

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Természetes vegyületek és szintetikus szteroid analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

Dr. Zupkó István



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

Szeged, 2016

Tartalomjegyzék

1.	Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke	1
2.	Bevezetés	3
2.1.	A daganatos megbetegedések epidemiológiája	3
2.2.	Hatóanyagaink eredete, a természetes eredet jelentősége	5
2.3.	A szteránváz jelentősége antiproliferatív hatóanyagok fejlesztésében	7
2.4.	A növényi tartalomanyagok jelentősége antiproliferatív hatóanyagok felfedezésében	11
3.	Célkitűzések	15
4.	Alkalmazott módszerek	17
4.1.	Alkalmazott sejtvonalak	17
4.2.	Antiproliferatív hatás meghatározása	17
4.2.1.	Antiproliferatív hatás meghatározása adherens sejteken	17
4.2.2.	Antiproliferatív hatás meghatározása szuszpenziós sejteken	19
4.3.	Morfológiai vizsgálat fluoreszcens mikroszkópiával	19
4.4.	Sejtciklus-analízis áramlási citometriával	20
4.5.	Brómdeoxiuridin (BrdU) inkorporációs teszt	20
4.6.	Kaspázok aktivitásának meghatározása	21
4.7.	Polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatok	21
4.8.	Western blot vizsgálatok	22
4.9.	Tubulin polimerizációjának meghatározása	22
4.10.	G2 és M fázis elkülönítése áramlási citometriával	24
4.11.	Antioxidáns hatás meghatározása 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök (DPPH) megkötésével	24
4.12.	Lipidperoxidáció gátlásának meghatározása	24
4.13.	Multidrog rezisztencia (MDR) revertáló hatás vizsgálata	25
4.14.	<i>In situ</i> ribonukleotid reduktáz aktivitás meghatározása	25
4.15.	Transzmembrán permeabilitás meghatározása <i>in vitro</i> (PAMPA assay)	25
4.16.	<i>In vivo</i> uterotróp assay	26
4.17.	Statisztikai értékelés	26
4.18.	A tesztanyagok eredete	26
5.	Eredmények	27
5.1.	Szteroid analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata	27
5.1.1.	Triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata	27
5.1.2.	Szteroid-oxim analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata	37

5.1.3.	Homoösztron származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata	43
5.1.4.	Szolanidin analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata	49
5.1.5.	17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásának vizsgálata	55
5.2.	Növényi eredetű tartalomanyagok antiproliferatív hatásának vizsgálata	60
5.2.1.	Növényi alkaloidok antiproliferatív hatásának vizsgálata	60
5.2.2.	Növényi kivonatok és szeszkviterpének antiproliferatív hatásának vizsgálata	69
6.	Diszkusszió	78
6.1.	Szteroid analógok antiproliferatív hatása	78
6.1.1.	Triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok antiproliferatív hatása	78
6.1.2.	Az ösztron-oximok antiproliferatív hatása	81
6.1.3.	A D-homoösztron antiproliferatív hatása	82
6.1.4.	A szolanidin analógok antiproliferatív hatása	86
6.1.5.	A 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatása	88
6.2.	Növényi eredetű tartalomanyagok antiproliferatív hatása	91
6.2.1.	Növényi alkaloidok antiproliferatív hatása	91
6.2.2.	Növényi kivonatok és szeszkviterpének antiproliferatív hatása	95
7.	Az értekezés legfőbb megállapításai	98
8.	Irodalomjegyzék	101
9.	Publikációs adatok	115
9.1.	Az értekezés alapját képező <i>in extenso</i> közlemények	115
9.2.	Az értekezés témaköreiben megjelent idézhető absztraktok	117
9.3.	Az értekezés témaköreihez közvetve kapcsolódó válogatott közlemények	119
9.4.	Tudománymetriai összefoglaló táblázat	122
10.	Köszönetnyilvánítás	124

1. Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke

17 β -HSD1	17 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1
17 β -HSD1I	17 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 inhibitor
2ME, 4ME	2- és 4-metoxiösztadiol
ABCB1	ATP-kötő kazetta B1
ABTS	2,2'-azino-bisz-(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav)
Ac-DEVD	N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp
Ac-IETD	N-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp
Ac-LEHD	N-acetil-Leu-Glu-His-Asp
ATCC	American Type Culture Collection
Bax	Bcl-2 asszociált X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BrdU	brómdezoxiuridin
Cdc25	sejtosztódási ciklus 25 protein
CDK	ciklin-dependens kináz
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
Chk	ellőrzőponti (checkpoint) kináz
COMT	katekol-O-metil transzferáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonulkeozid-trifoszfát
DMSO	dimetil-szulfoxid
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
E2	17 β -ösztadiolt
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EGTA	etilénglikol-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay; enzimhez kötött ellenanyag meghatározás
ER	ösztrogén receptor
FA	fluoreszcencia arány
FBS	fötális borjúszerummal; fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FIX	frakcionális inhibíciós index
GnRH	gonadotropin releasing hormon
GTP	guanozin-trifoszfát

HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
hGAPDH	humán gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
HIF1 α	hipoxia indukált faktor-1 α
HPV	humán papillómavírus
IC ₅₀	50%-os inhibitorikus koncentráció
MDR	multidrog rezisztens
MEM	minimális esszenciális médium
MMLV	Moloney murine leukémia vírus
MMP	mátrix metalloproteináz
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
NCI	National Cancer Institute
NF- κ B	nukleáris faktor κ B
NP-40	nonil-fenoxi-polietoxi-etanol
PAR	parentális
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás NaCl oldat
PCR	polimeráz láncreakció
<i>p</i> NA	<i>p</i> -nitroanilin
PI	propidium-jodid
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PIPES	piperazin-N,N'-bisz(2-etánszulfonsav)
PR	progeszteron receptor
Rb	retinoblasztóma protein
RNS	ribonukleinsav
SEM	standard hiba
SZTE	Szegedi Tudományegyetem
TBA	tiobarbitursav
TIMP	szöveti metalloproteináz inhibitor
TNF α	tumor nekrosis faktor α
TRIS	trisz(hidroximetil)-aminometán
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
V _{max}	tubulin polimerizáció maximális sebessége
WHO	World Health Organisation; Egészségügyi Világszervezet

2. Bevezetés

2.1. A daganatos megbetegedések epidemiológiája

Világviszonylatban az elmúlt két évtizedben jelentős mértékben nőtt a várható élettartam; a változás 5,8, ill. 6,6 év a férfiak, ill. a nők esetében. További jelentős változás a mortalitási tendenciák átrendeződése: 2013-ban globálisan már több életet követeltek a kardiovaszkuláris megbetegedések, mint a fertőzések (GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2015). A halálokokban igen markáns földrajzi-gazdasági törésvonalakat tartanak számon. Míg az iparosodott országokban a szív- és érrendszeri megbetegedések vezetnek a mortalitási statisztikákat, addig a fejlődő országokban ma is a fertőző betegségek szedik a legtöbb áldozatot (Kontoghiorghie *et al.*, 2014). Európa 40 országában 2012-ben 3,45 millió új tumoros megbetegedést regisztráltak és 1,75 millió ilyen beteget veszítettünk. Férfiak körében a leggyakoribb a prosztatarák, amit a tüdő- és kolorektális karcinóma követ, míg a mortalitást a tüdőrák vezeti. A nőbetegek leggyakoribb tumora az emlőkarcinóma, ami egyben a legfőbb halálok, ezt követi a kolorektális karcinóma és a tüdőrák (1. táblázat).

A magyarországi mortalitási adatok részben egybevágnak a világ fejlettebb felében tapasztalható mortalitási trenddel, ugyanakkor nálunk igen erős a kardiovaszkuláris dominancia, az esetszám 50%-át ez adja, a halálokok mintegy 25%-ban tulajdoníthatók daganatos megbetegedéseknek, az összes többi ok teszi ki a fennmaradó 25%-ot. Ha a jelenlegi hazai mortalitási adatokat összehasonlítjuk az öt évtizeddel korábbiakkal, azt találjuk, hogy legnagyobb mértékben a daganatokhoz kötődő halálozás emelkedett: közel kétszerannyi ilyen beteget veszítettünk 2011-ben, mint 1960-ban (Molnár és M. Barna, 2012). Nemzetközi összehasonlításban több tekintetben is igen kedvezőtlen a magyar tumorstatisztika. Mind férfiak, mind nők körében hazánkban leggyakoribbak a szájüregi tumorok, valamint férfiakban a tüdő-és gégerák. A magyarországi összesített incidencia férfiakra nézve Európa 6. legmagasabb értékét mutatja. Mortalitás tekintetében szintén nálunk jelentkezik legnagyobb érték mindkét nemre szájüregi tumorokra és kolorektális karcinómára, valamint a nők hasnyálmirigyrákjára. A hazai összesített tumormortalitás férfiak esetében az európai maximumot, míg nők esetében a 3. legmagasabb értékét mutatja (Ferlay *et al.*, 2013).

1. Táblázat. A tumoros megbetegedések gyakorisága és mortalitása Európában (Ferlay *et al.*, 2013).

Férfiak				
	Incidencia		Mortalitás	
	Esetszám (ezer)	%	Esetszám (ezer)	Esetszám (ezer)
Prosztata	417	22,8	92	9,5
Tüdő	291	15,9	254	26,0
Kolorektális	242	13,2	113	11,6
Húgyhólyag	118	6,5		
Gyomor	84	4,6	64	6,5
Hasnyálmirigy			53	5,4
Egyéb	678	37,0	400	41,0

Nők				
	Incidencia		Mortalitás	
	Esetszám (ezer)	%	Esetszám (ezer)	%
Emlő	464	28,8	131	16,8
Kolorektális	205	12,7	102	13,0
Tüdő	119	7,4	99	12,7
Uterus	99	6,1		
Petefészek	66	4,1		
Hasnyálmirigy			52	6,7
Gyomor			44	5,7
Egyéb	658	40,8	351	45,1

Tüdőrák tekintetében hazánkban tapasztalhatók a legkedvezőtlenebb tendenciák, az új megbetegedések száma a nők körében folyamatosan emelkedik, és az összevont mortalitás is Európában itt a legnagyobb (Tompá, 2011).

Célszerű összevetni a két legfőbb halálok, a tumor és a kardiovaszkuláris betegségek tendenciáját hosszabb intervallumra vetítve. Az Egyesült Államokban a '70-es évek közepétől az ezredfordulóig igen meggyőzően csökkent az utóbbi csoportok mortalitása, míg a tumorhoz köthető halandóság esetében csak egy igen szerény csökkenésről beszélhetünk (Jemal *et al.*, 2007). Az eltérő tendenciák okainak feltárása meghaladja jelen értekezés kereteit, az azonban biztosnak tűnik, hogy azok között fontos szerepet játszik a rendelkezésre álló gyógyszerkincs alakulása. Míg az adott időszakban a kardiovaszkuláris medicina újabb hatástani csoportokkal bővült, addig a tumorellesz szerek bővülése kevésbé volt látványos, a „first in class” típusú hatóanyagok (imatinib, rituximab) megjelenése a '90-es évek második felére tehető (DeVita és Chu, 2008). Mindebből az is következik, hogy a tumoros megbetegedések terápiájában várt áttöréshez további innovatív vezérmolekulákra van szükség, melyek ideális esetben eljutnak a

gyakorlati felhasználásig, vagy a fejlesztésük során nyert tapasztalatok segíthetnek a további hatóanyag-jelöltek fellelésében.

2.2. Hatóanyagaink eredete, a természetes eredet jelentősége

A mindenkori gyógyszerkészlet, ill. az újabb szerek felkutatásának módja jellemző az azt alkalmazó kultúrára. Évezredekken keresztül az embert körülvevő természet biztosította mindazon szereket, melyektől elődeink a gyógyulást várták. Az első farmakológiai forrásműnek tekinthető, mintegy 3500 éves egyiptomi Ebers-papirusz több mint 700 készítmény leírását tartalmazza, ezek növényi és állati extraktumokból, valamint ásványokból állnak (Cunha, 1949). A XIX. századig a gyógyszerkincs természetes, jórészt növényi eredetű kivonatokból állt, ezek racionalitását, jelentőségét hiba volna alábecsülni. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint földünk népességének 65%-a ma is elsősorban növényi eredetű, tradicionális szerektől várja a gyógyulást (Fabricant és Farnsworth, 2001). A XIX. század alapvető változásokat indított el a gyógyszerkincs összetételében. Egyrészt a korábban gyógyszerként használt preparátumokból megtörtént az első hatásért felelő tartalomanyagok – rendszerint alkaloidok – izolálása. Az első tiszta formában rendelkezésre álló növényi hatóanyag a morfin volt, melyet Friedrich W. Sertürner állított elő 1805-ben. A század derekán pedig megjelentek az első szintetikus hatóanyagok: a korai inhalációs anesztetikumok (dietyl-éter, kloroform), ill. a klorálhidrát (Jones, 2011). Az első szintetikus csoportot a barbiturát származékok alkották, első képviselőjüket, a barbitált 1903-ban szabadalmaztatták. Ezek farmakológiai jelentősége messze túlmutat egykori szedatohipnotikus alkalmazásukon. Első alkalommal sikerült ugyanis összefüggéseket feltárni a mintegy 2500 analóg kémiai szerkezete és farmakológiai tulajdonságai között. Ezzel bebizonyosodott, hogy egy molekula farmakológiai és farmakokinetikai tulajdonságai kémiai úton módosítható, optimalizálható (Lopez-Munoz *et al.*, 2005). Kezdetét vette a szintetikus hatóanyagok térhódítása, mára ezek a farmakonok teszik ki a gyógyszerkincs domináns részét.

A jelenlegi gyógyszerkincs eredetének elemzése segíthet a természetes források szerepének mélyebb megértésében. Newman és Cragg legutóbbi ezirányú analízisükben az 1981 és 2010 között az FDA ill. más releváns engedélyező hatóság által jóváhagyott 1355 új hatóanyagot elemezve kimutatták, hogy azok 6%-a vakcina, 15%-a pedig ún. biológiai szer. Ez utóbbi alatt több mint 45 aminosavból álló peptidet vagy proteint értik. A kismolekulájú új

hatóanyagoknak mindössze 6%-a (59 vegyület) természetes tartalomanyag, így a szintetikumok dominanciája egyértelmű. Tovább részletezve azonban az egyes farmakonok eredetét, azt találták, hogy azok 28%-a (299 vegyület) természetes anyag származéka, további 30% (323 vegyület) pedig természetes molekulából származó építőelemet, farmakofor csoportot tartalmaz, vagy endogén anyag mimetikumaként ill. antagonistájaként hat, azzal szerkezeti homológiát mutat. Így az a 387 újonnan közelmúltban regisztrált szintetikus hatóanyag, ami nem vezethető vissza semmilyen természetes szerkezeti előzményre, mindössze 36%-ot tesz ki. A természetes vagy „természet-inspirálta” hatóanyagok aránya hatástani csoportonként eltérő, a fenti átlagnál magasabb értéket találtak az antiinfektív és a tumorellenes szerek között. A '40-es évek óta bevezetett összes kismolekulájú tumorellenes hatóanyag 74,8%-a köthető valamilyen módon természetes vegyülethez (Newman és Cragg, 2012). A természetes hatóanyagok jelentőségét illusztrálja az a WHO által készített összesítés is, ami 252 esszenciális hatóanyag között 11%-nyi növényi tartalomanyagot tart számon (Rates, 2001).

Ezek alapján nehéz lenne alábecsülni a természetes források felfedező gyógyszerkutatásban betöltött szerepét. Felvetődik ugyanakkor egy kérdés e szerep időbeliségével kapcsolatban. Van-e még a természetben, elsősorban a növényvilágban további lehetőség? Lehetnek-e még ebben a forrásban fejlesztésre érdemes hatóanyagjelöltek, vagy azt már jelentős mértékben kiaknáztuk és a meghatározó helyet átveszi a molekulatervezés és a szintézis? Ez utóbbiak megkerülhetetlen részei a korszerű felfedező gyógyszerkutatásnak. A növényvilágban rejlő potenciálra jellemző, hogy a globális magasabb rendű flóra mintegy félmillió fajból áll. A fajok csupán 15%-át vizsgálták fitokémiai szempontból és mintegy 6%-kal végeztek farmakológiai vizsgálatokat (Cragg és Newman, 2013). A növényvilág legnagyobb része tehát farmakológiai értelemben érintetlen és felbecsülhetetlen kémiai diverzitást képvisel. Ha figyelembe vesszük továbbá, hogy a gyógyszerkutatás figyelme csak az utóbbi időben fordult a tengeri flóra és az extrém élőhelyek fajai felé, akkor könnyű belátni, hogy a természetes forrásokra még belátható ideig úgy tekinthetünk, mint az újszerű hatóanyagjelöltek kimeríthetetlen lelőhelyére (Mayer és Gustafson, 2008, Wilson és Brimble, 2009).

2.3. A szteránváz jelentősége antiproliferatív hatóanyagok fejlesztésében

A szteránváz vegyületek igen elterjedtek a természetben. Kémiai hasonlóságuk ellenére igen változatos élettani funkciókat töltenek be (pl. szexuálszteroidok, mineralo- és glükokortikoidok, epesavak), ill. a xenobiotikus szteroidok is igen széles spektrumban mutatnak farmakológiai aktivitásokat. Találunk köztük antioxidáns, neuroprotektív, kardiotonikus és lipidprofilt befolyásoló molekulákat, melyek hatóanyag-jelöltekként is felmerülhetnek (Aperia, 2007, Prokai-Tatrai *et al.*, 2008, Rocha *et al.*, 2011, Burg *et al.*, 2013). Az antiproliferatív hatású farmakonokat a legintenzívebben kutatott vegyületek között találjuk, így nem meglepő, hogy az innovatív tumorelles szere keresése kiterjedt természetes szteroidokra, ill. azok szintetikus analógjaira.

A klasszikus citotoxikus szerek terápiás korlátai jól ismertek; tumorszelektivitásuk a gyors osztódás gátlásán alapul, így kevésbé befolyásolják a lassan osztódó malignus sejtet, ugyanakkor kifejezetten toxikusak az élettanilag gyorsan osztódó sejtekre. Ez utóbbi tulajdonságból erednek a citosztatikumok általános mellékhatásai (pl. alopecia, csontvelő depresszió). Az újabb tumorelles szere kutatása során előnyben részesülnek a direkt sejtkárosító hatást nem mutató, szelektívebb vegyületek. Ilyeneket gyakran más farmakológiai csoportban találhatunk.

Jóllehet az évszázadok óta kardiotonikumként alkalmazott kardenolidok (pl. digitoxin, digoxin) tumorelles hatását csak mintegy 50 éve dokumentálták, az oleandrint tartalmazó leander (*Nerium oleander*) ezirányú etnomedicinális alkalmazása szintén évszázadokra nyúlik vissza (Shiratori, 1967, Haux, 1999). Az *in vivo* vizsgálatok azonban nem igazolták a várt hatást, így a tudományos érdeklődés alábbhagyott. A kardenolidok terápiásan hasznosítható tumorelles potenciálját egy retrospektív epidemiológiai vizsgálat révén ismerték fel. Egy szerény esetszámú vizsgálatban azt találták, hogy a kardiális indikációval digitalizált emlőkarcinómás betegek műtéti mintái kedvezőbb szövettani képet mutattak, mint a szívglikozidot nem használó betegek mintái. Ez a kedvezőbb kép magába foglalta a sejtek és sejtmagok szignifikánsan kisebb méretét és méretbeli heterogenitását, valamint a diagnóziskor megállapítható kisebb tumortérfogatot. A két év alatt kialakult metasztázisok számát is csökkentette a szívglikozid. A szerzők a jelenség magyarázatára nem végeztek további vizsgálatokat, de felvetették, hogy a digitálisok rendelkezhetnek ösztrogén receptor moduláló

hatással (Stenkviszt *et al.*, 1979). A nem digitalizált betegek körében 5 évvel a masztektómia után egy nagyságrenddel gyakoribb volt a recidíva, emellett a kardenolid kezelés a másodlagos tumor morfológiai megjelenését is jótékonyan befolyásolta (Stenkviszt *et al.*, 1982). A nagyobb volumenű megerősítő, 32 digitalizált és 143 kontroll emlőkarcinómával diagnosztizált beteget involváló klinikai vizsgálatban 22,3 éven át követték az alanyokat. A digitalizált betegek körében jelentősen alacsonyabb (6%) volt a mortalitás, mint a kontrollcsoportban (34%). Emellett a kezelés csökkentette az aneuploidiát és a proliferációs rátát (Stenkviszt, 1999). Mindezen kísérleti adatok nyomán sikerült olyan félszintetikus kardenolid származékot előállítani, ami mind 57 humán sejtvonalon meghatározott *in vitro* antiproliferatív potenciáljában, mind pedig *in vivo* tolerálhatóságában felülmúlja a korábban vizsgált természetes vegyületeket (Van Quaquebeke *et al.*, 2005).

A tapasztalt effektus mechanizmusa teljes részleteiben máig tisztázatlan. Az eddigi adatok nem támasztják alá a hormonális (pl. ösztrogén) receptoron keresztül mediálódó hatás elméletét. Haux és mtsai. *in vitro* eredményei szerint a digoxin egyaránt hat az ösztrogén receptort nem expresszáló MDA-MB-231 és a receptorra pozitív T47D emlőkarcinóma sejtekre. A digoxin szelektivitására jellemző, hogy független az osztódás sebességétől, interleukinnal (IL-2) stimulált leukociták viabilitására jelentősen kevésbé hat (Haux *et al.*, 1999). Egyre inkább elfogadott, hogy nem kell feltétlenül új mechanizmust keresni az újonnan feltárt hatás mögött. A pozitív inotróp effektusért felelős fokozott intracelluláris kalcium koncentráció fontos szerepet játszik az apoptózis mitokondriális útjának kiváltásában (Pinton *et al.*, 2008). Ezt alátámasztja az a felismerés, hogy a malignus transzformáció során megnő a sejtek Na^+/K^+ -ATPáz aktivitása (Kaplan, 1978). Emellett a digitoxinról és ouabainról leírták, hogy csökkenti az apoptózis inhibitor szurvivin és a malignus viselkedésért felelős transzkripciós faktorok (pl. FOXO1) kifejeződését (Johnson *et al.*, 2002).

