

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Természetes vegyületek és szintetikus szteroid analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

Dr. Zupkó István



**Szegedi Tudományegyetem,
Gyógyszerésztudományi Kar,
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet**

Szeged, 2016

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	1
1.1.	Hatóanyagaink eredete, a természetes eredet jelentősége	1
1.2.	A szteránváz jelentősége antiproliferatív hatóanyagok fejlesztésében	1
1.3.	A növényi tartalomanyagok jelentősége antiproliferatív hatóanyagok felfedezésében	1
2.	Célkitűzések	2
3.	Alkalmazott módszerek	3
4.	Eredmények	4
4.1.	Szteroid analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata	4
4.1.1.	Triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata	4
4.1.2.	Szteroid-oxim analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata	7
4.1.3.	Homoöszttron származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata	9
4.1.4.	Szolanidin analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata	11
4.1.5.	17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásának vizsgálata	14
4.2.	Növényi eredetű tartalomanyagok antiproliferatív hatásának vizsgálata	15
4.2.1.	Növényi alkaloidok antiproliferatív hatásának vizsgálata	15
4.2.2.	Növényi kivonatok és szeszkviterpének antiproliferatív hatásának vizsgálata	18
5.	Az értekezés legfőbb megállapításai	21
6.	Publikációs adatok	23
6.1.	Az értekezés alapját képező <i>in extenso</i> közlemények	23
6.2.	Tudományometriai összefoglaló táblázat	26
7.	Köszönetnyilvánítás	27

1. Bevezetés

1.1. Hatóanyagaink eredete, a természetes eredet jelentősége

Jelenlegi gyógyszerkincsünkben a kismolekulájú új hatóanyagoknak mindössze 6%-a természetes vegyület. Ha azonban a természetes vagy „természet-inspirálta” farmakonok körét kibővítjük a természetes anyagok származékaival, ill. a természetes molekulából származó építőelemet tartalmazó szerekkel, akkor azt találjuk, hogy hatóanyagaink mindössze 36%-a nem vezethető vissza semmilyen természetes eredetre. A '40-es évek óta bevezetett összes kismolekulájú tumorellenes hatóanyag 74,8%-a köthető valamilyen módon természetes vegyülethez. A természetes forrásokra még belátható ideig úgy tekinthetünk, mint az újszerű hatóanyagjelöltek kimeríthetetlen lelőhelyére

1.2. A szteránváz jelentősége antiproliferatív hatóanyagok fejlesztésében

A szteránváz vegyületek igen elterjedtek a természetben. Az antiproliferatív hatású farmakonokat a legintenzívebben kutatott vegyületek között találjuk, így nem meglepő, hogy az innovatív tumorellenes szerek keresése kiterjedt a természetes szteroidokra, ill. azok szintetikus analógjaira.

Mára széles körben ismertté vált a kardiotonikumként alkalmazott kardenolidok (pl. digitoxin) tumorellenes tulajdonsága. Hasonló tumorellenes hatást írtak le egyes endogén ösztrogén metabolitokkal (2- és 4-metoxiösztadiol, 2ME, 4ME) kapcsolatban. A szerény mértékben képződő 2ME nem mutat ösztrogénszerű hatást, ugyanakkor gátolja az intakt és malignus sejtek proliferációját.

Mivel az endogén ösztrogéneket növekedést serkentő faktorokként tartjuk számon, azok lokális képződésének gátlása racionális farmakológiai beavatkozás. Ennek egyik célpontja a 17 β -hidroxiszeroid-dehidrogenáz 1 (17 β -HSD1). Kézenfekvőnek tűnik, hogy egy ilyen intrakrin úton ható molekula rendelkezhet direkt antiproliferatív hatása, így kettős mechanizmussal gátolhatja az ösztrogéndependens tumorsejtek osztódását.

1.3. A növényi tartalomanyagok jelentősége antiproliferatív hatóanyagok felfedezésében

A növényvilág tumorellenes szerek, és általában a hatóanyagok felfedezésében betöltött szerepét lehetetlen túlértékelni. Növényi minták szűrővizsgálatának eredményeként kerültek a terápiába többek között a Vinca alkaloidok, az epipodofillotoxin szintetikus analógjai, ill. a paklitaxel.

Az Amaryllidaceae növény családból több mint 500 alkaloidot teszteltek tumorsejteken, a legígéretesebbnek a pankratisztatint és a narciklazint találták. A vegyület hatását *in vivo* is igazolták, a hatás mechanizmusaként felmerült a proteinszintézis gátlása, ill. a topoizomerázok bénítása.

Az akridon alkaloidok a Rutaceae családra jellemző vegyületcsoport széles farmakológiai spektrummal. A csoport legintenzívebben fejlesztett eleme a piranoakridonvázat tartalmazó akronicin. A mielőttében szenvedő betegeken végzett klinikai vizsgálatokban a szer hatása elmaradt a várakozásoktól, ám elkezdődtek a szerkezet optimalizálását célzó munkák. A

vegyületcsalád elemei membrántranszporterek által kiváltott rezisztencia modulátoraiként is felmerültek. A növény család másik jellegzetes tartalomanyag-csoportja, a kinolinvázis alkaloidok szintén mutatnak értékes, terápiásan kiaknázható tulajdonságokat.

A növényvilág egyik legváltozatosabb és legintenzívebben kutatott vegyületcsoportját a szeszkviterpének képezik. A család több mint 5000 elemet tartalmaz, legtöbbjük az Asteraceae családból izolálták. Kiemelendő a gyulladásgátló és antiproliferatív hatásukat két szerkezeti elem hordozhatja: α -metilén- γ -lakton vagy telítetlen ciklopentanon.

2. Célkitűzések

Mindezen irodalmi adatok ismeretében célul tűztük ki további innovatív, preklinikai fejlesztésre alkalmas, tumorellenes tulajdonságú hatóanyagjelöltek vizsgálatát, *in vitro* módszerekkel. Ehhez Intézetünkben létre kívántunk hozni egy sejtkultúra-egységet ahol honosíthatók a megvalósításhoz nélkülözhetetlen sejtalapú metódusok.

Terveztük szintetikus eredetű szteroid analógsorok antiproliferatív hatásának vizsgálatát humán malignus sejtvonalakon. A vizsgált testanyagok elsősorban D-gyűrűben módosított vegyületek voltak, így triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok, szteroid-oxim analógok, homoösztroon, ill. szolanidin származékok. Fel kívántuk tárnai a hatékonyságot meghatározó szerkezet-hatás összefüggéseket, jellemezni kívántuk a leghatékonyabb vegyületek hatásmechanizmusát, valamint tumorszelektivitását. Kiválasztott vegyületek esetében további célunk volt az ABCB1 transzporter által mediált rezisztenciára gyakorolt hatás vizsgálata rezisztens sejtvonalon.

Hasonló vizsgálatokat terveztünk az ösztrogénhatás csökkentésén keresztül ható, így elsősorban hormondependens kórképek kezelésére fejlesztett vegyületek direkt tumorellenes hatásának feltárására. A vizsgálatba vont 17β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 inhibitorok direkt antiproliferatív hatás esetén olyan hatóanyagokként fejleszthetők tovább, amelyek ösztrogénfüggő tumorokra kettős mechanizmussal fejthetnek ki terápiás értékű hatást.

Célunk volt a növényvilágban rejlő farmakológiai potenciál kiaknázása, olyan természetes molekulák azonosítása, melyek alkalmasak antiproliferatív tulajdonságú hatóanyagjelöltekként történő további fejlesztésre. Vizsgálni kívántuk farmakológiailag kevésbé jellemzett alkaloidok – így az Amaryllidaceae család alkaloidai, valamint akridon- és kinolinvázis vegyületek – tumorellenes hatását, ill. annak mechanizmusát. Az alkaloidok esetében is célunk volt a transzporter általi rezisztenciára gyakorolt revertáló hatás vizsgálata.

Újabb hatóanyagjelöltek azonosítása érdekében célunk volt etnofarmakológiai adatokkal támogatott növényi extraktumok antiproliferatív hatásainak szűrővizsgálata. Ezirányú munkánkat az Asteraceae növény család Kárpát-medencében fellelhető fajaira koncentráltuk. Terveztük az izolált természetes vegyületek antiproliferatív hatásának jellemzését, mechanizmusuk és tumorszelektivitásuk feltárását.

3. Alkalmazott módszerek

Vizsgálatainkat humán adherens malignus sejtvonalakon végeztük (HeLa, A2780, MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-361, A431, Ishikawa, SiHa, C33A), egyes kísérletekhez szuszpenziós kultúrákat használtunk (HL-60, L5178). A tumorszelektivitás jellemzésére humán fibroblaszt sejteket használtunk. A tesztanyagok antiproliferatív hatását MTT teszt segítségével jellemeztük. Interakciók vizsgálatokra az ún. checkerboard-módszert alkalmaztuk.

Fluoreszcens festést végeztünk mikrotitráló lemezen Hoechst 33258 és propidium-jodid (PI) markerekkel, a látottakat CCD kamerával rögzítettük. A Hoechst 33258 membránpermeábilis, minden sejtmagot kékre fest, így a korai apoptózisra jellemző nukleáris fragmentáció és kromatin kondenzáció megjelenítésére alkalmas, míg a PI csak membránkárosodás esetén jut a sejtmagba, ezáltal az általa indukált vörös fluoreszcencia a késői apoptózis, ill. nekrozis indikátora.

Sejtciklus-analízis során a kezelt sejteket fixáltuk, majd azok DNS tartalmát propidium-jodiddal jelöltük. Méréskor 20 000 sejt fluoreszcencia adatait rögzítettük áramlási citométer segítségével. A kapott hisztogramokból meghatároztuk az egyes sejtciklus-fázisok (szubG1, G1, S és G2/M) arányát. A szubG1 populációt apoptotikus sejteknek tekintettük. A sejtciklus-analízis során együtt megjelenített G2 és M fázisok elkülönítésére áramlási citometriával meghatároztuk a H3 hiszton 10-es helyzetű szerinjének foszforilációját. A kezelt HeLa sejteket jelölt foszfohiszton H3 (Ser10) ellenanyaggal inkubáltuk, az azzal jelölődő sejtpopulációt tekintettük mitotikus (M-fázisú) állománynak. Kontrollként paklitaxelt és metoxiösztadiolt alkalmaztunk.

A DNS szintézis intenzitásának meghatározását brómdeoxiuridin (BrdU) inkorporációs teszt segítségével végeztük. A BrdU a DNS megkettőződése során beépül a timidin helyére, a beépülés mértéke arányos a DNS szintézis intenzitásával. A sejtek kezelése és fixálása után a BrdU egér anti-BrdU monoklonális ellenanyaggal és fluoreszcenccel, ill. peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyaggal jeleníthető meg.

A tesztanyagok hatására bekövetkezett apoptózis igazolására meghatároztuk a folyamatban kulcsszerepet játszó kaszpázok aktivitását mikrotitráló lemez-alapú módszerrel, kolorimetriásan. A kaszpáz-3, a kaszpáz-9 és a kaszpáz-8 aktivitását a kezelt adherens sejtekből preparált lizátumból mértük specifikus kromogén szubsztráttal. Az enzimek aktivitásának fokozódását szorzófaktorként adtuk meg.

A sejtciklust és apoptózist szabályozó faktorok expressziójának vizsgálatára RNS-t izoláltunk és reverz transzkriptázzal cDNS-t preparáltunk. A PCR reakciót GoTaq Green Master Mix segítségével végeztük, belső kontrollként minden esetben hGAPDH primert használtunk. A produktumokat 2%-os agaróz gélen szeparáltuk, majd etidium-bromidos jelölés után szemikvantitatív analízist végeztünk. Egyes regulációs faktorok esetében protein szintű kifejeződést vizsgáltunk Western blot technikával, a proteineket kemilumineszcens úton detektáltuk.

A tesztanyagok tubulin polimerizációra gyakorolt direkt hatását kinetikai fotometriás *in vitro* módszerrel határoztuk meg. A tubulint tartalmazó elegy abszorbanciáját 60 percen keresztül percenként határoztuk meg 340 nm-en. Meghatároztuk az időegység alatti abszorbancia növekedés maximumát ($V_{\max}$). Referenciavegyületként paklitaxelt használtunk.

