll sejtek esetén,  $1,15 \pm 0,33$  nmol/mg fehérje **4a** esetén). A **4b** származék azonban a redukált glutation mennyiségét növeli meg kis mértékben ( $35,3 \pm 6,6$  nmol/mg fehérje mennyiségről  $42,4 \pm 7,2$  nmol/mg fehérje-re), de nem befolyásolja jelentősen a GSSG szintet a kezeletlen kontroll, illetve 1% DMSO-val inkubált sejtekhez viszonyítva.

A glutation-rendszer az egyik legfontosabb celluláris védekező mechanizmus az élő sejtben. A sejt azon képessége, hogy milyen mértékben képes glutationt termelni (akár a GSSG redukciója révén, vagy *de novo* GSH szintézis révén) alapvetően meghatározza a sejt hatékonyságát az oxidatív stressz kezelésében. A metilszármazék (**4b**) az ismert kondíciók mellett képes a GSH szintet kis mértékben megnövelni. Korábban is beszámoltak már arról, hogy néhány elektrofil tulajdonsággal rendelkező Mannich bázis megnövelte a celluláris tiol-szintet Jurkat T sejtekben, illetve HeLa sejt vonalakban. A megnövekedett GSH szint nagy valószínűséggel az azt befolyásoló tényezők hatására fellépő feedback mechanizmus következtében, *de novo* szintézis eredményeként képződött GSH-nak tudható be.

Ezzel ellentétben a metoxianalóg (**4a**) a sejt oxidált GSSG-tartalmát növelte meg szignifikáns mértékben, ami utalhat arra, hogy a vegyület oxidatív stresszt idéz elő. A GSSG-szint fiziológiás indikátora a ROS elleni intracelluláris védekező mechanizmus aktivitásának, így alkalmas az oxidatív stressz *in vivo* monitorozására is.

### III.2.4. A kalkonszármazékok glutationnal való reaktivitásának vizsgálata

A celluláris glutation-státusz megváltoztatásának a redox reakción kívül egy másik lehetséges, a gyűrűs kalkonanalógok kémiai szerkezete alapján feltételezhető mechanizmusa a vegyületek redukált glutationnal lejátszódó spontán és/vagy glutation-S-transzferáz enzim által katalizált konjugációs reakciója.

Első lépésben a spontán lejátszódó reakciót vizsgáltuk sejtmentes körülmények között. Ehhez a kalkonanalógokat és redukált glutationt ekvimoláris mennyiségben tartalmazó, különböző pH-jú (pH = 5,5; 7,4; 9,0) oldatokat inkubáltunk 37 °C-on, illetve 50°C-on, 1 és 3 órán keresztül. Az inkubátumok összetételét vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel vizsgáltuk. A pH 7,4-es, illetve a pH 9,0-es oldatok esetén az 50 °C-os inkubátum, valamint a pH 9,0-es, 37 °C-os inkubátum analízise során a kalkon, valamint a GSH foltján kívül egy harmadik folt is láthatóvá vált. Ez a folt egy addukt jelenlétét feltételezi, hiszen mind a két előhívási forma szerint látható volt, vagyis az aromás vegyületekre jellemző UV-aktivitást is mutatja és a peptid (GSH) jelenlétére utaló ninhidrines színreakciót is adja. Mindkét vizsgált származék (**4a** és **4b**) esetén hasonlóak voltak a tapasztalatok.

Gyengén savas körülmények között (pH = 5,5), ami egyébként jellemző kémhatás tumoros sejtek környezetében, a vizsgált származékok nem mutatnak intrinsic aktivitást glutationnal.

A kalkonszármazékok és GSH között lejátszódó nem enzim-katalizált reakció további vizsgálata céljából egy fordított-fázisú nagyhatékonyságú-folyadékromatográfiás módszer (RP-HPLC) kifejlesztése is megtörtént. A reakcióelegyben a GSH végső koncentrációja  $5 \times 10^{-2}$  M, a kalkon koncentrációja  $5 \times 10^{-3}$  M volt. A reakcióelegy pH értékének beállítása pH 8-ra történt, amely pH értéken a GSH kb. 6%-a a sokkal erősebb nukleofil tiolát-anion formában található. Az inkubációs idő lejártá után (150, illetve 330 perc) a komponensek elválasztása fordított fázisú C-18 oszlopon történt UV-detektálás mellett ( $\lambda = 260$  nm). Ezen inkubálási körülmények és kromatográfiás paraméterek mellett a kromatogramon a kalkonanalógok (**4a**, illetve **4b**) jele mellett, további két csúcs jelent meg, feltételezhetően a kalkon-glutacion konjugátum diasztereomer párjának jele.