A kardenolidok tumorellenes hatásával kapcsolatos tudásunkat tovább árnyalja, hogy kis esetszámú retrospektív vizsgálatokban sikerült megerősíteni a fent leírt biztató eredményeket, ugyanakkor egy nagyobb volumenű, több mint 9000 beteget involváló klinikai vizsgálat nem erősítette meg a korábban leírt effektust. Ugyanakkor megállapította, hogy néhány tumor esetében (leukémia, limfóma, húgyúti tumorok) a magasabb digitoxin koncentrációhoz alacsonyabb tumorkockázat társul (Goldin és Safa, 1984, Haux *et al.*, 2001).

Hasonló szteroid szerkezethez kötődő tumorelles hatást írtak le egyes endogén ösztrogén metabolitokkal kapcsolatban. Az endogén ösztradiol metabolizmusa független a nemtől, reverzibilis ösztroonná alakulás után az A- és a D-gyűrűn bekövetkező irreverzibilis oxidációból áll. Míg a D-gyűrű oxidációjával keletkező 16 α -hidroxiösztroont és ösztriot hatástalan végtermékként tartjuk számon, az A-gyűrű módosulásával létrejövő ún. katekol-ösztrogének (2- és 4-hidroxiösztroon) kevésbé ismertek. Ez utóbbiak a COMT által egy konjugációs lépésen esnek át, a keletkező végtermékek (2- és 4-metoxiösztradiol, 2ME, 4ME) jelentőségét az utóbbi 2 évtizedben ismerték fel. Mindkét metabolit antiproliferatív tulajdonságú, a 2ME jóval nagyobb figyelmet kapott. Az élettani körülmények között szerény mértékben képződő 2ME nem mutat ösztrogénszerű hatást, ugyanakkor *in vitro* gátolja az intakt (pl. endotél) és adherens malignus sejtek proliferációját (Mueck és Seeger, 2010). A hatást megerősítették *in vivo* kísérletekben is, emellett dokumentálták a hatóanyag kedvező tolerálhatóságát (Fotsis *et al.*, 1994, Klauber *et al.*, 1997). Az észlelt hatás mechanizmusával kapcsolatban közölték az antiapoptotikus hatású Bcl-2 és Bcl-xL foszforiláción keresztül megvalósuló inaktivációját (Bu *et al.*, 2002, Shimada *et al.*, 2003, Tinley *et al.*, 2003). Emellett a kolhicin kötőhelyén hatva gátolja a tubulin polimerizációját, így mitotikus blokádot okoz (Cushman *et al.*, 1995). *In vivo* körülmények között ezeken túl gátolja a hipoxia indukált faktor-1 α (HIF1 α) termelődését, ami a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor egyik stimulátora (Mabjeesh *et al.*, 2003). A folyamat eredménye az angiogenezis gátlása. A 2ME fejlesztése II-es fázisú klinikai vizsgálatokig jutott, ezek eredményei szerint a szer jól tolerálható, ám hatékonysága elmaradt a várttól, amit az alkalmazott *per os* készítmény alacsony biológiai hasznosíthatóságával hoztak összefüggésbe (James *et al.*, 2007). A felszívódás elégtelenségét az újabb klinikai vizsgálatokban nanotechnológiai formulálással kívánták megoldani. A 2ME hatása ekkor sem volt meggyőző, ám tolerálhatóságára jellemző, hogy napi 6 g adagban sem dokumentáltak súlyos mellékhatásokat (Harrison *et al.*, 2011). Mivel az alacsony biológiai hasznosíthatóság (mintegy 1,5%) sokkal inkább a gyors metabolizmusnak, mint az inkomplett felszívódásnak tudható be, több munkacsoport is megpróbált metabolikusan stabil hatásos analógokat szintetizálni (Ireson *et al.*, 2004). Az egyik legeredményesebb szerkezetmódosítás a D-gyűrű hattagúvá bővítése volt, az így nyert D-homo 2ME szubmikromoláris koncentrációban gátolja az MDA-MB-231 sejtek proliferációját, miközben kevésbé hat a köldökzsínór vénából származó endotélsejtekre (Peyrat *et al.*, 2012).

Az endogén szteroid hormonokat legtöbbször növekedést serkentő faktorokként tartjuk számon, ez a nőgyógyászati tumorok esetében a leggyakoribb. Az ilyen ösztrogéndependens tumorok kedvezően reagálnak az ösztrogén elvonására, amit a legegyszerűbben ösztrogén-antagonistával vagy GnRH analóggal érhetünk el. Egy alternatív beavatkozási lehetőség az ösztrogén lokális képződésének gátlása. A 17β -ösztadiol a lokális (intrakrin) képződéskor jóval kevésbé potens ösztrobonból keletkezhet, a redukciót a 17β -hidroxiszeroid-dehidrogenáz 1 (17β -HSD1) katalizálja (Miyoshi *et al.*, 2001). Az enzim bénításával csökkenthető az ösztrogén okozta proliferáció, ami a hormonfüggő tumorok mellett további kórképek – pl. endometriózis – terápiájában is kedvező lehet. Szteroid és nem szteroid szerkezetű 17β -HSD1 inhibitorokat (17β -HSD1I) több munkacsoport is fejleszt, az enzimtől független hatásaikra azonban kisebb figyelem összpontosul (Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011). Kézenfekvőnek tűnik, hogy egy ilyen intrakrin úton ható molekula rendelkezhet direkt antiproliferatív hatással. Az ilyen hatóanyagok kettős mechanizmussal gátolhatják az ösztrogéndependens tumorsejtek osztódását.

A szteroid alkaloidok a növényvilágban elterjedt, nitrogént tartalmazó szekunder metabolitok, különösen jellemzőek a Solanaceae és Liliaceae családokra, de fellelhetők kétélűekben és egyes alacsonyabb rendű tengeri állatokban is. A csoport átfedést képez a jelen értekezésben vizsgált két vegyületcsoport, a szteroid analógok és a növényi eredetű természetes vegyületek között. A vegyületcsoportra igen széles farmakológiai spektrum jellemző; beszámoltak antibakteriális, maláriaellenes, antivirális, gyulladásgátló, antinociceptív tulajdonságaikról, emellett modulálják a szexuálszteroidok receptorait (Jiang *et al.*, 2016). Jelentős ismeretanyag halmozódott fel *in vitro* tumorelles hatásukkal kapcsolatban, különösen a kolesztán alkaloidok ezirányú hatása jelentős. A természetes forrásokban aglikonként és 1-4 monoszacharid egységgel képzett glikozidként fordulnak elő, mindkét formában lehetnek aktívak. A szolanidin glikozidjai, az α -szolanin és α -kakonin gátolják a kolon- (HT29) és májtumor (HepG2) sejtek osztódását, utóbbi hatása összevethető a referenciaként használt kamptotecinnel (Lee *et al.*, 2004). Az α -szolanin szubantiproliferatív koncentrációban PC-3 sejteken csökkenti a metasztázis képzésben érintett mátrix metalloproteinázok (MMP-2, MMP-9) expresszióját, fokozza az ezeket gátló szöveti faktorok (TIMP-1, TIMP-2) kifejeződését és kedvező irányba befolyásolja egyes onkogén és tumorszuppresszor mikroRNS-ek arányát. Mindezen hatások összefüggésbe hozhatók a PI3K és Akt csökkent foszforilációjával (Shen *et al.*, 2014). A tomatidin ill. glikozidjai (α -, β -, γ - és δ -tomatin) tumorsejtekre gyakorolt gátló

hatását szintén számos sejtvonalon igazolták. Az α -tomatin humán leukémia sejteken apoptózist vált ki és gátolja a lokálisan alkalmazott HL-60 sejtek növekedését immundeficiens egerekben (Chao *et al.*, 2012). Nem egyértelműen eldöntött, hogy a szacharid egységek milyen szerepet töltenek be a glikozidok antiproliferatív hatásában. A tomatinok cukorkomponenseinek eltávolításával csökkent a vegyületek hatása emlő- és prosztatakarcinóma sejteken, az aglikon volt a legkevésbé hatásos, ami a szacharidok jelentőségét támasztja alá (Choi *et al.*, 2012). A direkt antiproliferatív hatáson túl ezen alkaloidok szenzitizáló, ill. rezisztencia revertáló hatóanyag prototípusként is értékesek lehetnek. A tomatidin és a rokon szerkezetű ciklopamin revertálja az ABC transzporterek által manifesztált multidrog rezisztenciát és érzékenyíti a rezisztens tumorsejteket doxorubicinra (Lavie *et al.*, 2001).

A rokon szerkezetű, nitrogént nem tartalmazó növényi szteroid szaponinok, ill. szapogeninek tumorelles hatásairól szintén kiterjedt szakirodalom áll rendelkezésre, a legtöbb eredmény a dioszgeninnel kapcsolatban halmozódott fel. A vegyület több malignus sejtvonal proliferációját gátolja, sejtciklus blokádot okoz, valamint aktiválja az apoptózis intrinszik és extrinszik útját. Ezeket az effektusokat a PI3K-Akt jelátviteli útba történő beavatkozásra vezetik vissza (Chen *et al.*, 2015). Ezen túl gátolja az adherens sejtek migrációját és invázióját, ami az áttétképzés gátlására utal. Ez utóbbi hatás hátterében a MMP-2, MMP-9 és a VEGF expressziójának gátlása, a TIMP-2 indukálása, és a PI3K foszforilációjának csökkentése állhat (Chen *et al.*, 2011).

Mindezen adatok kellően illusztrálják, hogy a szteroid alapváz felhasználásával, természetes tartalomanyagok, metabolitok módosításával eljuthatunk olyan származékokhoz, melyek alkalmasak tumorelles irányú preklinikai farmakológiai vizsgálatokra, kedvező eredmények esetén további fejlesztésre, ill. modellvegyületekként szolgálhatnak további tesztanyagok tervezésekor.

2.4. A növényi tartalomanyagok jelentősége antiproliferatív hatóanyagok felfedezésében

A növényvilág tumorelles szerek, és általában a hatóanyagok felfedezésében betöltött szerepét szinte lehetetlen túlértékelni. Az utóbbi három évtizedben bevezetett új hatóanyagok közül az élő kórokozókra ható és a tumorelles szerek mintegy kétharmada természetes eredetű vagy „természet-inspirálta” molekula (Cragg és Newman, 2013). Jóllehet az első daganatellenes

szerek szintetikus eredetűek voltak (mustárnitrogén: 1943, metotrexát: 1948), a tumorellenes antibiotikumokkal, majd a Vinca alkaloidokkal elkezdődött a máig használatos szerek gyarapodása (DeVita és Chu, 2008). Az újszerű tumorellenes szerek felfedezésében elvitathatatlan érdemeket szerzett az Egyesült Államokban 1937-ben a rákkutatás koordinálására alapított National Cancer Institute (NCI) (Cragg és Newman, 2009). Szervezésével több, mint félmillió tesztanyag – természetes és szintetikus eredetű vegyületek – szűrővizsgálata valósult meg 1962 és 1980 között. E program egy részeként több mint 35.000 növényi minta tesztelése is megtörtént, aminek a legjelentősebb eredménye a paklitaxel (Taxol®) felfedezése volt. Az ebből a periódusból származó növényi eredetű, máig használt tumorellenes szerek körét bővítik a Vinca alkaloidok (vinkrisztin, vinblasztin és a félszintetikus vinorelbin), az epipodofillotoxin szintetikus analógjai (etopozid és tenipozid), a kamptotecinből származtatott irinotekán és topotekán. A közelmúltban bevezetett vagy még klinikai vizsgálati fázisban lévő természetes eredetű vegyületeket képviseli a flavonoid analóg kináz inhibitor flavopiridol, (Maddocks *et al.*, 2015), a transzláció gátló omacetaxin (Khoury *et al.*, 2015) és a tubulin polimerizációjára ható kombretasztatin A4 (Liu *et al.*, 2014).

Az Amaryllidaceae alkaloidokról előbb írták le növényi sejtekre gyakorolt szuppresszor hatásukat, a narciklazin humán tumorsejtekre gyakorolt antimitotikus hatásának felismerése 1967-ben történt (Ceriotti, 1967). A vegyület hatását *in vivo* is igazolták, az effektust „mitózis-mérgezőskét” értelmezték. Azóta több mint 500 Amaryllidaceae alkaloidot teszteltek tumorsejteken. A legígéretesebbnek a pankratisztatint és a narciklazint találták. A csoport számos képviselőjéről írtak le *in vitro* antiproliferatív és proapoptotikus tulajdonságot, a hatás mechanizmusa kevésbé tisztázott (Nair *et al.*, 2015). A narciklazin tumorszelektív módon hat, nem befolyásolja az intakt fibroblasztok osztódását. Bizonyították, hogy az alkaloid a GTP-ázra hatva károsítja tumorsejt citoskeletonját, közvetlenül a riboszómára hatva pedig gátolja a proteinszintézist (Rodriguez-Fonseca *et al.*, 1995, Van Goietsenoven *et al.*, 2013). Lehetséges hatásmechanizmusként felmerült továbbá a topoizomeráz I és II bénítása is. A rokon szerkezetű likobetain antiproliferatív koncentrációban gátolta mindkét topoizomeráz aktivitását, stabilizálva a kovalens enzim-DNS komplexet (Ancuceanu és Istudor, 2004).

Az akridon alkaloidok a Rutaceae családra jellemző vegyületcsoport széles farmakológiai spektrummal; leírták vírus-, gomba- és maláriaellenes hatásukat (Ahua *et al.*, 2004, Bastow, 2004). Több képviselőjük *in vitro* antiproliferatív tulajdonságáról számoltak be adherens és

szuszpenziós sejtvonalakon egyaránt. Egy kiterjedtebb vizsgálatsorozatban a piranoakridon szerkezetű atalafillinin bizonyult a legpotensebbnek, ami egyben az akridon vázhoz kondenzált pirángyűrű jelentőségét is mutatja (Kawaii *et al.*, 1999). A vegyületcsalád tumorelles hatását a DNS-be történő interkalációra és a DNS-t kontrolláló enzimek (topoizomeráz, telomeráz) gátlására vezetik vissza (Cholewinski *et al.*, 2011). A csoport legintenzívebben fejlesztett eleme a szintén piranoakridonvázat tartalmazó akronicin. Az alkaloidot 1948-ban izolálták egy ausztráliai fa (*Acronychia baueri*) kérgéből. A biztató preklinikai eredmények nyomán a nyolcvanas évek elején végeztek I-es és II-es fázisú klinikai vizsgálatokat terápiarezisztens mielómában szenvedő betegeken. Bár igazolták a szer hatását, az nem bizonyult elégségesnek a további fejlesztéshez, így a szerkezet optimalizálását és a hatás mechanizmusának feltárását célzó munkák kezdődtek el. Megállapították, hogy a pirángyűrű telítetlen kötése elengedhetetlen a hatáshoz. A ma elfogadott hipotézis szerint a kettős kötésen képződő epoxid, ill. az abból származó diolok aktív metabolitoknak tekinthetők; alkilálják a tumorsejt nukleofil targetjeit (pl. DNS, enzimek) (Guilbaud *et al.*, 2002). Egy szintetikus akridin analóg, a ledakrin – nitrakrinként is ismert – Lengyelországban használatos volt szolid tumorok kezelésre (Wilson *et al.*, 1984). Jobban tolerálható analógjait még a közelmúltban is fejlesztették (Tadi *et al.*, 2007). A vegyületcsalád elemei membrántranszporterek által kiváltott rezisztencia modulátoraiként is felmerültek, az ABCB1 és ABCG2 inhibitoraként számon tartott elakridar is akridonvázat tartalmaz.

A Rutaceae növénycsalád másik jellegzetes tartalomanyag-csoportja, a kinolinvázas alkaloidok szintén mutatnak értékes, terápiásan kiaknázható tulajdonságokat. A széles citotoxikus és antimikrobiális spektrum (antibakteriális, antivirális, malária- és gombaellenes) mellett simaizom relaxáló hatást is mutatnak, amit a foszfodiészteráz 5 bénításával magyaráznak (Olila *et al.*, 2001, Nam *et al.*, 2005, Dolabela *et al.*, 2008, Yang és Chen, 2008, Duraipandian és Ignacimuthu, 2009, Varamini *et al.*, 2009). A haplaminról – a direkt citotoxikus hatáson túl – rezisztencia módosító effektust is közöltek (Min *et al.*, 2007, Ea *et al.*, 2008). A csoport jelentőségét illusztrálja, hogy a prototípusként sikeres kamptotecin is egy kondenzált kinazolinvázat tartalmazó alkaloid.

A növényvilág egyik legváltozatosabb és legintenzívebben kutatott vegyületcsoportját a szeszkviterpének képezik. A család több mint 5000 elemet tartalmaz, legtöbbjüket az Asteraceae családból izolálták. A sokoldalú farmakológiai effektus közül kiemelendő a gyulladásgátló és antiproliferatív hatás. A csoport öt fő alapváz köré csoportosítható, ezek közül a gvajanolidok és

pszeudogvajanolidok mutatják a legmarkánsabb cisztatikus tulajdonságot, amit két meghatározó szerkezeti elem hordozhat: α -metilén- γ -lakton vagy telítetlen ciklopentanon (Fernandes *et al.*, 2008). Ezek alkilálószerként hatva addicionálódnak intracelluláris célpontokhoz, jellemzően fehérjék szulfhidril csoportjaihoz, gátolva ezzel a proliferációhoz szükséges enzimek működését. A reakció érinti a glutationt is, aminek depléciója oxidatív stresszhez és az apoptózis mitokondriális útjának aktiválódásához vezet (Gach *et al.*, 2015). Különösen sok adat halmozódott fel a partenolid ezirányú hatásával kapcsolatban. A vegyület direkt módon gátolja az NF- κ B-t, kivédi az I κ B foszforilációját és az azt követő proteaszómális lebomlását (Ghantous *et al.*, 2013). Jóllehet a természetes vegyületek gyógyszerfelfedezésben betöltött szerepe vitathatatlan, az utóbbi évtizedekben kevés ilyen farmakon került közvetlenül be a klinikai gyakorlatba. A szeszkviterpének, ill. általában a terpenoidok jelentőségét, „gyógyszerszerűségét” mutatja, hogy a természetes arglabin vízoldékony dimetilamino-származéka jelenleg is használatos szolid tumorok kezelésére Kazahsztánban (Shaikenov *et al.*, 2001). Az *Euphorbia peplus* diterpén tartalomanyaga, az ingenol-3-angelát 2012 óta használatos az aktinikus keratózis lokális kezelésére (Doan *et al.*, 2012).

3. Célkritizések

Mindezen irodalmi adatok ismeretében célul tűztük ki további innovatív, preklinikai fejlesztésre alkalmas, tumorellenes tulajdonságú hatóanyagjelöltek vizsgálatát, elsősorban *in vitro* módszerekkel. Ehhez létre kívántunk hozni egy, a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karán előzmények nélküli sejtkultúra-egységet ahol honosíthatók a megvalósításhoz nélkülözhetetlen sejtalapú metódusok. Célkritizéseinket az alábbi részletezésben terveztük megvalósítani.

Terveztük szintetikus eredetű szteroid analógsorok antiproliferatív hatásának vizsgálatát humán malignus sejtvonalakon. A vizsgált tesztanyagok elsősorban D-gyűrűben módosított vegyületek voltak, így triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok, szteroid-oxim analógok, homoösztroon származékok, ill. szolanidin származékok. Fel kívántuk tární 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 17 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 (17 β -HSD1) 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 fejlesztésére. Vizsgálni kívántuk farmakológiailag kevésbé jellemzett alkaloidok – így az Amaryllidaceae család alkaloidai, valamint akridon- és kinolinvázás 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, hatásmechanizmusuk és tumorszelektivitásuk feltárását.

4. Alkalmazott módszerek

4.1. Alkalmazott sejtvonalak

Vizsgálataink túlnyomó részét humán adherens malignus sejtvonalakon végeztük, ezeket a 2. táblázat foglalja össze. A sejteket 10% főtális borjúsérummal (FBS), 1-1% nem esszenciális aminosavval és antibiotikum-antimikotikum keverékkel kiegészített minimális esszenciális médiumban (MEM) tenyésztettük 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében. A szuszpenziós HL-60 sejteket 10% FBS-t, 1-1% L-glutamint és antibiotikum-antimikotikum elegyet tartalmazó RPMI 1640 médiumban tartottuk. Az L5178 egér limfóma parentális (PAR) és az ABCB1 transzporter transzfekció útján multidrog rezisztenssé tett (MDR) variánsát 10% inaktivált lószérummal és 1-1% L-glutaminnal és antibiotikum-antimikotikum keverékkel kiegészített McCoy médiumban tartottuk. Az MDR sejtek médiuma tartalmazott 60 ng/ml kolhicint a rezisztencia fenntartására.

4.2. Antiproliferatív hatás meghatározása

4.2.1. Antiproliferatív hatás meghatározása adherens sejteken

A tesztanyagok antiproliferatív hatását MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium) teszt segítségével jellemeztük (Mosmann, 1983). Ehhez az adherens sejteket 96 üregű mikrotitráló lemezre telepítettük 5000 sejt/üreg denzitással, MDA-MB-361 és C33A sejtek esetében 10000/üreg volt a telepítési sejtszám. Másnap felvittük a tesztanyagot tartalmazó médiumot, majd 72 órás inkubáció után 20 µl 5 mg/ml koncentrációjú MTT-oldatot adtunk minden üreghez. Négyórányi kontakt periódus után a viabilis sejtek reduktázai precipitálták a MTT-ből képződő formazánt, arról eltávolítottuk a médiumot, majd 100 µl dimetil-szulfoxidban (DMSO) 60 perces rázás során feloldottuk. Az üregek abszorbanciáját ELISA-leolvasó segítségével határoztuk meg 545 nm-en. A médium legfeljebb 0,3% DMSO-t tartalmazott, ami nem gyakorolt jelentős háttérhatást a sejtek proliferációjára. Az első mérésorozatokban két végkoncentrációt alkalmaztunk, rendszerint 10 és 30 µM-t. A hatékony tesztanyagok esetében meghatároztuk az IC₅₀ értéket (az 50% proliferáció gátlást kiváltó koncentrációt). Ehhez hígítási sort alkalmaztunk, a mért értékekre GarphPad Prism 4.0 segítségével illesztettünk szigmoid görbét). Kezeletlen sejteket tekintettünk negatív kontrollnak, referenciavegyületként ciszplatint

használtunk (3. táblázat). Legalább 2 független mérést végeztünk, kondícióként 5-5 párhuzamos üreget használva.

2. táblázat. Az alkalmazott sejtvonalak legfontosabb jellemzői.