A tesztanyag szabadgyökfogó tulajdonságát 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök (DPPH) megkötésén keresztül vizsgálatuk, a reakciót 517 nm-en határoztuk meg. A biológiai mátrixban érvényesülő antioxidáns hatás igazolására patkányagyból preparált telítetlen zsírsavak autooxidációjának gátlását határoztuk meg fotometriásan. Az oxidált lipidek mennyiségét tiobarbitursavas előhívás után mértük fotometriás úton.

A tesztanyagok ABCB1 transzporter által mediált multidrog rezisztenciára gyakorolt hatását rodamin-123 kumulációs módszerrel jellemeztük. Tesztanyaggal, majd rodaminnal inkubált parentális (PAR) és transzfektált (MDR) L5178 egérlimfóma sejtek fluorszcenciáját határoztuk meg áramlási citométerrel, a kapott hisztogramokból fluoreszcencia arányt (FA) számítottunk. Referenciavegyületeként verapamilt használtunk.

A tesztanyag DNS szintézisre kifejtett közvetlen hatását a ribonukleotid reduktáz aktivitásának *in situ* meghatározásával jellemeztük. Kezelt HL-60 sejteket inkubáltunk [¹⁴C]citidinnel, majd teljes DNS kivonást végeztünk és a minták radioaktivitását folyadék szcintillációs számláló segítségével határoztuk meg.

A vizsgált akridon alkaloidok transzmembrán permeabilitásának meghatározására 96 üregű MultiScreen rendszert használtunk. A mesterséges membránt 5%-os *n*-hexánban oldott *n*-dodekánnal kezeltük. A donorfázisba vitt tesztanyag koncentrációja 240 μM volt, az akceptorfázisban mérhető koncentrációt fotometriás úton határoztuk meg 5 órás inkubáció elteltével.

A D-homoösztroon feltételezett ösztrogén hatásának jellemzésére *in vivo* uterotróp tesztet végeztünk patkányon. Ovariectomizált Sprague-Dawley patkányokat kezeltünk 7 napon át a tesztvegyülettel, referenciaként 17β-ösztradiolt (E2) alkalmaztunk. A 8. napon a patkányok uterusát eltávolítottuk, tömegüket az állatok testsúlyára normalizáltuk.

A vizsgált szteroid-analógok tervezése és szintézise a Szegedi Tudományegyetem (SZTE) Szerves Kémiai Intézetében történt. A növényi eredetű tartalomanyagok izolálását és szerkezetük meghatározását az SZTE Farmakognózi Intézetében végezték. A 17β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 inhibitorokat (17β-HSDI) a Saarvidéki Egyetem Gyógyszerészeti és Orvosi Vegytani Intézetében (Saarland University, Pharmaceutical and Medicinal Chemistry) szintetizálták.

4. Eredmények

4.1. Szteroid analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

4.1.1. Triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata

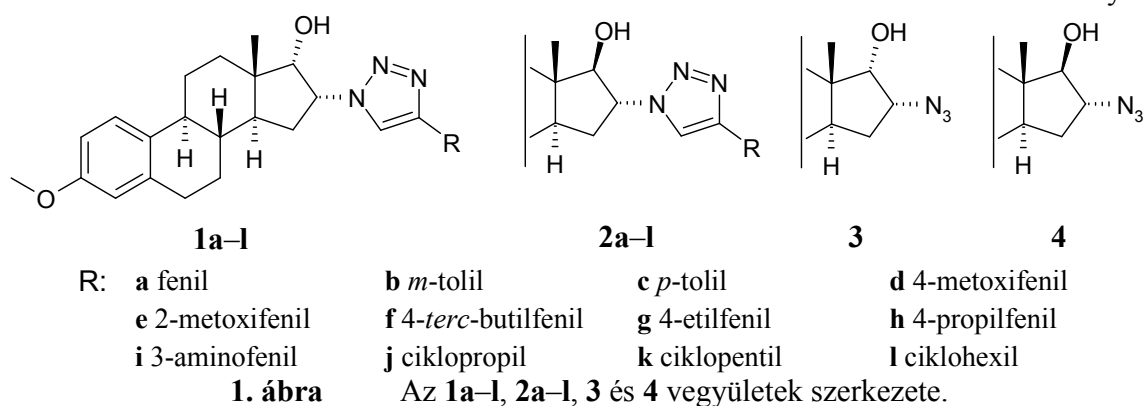
A D-gyűrűben módosított szteroid analógokra vonatkozó vizsgálatainkat egy 13 epimer párt (**1a–l**, **2a–l**, **3**, **4**) tartalmazó vegyületkönyvtár 3 adherens sejtvonalon történő tesztelésével kezdtük (1. ábra, 1. táblázat).

Mivel a tesztanyagok kiindulási anyagaiként szolgáló azidoalkoholok (**3** és **4**) nem mutattak jelentős hatást, a triazol gyűrű meghatározó szerepet játszik a sejtosztódás gátlásában. A hatásnak a triazol gyűrű *p*-alkilfenil szubsztituensei 17β-hidroxilcsoport mellett kedveztek (**2f–h**), a cikloalkil szubsztituens beépítése farmakológiai szempontból nem tekinthető kedvezőnek (**1j–l**).

és **2j–l**). Antiproliferatív hatásai alapján az **1i** és **2f–h** vegyületeket választottuk ki további vizsgálatokra, ezek kevésbé hatnak az MRC-5 fibroblasztokra mint az alkalmazott tumorsejtekre.

A kiválasztott vegyületek sejtciklus-eloszlásra gyakorolt hatását HeLa sejteken vizsgáltuk, 3 és 10 μM koncentrációban 24 és 48 órás inkubációt követően. A legjellemzőbb effektus a szubG1 populáció növekedése volt, amihez csökkent G1 és kissé emelkedett G2/M halmaz társult (2. ábra).

A hipodiploid (szubG1) állomány idő- és koncentrációfüggő felszaporodása az apoptózis egyik következménye, aminek további igazolására meghatároztuk a kritikus kaszpázok aktivitását a kezelt sejtekben. A **2f** és **2g** jelentősen és koncentrációfüggően növelte a kaszpáz-3 aktivitását, kisebb, de szignifikáns mértékben a kaszpáz-9 aktivitását, míg a kaszpáz-8 enzimre nem hatott (3. ábra). A mitokondriális eredetű apoptózist bizonyítja, hogy mindkét vegyület 10 μM koncentrációban 24 órás behatás mellett mRNS-szinten fokozta a Bax/Bcl-2 faktorok arányát.

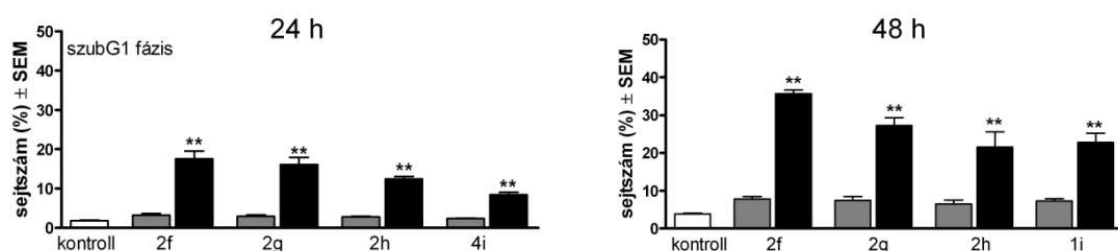


1. táblázat A leghatékonyabb vizsgált 16-triazolil-ösztérán származékok számított antiproliferatív IC₅₀ értékei

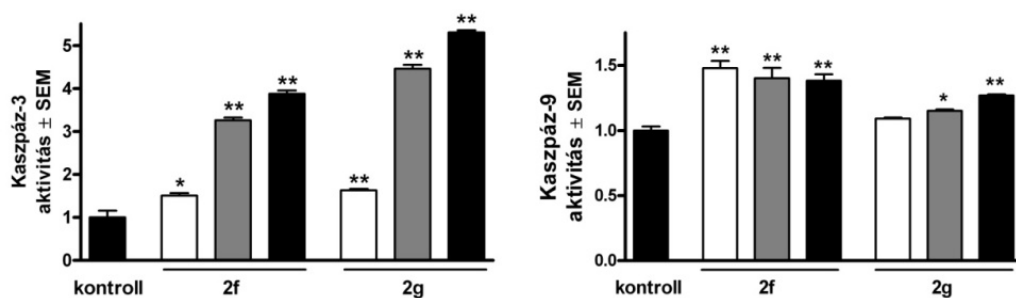
Vegyület	IC ₅₀ érték (μM)			
	HeLa	MCF7	A431	MRC-5
1i	13,9 μM	14,9 μM	11,8 μM	>30 μM
2f	5,1 μM	7,9 μM	6,8 μM	17,6 μM
2g	8,7 μM	10,8 μM	10,7 μM	17,1 μM
2h	12,1 μM	>30 μM	>30 μM	>30 μM
Ciszplatin	12,4 μM	9,6 μM	2,8 μM	4,5 μM

A sejtciklus-analízis során kapott átrendeződés megértésére meghatároztuk a G2→M átmenet szabályozásában érintett legfőbb faktorok kifejeződését mRNS szinten. Valamennyi faktor (CDK1, ciklin B1 és B2, Cdc25B) expressziója csökkent a **2f** és **2g** kezelés (10 μM , 24 óra) hatására.

A szubsztituált triazol gyűrű 16-os helyzetű jelenlétét a 13 α -ösztérán sorban is eredményesnek találtuk. Egy 22 elemből álló vegyületkönyvtár vizsgálata során 5 származék (**5a–e**) mutatott kiemelkedő aktivitást (4. ábra). További vizsgálatainkat az **5c** vegyülettel végeztük, ami az ígéretes IC₅₀ értékek mellett is csak 22,2 $\pm$ 2,9 %-ban gátolta az MRC-5 sejtek proliferációját, így hatása tumorszelektívnek mondható.

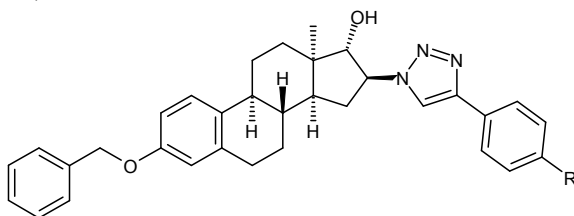


2. ábra A 2f–h és 1i vegyületek hatása a HeLa sejtek szubG1 fázisára 3 μM (szürke oszlop) és 10 μM (fekete oszlop) koncentrációban. n: 3, *: $p < 0,01$ és **: $p < 0,01$ a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva.



3. ábra A 2f és 2g vegyületek hatása a kaspáz-3 és -9 aktivitására HeLa sejtek 24 órás kezelése után. □: 3 μM , ■: 10 μM , ■: 30 μM . n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$, ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

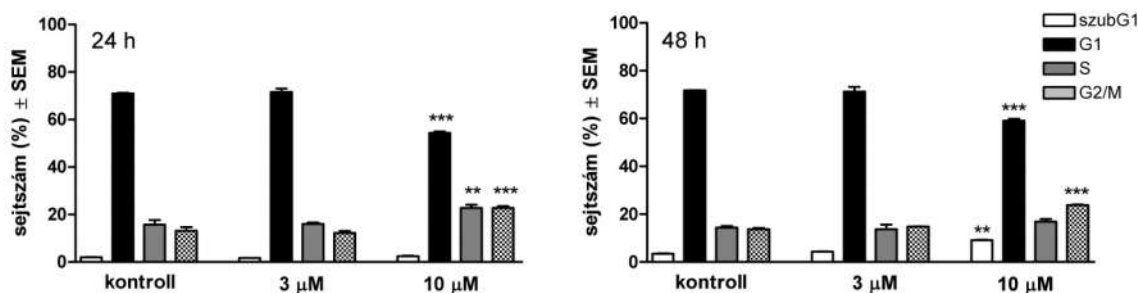
A sejtciklus-analízis során azt találtuk, hogy az S és G2/M sejtállomány már 24 óra után jelentősen növekedett a G1 populáció csökkenése mellett, míg 48 óra után felszaporodott a szubG1 sejtcsoport (5. ábra).