A folyadékromatográfiás vizsgálatok megerősítése céljából, illetve a feltételezett GSH-adduktok szerkezetének igazolása céljából MALDI-TOF-MS, illetve elektronspray ionizáció segítségével HPLC-ESI-MS vizsgálatok is történtek. A mérések megerősítették a DAD-HPLC vizsgálatok eredményeit, miszerint az inkubátumokban **4a**-GSH, illetve **4b**-GSH adduktok (a protonált molekulatömegek 586,18 és 570,23) keletkeznek spontán reakció révén.

A kifejlesztett RP-HPLC és csatolt ESI-MS eljárással azt kívántuk vizsgálni, hogy a konjugációs reakció a Jurkat T sejtekben is lejátszódik-e, hozzájárulva a vegyületek toxikus hatásának kialakításához. A kezelt sejteket lizáltuk, majd külön vizsgáltuk a centrifugálás során kapott felülúszót és üledéket is. A megfelelő fehérjementesítés és előkészítési eljárást követően felvett HPLC kromatogramokat, valamint ESI tömegspektrumokat összehasonlítottuk a kalkonanalógokat és glutationt tartalmazó inkubátumok vizsgálatokor kapott kromatogramokkal, illetve spektrumokkal.

A vizsgálatok arra utalnak, hogy a **4a** származék (279,2 Da protonált molekulatömegeg) a sejtkelések követően megtalálható mind a sejt felülúszóban, mind a sejtes üledékben. A vegyület tehát a sejtkelés során a Jurkat sejtek membránján átjut és hatását intracellulárisan fejti ki. A **4a** származékot és GSH-t tartalmazó inkubátumban igazoltan keletkező **4a**-GSH adduktok jelenléte azonban sem a sejt felülúszóból sem az üledékből nem bizonyítható. A **4b** vegyülettel kapott eredmények teljesen azonosak a **4a** vegyület analízisekor kapott eredményekkel. A **4b** analóg jelenléte ( $m/z = 263,2$ ) igazolható a felülúszóból, és az üledékből is, de **4b**-GSH konjugátumok ebben az esetben sem mutathatók ki.

Az előzetes, sejtmentes körülmények között elvégzett mérések eredményi arra engedtek következtetni, hogy a vizsgált ciklikus kalkonanalógok citotoxikus hatásában a redukált glutationnal lejátszódó konjugációs reakció is szerepet kap. A HPLC-ESI MS mérések során azonban nem sikerült igazolni a konjugátumok jelenlétét. A megfigyelés akár reverzibilis reakcióra is utalhat, amikor retro-Michael-típusú reakció során az addukt a GSH felesleg csökkenése következtében „szétesik”.

#### IV. Új eredmények összefoglalása

- Fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel számos, különböző módon szubsztituált, öt-, illetve hattagú gyűrűs kalkonanalóg  $\log P$  értékét határoztuk meg.
- *In vitro* kísérletek során áramlásos citometriai módszerrel vizsgáltuk a vegyületek sejtzesporodást gátló, valamint sejtciklusra gyakorolt hatását Jurkat T sejtekkel szemben. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy az *in vitro* citotoxicitás azon alapszik, hogy a vegyületek erős apoptózist indukáló szerek, a hatékonyabb vegyület (**4a**) esetén megfigyelhető a  $G_2/M$  fázisú sejtciklus gátlás, és jellemző a poliploid sejtek képződése.
- A vegyületek *in vitro* antioxidáns jellemeztük azáltal, hogy a vegyületek mennyire képesek gátolni a hidroxilgyök toxicitását. Vizsgáltuk a vegyületek lehetséges prooxidáns aktivitását is, a dezoxiribóz degradációra gyakorolt hatásuk révén. A **4b** vegyület az alkalmazott tesztrendszerben mindvégig antioxidáns aktivitást mutatott, a **4a** vegyület a rövid távú antioxidáns hatás után (főként az EDTA-t is tartalmazó környezetben) átmenetileg prooxidáns aktivitást mutatott.
- A vegyületek celluláris redox-státuszra gyakorolt hatásának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a vegyületek nem növelik meg az intracelluláris ROS aktivitást, sőt a metilszubsztituált analóg (**4b**) szignifikánsan csökkenti a ROS-szintet és antioxidáns aktivitást mutat.
- A vegyületek izolált patkánymáj mitokondriumok funkcióira gyakorolt hatásának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a **4a** vegyület megnöveli a mitokondriális oxigénfogyasztást és emeli az ATPáz aktivitást. A mitokondriális funkciók megváltozása szerepet játszhat a vegyület citotoxikus hatásának kialakításában.
- A gyűrűs kalkonanalógok celluláris tiolokkal, ezen belül a sejtekben nagy mennyiségben jelen levő redukált glutationnal szemben mutatott esetleges kölcsönhatását vizsgáltuk.