Sejtvonal	Szöveti eredet	Beszerzési forrás	Legfőbb jellemző
HeLa	cervix adenokarcinóma	ECACC	HPV18+
A2780	petefészekrák	ECACC	ER–
MCF7	emlő adenokarcinóma	ECACC	ER+, PR+, HER2–
T47D	emlő adenokarcinóma	ECACC	ER+, PR+, HER2–
MDA-MB-231	emlő adenokarcinóma	ECACC	tripla negatív (ER–, PR–, HER2–)
MDA-MB-361	emlő adenokarcinóma	ECACC	ER+, PR–, HER2+
A431	epidermoid karcinóma	ECACC	β_2 -adrenerg receptor+
Ishikawa	endometriális adenokarcinóma	ECACC	ER+, PR+
SiHa	cervikális laphámrák	ATCC	HPV16+
C33A	cervikális laphámrák	ATCC	HPV–
HL-60	mieloid leukémia	ECACC	promielocitás leukémia, szuszpenzió
L5178	egér limfóma PAR és MDR variáns	SZTE ¹	Az MDR transzfekció következtében expresszálja az ABCB1 transzportert, szuszpenzió
MRC-5	fibroblaszt	ECACC	humán főtális tüdő eredetű

A tenyészeteket hetente kétszer passzáltuk, az *in vitro* vizsgálatokat közel konfluens, legfeljebb 30. passzázsú sejtkultúrákból végeztük.

¹ A sejtvonal MDR módosulata kereskedelmi forrásból nem szerezhető be. Kísérleteinkhez használt sejteket Prof. Dr. Molnár József (SZTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet) bocsátotta rendelkezésre.

3. táblázat. A ciszplatin számított IC₅₀ értékei az alkalmazott sejtvonalakon.

Sejtvonal	IC ₅₀ (μ M)	Sejtvonal	IC ₅₀ (μ M)
HeLa	12,4	MCF7	9,6
A2780	1,3	T47D	9,8
A431	2,8	MDA-MB-231	19,1
Ishikawa	3,5	MDA-MB-361	3,7
SiHa	7,8	C33A	3,7
MRC-5	4,5		

4.2.2. Antiproliferatív hatás meghatározása szuszpenziós sejteken

A szuszpenziós sejtek esetében (L5178 PAR és MDR) minden esetben üregenként 10000 sejttel végeztük a mérést. Az MTT-oldat hozzáadása és 4 órányi inkubálás után 100 μ l 10%-os nátrium-dodecil-szulfáttal szolubilizáltuk a formazánt. A kombinációs vizsgálatokra az ún. checkerboard-módszert alkalmaztuk, az interakció jellegének leírására a frakcionális inhibíciós indexet (FIX) használtuk (Csonka *et al.*, 2015). A humán leukémia sejtek (HL-60) esetében a proliferációra gyakorolt hatást tripánkéssel történt festéssel és közvetlen sejt számlálással határoztuk meg (Saiko *et al.*, 2015). Szintén a HL-60 sejtek esetében alkalmaztuk az MTT egy rokonvegyületét, az MTS-t, a mérés elve az MTT módszerével azonos.

4.3. Morfológiai vizsgálat fluoreszcens mikroszkópiával

A fluoreszcens festést mikrotitráló lemezen végeztük üregenként 5000 adherens sejt kitelepítése után (Ribble *et al.*, 2005). A megadott kezelési idők után a médiumhoz adtuk a Hoechst 33258 (5 μ g/ml) és propidium-jodid (PI; 2 μ g/ml) fluoreszcens markereket. 60 perces inkubációs idő után megfelelő optikai blokkal ellátott Nikon Eclipse TS1000 (Nikon Europe, Amstelveen) inverz mikroszkóppal figyeltük meg, ill. az arra szerelt MicroPublisher CCD (QImaging, Surrey) kamerával fotóztuk a sejteket. A Hoechst 33258 jelének fotózásához 360/40 nm excitációs és 460/50 nm-es emissziós filtert és 400 nm-es dikromatikus tükröt használtunk, míg a PI fluoreszcenciáját 500/20 nm-es excitációs és 520 nm-es felüáteresztő szűrővel és 515

nm-es dikromatikus tükörrel 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. Kvantitatív értékeléskor 4 üregben látóterenként legalább 150 sejtet számoltunk.

4.4. Sejtciklus-analízis áramlási citometriával

Az adherens sejteket 6 üregű lemezen kezeltük, majd foszfáttal puffertelt fiziológiás oldattal (PBS) végzett mosás és tripszinezés után pelletet preparáltunk. A sejteket újabb mosás után hideg 70%-os etanolban fixáltuk, feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A festés során propidium-jodidot (PI) és RNázt tartalmazó pufferral kezeltük a sejteket, majd áramlási citométer (Partec GmbH, Münster; FACStar, Becton-Dickinson, Mountain View) segítségével 20000 sejt fluoreszcencia adatait rögzítettük. A kapott hisztogramokból ModFit LT (Verity Software House, Topsham), ill. winMDI 2.8 (Scripps Research Institute, San Diego) programokkal határoztuk meg az egyes sejtciklus-fázisok (szubG1, G1, S és G2/M) arányát. A szubG1 populációt apoptotikus sejteknek tekintettük (Vermes *et al.*, 2000).

4.5. Brómdezoxiuridin (BrdU) inkorporációs teszt

A DNS szintézis intenzitásának meghatározását kereskedelembe forgalmazott kiték (Roche Diagnostics, Mannheim) segítségével végeztük, 96 üregű lemezen. A BrdU a DNS megkettőződése során beépül a timidin helyére, a beépülés mértéke arányos a DNS szintézis intenzitásával. A kezelt adherens sejteket 1 órán át jelöltük, majd etanollal fixáltuk. A BrdU a DNS nukleázokkal végzett részleges emésztése után egér anti-BrdU monoklonális ellenanyaggal és fluoreszcinnel konjugált másodlagos ellenanyaggal jeleníthető meg. A lemezt fluoreszcens mikroszkóp segítségével, 465-495 nm-es excitációs és 515-555 nm-es emissziós szűrő, valamint 505 nm-es dikromatikus tükör alkalmazásával figyeltük meg és fotóztuk. A BrdU⁺ sejtek arányának meghatározására 4-4 párhuzamos üregben legalább 400 sejtet számoltunk. Kísérleteink egy részében peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyagot használtunk. Ekkor a

BrdU beépülés mértéke az enzim szubsztrátja, 2,2'-azino-bisz-(3-etil-benzotiazolin-6-szulfonsav), (ABTS) hozzáadása után kolorimetrasan közvetlenül is meghatározható.

4.6. Kaszpázok aktivitásának meghatározása

A tesztanyagok hatására bekövetkezett apoptózis igazolására meghatároztuk a folyamatban kulcsszerepet játszó kaszpázok aktivitását mikrotitráló lemez-alapú módszerrel, kolorimetriásan, forgalmazott kitek segítségével. A kaszpáz-3 (végrehajtó kaszpáz), a kaszpáz-9 (mitokondriális út markere) és a kaszpáz-8 (extrinszik út markere) aktivitását a kezelt adherens sejtekből preparált lizátumból mértük az adott enzimre specifikus kromogén szubsztrát hozzáadása után. A szubsztrát mindhárom esetben egy-egy tetrapeptid-származék – kaszpáz-3-hoz Ac-DEVD-*p*NA, kaszpáz-9-hez Ac-LEHD-*p*NA, kaszpáz-8-hoz Ac-IETD-*p*NA – amiből az aktivált enzim felszabadítja a 405 nm-en mérhető *p*-nitroanilint (*p*NA). Kontrollként kezeletlen sejteket alkalmaztunk, az enzimek aktivitásának fokozódását szorzófaktoroként adtuk meg.

4.7. Polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatok

A vizsgált tesztanyagok hatásmechanizmusának megközelítésére meghatároztuk egyes kulcsfontosságú sejtciklust és apoptózist szabályozó faktorok kifejeződését mRNS szinten. A meghatározott faktorokat, az alkalmazott primerek adatait, ill. az eljárás paramétereit a 4. táblázat tartalmazza. A sejteket 6 üregű lemezen kezeltük (400 000/üreg), majd a behatási idő után RNS-t izoláltunk TRIzol reagenssel (Csertex, Budapest). A pelletet 100 µl DNáz- és RNáz-mentes desztillált vízben vettük fel, az RNS koncentrációját fotometriásan határoztuk meg 260 nm-en. 0,5 µg RNS-hez adtunk 20 µM oligodT reagenst (Invitrogen, Carlsbad) 10 µl térfogatban, inkubáltuk 70 °C-on 5 percen át, majd 4 °C-ra hűtve a rendszert kiegészítettük 20-20 egység RNáz inhibitorral és MMLV reverz transzkriptázzal (Promega, Madison), 200 µM dNTP eleggyel (Sigma-Aldrich, Budapest) 75 mM KCl-t és 5 mM MgCl₂-t tartalmazó 50 mM-os TRIS-pufferben (pH 8,3), a reakcióterfogat 10 µl volt. Az elegyet 60 percig inkubáltuk 37 °C-on. A PCR reakciót 5 µL cDNS, 12,5 µl GoTaq Green Master Mix és 2 µL 20 pM-os primer összemérésével végeztük Esco Swift Maxi (Esco Technologies; Philadelphia) készülék segítségével, belső kontrollként minden esetben hGAPDH primert használtunk. A produktumokat

2%-os agaróz gélen szeparáltuk, majd etidium-bromidos jelölés után Kodak Image Station 2000R készülék (Eastman Kodak, Rochester) segítségével szemikvantitatív analízist végeztünk.

4.8. Western blot vizsgálatok

Egyes regulációs proteinek posztisztetikusan foszforilálódnak és funkciójukat meghatározza a foszforiláció mértéke. Ezen proteinek behatásra történő reakcióját csak korlátozottan jellemzi az mRNS szintű expresszió, így az ilyen esetekben protein szintű kifejeződést is vizsgáltunk Western blot technikával. A 6 üregű lemezen kezelt sejtekből lízispufferrel (50 mM TRIS, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% dezoxikólsav, 1% proteáz és foszfatáz inhibitor koktél) lizátumot készítettünk, majd 50 µg proteint 4-12% Bis-Tris NuPAGE géltre vittünk, az elektroforézist XCell SureLock Mini-Cell Units (Invitrogen, Carlsbad) segítségével végeztük. A proteint iBlot Gel Transfer System (Invitrogen, Carlsbad) készülékkel vittük nitrocellulóz membránra. A retinoblasztóma és stathmin fehérjék különböző foszforilált módosulataihoz, valamint a β-aktinhez a megfelelő 1:200 hígítású poliklonális ellenanyagot (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) használtunk. Az antitest kötődését WesternBreeze Chemiluminescent Western blot kittel (Invitrogen, Carlsbad) detektáltuk, majd Kodak Image Station 2000R készülék (Eastman Kodak, Rochester) segítségével szemikvantitatív analízist végeztünk.

4.9. Tubulin polimerizációjának meghatározása

Egyes tesztanyagok tubulin polimerizációra gyakorolt direkt hatását kinetikai fotometriás *in vitro* módszerrel, kit segítségével határoztuk meg (Cytoskeleton, Denver). A tesztanyag oldatát előmelegített (37 °C) UV-transzparens 96 üregű lemez üregeibe helyeztük, majd hozzáadtuk a tubulin polimerizáció valamennyi feltételét tartalmazó oldatot (3 mg/ml tubulin 80 mM PIPES pufferben, pH 6,9, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 1 mM GTP, 10,2% glicerin). A rendszer abszorbanciáját 60 percen keresztül percenként határoztuk meg 340 nm-en, 37 °C-on tartott lemezen, programozható spektrofotométer segítségével (BMG Labtech, Ortenberg). A polimerizáció sebességének jellemzésére meghatároztuk az időegység alatti abszorbancia növekedés maximumát (V_{max}). Referenciavegyületként 10 µM paklitaxelt használtunk.

4. táblázat. A PCR vizsgálatok során alkalmazott primerek adatai és a meghatározás saját laboratóriumi körülményekre optimalizált paraméterei

Név:	Primer szekvencia	Gene ID	Méret (bázis-pár)	Anellációs hőmérséklet (°C)
CDK1	F: ACTGGCTGATTTTGGCCTTGCC R: TGAGTAACGAGCTGACCCCAGCAA	983	118	62
CDK2	F: CATTCTCTTCCCCTCATCA R: CAGGGACTCCAAAAGCTCTG	1017	173	57
CDK4	F: GAAACTCTGAAGCCGACCAG R: AGGCAGAGATTCGCTTGTGT	1019	213	57
CDK6	F: TCCCTCCTTTGAAGTGGATG R: GTCACCTGGGGCTAAATGAA	1021	149	60
ciklin B1	F: AATAAGGAGGGAGCAGTGCG R: GAAGAGCCAGCCTAGCCTCAG	891	51	60
ciklin B2	F: GCGTTGGCATTATGGATCG R: TCTTCCGGGAAACTGGCTG	9133	51	60
Cdc25B	F: CACGCCCCGTGCAGAATAAGC R: ATGACTCTCTTGTCAGGCTACAGG	994	417	60
Cdc25C	F: TTTTTCOAAGGTATGTGCGCTG R: TGGAACCTCCCCGACAGTAAGG	995	102	56
Bax	F: TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC R: CGTCCCAACCACCCTGGTCT	581	195	53
Bcl-2	F: GACTTCGCCGAGATGTCCAG R: CAGGTGCCGGTTCAGGTACT	596	225	51
p16	F: CTCTGGAGGACGAAGTTTGC R: CATTCTCTTCCTTGGTTTCC	1029	158	57
p21	F: GACACCACTGGAGGGTGACT R: CAGGTCCACATGGTCTTCCT	1026	172	59
p27	F: ATGTCAAACGTGCGAGTGTC R: TCTCTGCAGTGCTTCTCCAA	1027	152	57
p53	F: GTGACACGCTTCCCTGGATT R: ATCTCCCAAACATCCCTCACAG	7157	1486	60
Rb	F: GGAAGCAACCCTCCTAAACC R: TTTCTGCTTTTGCATTTCGTG	5925	153	57
hGAPD H	F: ACCCAGAAGACTGTGGATGG R: TGCTGTAGCCAAATTCGTTG	2597	415	55

4.10. G2 és M fázis elkülönítése áramlási citometriával

A sejtciklus-analízis során nem különül el a G2 és M fázis, mivel mindkét sejtpopuláció azonos DNS mennyiséget tartalmaz. Az alkalmazott eljárás lényege a H3 hiszton foszforilációjának ellenanyaggal történő detektálása. A H3 hiszton 10-es helyzetű szerinje csak a mitózis idejére foszforilálódik, a sejtciklus további részében defoszforilált állapotban van (Shibata és Ajiro, 1993). A HeLa sejtek kezelését 6 üregű lemezen végeztük (10^5 /üreg), tripszinezés és mosás (PBS) után a kit (Millipore, Billerica) fixáló pufferében inkubáltuk 4 °C-on, 20 percen át. Permeabilizálás után a sejteket Alexa Fluor 488-al jelölt foszfo-hiszton H3 (Ser10) ellenanyaggal kezeltük 1 órán át, majd elvégeztük a sejtciklus-analíziskor is szokásos PI-RNáz kezelést. Végül 20000 sejt fluoreszcenciáját határoztuk meg (Partec GMBH, Münster), az adatok értékelésére Flowing 2.5 szoftvert használtunk (Cell Imaging Core, Turku). A foszfo-hiszton H3 ellenanyaggal jelölődő sejtpopulációt tekintettük mitotikus (M-fázisú) állománynak. Kontrollként paklitaxelt (5 nM) és metoxiösztadiolt (5 μ M) alkalmaztunk.

4.11. Antioxidáns hatás meghatározása 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gyök (DPPH) megkötésével

A DPPH egy színes, stabil szabad gyök, ami gyökfogóval történő reakciója során elveszíti színét. A vizsgált vegyületet 3 ml etanolban oldott DPPH oldathoz (0,1 mM) adtuk, összeráztuk, majd 30 perces inkubáció után 517 nm-en mértük az oldat abszorbanciáját (Krings és Berger, 2001). A méréseket duplikátumban végeztük, referenciavegyületként egy vízzoldékony tokoferol analógot, a troloxot használtuk.

4.12. Lipidperoxidáció gátlásának meghatározása

A biológiai mátrixban érvényesülő antioxidáns hatás igazolására állati agyszöveti eredetű telítetlen zsírsavak autooxidációjának gátlását határoztuk meg fotometriásan (Stocks *et al.*, 1974). 250-300 g-os him Sprague-Dawley patkányok agyából homogenizálással és centrifugálással lipidgazdag frakciót preparáltunk. A tesztelt mintát 60 percen át 37 °C-on inkubáltuk a szövetfrakcióval, majd triklór-ecetsavas lecsapást és centrifugálást követően a felülúszóból tiobarbitursavas előhívás után meghatároztuk az oxidált lipidek mennyiségét. A méréseket

duplikátumban végeztük, referenciavegyületként ezúttal is troloxot használtuk. Valamennyi állatkísérlet megfelelt a vonatkozó etikai normáknak, azokat az SZTE Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának engedélyével végeztünk.

4.13. Multidrog rezisztencia (MDR) revertáló hatás vizsgálata

A tesztanyagok ABCB1 transzporter által mediált multidrog rezisztenciára gyakorolt hatását rodamin-123 kumulációs módszerrel jellemeztük (Molnár *et al.*, 1998). 10^6 /1ml parentális (PAR) és transzfektált (MDR) L5178 egérlimfóma sejtet inkubáltunk a tesztanyaggal 10 percen át, majd a transzporter szubsztátjaként ismert rodamin-123-t adtunk a rendszerhez (10 µl 1 mg/ml oldat). 20 percnyi inkubálás után a szuszpenziót kétszer mostuk, majd áramlási citométer (Becton-Dickinson, Mountain View) FL-1 csatornáján hisztogramot rögzítettünk. Referenciavegyületként verapamil használtunk 40,6 µM koncentrációban. Végző paraméterként fluoreszcencia arányt (FA) számítottunk három független kísérlet átlagából (Valente *et al.*, 2012):

$$\text{Fluoreszcencia arány} = \frac{\text{FL_1}_{\text{MDR (kezelt)}}/\text{FL_1}_{\text{MDR (kezeletlen)}}}{\text{FL_1}_{\text{PAR (kezelt)}}/\text{FL_1}_{\text{PAR (kezeletlen)}}}$$

4.14. *In situ* ribonukleotid reduktáz aktivitás meghatározása

A DNS szintézisre kifejtett közvetlen hatást a ribonukleotid reduktáz aktivitásának *in situ* meghatározásával jellemeztük (Szekeres *et al.*, 1994). Ötmillió 24 órán át tesztanyaggal kezelt HL-60 sejtet inkubáltunk [^{14}C]citidinnel (Sigma-Aldrich, 0,3125 µCi, 5 nM) 30 percen át 37 °C-on. Centrifugálás és PBS-ben történt mosás után teljes DNS kivonást végeztünk, majd a minták radioaktivitását folyadék szcintillációs számláló (PerkinElmer, Boston) segítségével határoztuk meg.

4.15. Transzmembrán permeabilitás meghatározása *in vitro* (PAMPA assay)

Egyes tesztanyagok (akridon alkaloidok) transzmembrán permeabilitásának meghatározására 96 üregű MultiScreen rendszert használtunk (Millipore, Billerica). A mesterséges membránt 15 µl 5%-os *n*-hexánban oldott *n*-dodekánnal kezeltük. A donorfázisba

vitt tesztanyag koncentrációja 240 μM volt, az akceptor lemez üregeiben mérhető koncentrációt fotometriás úton határoztuk meg 340 nm-en, 5 órás inkubáció elteltével (Wohnsland és Faller, 2001).

4.16. *In vivo* uterotróp assay

Tesztanyag feltételezett ösztrogén hatásának jellemzésére *in vivo* uterotróp tesztet végeztünk patkányon (Vogel, 2002). Ehhez 180-200 g-os nőstény Sprague-Dawley patkányokat izoflurán anesztézia alatt ovariectomizáltunk, majd a beavatkozás után 2 héttel az állatokat randomizáltuk (5 állat/csoport). A tesztvegyületet 7 napon át adagoltuk növényi olajban oldva szubkután, referenciaként 17 β -ösztradiolt (E2), kontrollként vivőanyagot alkalmaztunk. A 8. napon a patkányok uterusát eltávolítottuk, tömegüket az állatok testsúlyára normalizáltuk (mg/100 g).

4.17. Statisztikai értékelés

Kísérleti eredményeink statisztikai értékelésére egyutas varianciaanalízist végeztünk, erre a GraphPad Prism programot használtuk (GraphPad Software, San Diego). A legalább $p < 0,05$ értéket adó eltéréseket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

4.18. A tesztanyagok eredete

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

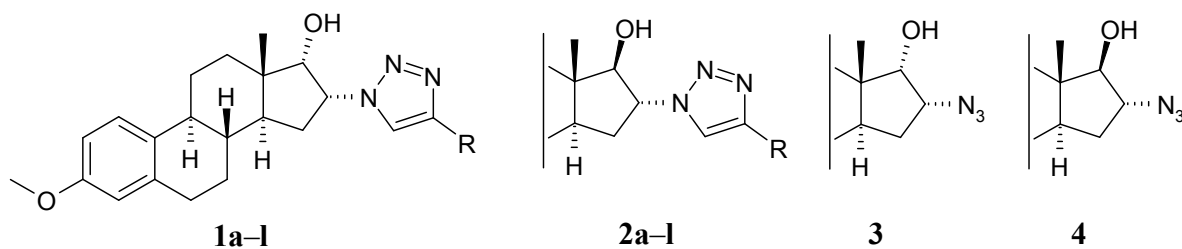
5. Eredmények

5.1. Szteroid analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

5.1.1. Triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata

A triazol gyűrű több vegyületcsoportban, így a szteroidok esetében is növelte az antiproliferatív potenciált. Beszámoltak triazolt tartalmazó pregnenolon származékokról, ill. ösztradiol-konjugátumokról (Banday *et al.*, 2010, Kamal *et al.*, 2011).

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, 5. táblázat). A 3-metoxi-ösztadiol származékok a 16-os helyzetben szubsztituált triazol gyűrűt tartalmaztak, az egyes vegyületepárok a 17-es helyzetű hidroxilcsoport térállásában tértek el. A mérésorozat eredményét az 5. táblázat tartalmazza (Molnár *et al.*, 2015).