		Számított IC_{50} érték (μM)						
Vegyület	R	HeLa	A2780	A431	MCF7	T47D	MDA-MB-231	MDA-MB-361
5a	–Me	7,6	10,2	6,0	6,0	5,9	6,5	5,3
5b	– CF_3	8,8	7,5	30	9,3	9,7	10,3	9,7
5c	–Et	2,6	2,6	2,9	2,4	5,9	6,5	5,4
5d	– $t\text{Bu}$	3,4	2,9	3,2	2,9	6,2	8,3	6,6
5e	–Br	8,5	¹			9,0	10,3	8,8

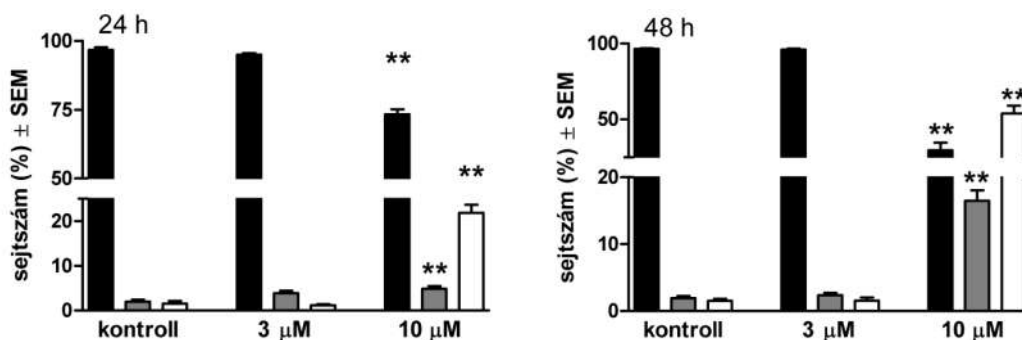
4. ábra A leghatékonyabb 16-triazolil-13 α -ösztрон származékok (**5a–e**) szerkezete és számított IC_{50} értékei.

¹ Az **5e** vegyület szerény aktivitást mutatott A2780, A431 és MCF7 sejteken, így az IC_{50} értékeket nem határoztuk meg.



5. ábra Az **5c** vegyület hatása HeLa sejtek ciklus-eloszlására 24 és 48 órás kezelést követően. n: 2, **, ill. ***: $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A kettős fluoreszcens festés eredménye alapján 24 órás kezelés után felszaporodtak mind a sejtmag kondenzációt, ill. fragmentációt mutató apoptotikus sejtek, mind a PI-t felvevő állomány. Hosszabb inkubáció esetén mindkét intakttól eltérő populáció tovább gyarapodott. (6. ábra). Az **5c** vegyület 48 órás inkubáció után 10 μM mellett jelentősen fokozta a kaszpáz-3 és -9 aktivitását, míg a kaszpáz-8 aktivitása nem változott, így az apoptózis receptoriális útja kizárható.



6. ábra Az **5c** vegyület hatása HeLa sejtek morfológiájára Hoechst 33258 – PI festéssel 24 és 48 órás kezelést követően. ■: intakt sejtek, ■: korai apoptotikus sejtek, □: késői apoptotikus/nekrotikus sejtek. n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$, ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

4.1.2. Szteroid-oxim analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

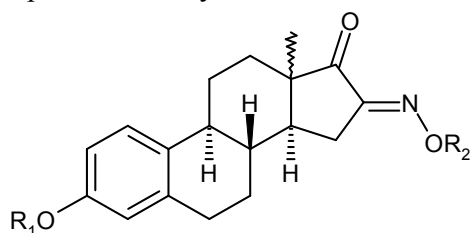
Az oxim molekularész innovatív tumorellenes vegyületbe történő kialakítása több, ismerten antiproliferatív tulajdonságú hatóanyagcsoport hasonló módosítása alapján indokolt. Szteroid-oximokra vonatkozó vizsgálatainkat egy 63 ösztron-16-oximból, ill. azok intermediereiből álló vegyületkönyvtár 3 adherens sejtvonalon történő vizsgálatával kezdtük. A vegyületek a 3-as és 16-os helyzetű szubsztituensben, ill. a 13-as metilcsoport térállásában tértek el (7. ábra).

A nem szubsztituált oximcsoportot hordozó vegyületek a HeLa sejtekre mutattak némi szelektivitást, a 13-as metilcsoport β térállása kedvezett a hatásnak (**6a**, **6b**). A szubsztituált oximok esetében az antiproliferatív hatáshoz szükség volt a 3-as helyzetű hidroxilcsoport

benzilalkohollal ill. *p*-metoxi-benzilalkohollal végzett éteresítésére (**6c**, **6d**). A kiválasztott 4 hatékony farmakonból három (**6a–c**) nem hatott jelentősen a fibroblasztokra.

A Hoechst 33258 – PI festést 24 órás inkubáció után végeztük el. Valamennyi vegyület esetében tapasztaltunk nukleáris kondenzációt és sejtmembrán-károsodást. A legkifejezettebb membránpermeabilitás-fokozódást a **6b** vegyület váltotta ki, míg a **6c** még 30 μ M mellett sem okozott jelentős PI felvételt.

A kiválasztott vegyületek idő- és koncentrációfüggő módon okoztak zavart az inkubált HeLa sejtek sejtciklus-eloszlásában. A szubsztituátlan hidroximino-csoportot tartalmazó farmakonok (**6a**, **6b**) 24 órás inkubáció után fokozták a G1 és csökkentették az S populációkat, ami a G1→S átmenet gátlására utal. Az *O*-szubsztituált oximok (**6c**, **6d**) hatása kevésbé volt markáns; a **6d** a G1 fázis csökkenését okozta. 48 órás expozíció esetén a **6a** és **6b** leglátványosabb hatása a hipodiploid állomány növekedése volt.

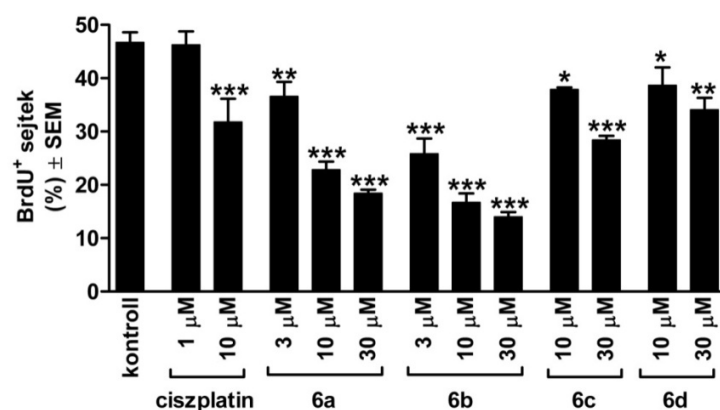


Vegyület	R ₁	R ₂	13 térállás	Számított IC ₅₀ érték (μ M)				
				HeLa	A2780	A431	MCF7	MRC-5
6a	H	H	β	4,4	18,3	>30	>30	>30
6b	–SO ₂ NH ₂	H	β	4,0	12,0	>30	>30	>30
6c	Bn	–COEt	α	3,5	4,6	>30	4,1	>30
6d	<i>p</i> -MeO-Bn	Me	β	5,6	25,1	13,3	>30	6,9

7. ábra A leghatékonyabb öszttron-16-oximok (**6a–d**) szerkezete és számított IC₅₀ értékei.

A DNS-szintézis zavarának direkt igazolására meghatároztuk a BrdU inkorporációját a 24 órán át kezelt HeLa sejtekbe (8. ábra). Azt találtuk, hogy a markáns S fázis csökkenést okozó vegyületek (**6a**, **6b**) jelentősen gátolják a BrdU sejtekbe történő beépülését, emellett mindkét farmakon fokozta a kaszpáz-3 aktivitását.

Meghatároztuk a G1→S átmenetet kontrolláló faktorok kifejeződését mRNS szinten. A tumorsuppresszor p16 expresszióját mindkét vegyület növelte. A fázisátmenetet facilitáló retinoblasztóma protein (Rb) és CKD4 represszióját figyeltük meg, míg a további 5 faktor (CDK2, CDK6, p21, p27 és p53) expressziója nem változott szignifikánsan.

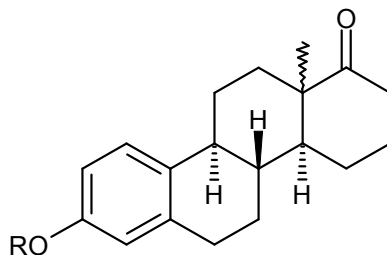


8. ábra A **6a–d** vegyületek hatása a BrdU HeLa sejtek sejtekbe történő beépülésére 24 órás kezelés esetén. n: 5, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Mivel az Rb szabályozó funkciója foszforilációhoz kötött és a poszttranszkripció módosulás nem detektálható PCR technikával, meghatároztuk a faktor protein szintű expresszióját is. Azt találtuk, hogy a mindkét kiválasztott vegyület jóval nagyobb mértékben csökkentette a foszforilált, mint a nem foszforilált forma kifejeződését. Ebből azt állapíthatjuk meg, hogy a kezelés jelentős mértékben gátolta az Rb funkcióját, ami összefügg a sejtciklus G1→S fázisátmenetének blokádjával.

4.1.3. Homoösztron származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata

Vizsgálataink a D-homoösztron (**7a**), 3-metil-étere (**7c**), ill. mindkét vegyület 13-epimerének (**7b**, **7d**) adherens sejtvonalakon végzett tesztelésével kezdődtek (9. ábra).



Vegyület	R ₁	a 13-Me térállása	Számított IC ₅₀ érték (μM)			
			HeLa	MCF7	Ishikawa	MRC-5
7a	H	β	5,5	>30	21,2	>30
7b	H	α	>30	>30	>30	–
7c	Me	β	>30	>30	>30	–
7d	Me	α	>30	>30	>30	–

9. ábra A D-homoösztron és vizsgált származékainak (**7a–d**) kémiai szerkezete és számított IC₅₀ értékei. –: nem teszteltük.

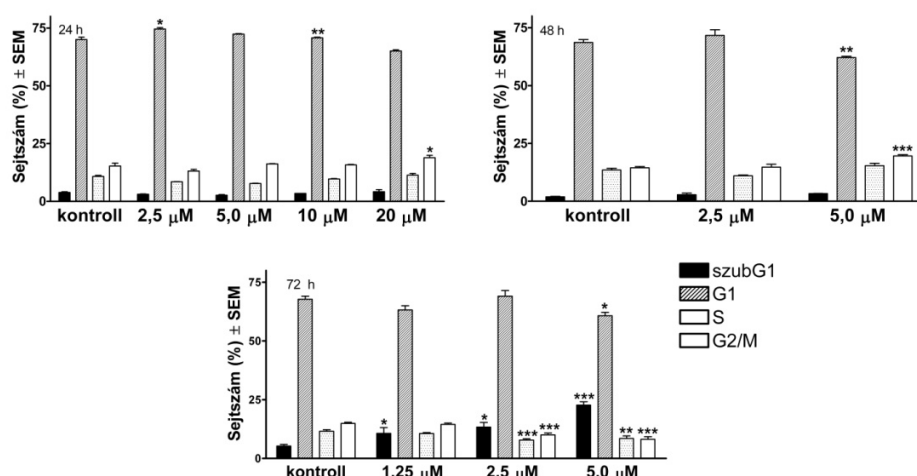
A **7b–d** vegyületek egyik sejtvonalon sem fejtettek ki jelentős hatást. A D-homoösztron (**7a**) a ciszplatinnal összevethető hatást fejtett ki a HeLa sejtekre, míg az MCF7, Ishikawa és MRC-5 sejtek növekedését jelentősen nem befolyásolta.

A **7a** sejtmorfológiájára gyakorolt hatását fluoreszcens kettős festéssel jellemeztük, 24–72 órás behatási idővel. A vegyület idő- és koncentrációfüggő módon növelte a korai, ill. a késői apoptotikus sejtek arányát az intakt sejtek rovására.

A **7a** hatásának jellemzésére mindhárom inkubációs idő után elvégeztük a sejtciklus-analízist (10. ábra). Rövid – 24 és 48 órás – behatás során a legjellemzőbb eredmény a G2/M populáció emelkedése, 72 órás kezelés hatására többszöröződött a hipodiploid állomány.

Mivel a PI jelöléssel nem különíthető el a G2 és M fázis, az M fázisra szelektív anti-foszfo-hiszton H3 (Ser10) ellenanyaggal jelöltük a 20 μM **7a** vegyülettel 24 órán át inkubált HeLa sejteket. Referenciavegyületeként paklitaxelt és 2ME-t alkalmaztunk. A **7a** szignifikánsan csökkentette az M populációt, míg a referenciavegyületek fokozták azt.