Megállapítottuk, hogy míg a **4a** vegyület az oxidált glutation mennyiségét növelte meg, és a redukált glutation-szintet nem befolyásolta, addig a **4b** származék a redukált glutation szintet (és a totál SH-szintet is) növelte. A redukált glutation-szint növelése magyarázatot adhat a korábbi vizsgálatok során tapasztalt antioxidáns aktivitás (ROS csökkentés) hátterére. A **4a** vegyület GSSG-szintet növelő hatása szerepet játszhat az apoptózis-indukcióban.

- A vegyületek glutationnal történő konjugációs reakciójának vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a vegyületek közel semleges és gyengén lúgos kémhatás mellett, magasabb hőmérsékleten *intrinsic* aktivitást mutatnak redukált glutationnal szemben. A reakció során keletkező kalkon-GSH adduktok jelenlétének igazolása vékonyréteg-kromatográfiás, illetve RP-HPLC eljárásokkal, szerkezetük igazolása HPLC-MS technika segítségével történt.

A kifejlesztett módszerek lehetőséget nyújtottak a konjugációs reakció sejtes körülmények közötti vizsgálatára is. A Jurkat T sejtekben a kalkonokkal való kezeléseket követően, azonban csak a vizsgált származékot sikerült kimutatni, konjugátumok jelenlétét nem.

Összefoglalva megállapítottuk, hogy a kevésbé toxikus 4-metilanalóg (**4b**) apoptózist indukál Jurkat T sejtekben, de hatása elmarad a **4a** vegyület sejtciklust befolyásoló hatásától. Mind az *in vitro* tesztben, mind sejtes körülmények között antioxidáns aktivitást mutat, ami összefüggésben állhat a redukált glutation-szintet emelő hatásával.

A kiemelkedő citotoxicitást mutató 4-metoxiszármazék (**4a**) drasztikusan befolyásolja a sejtciklust, apoptózist indukál, poliploid sejtek képződését váltja ki. Nem rendelkezik kifejezett antioxidáns hatással, sőt citotoxikus hatásának hátterében a vegyület prooxidáns hatása is valószínűsíthető. Befolyásolja a mitokondriális funkciókat, a celluláris SH-szintet, megnöveli a sejtek oxidált glutation tartalmát, ezáltal befolyásolja a redox homeosztázist.

A sejtciklus G<sub>2</sub>/M fázisú, a vegyületek általi gátlásának egyik biokémiai háttere a tubulin polimerizációs-depolimerizációs folyamatára gyakorolt hatás lehet. A citotoxikus hatás, a fent említett hatások mellett, részben a vegyületek celluláris makromolekulákkal (tubulin, DNS) történő nem-kovalens kölcsönhatásának eredményeképpen alakulhat ki.

## V. Publikációk listája

### A tézis alapját képező közlemények

1. **Zs. Rozmer**, T. Berki, G. Maász, P. Perjési: Different effects of two cyclic chalcone analogues on redox status of Jurkat cells. *Toxicology in Vitro*. (2014) 28, 1359-1365. IF: 3,207
2. **Zs. Rozmer**, P. Perjési: Naturally occurring chalcones and their biological activity. Review. *Phytochemistry Reviews*. (2014) DOI: 10.1007/s11101-014-9387-8; IF: 2,894
3. P. Perjési, **Zs. Rozmer**: Kinetic analysis of some chalcones and synthetic chalcone analogues on the Fenton-reaction initiated deoxyribose degradation assay. *Open Med. Chem. J.* (2011) 142, 463-468. IF: -

4. P. Perjési, J. Kubalkova, Z. Chovanova, M. Marekova, **Zs. Rozmer**, K. Fodor, Z. Chavkova, V. Tomecková, J. Guzy: Comparison of effects of some cyclic chalcone analogues on selected mitochondrial functions. *Pharmazie* (2008) 63, 899-903. IF: 0.858
5. **Zs. Rozmer**, P. Perjési, K. Takács-Novák: Use of RP-TLC for Determination of log*P* of Isomeric Chalcones and Cyclic Chalcone Analogues. *J. Planar Chrom. – Modern TLC* (2006) 19, 124-128. IF: 1,153
6. **Zs. Rozmer**, T. Berki, P. Perjési: Different effects of two cyclic chalcone analogues on cell cycle of Jurkat T cells. *Toxicol. in Vitro* (2006) 20, 1354-1362. IF: 2,045