R	a: fenil	b: <i>m</i> -tolil	c: <i>p</i> -tolil	d: 4-metoxi-fenil
	e: 2-metoxi-fenil	f: 4- <i>terc</i> -butil-fenil	g: 4-etil-fenil	h: 4-propil-fenil
	i: 3-amino-fenil	j: ciklopropil	k: ciklopentil	l: ciklohexil

1. ábra

Az **1a–l**, **2a–l**, **3** és **4** vegyületek szerkezete.

5. táblázat A vizsgált 16-triazolil-ösztán származékok antiproliferatív hatása és számított IC₅₀ értékei

Vegyület	Konc. (μM)	Proliferáció gátlás (%) ± SEM [számított IC ₅₀ érték (μM) ²]			
		HeLa	MCF7	A431	MRC-5
1a	10	37,4 ± 2,4	— ³	34,9 ± 0,6	
	30	68,3 ± 0,5 [10,2 μM]	49,9 ± 0,6 [>30 μM]	47,9 ± 1,2 [>30 μM]	
1b	10	—	—	—	
	30	—	—	—	
1c	10	—	—	—	
	30	—	—	—	
1d	10	—	—	24,7 ± 1,3	
	30	45,5 ± 0,8	28,8 ± 1,5	26,1 ± 2,3	
1e	10	51,3 ± 0,6	34,1 ± 2,1	41,9 ± 1,9	
	30	71,4 ± 1,2 [14,8 μM]	64,4 ± 1,2 [17,8 μM]	55,5 ± 0,8 [22,8 μM]	
1f	10	47,1 ± 1,1	61,9 ± 2,6	—	
	30	97,3 ± 0,5 [10,7 μM]	96,4 ± 0,4 [8,1 μM]	29,2 ± 2,8 [>30 μM]	
1g	10	—	—	—	
	30	51,6 ± 2,0	—	23,2 ± 1,0	
1h	10	—	24,2 ± 2,0	23,7 ± 1,0	
	30	92,9 ± 0,4 [11,7 μM]	66,6 ± 1,2 [11,6 μM]	42,6 ± 1,1 [>30 μM]	
1i	10	47,2 ± 2,1	—	27,0 ± 0,9	—
	30	98,4 ± 0,2 [13,9 μM]	82,5 ± 0,9 [14,9 μM]	94,7 ± 0,5 [11,8 μM]	25,7 ± 2,9 [>30 μM]
1j	10	23,8 ± 2,27	31,0 ± 1,7	35,8 ± 1,5	
	30	51,5 ± 1,9	43,5 ± 1,3	50,0 ± 1,4	
1k	10	25,3 ± 2,5	—	—	
	30	38,1 ± 2,0	47,9 ± 1,2	—	
1l	10	—	—	—	
	30	34,4 ± 2,1	33,3 ± 2,5	26,9 ± 1,8	
2a	10	—	—	—	
	30	34,6 ± 2,1	40,0 ± 2,0	52,9 ± 0,7	
2b	10	40,5 ± 0,7	—	44,3 ± 0,7	
	30	50,1 ± 1,1	—	44,7 ± 1,6	

² Az IC₅₀ értéket a legalább 60% proliferáció gátlást kiváltó vegyületek esetében határoztuk meg hígítási sor alkalmazásával.

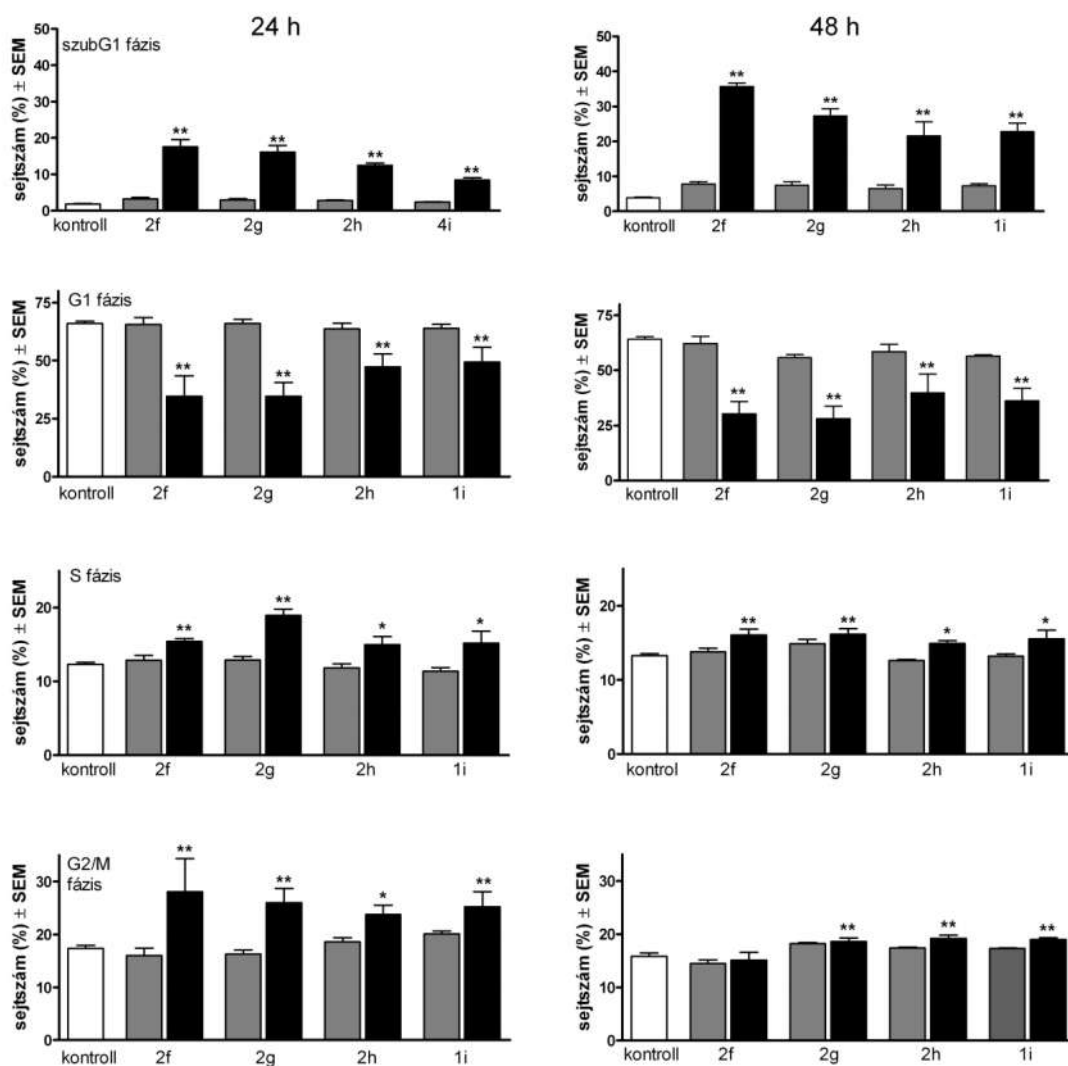
³ A 20%-nál alacsonyabb gátlási értékeket számszerűen nem adtuk meg.

2c	10	–	–	–	
	30	36,6 ± 1,1	44,2 ± 1,5	58,1 ± 0,2	
2d	10	37,4 ± 1,2	26,1 ± 2,7	–	
	30	46,8 ± 3,0	37,1 ± 2,4	49,1 ± 2,1	
2e	10	31,7 ± 2,5	–	–	
	30	40,8 ± 2,4	–	–	
2f	10	90,5 ± 0,5	73,2 ± 1,4	72,9 ± 0,9	32,8 ± 2,5
	30	95,2 ± 0,3 [5,1 µM]	78,9 ± 0,6 [7,9 µM]	71,0 ± 0,9 [6,8 µM]	68,3 ± 0,8 [17,6 µM]
2g	10	85,6 ± 0,8	44,8 ± 2,2	47,3 ± 1,0	33,7 ± 1,7
	30	95,6 ± 0,6 [8,7 µM]	60,6 ± 2,0 [10, 8 µM]	73,6 ± 0,5 [10,7 µM]	68,6 ± 1,2 [17,1 µM]
2h	10	75,3 ± 1,6	32,8 ± 2,6	43,2 ± 1,9	21,0 ± 1,6
	30	86,4 ± 0,6 [12,1 µM]	36,3 ± 1,3 [>30 µM]	51,8 ± 1,5 [>30 µM]	20,4 ± 1,3 [>30 µM]
2i	10	–	–	–	
	30	24,6 ± 2,7	64,6 ± 1,7	–	
2j	10	–	–	–	
	30	40,5 ± 2,4	–	–	
2k	10	26,3 ± 1,2	–	–	
	30	34,6 ± 1,6	–	–	
2l	10	–	–	–	
	30	26,5 ± 2,2	–	–	
3	10	–	–	29,8 ± 2,4	
	30	30,2 ± 2,3	–	51,5 ± 1,9	
4	10	–	–	–	
	30	24,4 ± 2,5	–	47,7 ± 2,2	
Ciszplatin	10	42,6 ± 2,3	53,0 ± 2,3	88,5 ± 0,5	72,3 ± 2,3
	30	99,9 ± 0,3 [12,4 µM]	86,9 ± 1,2 [9,6 µM]	90,2 ± 1,8 [2,8 µM]	70,7 ± 1,3 [4,5 µM]

Az találtuk, hogy a 17-es helyzetű hidroxilcsoport térállása jelentősen nem befolyásolja a vegyületek hatását, bár tendenciaszerűen a β térállás kedvezőbb. 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 kedveztek, 17 β -hidroxilcsoport mellett (**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 hatását MRC-5

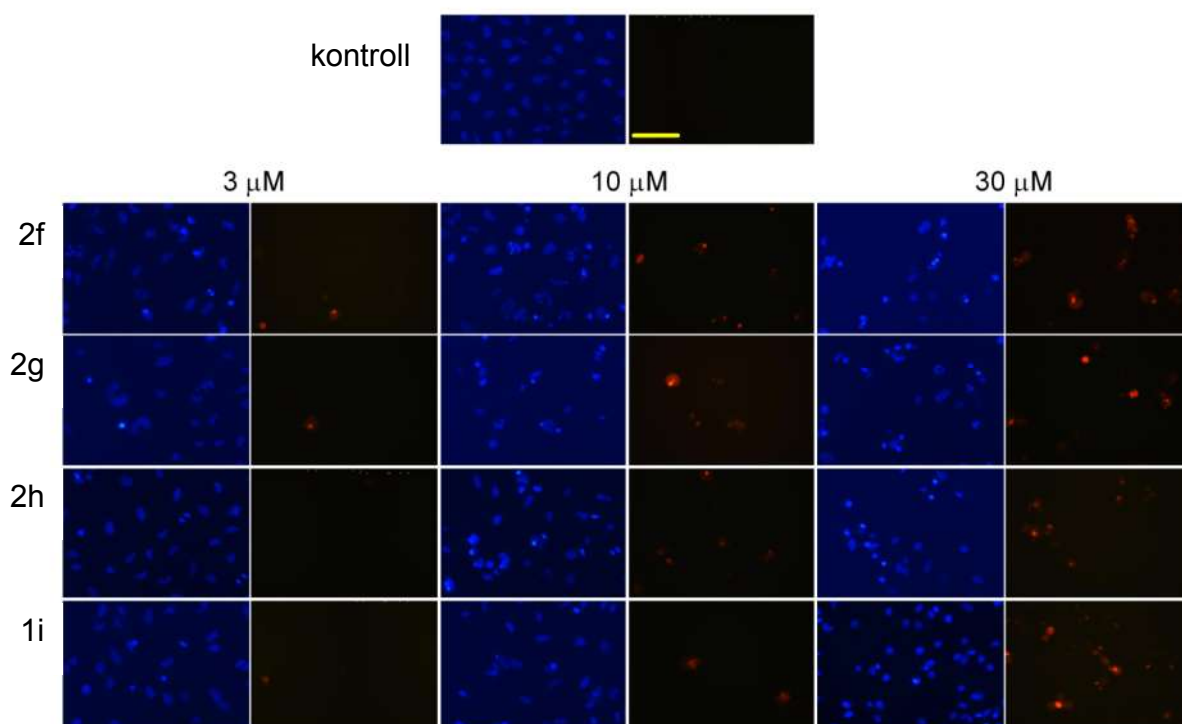
fibroblaszt sejteken is meghatároztuk. Mind a négy vegyület kevésbé hat az MRC-5 fibroblasztokra mint az alkalmazott tumorsejtekre.

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 növekedés volt, amihez csökkent G1 és kissé emelkedett G2/M halmaz társult (2. ábra).



2. ábra A 2f–h és 1i vegyületek hatása a HeLa sejtek ciklus-eloszlására 3 μM (■) és 10 μM (■) koncentrációban. n: 3, *: p < 0,01 és **: p < 0,01 a kezeltellen kontroll sejtekhez viszonyítva.

A kezelés hatására bekövetkező morfológiai változást fluoreszcens kettős festéssel dokumentáltuk. Minden látótérrel két képet rögzítettünk, a Hoechst 33258 és a PI megjelenítésére. A kiválasztott vegyületek már 3 μM mellett 24 órás inkubáció után kiváltanak nukleáris zsugorodást és kondenzációt. Nagyobb koncentrációban (10–30 μM) pedig ehhez társul a sejtmembrán fokozott permeabilitása, amire a PI felvétele utal (3. ábra). A kettős festést a **2f** és **2g** vegyületekkel elvégeztük az MRC-5 fibroblasztokon is, membránkárosodásra utaló PI festődést 30 μM mellett sem tapasztaltunk.



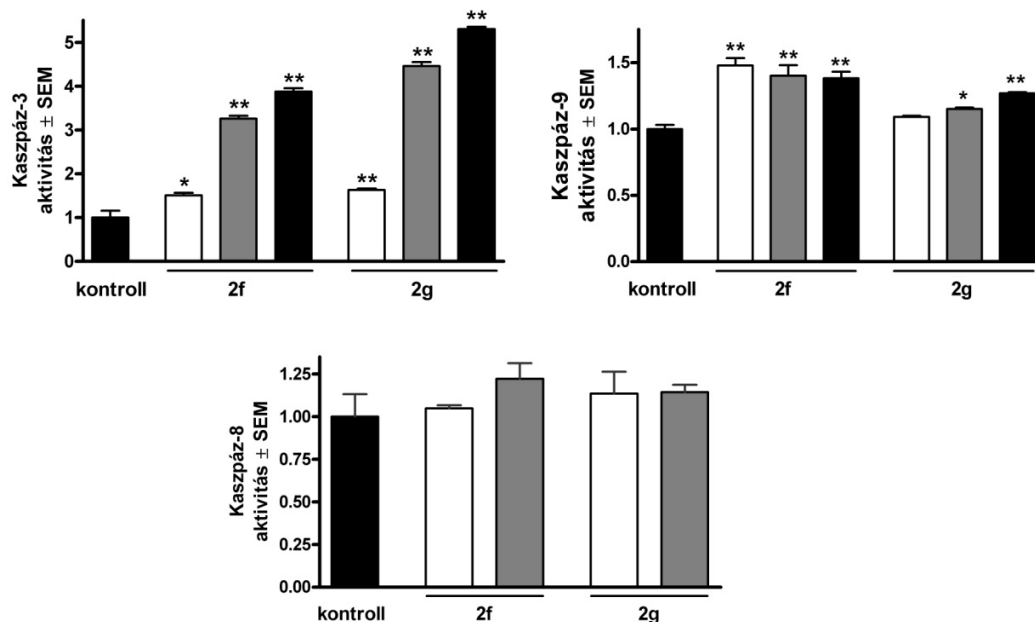
3. ábra A **2f–h** és **1i** vegyületek hatása a HeLa sejtek morfológiájára 24 órás kezelés hatására. Egy-egy kondíció esetén a bal oldali panelek a Hoechst 33258, a jobb oldaliak a PI fluoreszcenciáját mutatják. Indikátor a kontroll képen: 100 μm .

A hipodiploid (szubG1) állomány idő- és koncentrációfüggő felszaporodása az apoptózis egyik következménye, aminek további igazolására meghatároztuk a kritikus kaszpázok (kaspáz-3, -8 és -9) aktivitását a kezelt sejtekben. Az alacsonyabb IC_{50} értékek és a markánsabb szubG1 állomány alapján a **2f** és **2g** vegyületeken végeztük további vizsgálatainkat. Azt találtuk, hogy mindkét vegyület jelentősen és koncentrációfüggően növeli a kaszpáz-3 aktivitását, kisebb, de

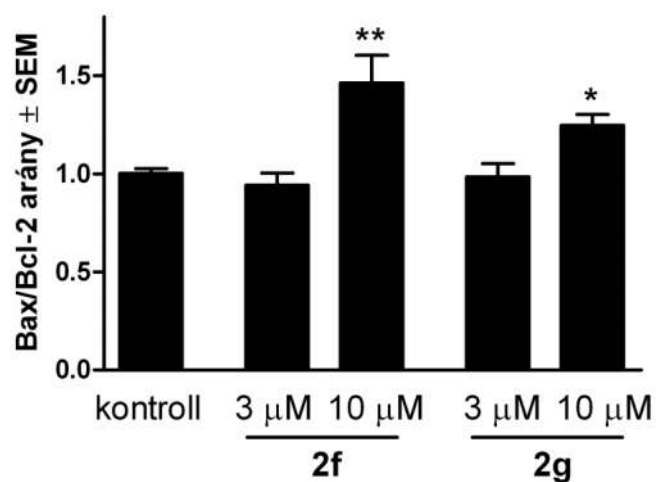
szignifikáns mértékben a kaszpáz-9 aktivitását, míg a kaszpáz-8 esetében nem mértünk jelentős változást (4. ábra).

Jóllehet a kaszpázok aktivitásának ezen mintázata megfelel az apoptózis mitokondriális útjának, mivel az enzimek apoptózistól független folyamatokban is részt vesznek, célszerűnek láttuk a tesztanyagok proapoptotikus hatásának megerősítését (Connolly *et al.*, 2014). Ezért meghatároztuk az apoptotikus Bax és antiapoptotikus Bcl-2 kifejeződését. Azt találtuk, hogy a két faktor aránya mindkét vegyület esetében az apoptózis felé tolódik (5. ábra).

Mivel a sejtciklus-analízis során a hipodiploid (szubG1) állomány felszaporodása mellett a másik jellemző észlelt jelenség az S és a G2/M populáció növekedése a G1 rovására, meghatároztuk a G2→M átmenet szabályozásában érintett legfőbb faktorok kifejeződését mRNS szinten. Az átmenetet a ciklin B és CDK1 komplexe regulálja, utóbbi aktivitását a Cdc25 biztosítja a fehérje defoszforilálása révén (Lindqvist *et al.*, 2005). A három izoforma (Cdc25A, -B és -C) közötti funkcionális eltérések kevésbé feltérképezettek, de HeLa sejtek esetében a B módosulatnak tulajdonítják a ciklin B – CDK1 komplex aktiválását (Gabrielli *et al.*, 1996).

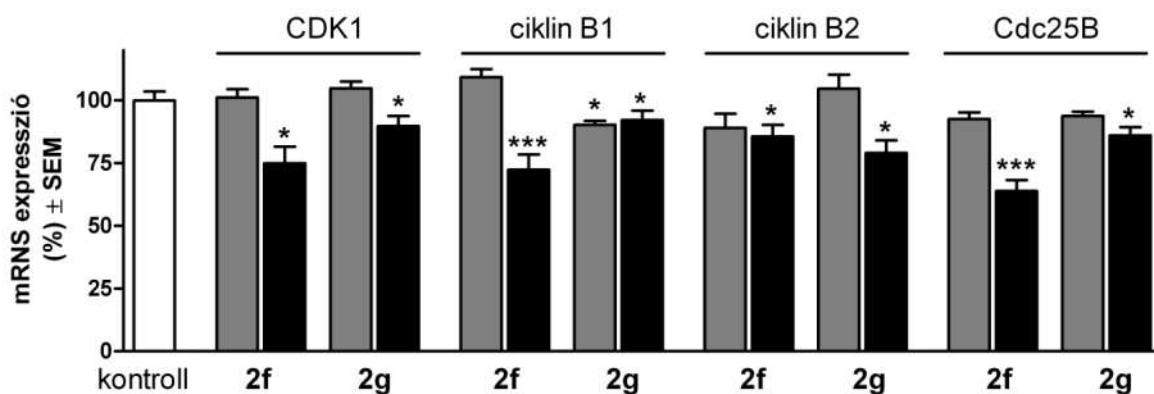


4. ábra A **2f** és **2g** vegyületek hatása a kaszpázok aktivitására HeLa sejtek 24 órás kezelése után. □: 3 μM, ■: 10 μM, ■: 30 μM. n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$, ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.



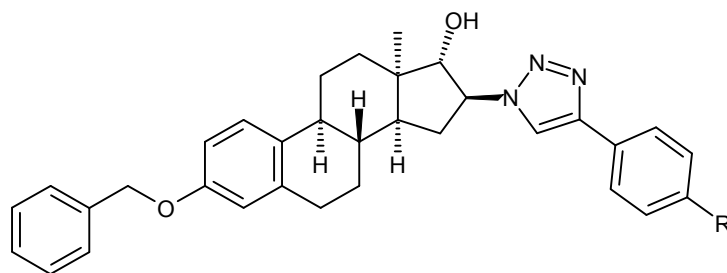
5. ábra A **2f** és **2g** vegyületek hatása a Bax/Bcl-2 arányra HeLa sejtek 24 órás inkubációja után. n: 4, *, ill. **: $p < 0,05$, ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Valamennyi meghatározott regulációs faktor expressziója koncentrációfüggően csökkent a 24 órás kezelés hatására (6. ábra).



6. ábra A **2f** és **2g** vegyületek hatása a CDK1, ciklin B1 és B2, valamint a Cdc25B expressziójára HeLa sejtek 24 órás 3 μM (■) és 10 μM (■) tesztanyaggal végzett inkubációja után. n: 4, *, ill. ***: $p < 0,05$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A szubsztituált triazol gyűrű 16-os helyzetű jelenlétét a 13 α -ösztrom sorban is eredményesnek találtuk. Egy 22 elemből álló vegyületkönyvtár vizsgálata során 5 származék (**5a–e**) mutatott kiemelkedő aktivitást (7. ábra) (Mernyák *et al.*, 2015).