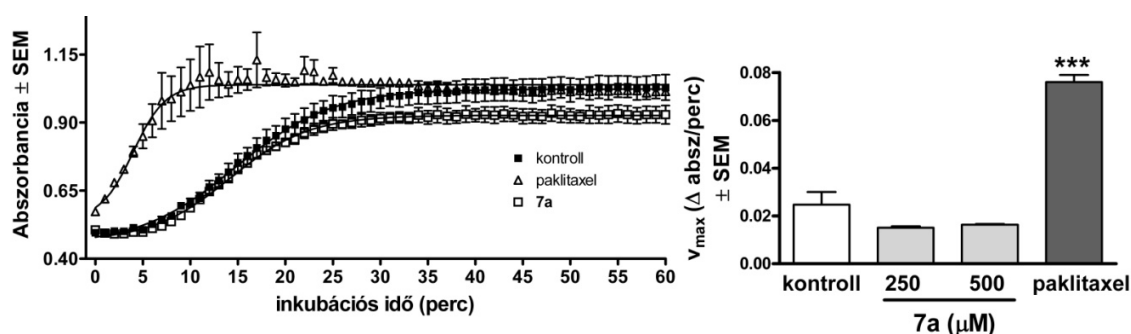
A tubulin polimerizációjának sebességét *in vitro* sejtmentes közegben fotometriásan követtük **7a** jelenlétében 1 órán át (11. ábra). A referencia paklitaxel gyorsította a tubulin polimerizációját, ezzel szemben 250 és 500 μM **7a** mellett a kinetikai görbék egybeesnek a kontrollal, így a **7a** nem hat közvetlenül a tubulin polimerizációjára.



10. ábra A **7a** vegyület hatása a HeLa sejtek sejtciklus-eloszlására 24, 48 és 72 órás behatás esetén. n: 3, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

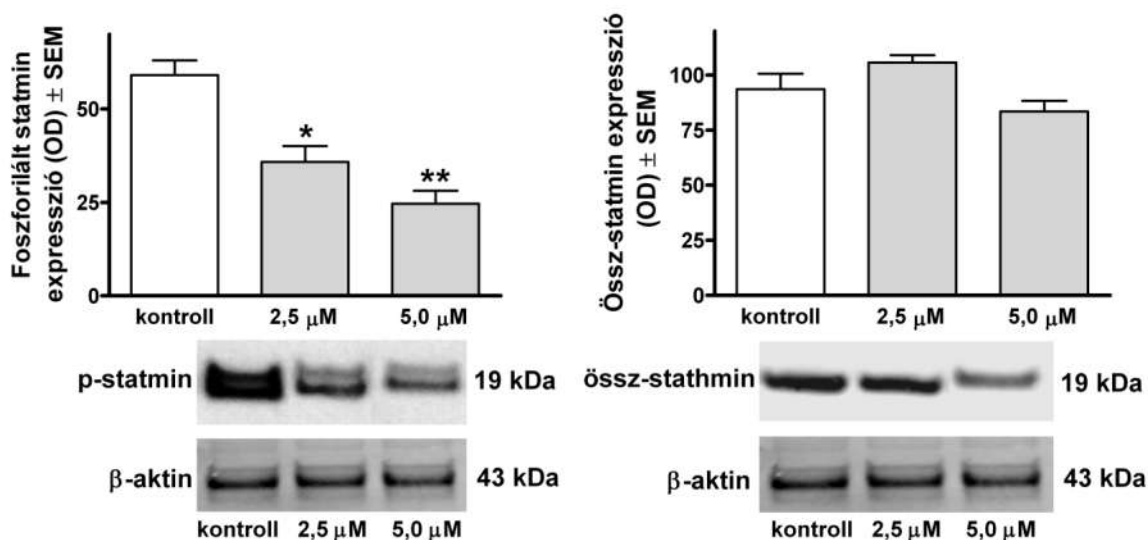
A G2/M fázisátmenet regulációs faktorainak mRNS-szintű expresszióját vizsgálva azt találtuk, hogy 10 μM **7a** jelenlétében jelentősen csökken a ciklin B1 és B2, a Cdc25B és Cdc25C expressziója, míg a CDK1 esetében nem tapasztaltunk változást.

A CDK1 egyik célpontja a tubulin polimerizációt szabályozó statmin. A 48 órás **7a** kezelés nem befolyásolta az össz-statmin mennyiségét, ugyanakkor koncentrációfüggően csökkentette a foszforilált forma expresszióját, ami egyben azt is jelenti, hogy fokozódott a defoszforilált, tehát aktív forma mennyisége (12. ábra). A **7a** 72 órás inkubáció után HeLa sejtekben jelentős mértékben fokozta a kaszpáz-3 aktivitását, szintén szignifikáns aktiválódást mutatott a kaszpáz-9, míg a kaszpáz-8 aktivitása változatlan maradt.



11. ábra A **7a** vegyület hatása a tubulin polimerizációjának sebességére. Bal panel: kinetikus görbék 10 μM paklitaxel és 250 μM **7a** jelenlétében. Jobb panel: a számított $V_{\max}$ értékek. n: 2, ***: $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A **7a**, ill. az esetleges metabolitok hormonális hatásának kimutatására *in vivo* uterotróp tesztet végeztünk ovariectomizált patkányon. A tesztanyag napi dózisa 10–50 μg volt, a referenciaként szolgáló 17β-ösztradiolt (E2) 10 μg/nap adagban adtuk. Az állatok testtömegre normalizált uterus-tömege E2 hatására megtöbszöröződött, míg a **7a** legnagyobb alkalmazott adagban sem fejtett ki uterotróp hatást.



12. ábra A **7a** vegyület hatása a foszforilált és össz-statmin fehérje kifejeződésére 48 órás inkubáció után. A grafikonok alatt reprezentatív membránfotók. n: 6, *, ill. **: $p < 0,05$, ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

4.1.4. Szolanidin analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

A szolanidin analógokra vonatkozó vizsgálatainkat egy vegyületkönyvtár 3 adherens sejtvonalon történő tesztelésével kezdtük (13. ábra). Az tesztanyagok 3-acetilezett formája (**9a–f**) kevésbé volt hatásos. A pirazolinra épített szubsztituátlan fenilcsoport (**8a, 9a**) hatástalan vegyületet eredményezett, míg a leghatékonyabbnak a *para*-metoxi-szubsztituált származékot (**8c**) találtuk. Ez utóbbi anyag IC₅₀ értéke mindhárom sejtvonalon alacsonyabb volt, mint a

referencia ciszplatiné. A vegyületek egy részével (**8b–e**, **8g**, **8h**, **9b**, **9d**, **9g**) HeLa sejteket kezeltünk 24 órán át, majd sejtciklus-analízist végeztünk. a legjellemzőbb hatás a szubG1 állomány felhalmozódása volt.

Vizsgáltuk vegyületeink ABCB1 transzporter által kiváltott multidrog rezisztenciára gyakorolt hatását rodamin akkumulációs teszttel. A **9d** és **9f** kivételével valamennyi vegyület nagyságrenddel emelte az transzportert expresszáló, transzfektált (MDR) egérlímforma sejtek rodamin tartalmát, a fluoreszcencia arány (FA) a referencia verapamil esetében $5,4 \pm 1,9$ volt (13. ábra).

A vegyületek rezisztencia revertáló hatásának megerősítésére kombinációs kísérleteket doxorubicinnel: 0,1 μM doxorubicin és 5 μM **8a–k**, **9a**, **9b**, **9d–f** együtthatását vizsgáltuk 72 órás MTT teszttel. A doxorubicin önmagában szerény hatást fejt ki, amit jelentős mértékben – 50% fölötti proliferáció gátlást okozva – csak 3 vegyület potenciált: **8c**, **8e** és **8h**. Az első kettő jelentős intrinszik hatással rendelkezik, míg a **8h** még 30 μM -ban sem befolyásolja jelentősen a multidrug rezisztens egérlímforma sejtek működését. Ezek alapján a **8h** saját antiproliferatív hatás nélkül fokozza a rezisztens sejtek rodaminfelvételét és a doxorubicin antiproliferatív tulajdonságát.

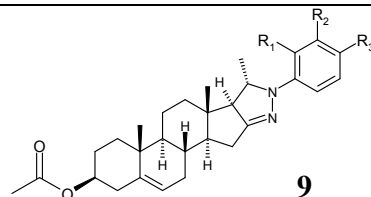
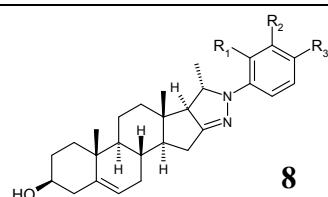
Három vegyület – **8c**, **9a** és **9g** – antiproliferatív hatásának bizonyult HL-60 sejteken, míg a legpotensebb (**8c**) az MRC-5 fibroblasztokon 17,0 μM IC_{50} értéket eredményezett 72 órás kezelés esetén (2. táblázat). További vizsgálatainkat ezzel a vegyülettel végeztük.

2. táblázat A **8c**, **9a** és **9g** antiproliferatív vegyületek hatása HL-60 leukémia sejt vonalon.

	Számított IC_{50} (μM)	
	48 h	72 h
8c	1,7	1,3
9a	5,5	2,9
9g	7,6	2,4

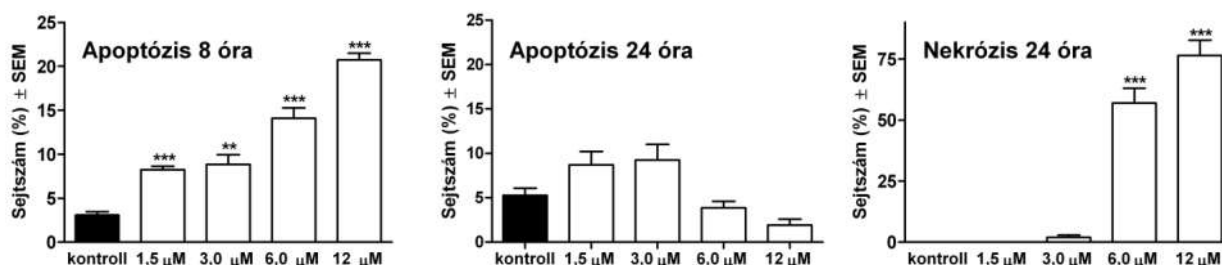
A **8c** sejtciklusra gyakorolt hatását 24 és 48 órás kezelések után határoztuk meg. Rövid inkubáció után koncentrációfüggően emelkedett a G2/M állomány a G1 fázis rovására. Hosszabb expozíció esetén markáns emelkedést észleltünk a hipodiploid állományban. A fluoreszcens kettős festést alkalmazva azt találtuk, hogy a **8c** már 8 óra alatt kiváltja az apoptózisra jellemző nukleáris kondenzációt, ugyanakkor a sejtmembrán károsodását – PI festődést – nem észleltük (14. ábra). 24 óra elteltével az apoptotikus állomány döntő része nekrotikus küllemet mutatott. A **8c** 24 órás inkubáció után 6 μM jelenlétében jelentősen csökkentette a [^{14}C]citidin beépülését a DNS-be, ami a ribonukleotid reduktáz gátlására utal. Ez az enzim tirozil gyököt tartalmaz, így aktivitása antioxidánsokkal befolyásolható. Meghatároztuk a **8c** antioxidáns ill. szabadgyökfogó aktivitását *in vitro* sejtmentes rendszerekben.

A vegyület mindkét hatással rendelkezett; a patkányagy telítetlen lipidjeinek oxidációját 2,0 μM -os IC_{50} értékkel gátolta, míg a DPPH teszten 13,1 μM IC_{50} értéket kaptunk. Ugyanezen rendszereken a vízőldékony tokoferol származék, a trolox IC_{50} értéke 48,2 μM , ill. 21,6 μM volt. Ezek alapján a **8c** antiproliferatív effektusában feltehetően szerepet játszik annak antioxidáns tulajdonsága, ill. az abból származó ribonukleotid reduktázt bénító hatása.