### Egyéb közlemények

1. **Rozmer Zs.**, Perjési P.: (E)-2-benzylidenebenzocyclohexanones: Part X. Determination of log*P* of (E)-3-benzylidene-2,3-dihydro-1-benzopyran-4-ones by RP-TLC. Effect on log*P* of incorporation of oxygen atom into carbocyclic chalcone analogues. *J. Planar Chrom. - Modern TLC* (2013) 26, 284-288. IF: 0,955
2. P. Perjési, K. Takács-Novák, **Zs. Rozmer**, P. Sohár, R. E. Bozak, T. M. Allen: Comparison of structure, log*P* and P388 cytotoxicity of some phenyl and ferrocenyl cyclic chalcone analogues. Application of RP-TLC for log*P* determination of the ferrocenyl analogues. *Cent. Eur. J. Chem.* (2012) 10, 1500-1505. IF: 1,073
3. J. Guzy, J. Vasková-Kubáľková, **Zs. Rozmer**, K. Fodor, M. Marekova, M. Poskrobová, P. Perjési: Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. *FEBS Lett.* (2010) 584, 567-70. IF: 3.601
4. P. Perjési, U. Das, E. De Clerq, J. Balzarini, M. Kawase, H. Sakagami, J. P. Stables, T. Loránd, **Zs. Rozmer**, J. R. Dimmock: Design, synthesis and antiproliferative activity of some 3-benzylidene-2,3-dihydro-1-benzopyran-4-ones which display selective toxicity for malignant cells. *Eur. J. Med. Chem.* (2008) 43, 839-845. IF: 2,882
5. P. Perjési, I. Ember, R. E. Bozak, E. Nádas, **Zs. Rozmer**, T. Varjas, R. J. Hicks: Effect of the Chalcone Analogue *E,E*-bis(2-Hydroxybenzylidene)acetone on the 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene-Induced Ha-ras Gene Action in Vivo. *In Vivo* (2006) 20, 141-146. IF: 1,273
6. **Rozmer Zs.**, Perjési P.: Néhány nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata a 2-deoxi-D-ribóz Fenton-reakció iniciálta degradációjára *Acta Pharm. Hung.* (2005) 75, 87-93.

### Idézhető absztraktok

1. **Rozmer Zs.**, Marton E., Perjési P.: Gyűrűs kalkonanalógok celluláris makromolekulákkal kialakuló kölcsönhatásának vizsgálata spektroszkópiai és kromatográfiai módszerekkel. *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV.*, Budapest, 2014. *Gyógyszerészet Suppl.* 2014/14. P-18
2. **Rozmer Zs.**, Berki T., Maász G., Perjési P.: Gyűrűs kalkonszármazékok celluláris redox státuszra gyakorolt hatásának vizsgálata Jurkat T sejtekben. *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV.*, Budapest, 2014. *Gyógyszerészet Suppl.* 2014/14. P-94

3. P. Perjési, M. Kuzma, K. Fodor, **Zs. Rozmer**: Application of crocin bleaching and deoxyribose degradation tests to assess antioxidant capacity of capsaicinoids and some selected flavonoids. *2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences*, Tartu, 2007. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32 (S1), 39, 2007.
4. Csékei J., Szitter I., **Rozmer Zs.**, Perjési P.: Flavonoid tartalmú teakeverékek flavonoidtartalmának meghatározása és hidroxilgyök scavenger hatásának in vitro jellemzése a dezoxiribóz degradációs teszt alkalmazásával. *Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság III. Nemzetközi Kongresszusa*, Pécs, 2006. *Magyar Epidemiológia* 3 (S), S33, 2006.
5. **Rozmer Zs.**, Perjési P.: Kalkonszármazékok és fenolos nem-szteroid gyulladáscsökkentők hidroxilgyök scavenger hatásának in vitro jellemzése a dezoxi-ribóz degradációs teszt alkalmazásával. *Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa*, Pécs, 2005. *Magyar Epidemiológia* 2 (S), S76. 2005.
6. Nádas E., **Rozmer Zs.**, Bozak R. E., Hicks R. J., Perjési P.: A synthetic curcumin analogue: chemopreventive or genotoxic effect? *Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa*, Pécs, 2005. *Magyar Epidemiológia* 2 (S), S63. 2005.