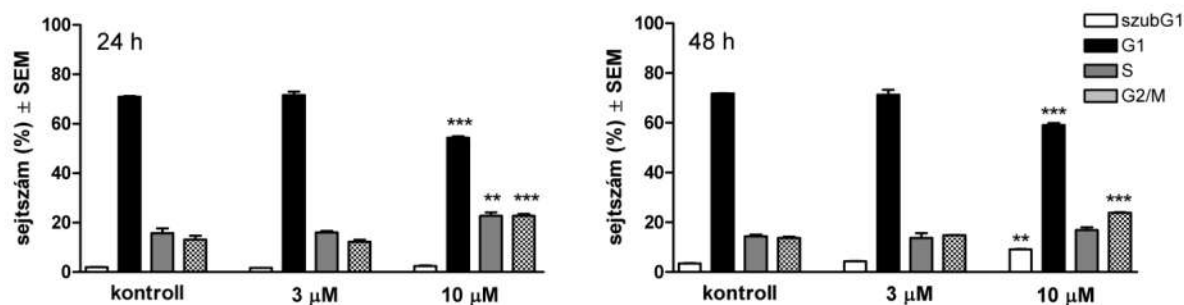
Vegyület	R	Számított IC ₅₀ érték (μM)						
		HeLa	A2780	A431	MCF7	T47D	MDA-MB-231	MDA-MB-361
5a	–Me	7,6	10,2	6,0	6,0	5,9	6,5	5,3
5b	–CF ₃	8,8	7,5	>30	9,3	9,7	10,3	9,7
5c	–Et	2,6	2,6	2,9	2,4	5,9	6,5	5,4
5d	– ^t Bu	3,4	2,9	3,2	2,9	6,2	8,3	6,6
5e	–Br	8,5	⁴			9,0	10,3	8,8

7. ábra A leghatékonyabb 16-triazolil-13α-öszttron származékok (**5a–e**) szerkezete és számított IC₅₀ értékei.

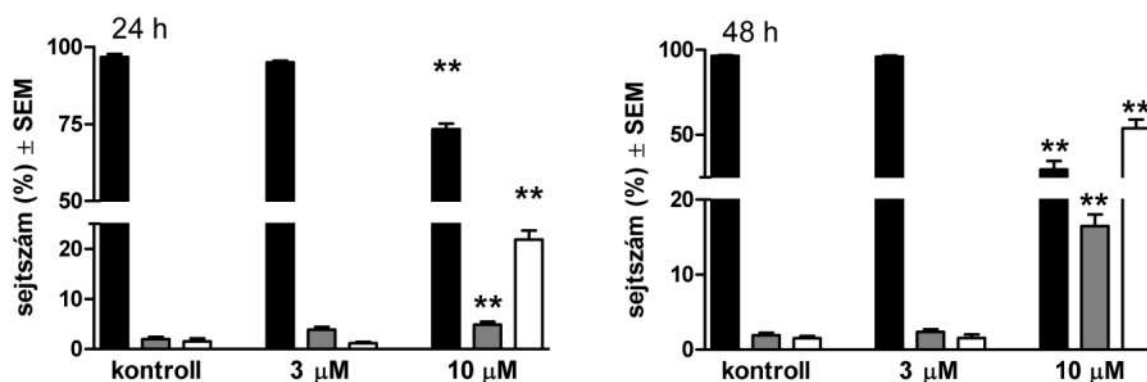
A vegyületsor *in vitro* vizsgálata során megállapítottuk, hogy az antiproliferatív hatásnak kedvez a triazol gyűrű és a 3-as helyzetű benzil-éter jelenléte, valamint a D-gyűrű szubsztituenseinek 16β,17α térállása. További vizsgálatainkat az **5c** vegyülettel végeztük. Az **5c** az ígéretes IC₅₀ értékek mellett is csak 22,2 ± 2,9 %-ban gátolta az MRC-5 fibroblaszt sejtek proliferációját, így hatása tumorszelektívnek mondható.

Sejtciklus-analízist HeLa sejteken végeztünk 24 és 48 órás behatás után (8. ábra). 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. Azonos behatási idők és koncentrációk mellett elvégeztük a kettős fluoreszcens festést, az eredményeket kvantitatív módon értékeltük (9. ábra). 24 óra 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. A PI-t felvevő sejteket késői apoptotikus, ill. nekrotikus sejtekként értelmezhetjük (Kepp *et al.*, 2011).

⁴ Az **5e** vegyület viszonylag szerény aktivitást mutatott A2780, A431 és MCF7 sejteken (42,6-73,5% proliferáció gátlás 30 μM mellett), így az IC₅₀ értékeket nem határoztuk meg.

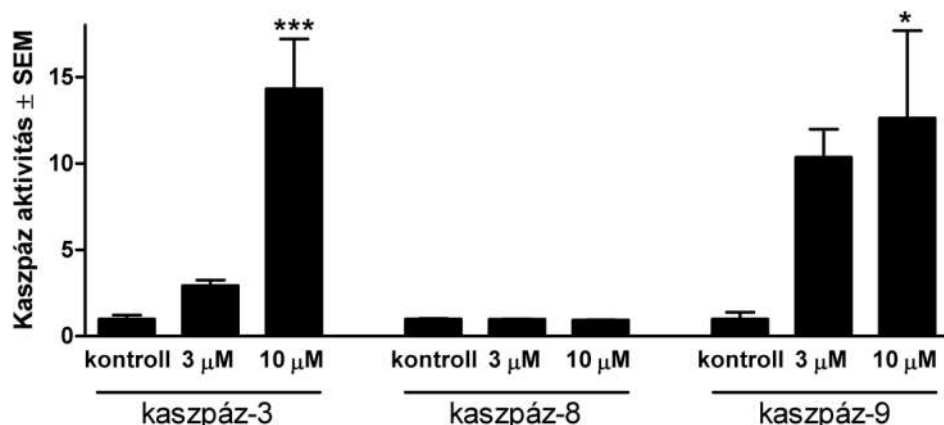


8. ábra Az **5c** vegyület hatása HeLa sejtek ciklus-eloszlására 24 és 48 órás kezelést követően. n: 2, **, ill. ***: $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.



9. 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.

Végül az apoptózis végső bizonyítására az **5c** vegyülettel kezelt HeLa sejtekből is meghatároztuk a kritikus kaspázok aktivitását, az eddigi eredmények alapján 48 órás inkubáció után (10. ábra). A kaspáz-3 aktivitásának jelentős fokozódása igazolta az apoptózis indukcióját, míg a kaspáz-9 aktivációja a folyamat mitokondriális eredetére utal. Nem észleltünk kezelésfüggő változást a kaspáz-8 aktivitásában, így az apoptózis receptoriális vagy extrinszik útja kizárható.



10. ábra Az **5c** vegyület hatása HeLa sejtek kaspázainak (3, 8 és 9) aktivitására. n: 3, *, ill. ***: $p < 0,05$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A szubsztituált triazolil-csoport jelentőségét támasztják alá a további, 15 β -triazolil-androsztán származékokkal végzett vizsgálataink eredményei. Az 5 kiválasztott leghatékonyabb vegyület 6,5–10,3 μM számított IC_{50} értékkel gátolta a HeLa sejtek proliferációját. Ezek 3–10 μM koncentrációban már 24 órás behatás után a **2f–h** és **1i** vegyületekhez hasonló módon befolyásolták a kezelt sejtek sejtciklus-eloszlását: növelték a hipodiploid állományt, csökkentették a G1 populációt, míg az S és G2/M állományt szintén fokozták. Ezen eredmények a G2/M fázisban kialakuló sejtciklus blokádra utalnak. Fluoreszcens kettős festéssel (Hoechst 33258 – PI) igazoltuk az apoptózisra jellemző nukleáris kondenzációt, ill. magasabb koncentrációban (10 μM) a sejtmembrán permeabilitásának fokozódását (Kádár *et al.*, 2012).

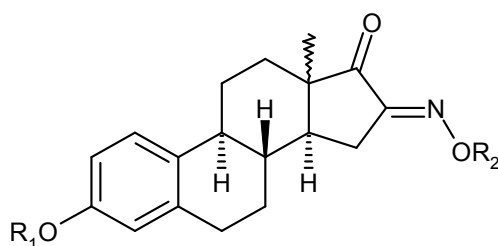
A szubsztituált triazol gyűrűnek a szteránváz további pozícióiba történő elhelyezése farmakológiai szempontból kevésbé volt eredményes. Így egy 17 α -triazolil funkciót tartalmazó ösztrán és 2-androsztén analógsor utóbbi elemei kifejezettebb antiproliferatív hatást mutattak adherens sejteken (HeLa, MCF7 és A431), hatásaik azonban elmaradtak a korábban tárgyalt farmakonok hatásaitól (Frank *et al.*, 2011).

A 17 α - és 17 β -helyzetben szubsztituált triazol gyűrűt tartalmazó 3-metoxi-ösztrán származékok is hasonló hatást eredményeztek. A vizsgált 28 vegyület 6 adherens sejtvonalon ugyan hatékonyabb volt, mint a triazol elemet nem tartalmazó intermedierek, ám kiemelkedően ígért vegyületet nem azonosítottunk. Azt találtuk, hogy a 17-es helyzetű triazolil szubsztituens térállása nem befolyásolja jelentősen a vegyület antiproliferatív hatását (Schneider *et al.*, 2015).

5.1.2. Szteroid-oxim analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

Az oxim molekularész innovatív tumorellenes vegyületbe történő kialakítása több, ismerten antiproliferatív tulajdonságú hatóanyagcsoport hasonló módosítása alapján indokolt. Wang és mtsai. egy nagy elemszámú és kiemelkedően hatékony flavon- és izoflavon-oxim vegyületcsoport vizsgálatáról számoltak be. A csoport egyik eleme 0,08 μM -os eredő IC_{50} értéket mutatott az NCI által összeállított 60 humán sejtvonalat tartalmazó panelen (Wang *et al.*, 2005). A koleszt-4-én-6-oxim *Z* és *E* izomerjei tumorszelektív módon gátolják a HeLa és K562 leukémiasejtek proliferációját (Krstic *et al.*, 2007).

Szteroid-oximokra vonatkozó vizsgálatainkat egy 63 ösztron-16-oximból, ill. azok intermediereiből álló vegyületkönyvtár 3 adherens sejtvonalon történő vizsgálatával kezdtük (Berényi *et al.*, 2013a). A vegyületek a 3-as és 16-os helyzetű szubsztituensben, ill. a 13-as metilcsoport térállásában tértek el (11. ábra).



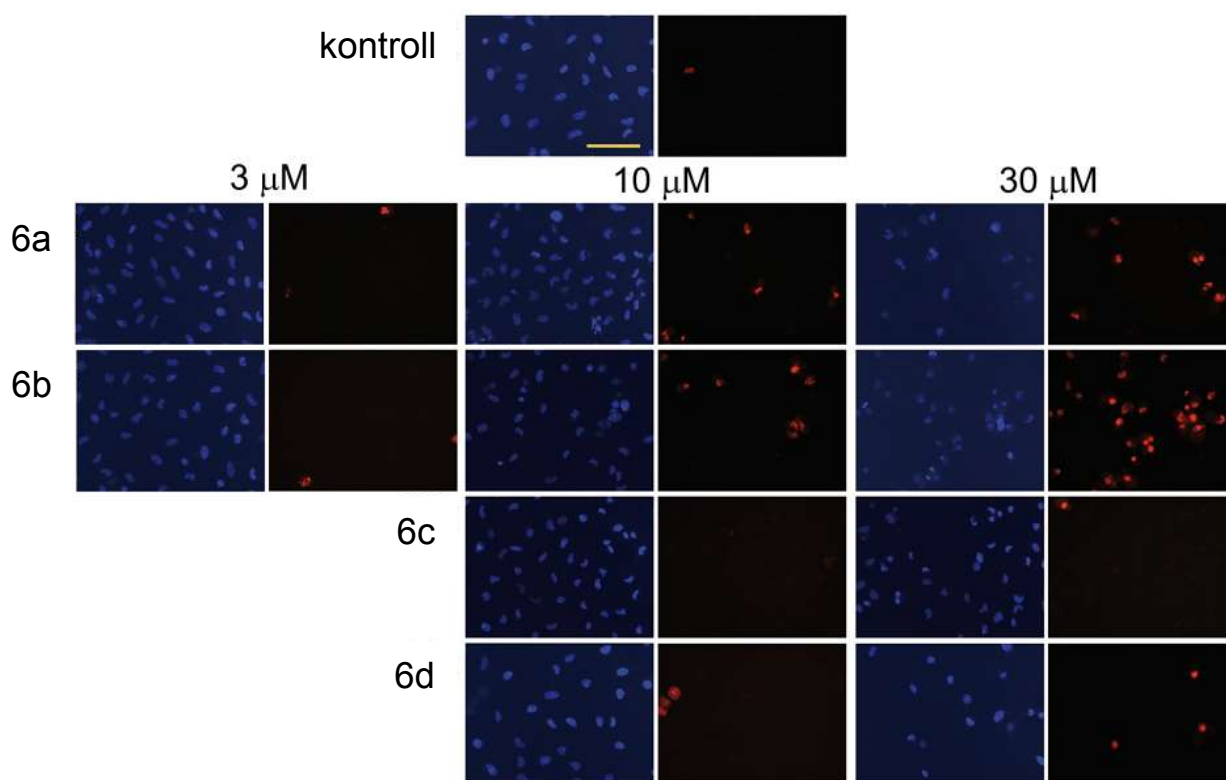
Vegyület	R_1	R_2	13 térállás	Számított IC_{50} érték (μM)				
				HeLa	A2780	A431	MCF7	MRC-5
6a	H	H	β	4,4	18,3	>30	>30	>30
6b	$-\text{SO}_2\text{NH}_2$	H	β	4,0	12,0	>30	>30	>30
6c	Bn	$-\text{COEt}$	α	3,5	4,6	>30	4,1	>30
6d	<i>p</i> -MeO-Bn	Me	β	5,6	25,1	13,3	>30	6,9

11. ábra A leghatékonyabb ösztron-16-oximok (**6a–d**) vegyületek szerkezete és számított IC_{50} értékei.

A szerkezet-hatás összefüggések elemzésekor azt találtuk, hogy az oximfunkciót nem tartalmazó analógok rendszerint csekély aktivitást mutatnak. 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**). Ez utóbbi vegyületek esetében a 13-as metilcsoportnak kisebb volt a jelentősége, a hatékony analógok kevésbé voltak egy sejtvonalra szelektívek. A kiválasztott 4 hatékony farmakonból három (**6a–c**) nem gátolta jelentősen a fibroblasztok proliferációját, míg a **6d** nem mutatkozott szelektívnek.

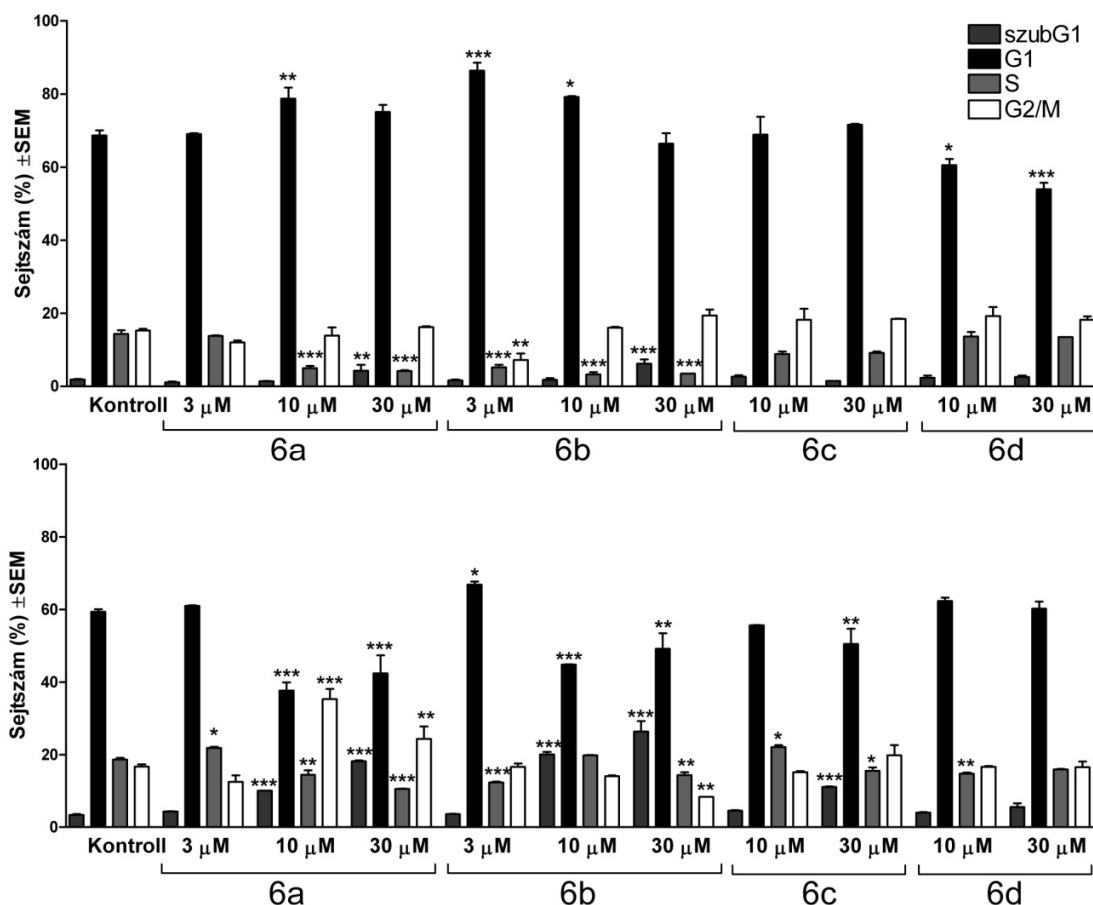
A Hoechst 33258 – PI fluoreszcens kettős festést 24 órás inkubáció után végeztük el (12. ábra). Valamennyi vegyület esetében tapasztaltunk nukleáris kondenzációt és sejtmembránkárosodást. A legkifejezettebb membránpermeabilitás-fokozódást a **6b** vegyület váltotta ki, míg a **6c** még 30 μ M mellett sem okozott jelentős PI felvételt.



12. ábra A **6a–d** vegyületek hatása a HeLa sejtek morfológiájára 24 órás kezelés után. Egy-egy kondíció esetén a bal oldali panelek a Hoechst 33258, a jobb oldaliak a PI fluoreszcenciáját mutatják. Indikátor a kontroll képen: 100 μ m.

A kiválasztott vegyületek idő- és koncentrációfüggő módon okoztak zavart az inkubált HeLa sejtek sejtciklus-eloszlásában (13. ábra). 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. A G1 állományra gyakorolt hatás 30 μ M

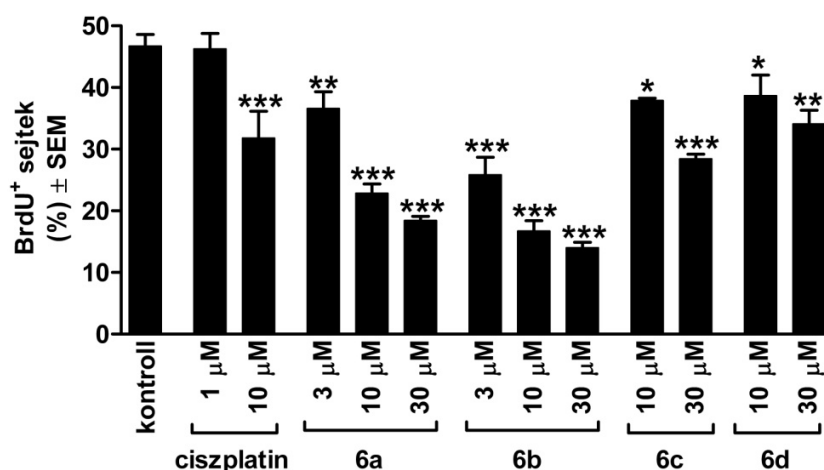
mellett már nem volt mérhető, helyett megjelent a fokozott szubG1 csoport. Az O-szubsztituált oximok (**6c**, **6d**) hatása kevésbé volt markáns; a **6d** a G1 fázis csökkenését okozta. Hosszabb expozíció esetén a **6a** és **6b** leglátványosabb hatása a hipodiploid állomány növekedése volt, ami leginkább a G1 fázis rovására történt. Hasonlóan viselkedett a **6c** is, míg a **6d** hatása csekély maradt.



13. ábra A **6a–d** vegyületek hatása a HeLa sejtek sejtciklus-eloszlására 24 (felső panel) és 48 órás (alsó panel) kezelés esetén. n: 3, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

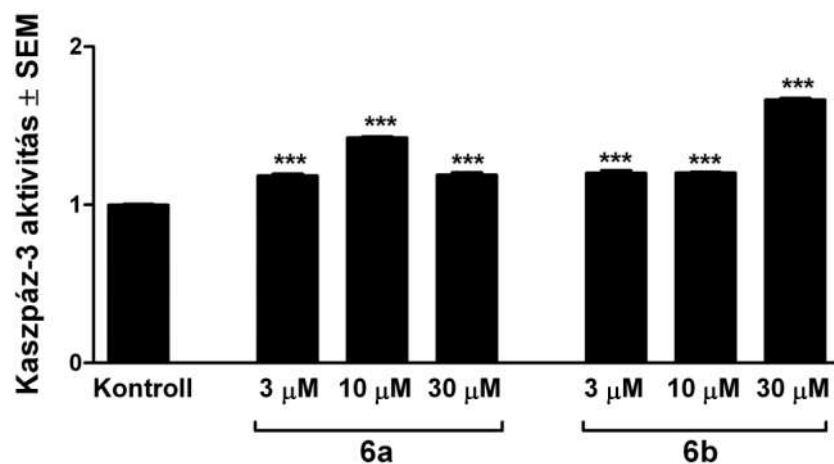
A sejtciklus-eloszlás legjellemzőbb eltérése az S fázis depressziója volt, ami a DNS szintézisének gátlására utal. A DNS-szintézis zavarának direkt igazolására meghatároztuk a timidinnel analóg brómdeoxiuridin (BrdU) inkorporációját a 24 órán át kezelt HeLa sejtekbe (14. ábra).

Azt találtuk, hogy a markáns S fázis csökkenést okozó vegyületek (**6a**, **6b**) igen jelentősen és koncentrációfüggően gátolják a BrdU sejtekbe történő beépülését. A két vegyület már 3 μ M mellett is jelentősen csökkentette a BrdU⁺ sejtek arányát, a gátlás mértéke meghaladta az azonos koncentrációban (10 μ M) alkalmazott ciszplatin hatását. Ebből arra következtethetünk, hogy **6a** és **6b** direkt módon gátolja a DNS szintézisét. A **6c** és **6d** ezirányú hatása – bár szignifikánsnak bizonyult – kevésbé volt számottevő.