Vegyület	R ₁	R ₂	R ₃	Számított IC ₅₀ (μM)			FA (n=3)	
				HeLa	MCF7	A431	40 μM	400 μM
8a	H	H	H	>30	>30	27,9	36,3 ± 9,6	14,3 ± 1,2
8b	-CH ₃	H	-CH ₃	7,4	11,9	7,9	30,6 ± 10,1	44,9 ± 16,1
8c	H	H	-OCH ₃	2,0	2,2	1,4	40,7 ± 13,8	2,3 ± 0,4
8d	H	H	-OCF ₃	3,2	24,7	>30	2,9 ± 1,8	10,2 ± 2,8
8e	H	H	-CN	2,5	3,5	7,9	169,6 ± 43,8	106,1 ± 17,1
8f	-CH ₃	H	-OCH ₃	10,5	3,5	22,3	135,1 ± 48,4	4,6 ± 0,6
8g	H	H	-CH ₃	2,1	>30	7,3	3,7 ± 1,0	50,1 ± 7,6
8h	H	-OCH ₃	H	2,6	2,9	8,9	51,6 ± 12,6	114,4 ± 26,5
8i	H	H	Cl	2,2	5,1	14,0	28,7 ± 8,3	49,1 ± 19,1
8j	H	H	-CF ₃	6,3	8,3	18,0	4,7 ± 0,5	84,0 ± 14,2
8k	H	H	-NO ₂	3,2	7,3	6,9	2,52 ± 0,1	187,6 ± 51,7
8l	-CH ₃	H	H	22,1	>30	26,2	–	–
9a	H	H	H	>30	>30	>30	12,3 ± 3,7	50,2 ± 3,8
9b	-CH ₃	H	-CH ₃	26,1	>30	>30	3,2 ± 1,3	17,2 ± 3,7
9c	H	H	-OCH ₃	4,5	15,6	3,3	–	–
9d	H	H	-OCF ₃	4,0	>30	>30	1,6 ± 0,2	2,8 ± 0,9
9e*	H	H	-CN	>30	>30	>30	6,7 ± 1,7	20,0 ± 4,3
9f	-CH ₃	H	-OCH ₃	>30	>30	>30	1,7 ± 0,5	7,3 ± 2,3
9g*	-NO ₂	H	-NO ₂	9,7	>30	>30	–	–

13. ábra A vizsgált szolanidin analógok (**8a–l**, **9a–g**) szerkezete, IC₅₀ és fluoreszcencia arány (FA) értékei. *: A **9e** és **9g** vegyületek pirazolin helyett pirazolidin gyűrűt tartalmaznak. –: nem teszteltük.



14. ábra A **8c** vegyület hatása a HL-60 sejtek morfológiájára 8 és 24 órás kezelés után. n: 3, ** ill. ***: p<0,01, ill. p<0,001 a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

4.1.5. 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásának vizsgálata

A vizsgálatba vont 17 β -HSD1 inhibitor (17 β -HSD1I) vegyületek szteroid-mimetikumok, tervezésének eredeti célja az E2 lokális termelődésének gátlása. Tíz potenciális 17 β -HSD1I (**10a–j**) direkt antiproliferatív tulajdonságát vizsgálatuk nőgyógyászati eredetű sejtvonalainkon, hét vegyület mutatott számottevő aktivitást (3. táblázat). Ezek szteroidmentes médiumban tendenciaszerűen magasabb IC₅₀ értékeket mutattak, ám az eltérés nem nagyságrendnyi, így az antiproliferatív hatás létrejöttében vélhetően nem játszik jelentős szerepet a hormonális háttér. A fibroblasztok proliferációját egyik aktív vegyület sem befolyásolta jelentősen.

A standard médiumban HeLa sejtvonalon 10 μ M alatti IC₅₀ értéket adó vegyületekkel (**10a–c**, **10e–g**) végeztünk sejtciklus-analízist 24 és 48 órás inkubáció után. Rövid (24 órás) behatás után a legjellemzőbb hatás a G1 populáció fokozódása és a szintetikus (S) fázis depressziója volt, emellett a **10c**, **10e** és **10g** vegyület 10 μ M mellett fokozta a G2/M állományt. Hosszabb (48 órás) expozíció legmarkánsabb következménye a hipodiploid állomány felszaporodása volt.

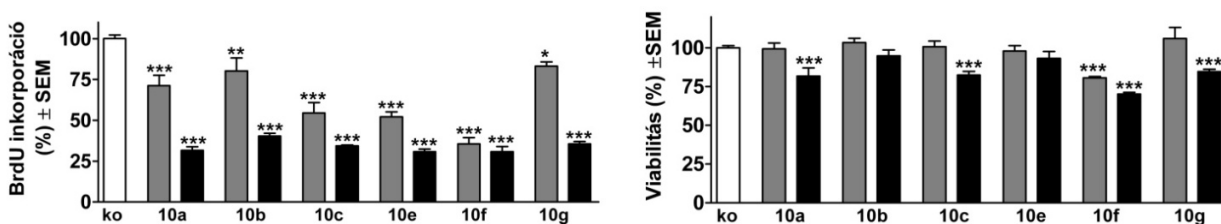
3. táblázat A vizsgált 17 β -HSD1 inhibitorok (**10a–j**) antiproliferatív hatása az alkalmazott sejtvonalakon standard és szteroidmentes médiumban. —: nem vizsgáltuk.

Vegyület	Számított IC ₅₀ érték (μ M)					
	HeLa		MCF7		A2780	MRC-5
	standard médium	szteroidmentes médium	standard médium	szteroidmentes médium	standard médium	standard médium
10a	5,3	13,7	25,2	>30	>30	>30
10b	6,8	23,8	13,9	>30	>30	>30
10c	3,8	11,1	16,1	29,4	>30	>30
10d	14,5	>30	>30	>30	>30	>30
10e	5,7	6,1	>30	>30	>30	>30
10f	1,4	3,2	>30	>30	>30	>30
10g	5,3	12,2	25,5	>30	9,7	—
10h	>30	—	>30	—	25,9	—
10i, 10j	>30	—	>30	—	>30	—

Valamennyi vegyület igen markáns módon gátolta a BrdU inkorporációt, 10 μ M mellett a gátlás mértéke 50% fölötti volt (15. ábra). Ennél jóval kisebb mértékben csökkent a sejtek viabilitása, 10 μ M mellett – a **10f** kivételével – a gátlás nem érte el a 25%-ot. Ezek az adatok a DNS szintézis direkt gátlására utalnak.

A legpotensebb szubG1 populációt növelő vegyületek – a **10e** és **10f** – jelentősen növelték a kaszpáz-3 aktivitását 48 órás kezelés után már 3 μ M mellett is. A DNS szintézis, ill. a szintetikus fázis legerőteljesebb szuppresszorai (**10a**, **10b** és **10f**) növelték a két vizsgált tumorszuppresszor (p21 és p53) expresszióját, emellett csökkentették a sejtciklus továbbvitelért

felelős CDK2 kifejeződését 24 órás kezelést követően. A fázisátmenet végső regulálását végző Rb expresszióját a **10a** és **10f** már 3 μM mellett is csökkentette.



15. ábra A **10a–c** és **10e–g** vegyületek hatása a BrdU beépülésére HeLa sejtek 24 órás 3 (■) és 10 (■) μM koncentrációban végzett kezelése esetén, ill. a vegyületek hatása a sejtek viabilitására. n: 4, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz (ko) viszonyítva.

4.2. Növényi eredetű tartalomanyagok antiproliferatív hatásának vizsgálata

4.2.1. Növényi alkaloidok antiproliferatív hatásának vizsgálata

Az Amarillidaceae növény család öt alkaloidjának antiproliferatív és ABCB1 bénító tulajdonságát határoztuk meg a korábbiakban is alkalmazott sejtvonalakon (4. táblázat). Minden sejtvonalon a **11c** bizonyult a legpotensebbnek. Az MDR limfómán mintegy ötszörös IC_{50} értéket mutatott a PAR sejtekhez viszonyítva, ami felveti, hogy a vegyület az ABCB1 szubsztrátjaként viselkedik. A **11a** és **11d** alkaloidok koncentráció függvényében növelték a hipodiplod sejtek arányát HeLa sejten, 24 órás kezelést követően.

4. táblázat A vizsgált Amaryllidaceae alkaloidok számított IC_{50} és FA értékei. –: nem vizsgáltuk.

	Számított IC_{50} érték (μM)					FA	
	HeLa	MCF7	A431	L5178 PAR	L5178 MDR		
11a	10,3	19,8	14,1	11,6	13,0	40 μM	<2
2-O-acetil-likorin						400 μM	$2,9 \pm 0,2$
11b	>30	–	–	28,5	69,1	40 μM	<2
homolikorin						400 μM	<2
11c	8,9	7,9	5,4	0,8	4,1	40 μM	<2
pretazettin						400 μM	$31,4 \pm 10,6$
11d	24,1	21,1	>30	20,3	29,5	40 μM	<2
triszferidin						400 μM	$48,8 \pm 4,9$
11e	>30	>30	–	>30	>30	40 μM	<2
izmin						400 μM	$3,3 \pm 0,2$

A **11c** és **11d** alkaloidok magasabb koncentrációban (400 μM) jelentős FA fokozódás váltottak ki. A **11a–d** vegyületek rezisztencia revertáló hatását doxorubicinnel történő kombinációban is értékeltük checkerboard módszerrel. Két alkaloid esetében kaptunk 0,5 alatti, szinergizmusra utaló frakcionális inhibíciós indexet (FIX): **11a** (0,41) és **11c**: (0,34). A **11b** és **11d** FIX értékei (0,63 és 0,86) additív interakcióra utalnak.

A vizsgálatba vont akridonváz as alkaloidok a következők voltak: **12a**: izogravakridonklorin, **12b**: rutakridon, **12c**: gravakridondiol, **12d**: gravakridontriol, **12e**: gravakridondiol

monometil-éter, **12f**: gravakridondiol és gravakridontriol monoglikozidok 1:1 elegye, **12g**: arborinin, **12h**: evoxantin; a **12g** és **12h** kivételével a farmakológiailag kevésbé feltárt furanoakridon alapvázat tartalmazzák

Adherens sejtvonalakon a **12a** mutatta a legkifejezettebb antiproliferatív hatást és a HeLa sejtvonal mutatkozott a legérzékenyebbnek (5. táblázat). A **12a** tumorszelektivitásának jellemzésére antiproliferatív tulajdonságát meghatároztuk nem malignus eredetű epiteliális immortalizált sejtvonalon (hTERT-HME1) is, ahol az IC_{50} értéke $5,9 \mu M$ lett, szemben a referenciaként alkalmazott ciszplatin $2,0 \mu M$ értékével. A furanoakridon vegyületek esetében meghatároztuk a mesterséges membránon történő átjutás sebességét. A számított Log P és IC_{50} értékekből kitűnik, hogy fokozott vízdoldékonyságra utaló alacsony Log P nem kedvez az antiproliferatív hatásnak (5. táblázat).

5. táblázat A vizsgált akridonvázak alkaloidok számított IC_{50} értékei. –: nem vizsgáltuk.

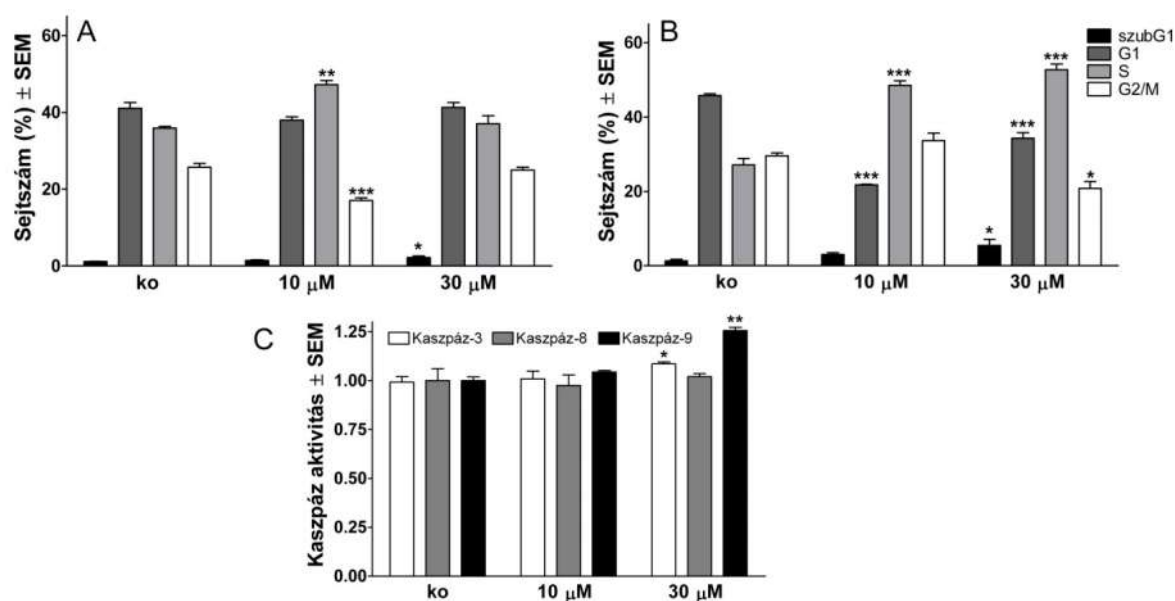
	Számított IC_{50} érték (μM)						Log P érték
	MCF7	MDA-MB-361	MDA-MB-231	T47D	HeLa	A431	
12a	4,5	12,2	2,3	12,9	8,4	3,0	-5,11
12b	7,7	>30	27,3	>30	5,3	14,4	-4,99
12c	19,9	>30	23,3	>30	7,9	14,8	-5,09
12d	>30	>30	>30	>30	23,2	27,9	-5,87
12e	13,2	>30	11,6	>30	3,8	12,0	-5,36
12f	>30	>30	>30	>30	>30	>30	-6,36
12g	11,7	–	–	–	1,8	13,0	–
12h	>30	–	–	–	>30	>30	–

A legpotensebb furanoakridon (**12a**) MDA-MB-231 sejteken a koncentráció és a kezelési idő függvényében kiváltja a nukleáris kondenzációt a sejtmembrán károsodása nélkül. Ugyanakkor MCF7 sejteken minden esetben tapasztaltuk a PI felvételét. A vegyület 24 órás kezelés során emelte az S fázis volumenét, ill. $30 \mu M$ mellett a hipodiploid állományt (16. ábra). A **12a** 48 órás kezelés során MDA-MB-231 sejtekben növelte a kaszpáz-3 és -9 aktivitást.