### Posztterek

1. **Rozmer Zs.**, Berki T., Maász G., Perjési P.: Different effects of two cyclic chalcone analogues on redox status of Jurkat T cells. *2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences*, Pécs, 2013.
2. Perjési P., Kuzma M., Fodor K., **Rozmer Zs.**: Studies on in vitro antioxidant effect of salicylic acid and its hydroxylated metabolites. *9th International Symposium on Instrumental Analysis*, Pécs, 2008.
3. Kuzma M., Fodor K., **Rozmer Zs.**, Perjési P.: Néhány kapszaicinoid és flavonoid antioxidáns hatásának vizsgálata crocin oxidációs teszt és deoxiribóz degradációs teszt alkalmazásával. *Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa*, Pécs, 2007.
4. **Rozmer Zs.**, Berki T., Perjési P.: Gyűrűs kalkonanalógok citotoxicitásának vizsgálata. *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIII*, Budapest, 2006.
5. J. Guzy, M. Mareková, Z. Chavková, J. Kubálková, V. Tomečková, **Zs. Rozmer, P. Perjési**: Comparison of effect of some cyclic chalcone analogues on selected mitochondrial functions. *8th Symposium on Instrumental Analysis*, Graz, 2005.
6. **Rozmer Zs.**, T. Novák K., Perjési P.: Kalkonok és gyűrűs kalkonszármazékok logP értékeinek meghatározása fordított fázisú vékonyréteg kromatográfiás módszerrel. *Az MGYT Gyógyszerkutatási Szakosztály tudományos ülése*, Pécs, 2005.
7. **Zs. Rozmer**, P. Perjési: Application of deoxyribose degradation to assess hydroxyl radical scavenger activity of chalcones and cyclic chalcone analogues. *8<sup>th</sup> Symposium on Instrumental Analysis*, Graz, 2005.
8. **Zs. Rozmer**, T. Berki, P. Perjési: Cytotoxic effect of chalcone analogues in human T-cell leukemia. *1<sup>st</sup> BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences*, Siófok, 2005.

## Előadások

1. **Rozmer Zs.**, Perjési P.: Gyűrűs kalkonszármazékok citotoxikus és daganatellenes hatása molekuláris mechanizmusának vizsgálata. *Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium '14*, Herceghalom, 2014
2. **Rozmer Zs.**, Perjési P.: Flavonoidok sejtciklusra gyakorolt hatása, *Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportja szakülése*, Pécs, 2006
3. **Rozmer Zs.**, Berki T., Perjési P.: Gyűrűs kalkonanalógok daganatsejt-toxikus hatásának vizsgálata, *MTA Gyógyszerésztudományi Osztályközi Komplex Bizottságának ülése*, Pécs, 2005
4. **Rozmer Zs.**: Gyűrűs kalkonanalógok citotoxicitásának és citoprotektív hatásának vizsgálata. *VII. Clauder Otto Emlékverseny*, Visegrád, 2004

## VI. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Perjési Pál Professor Úrnak, hogy szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította és segítette. Köszönöm Dr. Gregus Zoltán Professor Úrnak szakmai tanácsait, disszertációm gondos átolvasását, és hogy kutatómunkámat az általa vezetett Ph.D. program keretein belül végezhettem.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Berki Tímea Professor Asszonynak, hogy lehetőséget biztosított a sejtkelések és áramlásos citometriai kísérletek elvégzésére az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben, valamint köszönöm segítségét a kísérletek megtervezésében és elvégzésében, szakmai és személyes tanácsait. Az intézetben dolgozó asszisztenseknek külön köszönöm a sejtek előkészítésében nyújtott segítségüket.

Köszönöm Dr. Maász Gábornak a tömegspektrometriás mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Takácsné Dr. Novák Krisztina Professor Asszonynak a log $P$  meghatározás módszerének elsajátításában nyújtott segítségét, valamint személyes példamutatását. A kooperációban végzett munkáért köszönetemet szeretném kifejezni a kassai P. J. Šafarik Egyetem Orvosi Kémiai és Biokémiai Intézet munkatársainak.

Köszönettel tartozom kollégáimnak szakmai tanácsaikért, valamint baráti támogatásukért. Köszönöm a Gyógyszerészi Kémiai Intézet minden munkatársának az évek során nyújtott segítségét.

Végül köszönöm barátaim biztatását, családom támogatását és megértő türelmét.