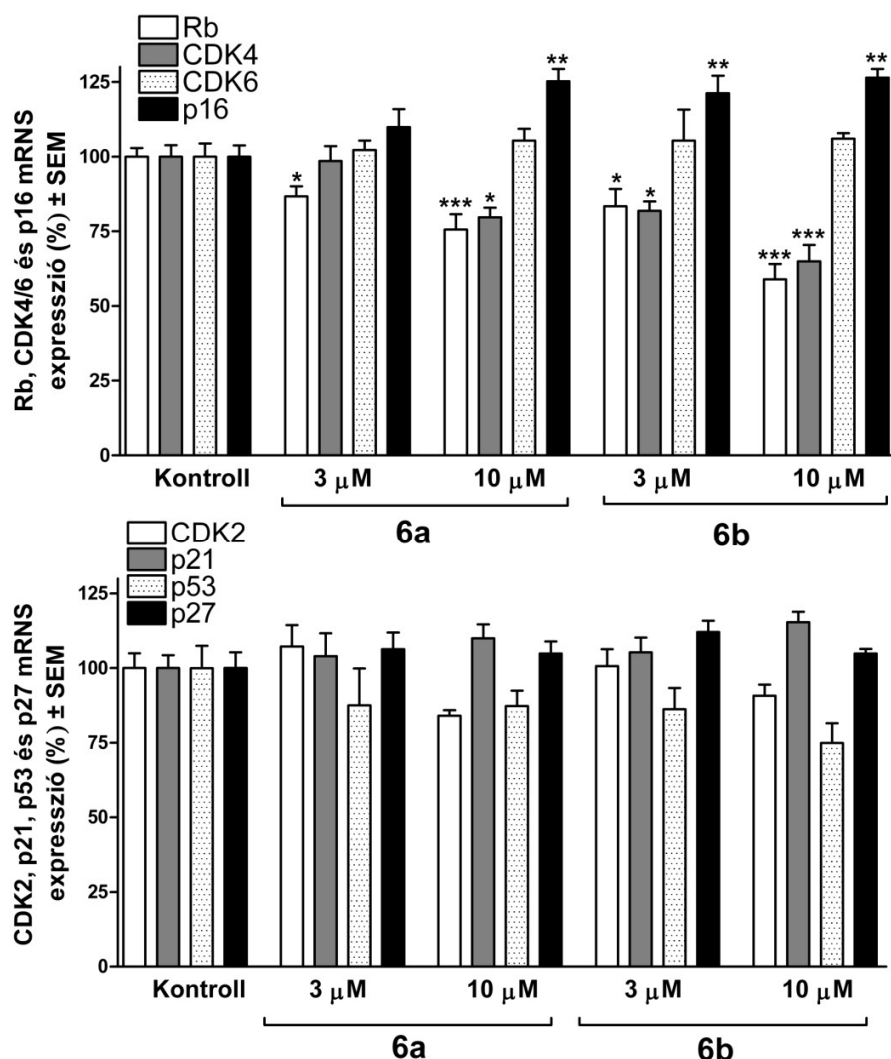
14. ábra A **6a–d** vegyületek hatása a BrdU HeLa sejtek sejtekbe történő beépülésére 24 órás kezelés esetén. n: 5, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A sejtciklus-analízis során leírt szubG1 emelkedés az apoptózis egyik markere, ám a jelenség további bizonyítására meghatároztuk a kaspáz-3 aktivitását a két hatékonyabb (**6a**, **6b**) vegyülettel végzett kezelés után (15. ábra). Mindkét farmakon fokozta a végrehajtó enzim aktivitását. Míg a **6b** koncentrációfüggően aktiválta a kaspáz-3-t, a **6a** 10 μ M mellett idézte elő a maximális választ, 30 μ M jelenlétében alacsonyabb aktivitást mértünk, ami az apoptózistól független sejtpusztulással függhet össze.



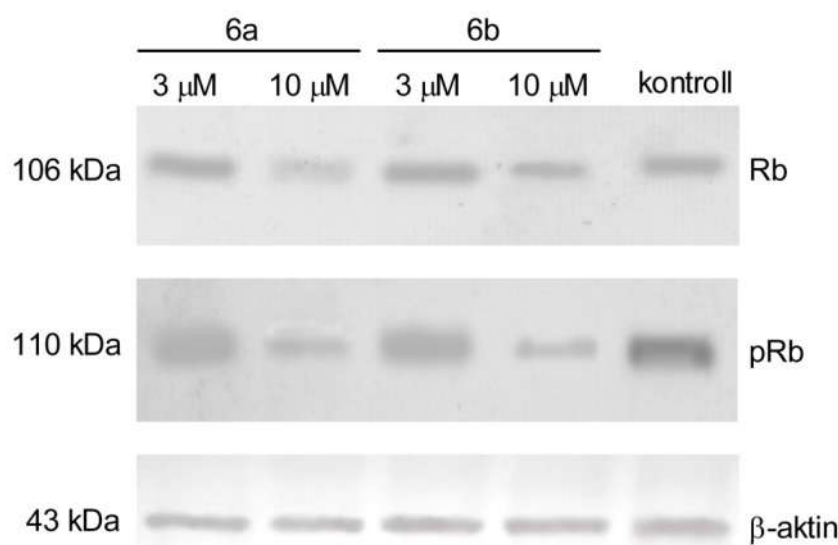
15. ábra A **6a** és **6b** vegyületek hatása a kaspáz-3 aktivitásra HeLa sejtek 24 órás kezelés után. n: 4, ***: $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Szintén a sejtciklus-analízis és a BrdU beépülés eredményei alapján indokoltnak láttuk meghatározni a G1→S átmenetet kontrolláló faktorok kifejeződését mRNS szinten. A tumorszuppresszorként ismert p16 expresszióját mindkét vegyület növelte, a **6b** már 3 μM esetén is. 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 (16. ábra).



16. ábra A **6a** és **6b** vegyületek hatása a kiválasztott reguláló faktorok mRNA-szintű expressziójára HeLa sejtek 24 órás kezelés után. n: 4, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Mivel az Rb szabályozó funkciója foszforilációhoz kötött és a poszttranszlációs módosulás nem detektálható PCR technikával, meghatároztuk a faktor protein szintű expresszióját is (17. ábra). 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 (Sunley és Butler, 2010).

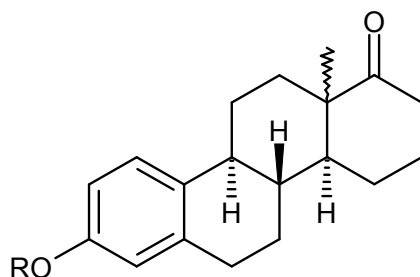


17. ábra A **6a** és **6b** vegyületek hatása a retinoblasztóma protein (Rb) és annak foszforilált formájának (pRb) fehérje-szintű expressziójára HeLa sejtek 24 órás kezelés után.

5.1.3. Homoösztroon származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata

A D-gyűrűben bővített ösztroon analógok antiproliferatív hatása a szerkezetileg rokon 2ME ezirányú ismert tulajdonsága kapcsán merült fel. A D-homoösztroonról és származékairól kevés farmakológiai adat áll rendelkezésre, ösztrogén receptorhoz mutatott affinitásuk elenyésző, így hormonális hatást várhatóan nem hordoznak (Wölfling *et al.*, 2003). Vizsgálataink a D-homoösztroon (**7a**), 3-metil-étere (**7c**), ill. mindkét vegyület 13-epimerének (**7b**, **7d**) nőgyógyászati eredetű adherens sejtvonalakon végzett tesztelésével kezdődtek (18. ábra).

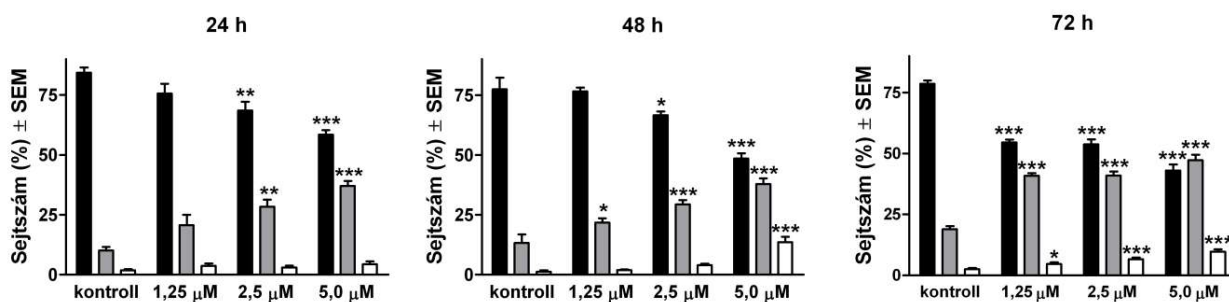
A **7b–d** vegyületek egyik sejtvonalon sem fejtettek ki 50%-ot elérő proliferáció gátlást a 0,3–30 μM tartományban. Ezzel szemben a D-homoösztroon (**7a**) a ciszplatinnal összevethető hatást fejtett ki a HeLa sejtekre, míg a többi alkalmazott sejtvonal (MCF7, Ishikawa, C33A és SiHa) növekedését jelentősen nem befolyásolta. Mivel **7a** az MRC-5 fibroblaszt sejtek proliferációját sem gátolta, annak hatása HeLa sejtvonalra szelektívnek mondható. További vizsgálatokat csak ez utóbbi vegyülettel végeztünk (Minorics *et al.*, 2012, Minorics *et al.*, 2015).



Vegyület	R ₁	a 13-Me térállása	Számított IC ₅₀ érték (μM)					
			HeLa	MCF7	Ishikawa	C33A	SiHa	MRC-5
7a	H	β	5,5	>30	21,2	>30	>30	>30
7b	H	α	>30	>30	>30	–	–	–
7c	Me	β	>30	>30	>30	–	–	–
7d	Me	α	>30	>30	>30	–	–	–

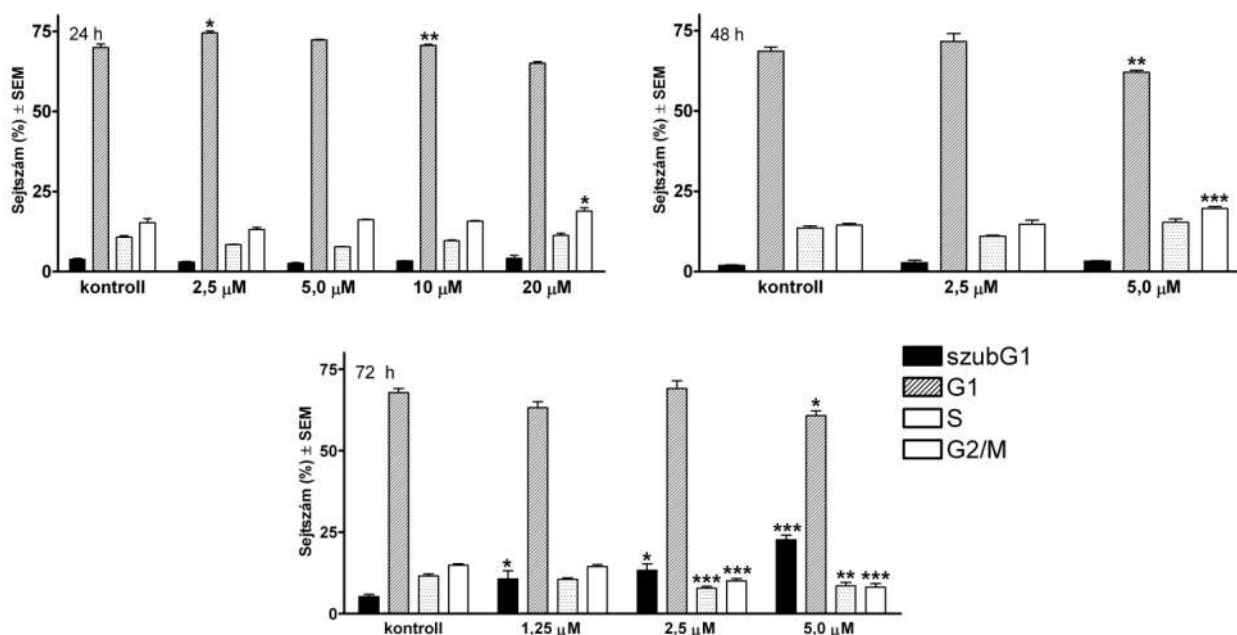
18. ábra A D-homoösztron és vizsgált származékainak (**7a–d**) kémiai szerkezete és számított IC₅₀ értékei. C33A, SiHa és MRC-5 fibroblaszt sejteken csak a **7a** hatását vizsgáltuk.

A **7a** vegyület sejtmorfológiájára gyakorolt hatását fluoreszcens kettős festéssel jellemeztük, 1,25–5 μM tartományban, 24–72 órás behatási idővel (19. ábra). Azt találtuk, hogy a vegyület idő- és koncentrációfüggő módon növeli a korai, ill. a késői apoptotikus sejtek arányát az intakt sejtek rovására. 24 órás kezelés után már 2,5 μM mellett felszaporodnak a nukleáris kondenzációt mutató sejtek, membránkárosodást viszont 5 μM hatására sem tapasztaltunk. 72 órás behatás után már 1,25 μM is kiváltotta a késői apoptózisra jellemző PI pozitív sejtek számának fokozódását.



19. ábra A **7a** vegyület hatása HeLa sejtek morfológiájára Hoechst 33258 – PI festéssel 24, 48 és 72 órás kezelést követően. ■: intakt sejtek, ■: korai apoptotikus sejtek, □: késői apoptotikus/sejtek. n: 3, *, **, ill. ***: p<0,05, p<0,01 ill. p<0,001 a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A **7a** hatásának kvantitatív jellemzésére mindhárom inkubációs idő után elvégeztük a sejtciklus-analízist (20. ábra). Rövid – 24 és 48 órás – behatás során a legjellemzőbb eredmény a G2/M populáció emelkedése, jóllehet ehhez 24 óra után 20 μM -ra volt szükség. Fokozott hipodiploid állományt csak 72 órás kezelés hatására észleltünk, ekkor viszont már a legkisebb koncentráció (1,25 μM) is jelentősen növelte a szubG1 populációt.

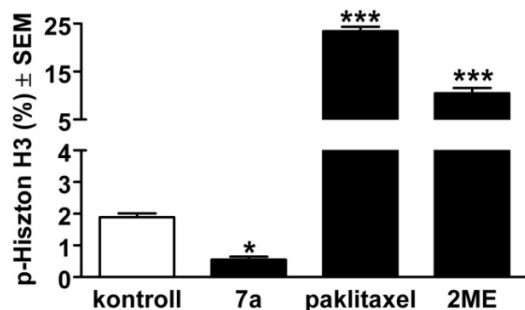


20. ábra A **7a** vegyület hatása a HeLa sejtek sejtciklus-eloszlására 24, 48 és 72 órás behatás esetén. n: 3, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A hipodiploid állomány gyarapodása apoptózis indukcióra, míg az emelkedett G2/M populáció sejtciklus blokádra utal. Megkíséreltük mindkét hatáskomponens mechanizmusát részletgazdagabb módon feltárni.

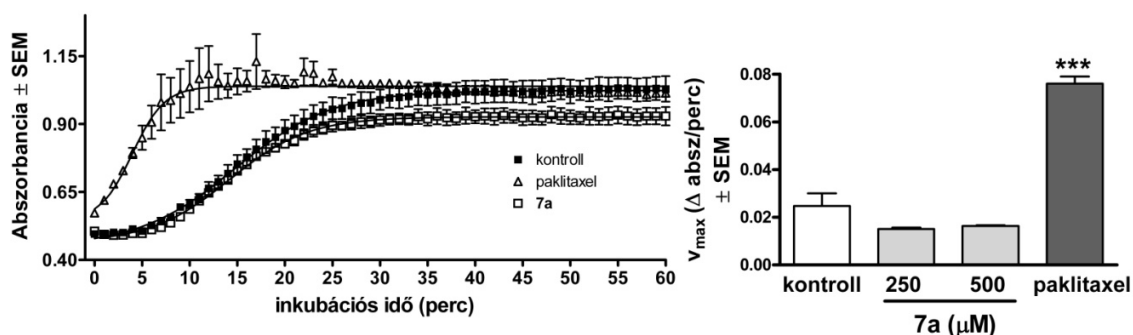
Mivel a PI jelöléssel nem különíthető el a G2 és M fázis, egy M fázisra szelektív markerrel, anti-foszfo-hisztón H3 (Ser10) ellenanyaggal kombináltuk a 20 μM **7a** vegyülettel 24 órán át inkubált HeLa sejtek PI jelölését. Referenciavegyületeként alkalmaztuk a tumorsejteken – így HeLa sejteken is – G2/M kumulációt okozó paklitaxelt (Michalakakis *et al.*, 2005). A 2ME-ről szintén leírták a sejtciklus hasonló blokádját, így ezt a vegyületet is pozitív kontrollként alkalmaztuk a vizsgálatban (Li *et al.*, 2004). Az anti-foszfo-hisztón H3 ellenanyagra pozitív sejteket tekintettük M fázisú állománynak. Azt találtuk, hogy a **7a** szignifikánsan csökkenti az M

populációt, míg a paklitaxel (5 nM) és a 2ME (5 μ M) – a várt eredményeknek megfelelően – fokozta az M fázisban lévő sejtek arányát (21. ábra).



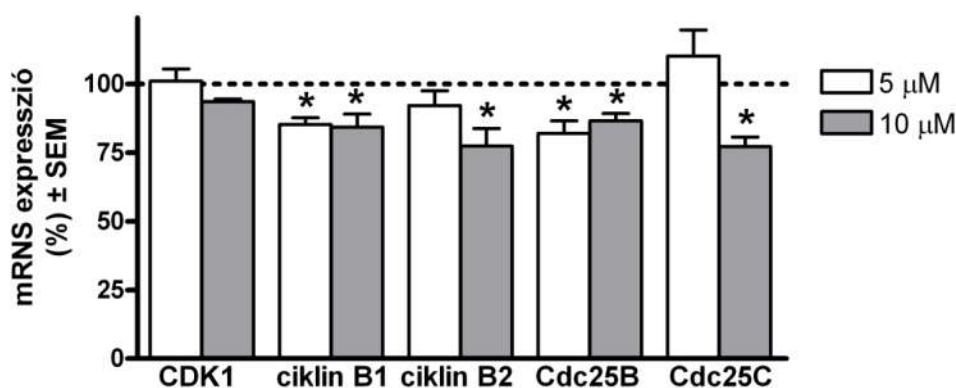
21. ábra A 7a vegyület hatása az M fázis arányára HeLa sejteken 24 órás kezelés után. n: 3, *, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Mivel a mitotikus sejtek arányának csökkenése elvben betudható a tubulin polimerizációra kifejtett közvetlen hatásnak is, célszerűnek tűnt megvizsgálni ezt az esetleges hatáskomponenst. A tubulin polimerizációjának sebességét *in vitro* sejtmentes közegben fotometriásan követtük a 7a jelenlétében 1 órán át, paklitaxel referencia mellett. A kapott polimerizációra jellemző görbékből maximális sebesség értékeket (V_{max}) számítottunk. A rögzítés első 30 percében a paklitaxel jelentősen gyorsította a tubulin polimerizációját, növelte a görbe meredekségét, ami megmutatkozott a számított V_{max} értékben (22. ábra). Ezzel szemben 250 és 500 μ M 7a mellett a kapott kinetikus görbék gyakorlatilag egybeesnek a kontrollal, a V_{max} értékek nem térnek el szignifikáns mértékben a kontrolltól. Ezek alapján megállapítható, hogy a 7a nem hat direkt módon a tubulin polimerizációjára.



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

Meghatároztuk a G2/M fázisátmenet kiemelt regulációs faktorainak mRNS-szintű expresszióját. Az átmenetben kulcsszerepet játszik a CDK1 és a ciklin B komplexe, amit a Cdc25 proteinek defoszforiláció útján regulálnak. Azt találtuk, hogy 10 μ M **7a** jelenlétében a CDK1 kivételével valamennyi vizsgált faktor expressziója csökkent (23. ábra).



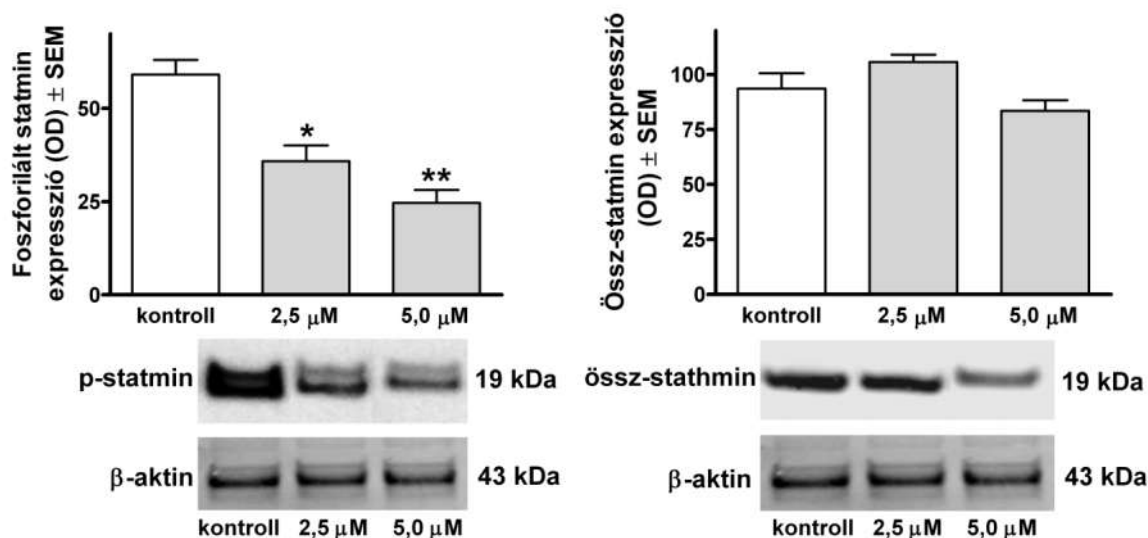
23. ábra A **7a** vegyület hatása a G2→M átmenet regulátorainak kifejeződésére 48 órás inkubáció után. n: 6, *: $p < 0,05$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

A CDK1 egyik célpontja a tubulin polimerizációt szabályozó statmin, ami foszforiláció után elveszíti a tubulint szekvesztráló, ezáltal a mikrotubulusok képződését gátló hatását. Mivel a statmin aktivitása a foszforilációjának függvénye, expressziójának meghatározását proteinszinten volt célszerű elvégezni. 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 (24. ábra).