L5178 MDR egérlimfóma sejteken vizsgálva az alkaloidok multidrog rezisztencia revertáló hatását, a legjelentősebb rodamin akkumulációt eredményező alkaloid (**12c**) additív interakcióba lépett a doxorubicinnal, míg a jóval szerényebb FA értéket mutató **12d** és **12e** szinergizmusra utaló, 0,5 alatti FIX eredményt mutatott (6. táblázat).

A két szinergizáló alkaloid (**12d**, **12e**) $15 \mu M$ végkoncentrációban 48 órás kezelés során jelentősen csökkentette a transzporter mRNS-szintű expresszióját. Ez arra utal, hogy az alkaloidok a direkt antiproliferatív és proapoptotikus hatás mellett több módon is csökkentik a tumorsejtek multidrog rezisztenciáját.

A Rutaceae növényfajokból izolált 11 kinolinvázak alkaloid közül két vegyület (**13a**: kokuszaginin és **13b**: szkimmianin) esetében tapasztaltunk számottevő antiproliferatív hatást HeLa sejteken (IC_{50} értékük $10,4$, ill. $9,8 \mu M$), a többi sejtvonalon (MCF7, A2780 és A431) jelentős proliferáció gátlást nem mértünk. Egyik alkaloid sem eredményezett 10%-ot meghaladó proliferáció gátlást MRC-5 sejteken még $30 \mu M$ jelenlétében sem.



16. ábra A **12a** hatása az MDA-MB-231 sejtek sejtciklus-eloszlására 24 és 48 órás behatás esetén (A és B). A **12a** hatása a kezelt sejtek kaspázainak aktivitására (C). n: 3, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz (ko) viszonyítva.

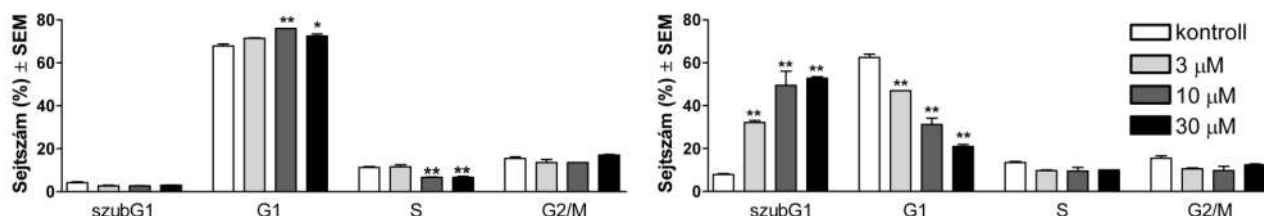
6. táblázat A vizsgált akridonvázias alkaloidok számított IC_{50} értékei MDR egérlimfómán, a mért FA értékek és a doxorubicinnel végzett kombinációk FIX értékei.

	MDR IC_{50} (μM)	Koncentráció (μM)	FA	FIX
12a	0,06	40	$18,7 \pm 1,5$	37,3
		400	$20,9 \pm 3,3$	
12b	16,0	40	$17,9 \pm 2,8$	2,19
		400	$11,0 \pm 2,2$	
12c	34,0	40	$105,1 \pm 16,3$	0,76
		400	$130,3 \pm 20,8$	
12d	67,2	40	$16,1 \pm 7,8$	0,41
		400	$20,8 \pm 8,2$	
12e	43,7	40	$2,5 \pm 0,1$	0,03
		400	$43,8 \pm 9,7$	
12g	69,6	40	<2	0,85
		400	$28,0 \pm 4,1$	
12h	33,2	40	<2	0,71
		400	$20,2 \pm 4,8$	

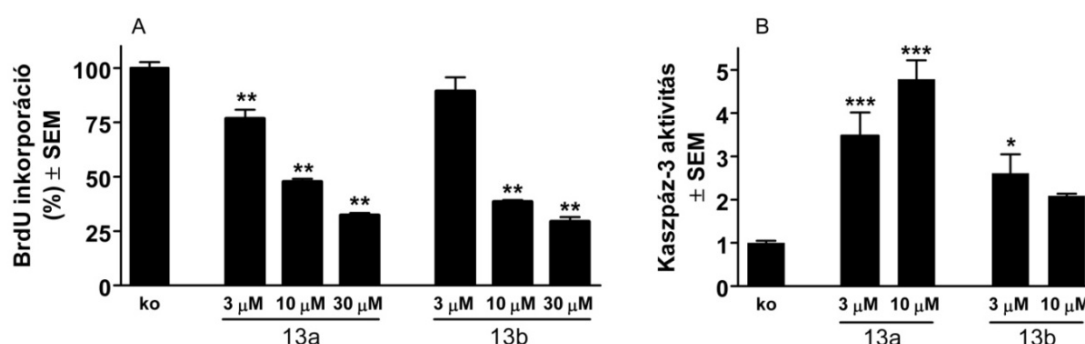
Rövid expozíciós idő (24 h) után mindkét vegyület csökkentette a szintetikus fázisban lévő populációt, ami a G1→S átmenet zavarára, ill. a DNS szintézisének gátlására utal. Hosszabb kezelési idő (72 h) esetén az apoptózist jelző szubG1 populáció igen markáns felszaporodása uralta a képet (17. ábra).

A fluoreszcens kettős festéssel 72 órás expozíció után mindkét vegyület esetében tapasztaltuk a magállomány kondenzációját membránkárosodás nélkül (3 μM), míg 10 μM

jelenlétében intenzív PI felvételt is észleltünk. 24 órás kezelés után mindkét alkaloid gátolta a BrdU HeLa sejtekbe történő beépülését, míg 72 órás kezelés után az alkaloidok növelték a kaszpáz-3 aktivitását (18. ábra).



17. ábra A **13b** hatása a HeLa sejtek sejtciklus-eloszlására 24 és 72 órás behatás esetén. n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$ ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.



18. ábra A **13a** és **13b** hatása a BrdU beépülésére 24 órás kezelés után (A), ill. a kaszpáz-3 aktivitására 72 órás kezelés után (B) HeLa sejteken. n: 5, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$ ill. $p < 0,001$ a kontroll (ko) kondícióhoz viszonyítva.

4.2.2. Növényi kivonatok és szeszkviterpének antiproliferatív hatásának vizsgálata

Növényi kivonatokkal végzett szisztematikus vizsgálataink közvetlen célja olyan fajok kijelölése, amelyekből potens – és ideális esetben új – aktív tartalomanyagokhoz juthatunk el. Az Asteraceae család a zárvatermők legnépesebb családja, a mintegy 23000 faj között sok a gyógyászati céllal alkalmazott növény. Átfogó szűrővizsgálatunk a család Magyarországon előforduló, vagy termesztető fajaira irányult. Összesen 51 faj 107 növényi részéből 228 kivonat hatását vizsgáltuk 3 adherens tumorsejten (HeLa, MCF7, A431). Az egyes növényi részekből különböző polaritású oldószerekkel 4-4 kivonat készült; a *n*-hexánban, kloroformban, 50%-os metanolban, ill. vízben oldódó tartalomanyagok az A, B, C, ill. D jelű kivonatokban dúsultak fel.

Jelentősnek tekintettük egy kivonat hatását, ha 10 μg/ml végkoncentrációban 50%-ot meghaladó mértékben gátolta a tumorsejtek osztódását. Ilyen esetekben meghatároztuk a kivonat IC₅₀ értékét és megismételtük az MTT tesztet 24 órás expozíciós idővel és 25 000/üreg kiindulási sejtszámmal a direkt citotoxikus tulajdonság jellemzésére.

Összesen 41 kivonat hatását találtuk jelentősnek, a legnagyobb részük kloroformmal készült (B kivonat), 8 *n*-hexánnal (A kivonat), 2 pedig 50%-os metanollal (C kivonat). A vizes kivonatok közül egyik sem váltott ki 50%-ot meghaladó proliferáció gátlást.

Az eddig komplettált vizsgálatok során jellemzően ismert vegyületeket sikerült kimutatni – sok esetben az adott fajból elsőként –, a kivonatok frakcionálása ugyanakkor új természetes molekulák azonosításához is elvezetett. Az Asteraceae fajok szűrővizsgálata alapján azonosított tartalomanyagokat foglalja össze a 7. táblázat.

7. táblázat Az Asteraceae fajok szűrővizsgálata alapján azonosított tartalomanyagok. **Az újonnan azonosított vegyületek kiemelten szerepelnek.**

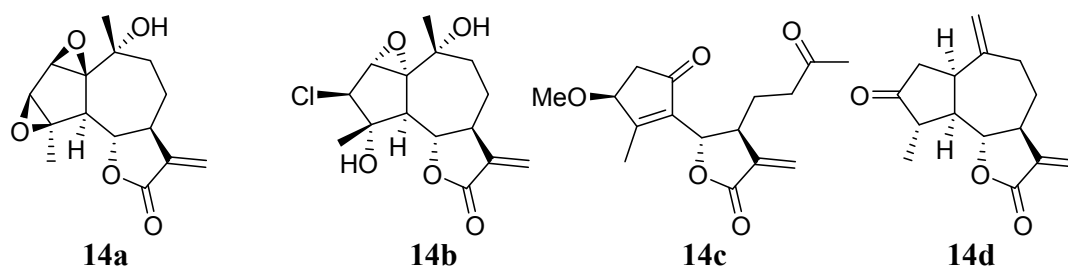
Faj, nyövényi rész	Azonosított tartalomanyagok
<i>Conyza canadensis</i> , gyökér	Triterpének: epifridelanol, fridelin, taraxerol, szimiarenol Egyéb: spinaszerol, apigenin, 4Z,8Z-matrikária- γ -lakton, 4E,8Z-matrikária- γ -lakton, 9,12,13-trihidroxi-10(E)-oktadecénsav, konizapiron A , konizapiron B
<i>Centaurea arenaria</i> , egész növény	Flavonoidok: eupatilin, eupatorin, 3'-metil-eupatorin, apigenin, izokemprefid Lignánok: arktigenin, arktiin, matairezínol Egyéb: knicin, β -amirin, β -szitoszterin- β -D-glükózid, moschamin, <i>cisz</i> -moschamin
<i>Anthemis ruthenica</i> , herba	Flavonoidok: centaureidin, centauridin Szeszkviterpének: krizanin, tanacin, szivaszínolid 6-O-angelát
<i>Artemisia asiatica</i> , herba	Flavonoidok: eupatilin, hiszpidulin, jaceozidin, cirzilíneol, 5,7,4',5'-tetrahidroxi-6,3'-dimetoxi-flavon, 6-metoxi-tricin, krizoplenetin Szeszkviterpének: 3 β ,4 β ,10 α -trihidroxi-1 α ,2 α -epoxi-5 α ,7 α H-gvaj-11(13)-en-12,6 α -olid, artekanin (14a), 3 β -klóro-4 α ,10 α -dihidroxi-1 α ,2 α -epoxi-5 α ,7 α H-gvaj-11(13)-en-12,6 α -olid (14b), 3 α -klóro-4 β ,10 α -dihidroxi-1 β ,2 β -epoxi-5 α ,7 α H-gvaj-11(13)-en-12,6 α -olid, izo-szeko-tanapartolid-metil-észter (14c), ridentin, ridentin B Monoterpének: artemiszia alkohol glükózid , dehidrolinalool oxid
<i>Onopordum acanthium</i> , gyökér	Szeszkviterpének: 4 β ,14-dihidro-3-dehidrozaluzanin C (14d), zaluzanin C, 4 β ,15,11 β ,13-tetrahidrozaluzanin C, Egyéb: nitidanin-diizovalerianát, 13-oxo-9Z,11E-oktadekadiénsav, 24-metilén-koleszterin, linolsav, α -linolénsav, β -szitoszterol, sztigmaszterol
<i>Centaurea jacea</i> , herba	Flavonoidok: apigenin, cirziliol, hiszpidulin, eupatorin, izokempferid, axillarin, centaureidin, 6-metoxi-kempferol-3-metil-éter Szeszkviterpének: knicin, 4'-acetyl-knicin Glükóz-észterek: 1β-izobutanoil-2-angeloil-glükóz , 1 β ,2-diangeloil-glükóz, 1 β -(2-metil-butanoil)-2-angeloil-glükóz Lignán: trachelogenin
<i>Achillea millefolium</i> , herba	Flavonoidok: apigenin, luteolin, centaureidin, kaszticin, artemetin Szeszkviterpének: paulitin, izopaulitin, pszilosztachin C, dezacetyl-matrikarin, szintenin
<i>Xanthium italicum</i> , levél	Xantanolidok: xantatin, 4-epixantanol, 4-epiizoxantanol, 2-hidroxixantinozin