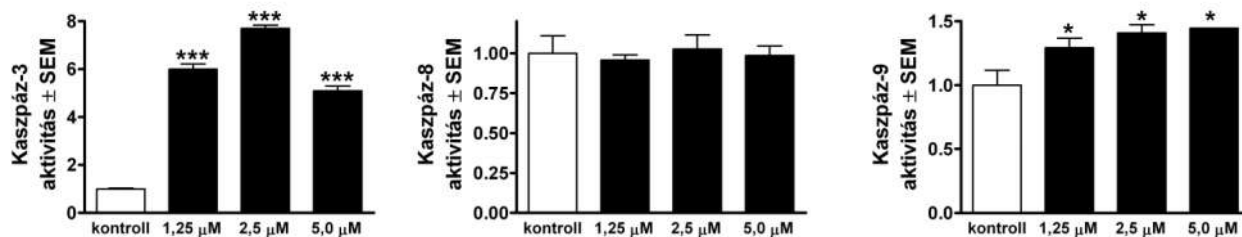
A **7a** proapoptotikus hatásának bizonyítására meghatároztuk a HeLa sejtek kaspázainak aktivitását 72 órás inkubáció után. A kaspáz-3 igen jelentős mértékben aktiválódott, maximális értéket 2,5 μ M mellett mutatott. Jóval szerényebb mértékű, de szignifikáns aktiválódást mutatott a kaspáz-9, míg a kaspáz-8 aktivitása változatlan maradt (25. ábra).

Jóllehet a **7a** vegyület receptorkötési tulajdonságai alapján nem várható jelentős ösztrogénhatás, az esetleges metabolitok ezirányú hatásának kimutatására *in vivo* uterotróp tesztet végeztünk ovariectomizált patkányon. A tesztanyag napi dózisa 10–50 μ g volt, a referenciaként

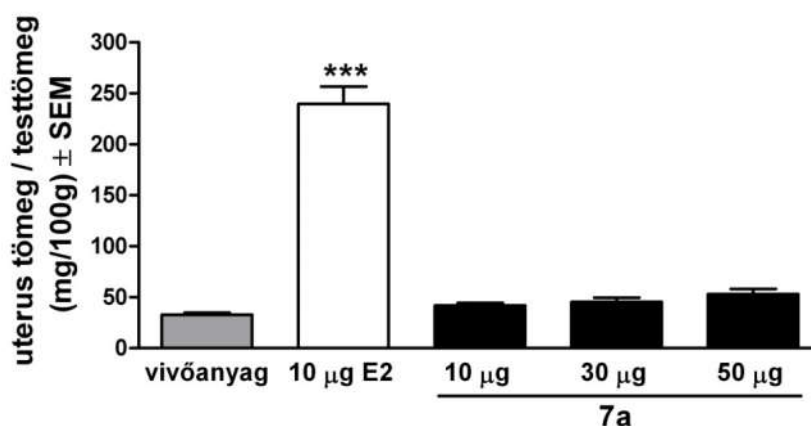
szolgáló 17β -ösztradiolt (E2) $10\text{ }\mu\text{g/nap}$ adagban adtuk. Az állatok testtömegre normalizált uterustömege E2 hatására többszöröződött, míg a **7a** a legnagyobb alkalmazott adagban sem fejtett ki uterotróp hatást (26. ábra).



24. 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.



25. ábra A **7a** vegyület hatása a HeLa sejtek kaspáz-3, -8 és -9 aktivitásaira 72 órás inkubáció után. n: 5, *, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.



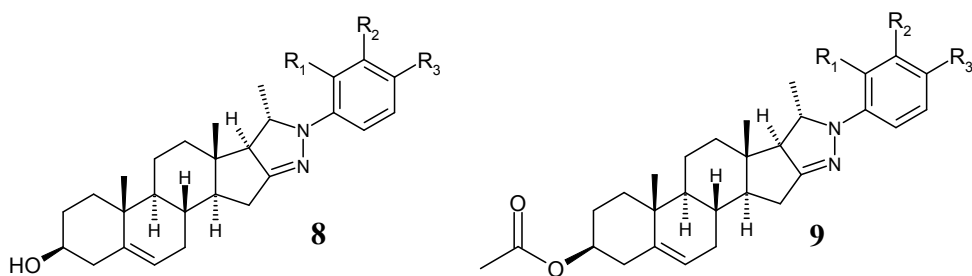
26. ábra A **7a** vegyület hatása ovariectomizált patkányok uterustömegére 7 napos szubkután kezelés után. n: 5, ***: $p < 0,001$ a vivőanyaggal kezelt állatokhoz viszonyítva.

5.1.4. Szolanidin analógok antiproliferatív hatásának vizsgálata

A szteroid alkaloidok a legintenzívebben kutatott természetes vegyületek egyik csoportját képezik. A szolanidin analógokra vonatkozó vizsgálatainkat egy vegyületkönyvtár 3 adherens sejtvonalon történő tesztelésével kezdtük (27. ábra).

A tesztanyagok egy részét 3-acetilezett formában is vizsgálatuk (**9a–f**), ám ez az észterezés általában rontotta a hatást. A pirazolinra épített szubsztituátlan fenilcsoport (**8a**, **9a**) hatástalan vegyületet eredményezett, míg a leghatékonyabbnak a *para*-metoxi-szubsztituált származékot (**8c**) találtuk. Ez utóbbi anyag IC_{50} értéke mindhárom sejtvonalon alacsonyabb volt, mint a referenciaként használt ciszplatiné. A három alkalmazott sejtvonal közül a HeLa bizonyult a legérzékenyebbnek (Frank *et al.*, 2009).

Kiválasztott vegyületekkel (**8b–e**, **8g**, **8h**, **9b**, **9d**, **9g**) HeLa sejteket kezeltünk 24 órán át, majd sejtciklus-analízist végeztünk (28 ábra). A legjellemzőbb hatás a szubG1 állomány felhalmozódása volt (**8b–e**, **8h**), amit a **8d** már 10 µM mellett is kiváltott. A **9g** nem okozott szubG1 növekedést, viszont jelentősen emelte a G2/M állományt a G1 rovására, ami a sejtciklus blokádjára utal (Zupkó *et al.*, 2014).

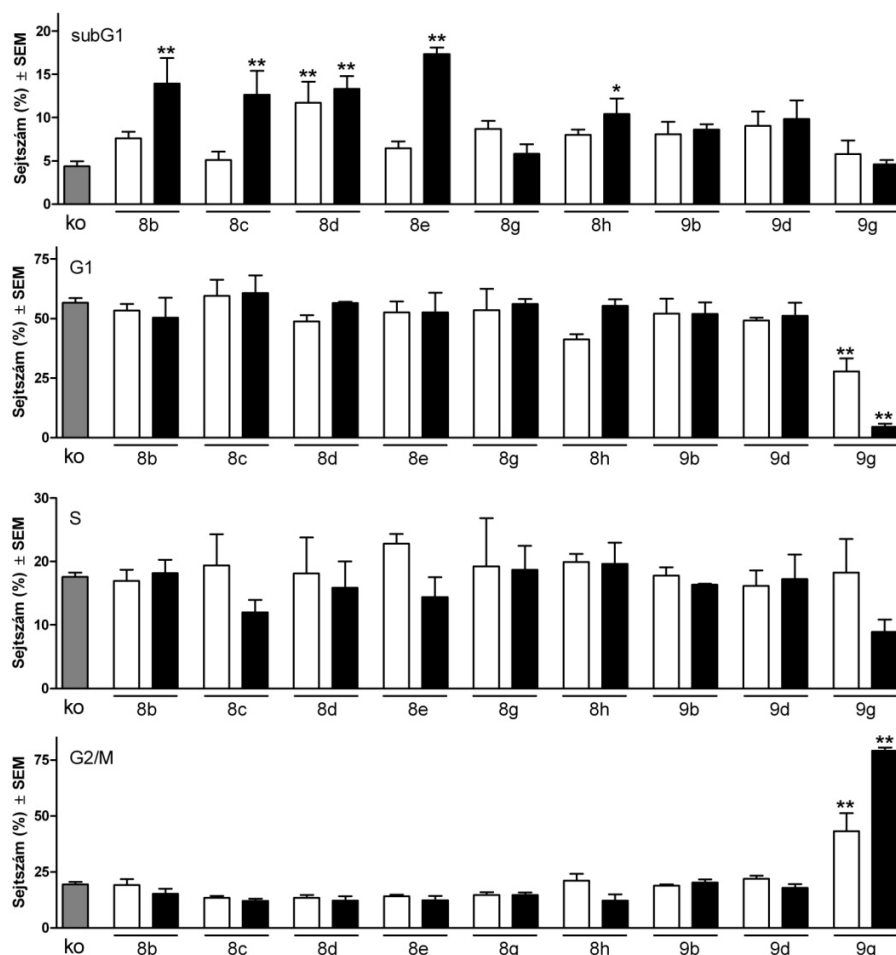


Vegyület	R ₁	R ₂	R ₃	Számított IC ₅₀ (μM)			FA	
				HeLa	MCF7	A431	40 μM	400 μM
8a	H	H	H	>30	>30	27,9	36,3 ± 9,6	14,3 ± 1,2
8b	–CH ₃	H	–CH ₃	7,4	11,9	7,9	30,6 ± 10,1	44,9 ± 16,1
8c	H	H	–OCH ₃	2,0	2,2	1,4	40,7 ± 13,8	2,3 ± 0,4
8d	H	H	–OCF ₃	3,2	24,7	>30	2,9 ± 1,8	10,2 ± 2,8
8e	H	H	–CN	2,5	3,5	7,9	169,6 ± 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	–	

27. 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.

Mivel egyes szteroid alkaloidok (pl. ciklopamin, tomatidin) gátolták a transzporterek által kiváltott multidrog rezisztenciát, vizsgáltuk vegyületeink ezirányú hatását rodamin akkumulációs teszttel (Lavie *et al.*, 2001). Azt találtuk, hogy a **9d** és **9f** kivételével valamennyi vegyület nagyságrenddel emelte az ABCB1 transzportert expresszáló, transzfektált (MDR) egérlimfóma

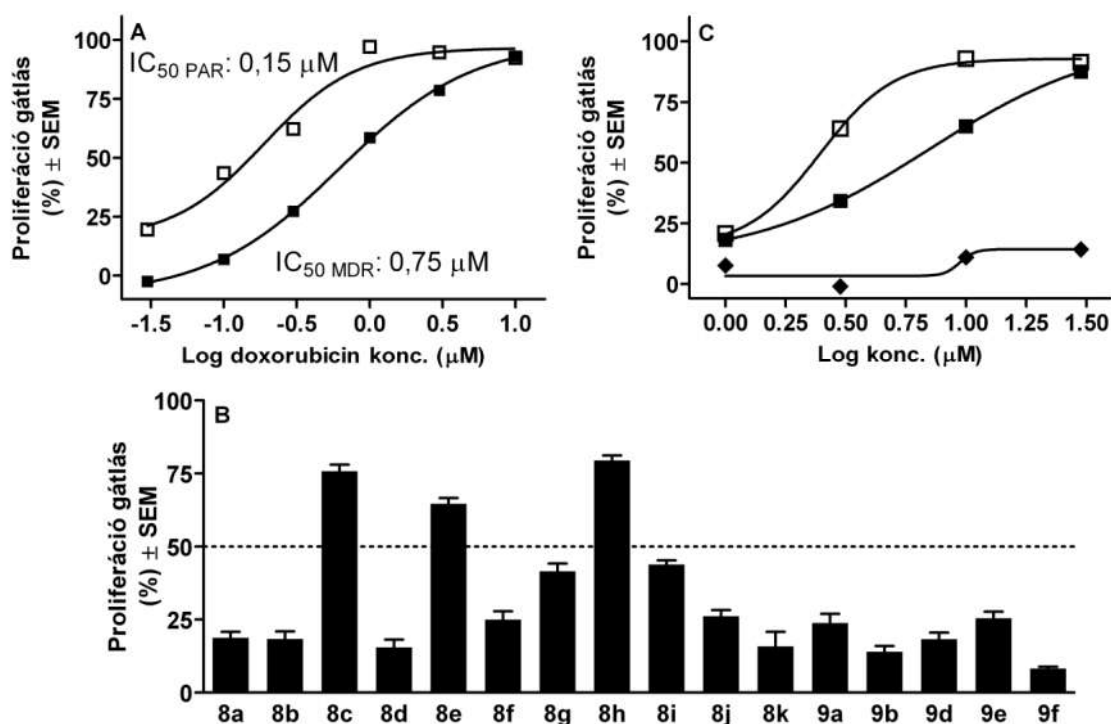
sejtek rodamintartalmát. A fluoreszcencia arány (FA) a referenciaként alkalmazott verapamil esetében $5,4 \pm 1,9$ volt (27. ábra).



28. ábra A kiválasztott szolanidin származékok (8b–e, 8g, 8h, 9b, 9d, 9g) hatása a HeLa sejtek sejtciklus-eloszlására 24 órás behatás esetén 10 μM (□) és 30 (■) μM koncentrációban. n: 3, *, ill. **: p<0,05, ill. p<0,01 a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Annak eldöntésére, hogy egy-egy vegyület jelentős FA értéke mennyiben jelenti a rezisztencia revertálását, kombinációs kísérleteket végeztünk az ABCB1 transzporter szubsztrátjával, a doxorubicinnel (Zupkó *et al.*, 2014). Meghatároztuk a doxorubicin antiproliferatív hatását parentális (PAR) és MDR sejteken (29. ábra). A két koncentráció-hatás görbe között jelentős eltérést találtunk, így az ABCB1 valóban biztosítja a doxorubicinnel szembeni rezisztenciát. Ezek után 0,1 μM doxorubicin és 5 μM 8a–k, 9a, 9b, 9d–f

kombinációival elvégeztük a 72 órás MTT tesztet. A doxorubicin önmagában szerény hatást fejt ki, amit jelentős mértékben – 50% fölötti proliferáció gátlást okozva – csak 3 vegyület potenciált: **8c**, **8e** és **8h**. Ezek közül az első kettő jelentős intrinszik hatással rendelkezik, míg a **8h** még 30 μM -ban sem befolyásolja jelentősen a multidrug rezisztens egérlimfóma sejtek viabilitását (29. ábra). Ezek alapján megállapítható, hogy az egyik szolanidin analóg (**8h**) saját antiproliferatív hatás nélkül fokozza a rezisztens sejtek rodaminfelvételt és fokozza a doxorubicin antiproliferatív tulajdonságát.



29. ábra A doxorubicin hatása a PAR ($\square$) és MDR ($\blacksquare$) egérlimfóma sejtek proliferációjára (A). 5 μM **8a–4**, **9a**, **9b** és **9d–f** és 0,1 μM doxorubicin kombinációjának hatása MDR egérlimfóma sejtek proliferációjára (B). A **8c** ($\square$), **8e** ($\blacksquare$) és **8h** ($\blacklozenge$) vegyületek hatása egérlimfóma sejtek proliferációjára, n: 5 (C).

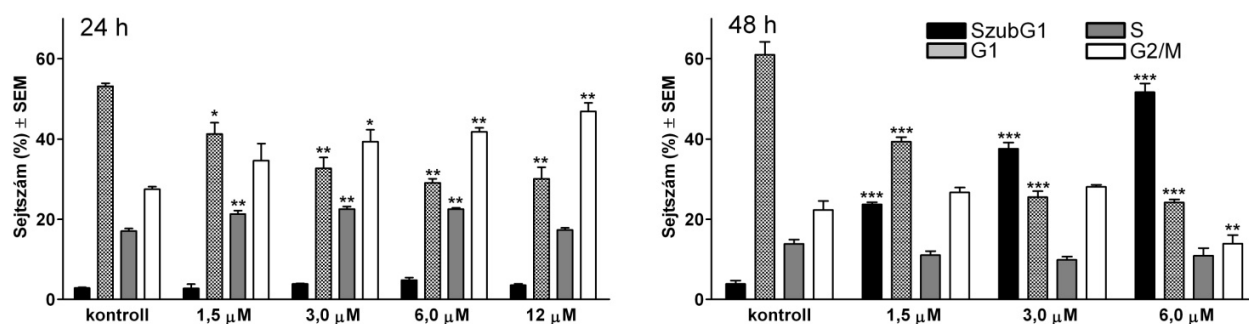
A szolanidinnel rokon szerkezetű szteroid alkaloidok leukémia sejteken is proapoptotikusnak bizonyultak, ezért vizsgálatainkat – a vegyületsor egyes elemeivel – kiterjesztettük leukémia-ellenes hatás irányába (Sun *et al.*, 2010). Három kiválasztott vegyület – **8c**, **9a** és **9g** – antiproliferatív hatását határoztuk meg HL-60 sejtek számolásával 48 és 72 órás kezelés után (6. táblázat). A leghatékonyabbnak talált **8c** tumorszelektivitásának jellemzésére

meghatároztuk az MRC-5 fibroblasztokra gyakorolt antiproliferatív hatását MTT módszerrel és 17,0 μM IC_{50} értéket kaptunk. További vizsgálatainkat ezzel a vegyülettel végeztük (Minorics *et al.*, 2011).

6. táblázat A **8c**, **9a** és **9g** antiproliferatív vegyületek hatása HL-60 leukémia sejtvonalon.

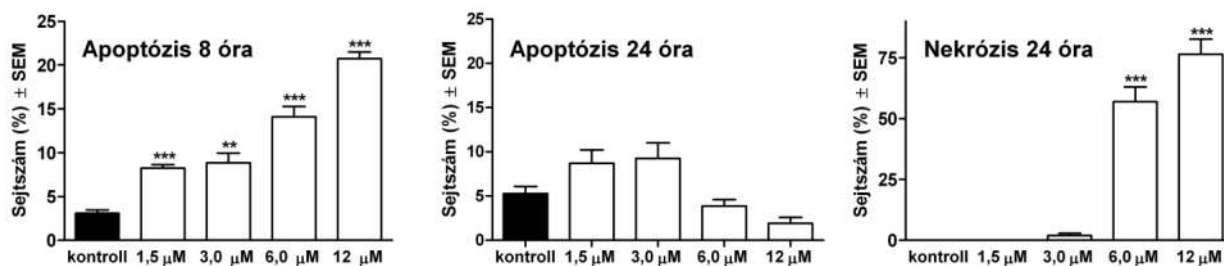
	Számított IC_{50} (μM)	
	48 h	72 h
8c	1,7	1,3
9a	5,5	2,9
9g	7,6	2,4

A **8c** sejtciklusra gyakorolt hatását 24 és 48 órás kezelések után határoztuk meg (30. ábra). Rövid inkubáció után nem tapasztaltunk eltérést a szubG1 populációban, ugyanakkor koncentrációfüggően emelkedett a G2/M állomány a G1 fázis rovására. Hosszabb expozíció esetén markáns emelkedést észleltünk a hipodiploid állományban.



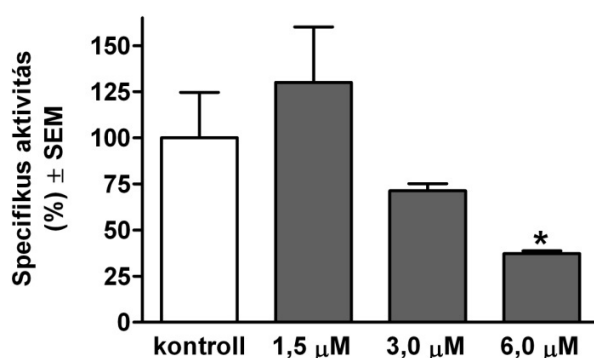
30. ábra A **8c** vegyület hatása a HL-60 sejtek sejtciklus-eloszlására 24 és 48 órás behatás esetén. n: 3, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Az apoptózis további igazolására elvégeztük a morfológiai vizsgálatot a korábban is alkalmazott kettős festéssel. A **8c** már 8 óra alatt kiváltotta az apoptózisra jellemző nukleáris kondenzációt, ugyanakkor a sejtmembrán károsodását – PI festődést – nem észleltük (31. ábra). 24 óra elteltével az apoptotikus állomány döntő része nekrotikus küllemet mutatott, a membránkárosodás mértéke koncentrációfüggőnek bizonyult.



31. 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.

HL-60 sejteken több természetes vegyület, ill. azok származékai által kiváltott apoptózist összefüggésbe hozták a ribonukleotid reduktáz aktivitásának csökkenésével, így célszerűnek tűnt megvizsgálni a **8c** ezirányú hatását (Madlener *et al.*, 2010). Azt találtuk, hogy a vegyület 24 órás inkubáció után 6 μM jelenlétében jelentősen csökkentette a [14 C]citidin beépülését a DNS-be, ami az enzim gátlására utal (32. ábra).



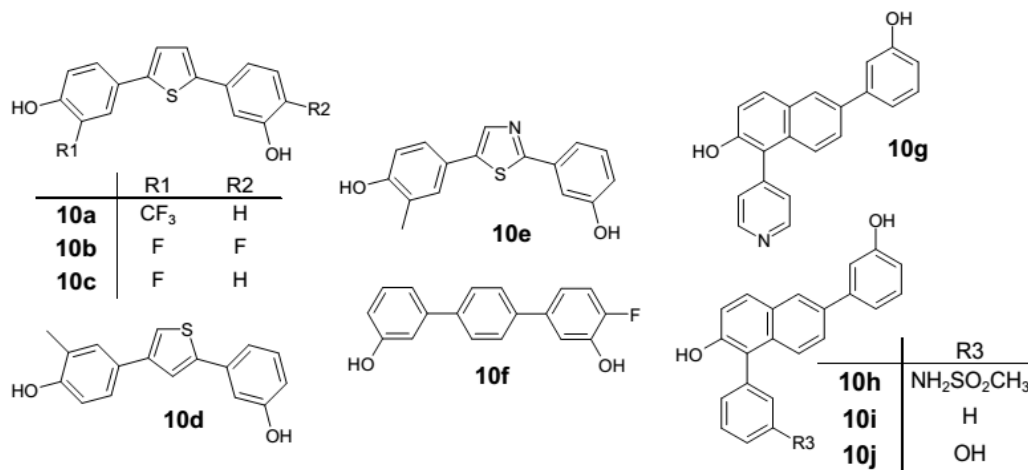
32. ábra A **8c** vegyület hatása a [14 C]citidin beépülésére HL-60 sejtek DNS állományába 24 órás kezelés után. n: 3, *: $p < 0,05$.