Az azonosított természetes vegyületek között voltak olyan kiemelkedően hatásos molekulák (**14a–d**), melyek antiproliferatív hatásáról még nem számoltak be, vagy igen csekély adat áll rendelkezésre.

A négy szeszkviterpén antiproliferatív hatását az adherens sejtvonalak mellett humán fibroblasztokon, valamint HL-60 leukémia sejteken is meghatároztuk (19. ábra).

A sejtciklus fázisok megoszlásában a legjellemzőbb hatás a G1, ill. a G2/M fázisok gyarapodása volt, amit a S populáció megfogyatkozása kísért. A hipodiploid állomány a koncentrációtól függő mértékben emelkedett, ami a **14d** vegyület esetében nem volt jelentős. A fluoreszcens festés során a sejtmagok kondenzációját minden esetben megfigyeltük. A sejtmembrán károsodására utaló PI felvétel jóval intenzívebb volt a **14c** és **14d** vegyületek esetében. A vizsgált vegyületek 24 órás behatás után fokozták a kaszpáz-3 és -9 aktivitását (20. ábra).

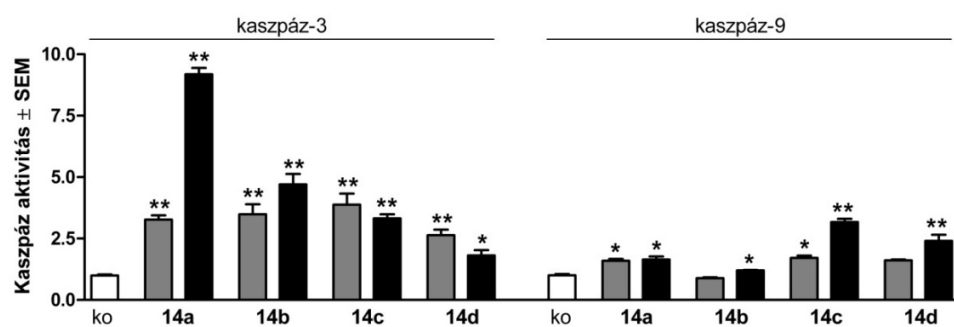
Két kiválasztott anyaggal 24 órán át kezelt sejtek lizátumából megállapítottuk a mitokondriális eredetű apoptózis iniciálásában és a sejtciklus G2→M átmenetében kulcsszerepet játszó faktorok kifejeződését mRNS-szinten. A **14a** és **14b** fokozta a Bax/Bcl-2 arányt, emellett csökkentette a CDK1 és a ciklin B2 expresszióját, a **14a** fokozta a ciklin B1 kifejeződését (21. ábra).



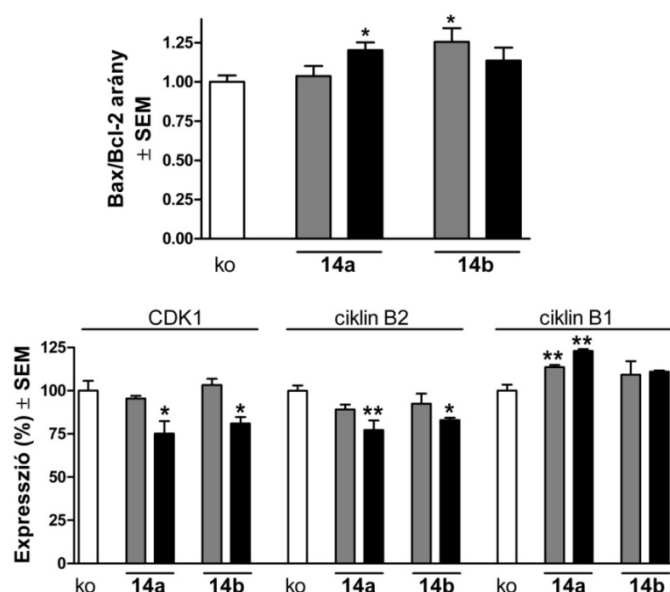
	Számított IC ₅₀ érték (μM)					
	MCF7	HeLa	A431	fibroblaszt	HL-60	HL-60 ²
14a	10,2	21,8	18,3	18,6	7,8	12,2
14b	13,0	11,5	12,1	18,4	4,7	13,5
14c	9,4	12,0	6,8	–	–	4,5
14d	2,7	15,1	4,2	–	–	3,6

19. ábra A **14a–d** szeszkviterpének szerkezete és IC₅₀ értékei. –: nem vizsgáltuk

² Az oszlop a közvetlen sejtszámolással meghatározott adatokból számított IC₅₀ értékeket tartalmazza, a táblázat többi adata MTT (MCF7, HeLa, A431) ill. MST (fibroblaszt, HL-60) módszerrel nyert adatokból származik.



20. ábra A 14a–d vegyületek hatása a kaspázok-3 és -9 aktivitására HL-60 sejtek 24 órás 5 (■) és 10 μ M (■) koncentrációban végzett kezelése után. n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$ ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz (ko) viszonyítva.



21. ábra A 14a és 14b vegyületek hatása a Bax/Bcl-2 arányra (felső panel), ill. a kiválasztott sejtciklust szabályozó faktorok expressziójára (alsó panel) HL-60 sejtek 24 órás 5 (■) és 10 μ M (■) koncentrációban végzett kezelése után. n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$ ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz (ko) viszonyítva.

5. Az értekezés legfőbb megállapításai

1. Közel kettőszáz szteroid származék antiproliferatív hatásáról kapott eredményekből kiindulva sikerült hatékony, további preklinikai fejlesztésre alkalmas molekulákat kijelölnünk. Jellemeztük a legígéretesebb molekulák hatásmechanizmusát; ezek hatékonysága felülmúlta vagy megközelítette a referenciaként alkalmazott ciszplatinét. Leírtuk a D-gyűrűben szubsztituált triazolt tartalmazó 13 β - és 13 α -ösztadiol származékok (2f, 2g, 5c) tumorszelektív antiproliferatív tulajdonságát humán adherens sejteken. Az észlelt hatást a sejtciklus G2/M fázisban bekövetkező blokádja kíséri. Morfológiai és

biokémiai módszerekkel igazoltuk a vegyületek mitokondriális úton kialakuló proapoptotikus hatását.

2. Kimutattuk ösztrol-16-oxim származékok (**6a**, **6b**) sejtosztódást gátló hatását HeLa sejteken, mely a sejtciklus zavarán és a DNS szintézisének gátlásán keresztül jön létre. Azonosítottuk a sejtciklus zavarában szerepet játszó szabályozó faktorokat (CDK4, p16 és foszforilált retinoblasztóma protein).
3. Elsőként mutattuk ki a D-homoösztrol (**7a**) HeLa sejtekre kifejtett szelektív antiproliferatív hatását, valamint a vegyület intrinszik úton megvalósuló proapoptotikus hatását. A vegyület hormonális hatását *in vivo* vizsgálattal zártuk ki. Igazoltuk, hogy a hatóanyag fokozza a G2/M fázisban lévő sejtek arányát, ennek oka a mitotikus sejtek felhalmozódása, amit a statmin fehérje csökkent foszforilációjára vezettünk vissza.
4. Igazoltuk szolanidin analógok antiproliferatív hatását adherens és leukémia sejtvonalakon. A kiválasztott vegyület (**8c**) kisebb mértékben zavarta a fibroblasztok proliferációját, mint a malignus sejtét. A vegyület HL-60 sejteken gátolta a jelölt citidin beépülését a DNS állományba, amit a farmakon antioxidáns tulajdonságára vezettünk vissza. Ugyanezen analógok gátolták az ABCB1 transzporter működését és fokozták a doxorubicin sejtosztódásra gyakorolt hatását limfóma sejteken.
5. Kimutattuk az ösztadiol lokális keletkezésének gátlására tervezett 14 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív effektusát adherens sejtvonalakon. A kiválasztott leghatékosabb származékok (**10a**, **10f**) HeLa sejteken apoptózist váltottak ki, gátolták a DNS szintézisét. Emellett fokozták az apoptózis kiváltásában, ill. gátolták a sejt túlélésében involvált szabályozó faktorok (p53, p21, ill. CDK2, Rb) mRNS-szintű expresszióját.
6. Adherens és limfóma sejtvonalakon jellemeztük öt Amaryllidaceae alkaloid antiproliferatív és rezisztencia revertáló tulajdonságát. Megállapítottuk, hogy két alkaloid (2-*O*-acetyl-likorin és pretazettin) potenciálja a doxorubicin hatását.
7. Farmakológiai nem jellemzett akridonvázak alkaloidok közül kiemelkedően hatékonyan találtuk az izogravakridon-klorint (**12a**) adherens sejteken. A vegyület mitokondriális úton váltott ki apoptózist MDA-MB-231 sejtvonalon. A vegyületek jelentősen gátolták az ABCB1 transzporter aktivitását, két alkaloid – a gravakridontriol (**12d**) és a gravakridondiol monometil-éter (**12e**) – potenciálta a doxorubicin hatását rezisztens limfóma sejteken. Mindkét alkaloid csökkentette a transzporter mRNS-szintű expresszióját 48 órás behatás esetén.
8. A Rutaceae növényfajokból származó kinolinvázak alkaloidok közül a kokuszagin és a szkimminin mutatott számottevő tumorszelektív hatást HeLa sejteken. Mindkét alkaloid kiváltotta az apoptózis morfológiai és biokémiai markereit, a jelenséget a DNS szintézisének gátlására sikerült visszavezetnünk.
9. A Kárpát-medencében fellelhető és etnofarmakológiai adatok alapján releváns növényfajok jellemzésére tervezett szűrővizsgálat során 51 faj 228 kivonatának antiproliferatív hatását határoztuk meg humán adherens sejtvonalakon. A 41 hatásosnak

talált extraktum további vizsgálata – hatáskövető frakcionálása – farmakológiai kevéssé jellemzett vegyületeket és eddig nem ismert természetes molekulákat eredményezett. A szűrővizsgálat nagyszámú természetes vegyületet eredményezett, közöttük négy szeszkviterpént (**14a–d**), melyek adherens és HL-60 sejteken antiproliferatív hatást fejtettek ki. A vegyületek aktiválták az apoptózis mitokondriális útvonalát, emellett a G2/M állomány idő- és koncentrációfüggő felhalmozódását eredményezték. Ez utóbbi effektust a CDK1 és ciklin B2 mRNS-szintű expressziójának csökkenésével hoztuk összefüggésbe.

6. Publikációs adatok

6.1. Az értekezés alapját képező *in extenso* közlemények

1. Réthy B, Csupor-Löffler B, **Zupkó I**, Hajdú Z, Máthé I, Hohmann J, Rédei T, Falkay G: Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I.
Phytother Res **21**: 1200–1208 (2007) IF: 1,430
2. Réthy B, **Zupkó I**, Minorics R, Hohmann J, Ocsovszki I, Falkay G: Investigation of cytotoxic activity on human cancer cell lines of arborinine and furanoacridones isolated from *Ruta graveolens*.
Planta Med **73**: 41–48 (2007) IF: 1,848
3. Réthy B, Hohmann J, Minorics R, Varga A, Ocsovszki I, Molnár J, Juhász K, Falkay G, **Zupkó I**: Antitumour properties of acridone alkaloids on a murine lymphoma cell line.
Anticancer Res **28**: 2737–2743 (2008) IF: 1,390
4. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Réthy B, **Zupkó I**, Máthé I, Rédei T, Falkay G, Hohmann J: Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II.
Phytother Res **23**: 1109–1115 (2009) IF: 1,746
5. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, **Zupkó I**, Réthy B, Falkay G, Forgo P, Hohmann J: Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines.
Phytother Res **23**: 672–676 (2009) IF: 1,746
6. Frank É, Mucsi Z, **Zupkó I**, Réthy B, Falkay G, Schneider G, Wölfling J: Efficient approach to androstene-fused arylpyrazolines as potent antiproliferative agents. Experimental and theoretical studies of substituent effects on BF₃-catalyzed intramolecular [3 + 2] cycloadditions of olefinic phenylhydrazones.
J Am Chem Soc **131**: 3894–3904 (2009) IF: 8,580
7. Kovács A, Vasas A, Forgo P, Réthy B, **Zupkó I**, Hohmann J: Xanthanolides with antitumour activity from *Xanthium italicum*.
Z Naturforsch **64c**: 343–349 (2009) IF: 0,800

8. **Zupkó I**, Réthy B, Hohmann J, Molnár J, Ocsovszki I, Falkay G: Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species.
In Vivo **23**: 41–48 (2009) IF: 1,171
9. Csapi B, Hajdú Z, **Zupkó I**, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, Hohmann J: Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*.
Phytother Res **24**: 1664–1669 (2010) IF: 1,878
10. Hajdú Z, **Zupkó I**, Réthy B, Forgo P, Hohmann J: Bioactivity-guided isolation of cytotoxic sesquiterpenes and flavonoids from *Anthemis ruthenica*.
Planta Med **76**: 94–96 (2010) IF: 2,369
11. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, **Zupkó I**, Molnár J, Forgo P, Vasas A, Kele Z, Hohmann J: Antiproliferative constituents of the roots of *Conyza canadensis*.
Planta Med **77**: 1183–1188 (2011) IF: 2,153
12. Frank É, Molnár J, **Zupkó I**, Kádár Z, Wölfling J: Synthesis of novel steroidal 17 α -triazolyl derivatives via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, and an evaluation of their cytotoxic activity in vitro.
Steroids **76**: 1141–1148 (2011) IF: 2,829
13. Minorics R, Szekeres T, Krupitza G, Saiko P, Giessrigl B, Wölfling J, Frank É, **Zupkó I**: Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro.
Steroids **76**: 156–162 (2011) IF: 2,829
14. Forgo P, **Zupkó I**, Molnár J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J: Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L.
Fitoterapia **83**: 921–925 (2012) IF: 2,231
15. Kádár Z, Molnár J, Schneider G, **Zupkó I**³, Frank É: A facile 'click' approach to novel 15 β -triazolyl-5 α -androstane derivatives, and an evaluation of their antiproliferative activities in vitro.
Bioorg Med Chem **20**: 1396–1402 (2012) IF: 2,903
16. Minorics R, Bózsity N, Wölfling J, Mernyák E, Schneider G, Márki A, Falkay G, Ocsovszki I, **Zupkó I**: Antiproliferative effect of normal and 13-epi-D-homoestrone and their 3-methyl ethers on human reproductive cancer cell lines.
J Steroid Biochem Mol Biol **132**: 168–175 (2012) IF: 3,984
17. Berényi A, Frotscher M, Marchais-Oberwinkler S, Hartmann RW, Minorics R, Ocsovszki I, Falkay G, **Zupkó I**: Direct antiproliferative effect of nonsteroidal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors in vitro.
J Enzyme Inhib Med Chem **28**: 695–703 (2013) IF: 2,383
18. Berényi A, Minorics R, Iványi Z, Ocsovszki I, Ducza E, Thole H, Messinger J, Wölfling J, Mótán G, Mernyák E, Frank E, Schneider G, **Zupkó I**: Synthesis and investigation of the anticancer effects of estrone-16-oxime ethers in vitro.
Steroids **78**: 69–78 (2013) IF: 2,716

³ A közleményben megosztott levelező szerzőként megjelölve.

19. Molnár J, Ocsóvszki I, Puskás L, Ghane T, Hohmann J, **Zupkó I**: Investigation of the antiproliferative action of the quinoline alkaloids kokusaginine and skimmianine on human cell lines.
Curr Signal Transduct Ther **8**: 148–155 (2013) IF: 0,452
20. Csupor-Löffler B, **Zupkó I**, Molnár J, Forgo P, Hohmann J: Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from the roots of *Onopordum acanthium*.
Nat Prod Commun **9**: 337–340 (2014) IF: 0,906
21. Hajdú Z, Hohmann J, Forgo P, Máthé I, Molnár J, **Zupkó I**: Antiproliferative activity of *Artemisia asiatica* extract and its constituents on human tumor cell lines.
Planta Med **80**: 1692–1697 (2014) IF: 2,152
22. **Zupkó I**, Molnár J, Réthy B, Minorics R, Frank É, Wölfling J, Molnár J, Ocsóvszki I, Topcu Z, Bitó T, Puskás GL: Anticancer and multidrug resistance-reversal effects of solanidine analogs synthesized from pregnadienolone acetate.
Molecules **19**: 2061–2076 (2014) IF: 2,416
23. Mernyák E, Kovács I, Minorics R, Sere P, Czégány D, Sinka I, Wölfling J, Schneider G, Újfaludi Z, Boros I, Ocsóvszki I, Varga M, **Zupkó I**: Synthesis of trans-16-triazolyl-13 α -methyl-17-estradiol diastereomers and the effects of structural modifications on their in vitro antiproliferative activities.
J Steroid Biochem Mol Biol **150**: 123–134 (2015) IF: 3,628
24. Minorics R, Bózsity N, Molnár J, Wölfling J, Mernyák E, Schneider G, Ocsóvszki I, **Zupkó I**: A molecular understanding of d-homoestrone-induced G2/M cell cycle arrest in HeLa human cervical carcinoma cells.
J Cell Mol Med **19**: 2365–2374 (2015) IF: 4,014
25. Molnár J, Frank É, Minorics R, Kádár Z, Ocsóvszki I, Schönecker B, Wölfling J, **Zupkó I**: A click approach to novel D-ring-substituted 16 α -triazolylestrone derivatives and characterization of their antiproliferative properties.
PLOS ONE **10**: e0118104 (2015) IF: 3,234
26. Schneider G, Görbe T, Mernyák E, Wölfling J, Holczbauer T, Czugler M, Sohár P, Minorics R, **Zupkó I**: Synthesis of novel 17-(5'-iodo)triazolyl-3-methoxyestrane epimers via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, and an evaluation of their cytotoxic activity in vitro.
Steroids **98**: 153–165 (2015) IF: 2,639
27. Molnár J, Szebeni GJ, Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Szekeres T, Saiko P, Ocsóvszki I, Puskás GL, Hohmann J, **Zupkó I**: Investigation of the Antiproliferative Properties of Natural Sesquiterpenes from *Artemisia asiatica* and *Onopordum acanthium* on HL-60 Cells in vitro.
Int J Mol Sci **17**: E83 (2016) IF: 2,862
28. Schelz Z, Ocsóvszki I, Bózsity N, Hohmann J, **Zupkó I**: Antiproliferative effects of various furanoacridones isolated from *Ruta graveolens* on human breast cancer cell lines.
Anticancer Res **36**: 2751–2758 (2016) IF: 1,826

ΣIF: 69,115

6.2. Tudománymetriai összefoglaló táblázat

Zupkó István tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2016.06.15.)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	147	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	134	1204	1703
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	---	3	1	6
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	---	7	11	11
rövid közlemény	---	3	312	327
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény³	1	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.-III.)		0	0	0
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)⁴	148	---	1528	2047
V. További tudományos művek	4	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	4	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Jelentés, guideline	---	0	0	0
VI. Idézett absztraktok⁵	7	---	7	12
Összesített impakt faktor⁴	305,8	---	---	---
Idézettség száma^{1, 4}	---	---	1535	2059
Hirsch index¹	25	---	---	---

VII. Sokszerzős vagy csoportos (multicentrikus) közlemény	2	---	---	---
a) Szerző⁴	---	2	0	2
b) Kollaborációs közreműködő⁴	---	0	0	0

Speciális tudománymetriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma	13
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma	22
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktor összege	70,6
Az utolsó tudományos fokozat/cím (PhD) elnyerése utáni (1999 -) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	143
impakt faktor összege	306,7
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	7
Az utolsó 10 év (2006-2016) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	131
impakt faktor összeg	282,1
idézések száma	1444
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	191 (9,28%)
WOS/Scopus azonosítóval idézettség	1685
Sokszerzős és/vagy csoportos közlemények impakt faktor összege	8,7
idézettisége	2
Folyóiratcikkek, 15-29 szerzővel	3

Megjegyzések:

Az MTMT nem tudja szolgáltatni a kérelmezőnek kizárólag külföldi intézményből publikált folyóiratcikkeinek számát, összesített impaktfaktorát és független hivatkozásainak számát, valamint az ilyen közlemények első és utolsó szerzőre vonatkozó impaktfaktor összeget. Ezeket az adatokat a pályázónak kell összegyűjtenie és feltöltenie a Doktori Tanács elektronikus rendszerébe.

¹ a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül

² lektorált, tudományos folyóiratban

³ konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben, egyéb konferenciakötetben

⁴ a sokszerzős és/vagy csoportos szerzőségű közlemények impakt faktora és idézettsége nem számítható be az összes értékekbe, ezeket a speciális tudománymetriai adatok között tünteti fel az összesítés

⁵ Nem idézett absztrakt itt nem kerül be az összesítésbe.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet mindazoknak, akik tudományos kutatómunkám során támogattak, akik segítségével, bátorítása nélkül pályázatom nem jöhetett volna létre.

Köszönöm **Dr. Hohmann Judit** Professzor Asszonynak, és az általa vezetett Farmakognózia Intézet munkatársainak a növényi hatóanyagok terén végzett sokéves és produktív együttműködést.

Köszönettel tartozom **Dr. Schneider Gyula** és **Dr. Wölfling János** Professzor Uraknak, **Dr. Frank Évának** és **Dr. Mernyák Erzsébetnek** a szintetikus szteroidokkal végzett közös munkáért.

Köszönöm **Dr. Falkay György** Professzor Úr támogatását, mellyel az általa vezetett Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézetben lehetővé tette az újonnan indított, sejt kultúrán alapuló kutatásokat.

Hálával gondolok a Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet valamennyi dolgozójára, kiemelten közvetlen munkatársaimra: **Dr. Minorics Renátára**, **Dr. Kovács Idára**, **Dr. Schelz Zsuzsannára**, **Czinkota Lászlónéra** és **Bérdi Péterre**.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Molnár József** Professzor Úrnak és **Dr. Puskás Lászlónak** a módszertani segítségért, **Ocsovszki Imrének** az áramlások citometriaiban végzett közreműködésért.

Köszönöm az értekezés témájában dolgozó Ph.D. hallgatók – időrendben: **Réthy Borbála**, **Berényi Ágnes**, **Molnár Judit**, **Bózsity Noémi**, **Gyovai András**, **Sinka Izabella** – lelkesen és nagy szorgalommal végzett munkáját.

Köszönet illeti mindazon külföldi vezető kutatókat, akik együttműködésükkel támogatták a bemutatott eredmények létrejöttét: **Prof. Thomas Szekeres** és **Prof. Georg Krupitza** (Medical University of Vienna, Bécs), **Prof. Zeki Topcu** (Ege University, Izmir), **Prof. Rolf W. Hartmann** (Saarland University, Saarbrücken).

Hálás vagyok családomnak az irántam mutatott türelemért, megértésért, és mindazért a semmihez sem mérhető szeretetért, amivel erőt adtak munkámhoz.