A ribonukleotid reduktáz egy különleges enzim: tirozil gyököt tartalmaz, ami nélkülözhetetlen a katalitikus tulajdonsághoz, így aktivitása antioxidánsokkal befolyásolható (Stubbe és Riggs-Gelasco, 1998). Meghatároztuk a **8c** antioxidáns ill. szabadgyökfogó aktivitását *in vitro* sejtmentes rendszerekben. Előbbihez állati agyhomogenizátum spontán autooxidációjának gátlását vizsgáltuk, a gyökfogó potenciál mérésére DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) módszert alkalmaztunk. Tesztanyagunk mindkét hatással rendelkezett; a patkányagy telítetlen lipidjeinek oxidációját 2,0 μM-os IC₅₀ értékkel gátolta, míg a DPPH teszten 13,1 μM IC₅₀ értéket kaptunk. Ugyanezen módszerekkel mérve a referenciaként szolgáló trolox –

a tokoferol vízdoldékony származéka – IC_{50} értéke $48,2 \mu M$, ill. $21,6 \mu M$ volt. Ezek alapján a **8c** antiproliferatív effektusában feltehetően szerepet játszik annak antioxidáns tulajdonsága, ill. az abból származó ribonukleotid reduktazt bénító hatása.

5.1.5. 17β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásának vizsgálata

A vizsgálatba vont 17β -HSD1 inhibitor (17β -HSD1I) vegyületek szteroidomimetikumok, tervezésének eredeti célja az E2 lokális termelődésének gátlása, ezáltal hormonfüggő kórképek befolyásolása volt (Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011). Mivel az ilyen kórképek többségére jellemző a proliferáció, az esetleges direkt antiproliferatív hatás hozzájárulhat a várt terápiás értékhez. Tíz potenciális 17β -HSD1I (**10a–j**) direkt antiproliferatív tulajdonságát vizsgálatuk nőgyógyászati eredetű sejtvonalainkon (33. ábra). Hét vegyület mutatott számottevő aktivitást, a legérzékenyebben a HeLa sejtek reagáltak a kezelésre (Berényi *et al.*, 2013b). Ezek vizsgálatát – az esetleges szteroidfüggő hatás kimutatására – megismételtük szteroidmentesített médiumban, valamint a tumorszelektivitás jellemzésére ezúttal is MRC-5 fibroblasztokat alkalmaztunk (7. táblázat).



33. ábra. A vizsgált 17β -HSD1 inhibitorok (**10a–j**) kémiai szerkezete.

A szteroidmentesített médiumban tendenciaszerűen magasabb IC_{50} értékeket kaptunk, ám az eltérés nem nagyságrendnyi, így feltételezzük, hogy az antiproliferatív hatás létrejöttében az ösztrogének metabolizmusára gyakorolt hatás nem játszik szerepet. Az intakt fibroblasztok proliferációját egyik aktív vegyület sem befolyásolta jelentősen $30 \mu M$ végkoncentrációig. A

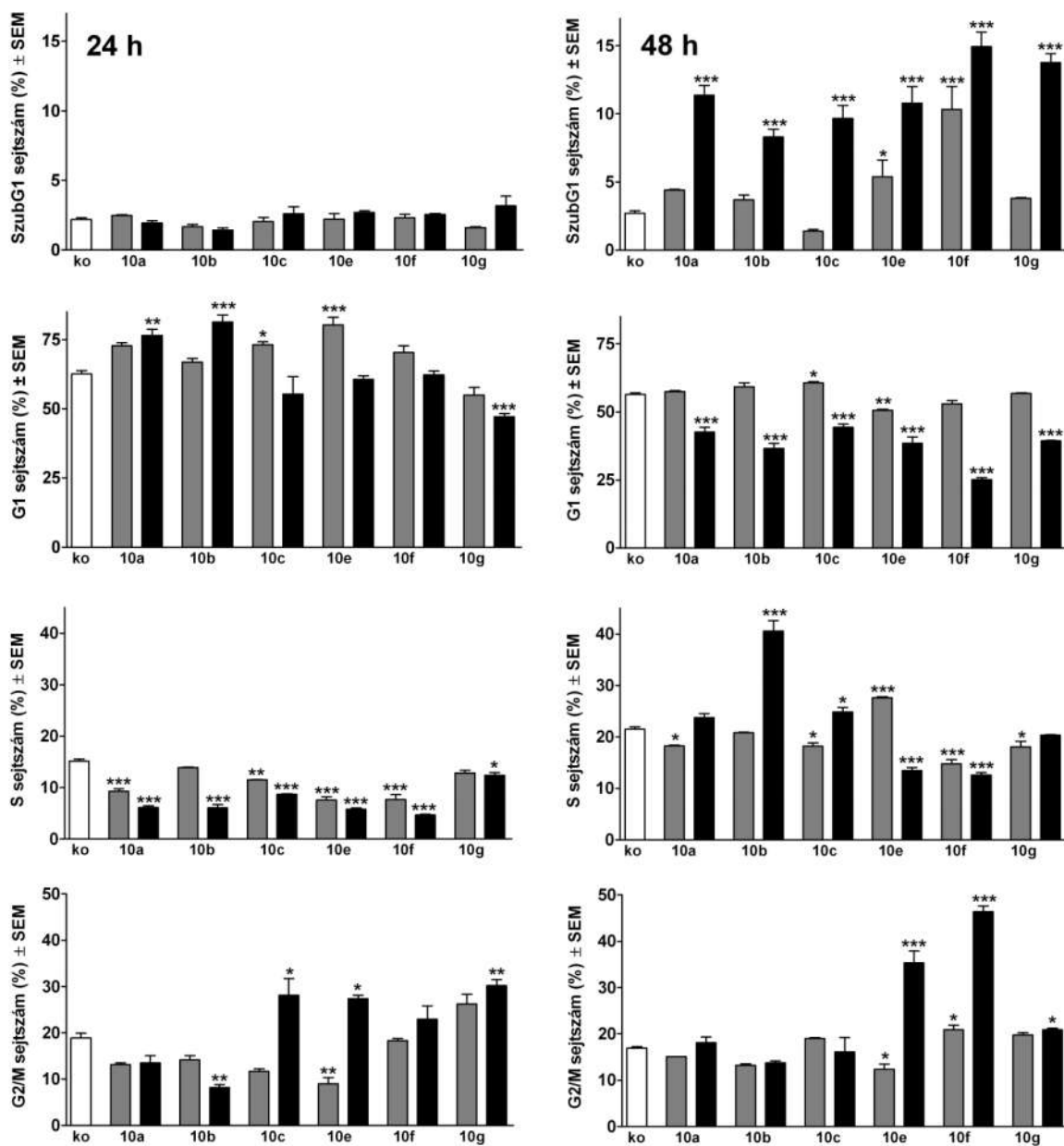
standard médiumban HeLa sejtvonalon 10 μM alatti IC_{50} értéket adó vegyületekkel (**10a–c**, **10e–g**) végeztünk sejtciklus-analízist 24 és 48 órás inkubáció után (34. ábra).

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

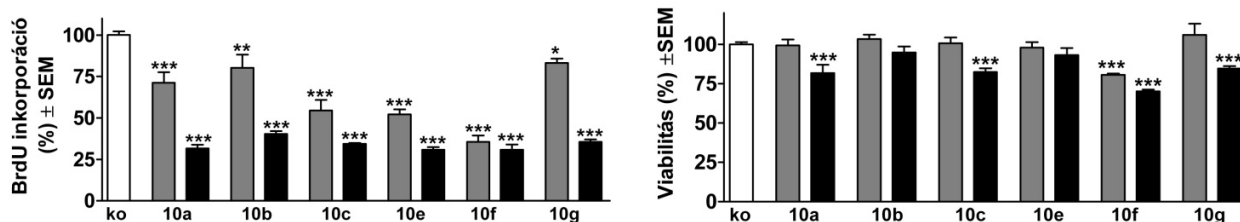
Vegyület	Számított IC_{50} érték (μM)					
	HeLa		MCF7		A2780	MRC-5
	standard médium	szteroidmentes médium	standard médium	szteroidmentes médium	standard médium	standard médium
10a	5,3	13,7	25,2	>30	>30	>30
10b	6,8	23,8	13,9	>30	>30	>30
10c	3,8	11,1	16,1	29,4	>30	>30
10d	14,5	>30	>30	>30	>30	>30
10e	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	—

Rövid (24 órás) behatás után a legjellemzőbb hatás a G1 populáció fokozódása és a szintetikus (S) fázis depressziója volt, ami felveti a G1→S fázisátmenet zavarát. Emellett a **10c**, **10e** és **10g** vegyület 10 μM mellett fokozta a G2/M állományt. Hosszabb (48 órás) expozíció legmarkánsabb következménye a hipodiploid állomány felszaporodása volt, a **10e** és **10f** már 3 μM mellett is kiváltotta ezt az efféktust.

A szintetikus fázisban lévő sejtállomány csökkenése miatt ezúttal is indokoltnak láttuk megvizsgálni a tesztanyagok direkt hatását a DNS szintézisére. A BrdU beépülését 24 órás inkubáció után határoztuk meg, ezzel párhuzamosan a kezelt sejtek viabilitását mértük. Valamennyi vegyület igen markáns módon gátolta a BrdU inkorporációt, 10 μM mellett a gátlás mértéke 50% fölötti volt (35. ábra). Ennél jóval kisebb mértékben csökkent a sejtek viabilitása, 10 μM mellett – a **10f** kivételével – a gátlás nem érte el a 25%-ot. Ezek az adatok a DNS szintézis direkt gátlására utalnak.

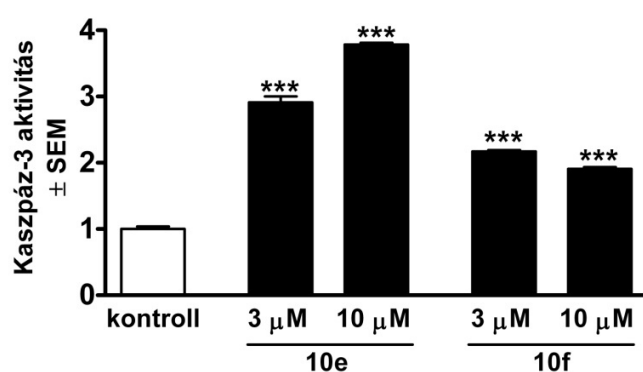


34. ábra A 10a–c és 10e–g vegyületek hatása a HeLa sejtek sejtciklus-eloszlására 24 és 48 órás behatás esetén 3 (■) és 10 (■) μM koncentrációban. n: 3, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz (ko) viszonyítva.

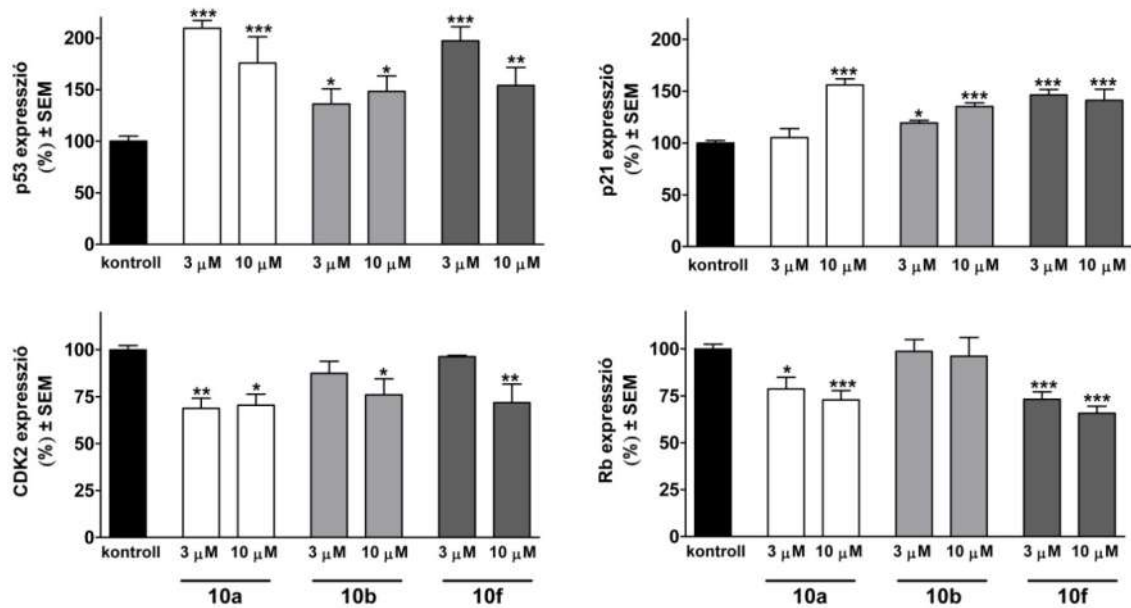


35. ábra A **10a–c** és **10e–g** vegyületek hatása a BrdU beépülésére HeLa sejtek 24 órás 3 (■) és 10 (■) μ M koncentrációban végzett kezelése esetén, ill. a vegyületek hatása a sejtek viabilitására. n: 4, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz (ko) viszonyítva.

További vizsgálatainkat, ill. az azokon alkalmazott tesztanyagokat a sejtciklus-analízis és a BrdU beépülés eredményei alapján jelöltük ki. A legpotensebb szubG1 populációt növelő vegyület – a **10e** és **10f** már 3 μ M esetén is jelentős fokozódást okozott – proapoptotikus hatását kaszpáz-3 meghatározással terveztük igazolni. A DNS szintézis, ill. a szintetikus fázis legerőteljesebb szuppresszoraival kapcsolatban (**10a**, **10b** és **10f**) célszerűnek láttuk meghatározni a G1→S fázisátmenet legfőbb regulátorainak mRNS-szintű expresszióját. Mindkét kiválasztott vegyület jelentősen növelte a kaszpáz-3 aktivitását 48 órás kezelés után (36. ábra). Mindhárom farmakon növelte mindkét vizsgált tumorszuppresszor (p21 és p53) expresszióját, emellett csökkentette a sejtciklus továbbvitelért felelős CDK2 kifejeződését 24 órás kezelést követően (37. ábra). A fázisátmenet végső regulálását végző Rb expresszióját a **10a** és **10f** már 3 μ M mellett is csökkentette, míg a **10b** nem hatott erre a faktorra.



36. ábra A **10e** és **10f** vegyületek hatása a kaszpáz-3 aktivitására HeLa sejtek 48 órás kezelése után. n: 3, ***: $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.



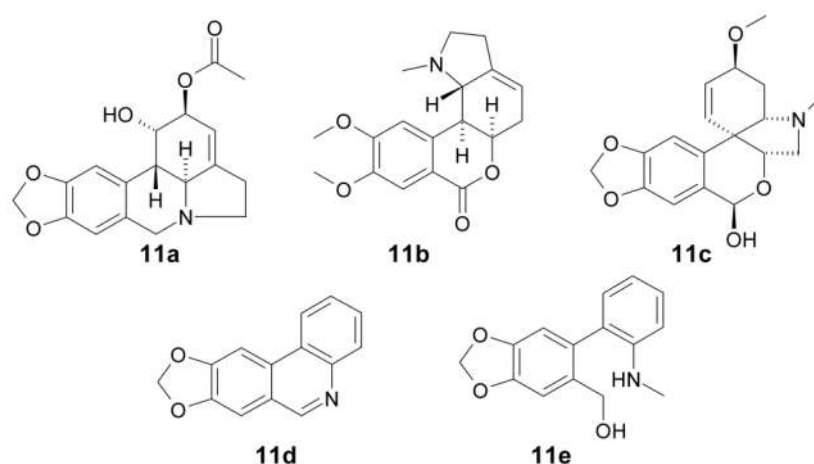
37. ábra A **10a**, **10b** és **10f** vegyületek hatása a G1→S átmenet szabályozó faktorainak mRNS-szintű expressziójára 24 órás kezelése után. n: 5, *, **, ill. ***: $p < 0,05$, $p < 0,01$, ill. $p < 0,001$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

5.2. Növényi eredetű tartalomanyagok antiproliferatív hatásának vizsgálata

5.2.1. Növényi alkaloidok antiproliferatív hatásának vizsgálata

Az alkaloidok a növényi szervezetek szekunder metabolitjai, a közös szerkezeti elemek mellett – ilyen a bázikus nitrogén és heterociklusos építőelem jelenléte – jellemzőjük még a széles spektrumú farmakológiai aktivitás, amin belül kiemelkedik az élő kórokozóra gyakorolt toxikus hatás. A vizsgálatba vont alkaloidok növényi eredet és kémiai szerkezet alapján 3 csoportba foglalhatók, minden csoportba olyan képviselőket választottunk be, melynek antiproliferatív hatása nem, vagy kevésbé ismert.

Az Amarillidaceae növény család tartalomanyagai nem ismeretlenek a felfedező gyógyszerkutatásban, a változatos farmakológiai aktivitást mutató alkaloidok intenzív vizsgálatok tárgyai. Öt ilyen vegyület antiproliferatív és ABCB1 bénító tulajdonságát határoztuk meg a korábbiakban is alkalmazott sejtvonalakon (38. ábra, 8. táblázat) (Zupkó *et al.*, 2009).



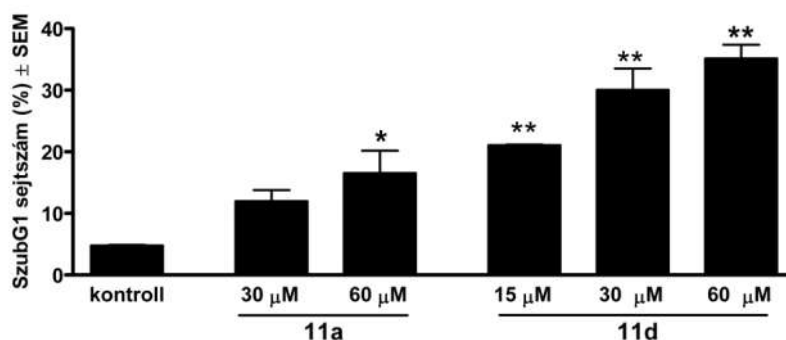
38. ábra A vizsgált Amaryllidaceae alkaloidok kémiai szerkezete.

Minden alkalmazott 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** jelentősen szerényebb mértékben gátolták a proliferációt, míg a **11b** és **11e** gyakorlatilag nem mutatott számottevő aktivitást.

8. táblázat A vizsgált Amaryllidaceae alkaloidok számított IC₅₀ és FA értékei. –: nem vizsgáltuk.

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

A **11a** és **11d** alkaloidok proapoptotikus hatását vizsgáltuk áramlási citometriás úton, HeLa sejten, 24 órás kezelést követően. Mindkét vegyület a koncentráció függvényében növelte a hipodiploid sejtek arányát, jóllehet jelentős, az IC₅₀ értékeket többszörösen meghaladó koncentrációkat alkalmaztunk (39. ábra).

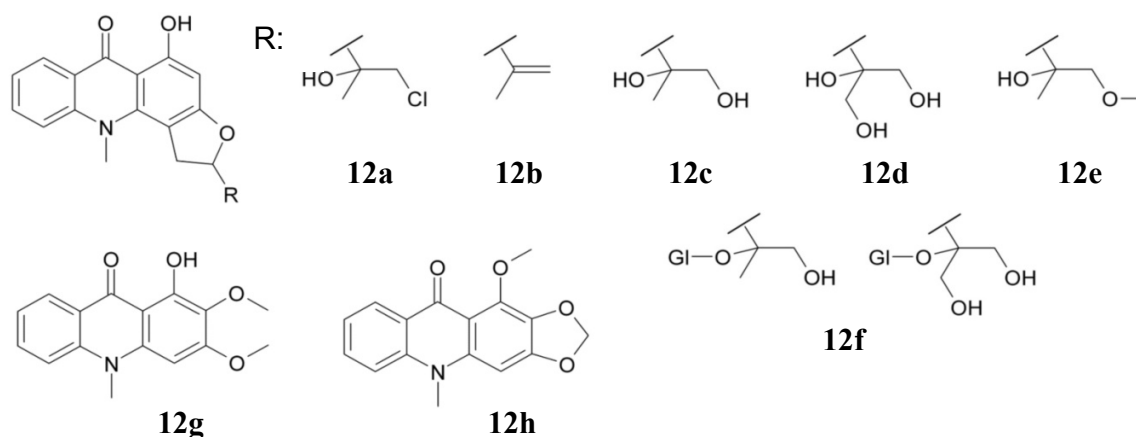


39. ábra A **11a** és **11d** alkaloidok hatása a hipodiploid HeLa sejtek arányára 24 órás behatás esetén. n: 3, * ill. **: p<0,05 ill. p<0,01 a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Vizsgáltuk az alkaloidok rodamin akkumulációra gyakorolt hatását is MDR egérlimfóma sejteken (8. táblázat). Alacsony koncentrációban (40 μM) egyik vegyület sem eredményezett markáns, a referenciaként alkalmazott verapamilét jelentősen meghaladó FA értéket. Magasabb koncentrációban (400 μM) a **11c** és **11d** váltott ki jelentős FA fokozódást. A **11a–d** vegyületek revertáló hatását doxorubicinnel történő kombinációban is értékeltük checkerboard módszerrel, a végpontot MTT-vel határoztuk meg 72 órás inkubáció után. 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.

Az akridonvázak alkaloidok kizárólag a Rutaceae növény családra jellemzőek, élő kórokozókkal szembeni aktivitásaik között beszámoltak egyes képviselőik citotoxikus hatásáról is. A vizsgálatba vont *Ruta graveolens*-ből izolált alkaloidok kettő kivételével (**12g**, **12h**) a farmakológiailag kevésbé feltárt furanoakridon alapvázat tartalmazták (40. ábra).



40. ábra A vizsgált akridonvázak alkaloidok kémiai szerkezete. **12a**: izogravakridon-klorin, **12b**: rutakridon, **12c**: gravakridondiol, **12d**: gravakridontriol, **12e**: gravakridondiol monometil-éter, **12f**: gravakridondiol és gravakridontriol monoglikozidok 1:1 arányú elegye (Gl: glükóz), **12g**: arborinin, **12h**: evoxantin.

Elsőként ezúttal is a vegyületek antiproliferatív hatását határoztuk meg adherens sejtvonalakon (9. táblázat) (Réthy *et al.*, 2007a, Schelz *et al.*, 2016).

9. táblázat A vizsgált akridonvázak alkaloidok számított IC₅₀ értékei. –: nem vizsgáltuk.

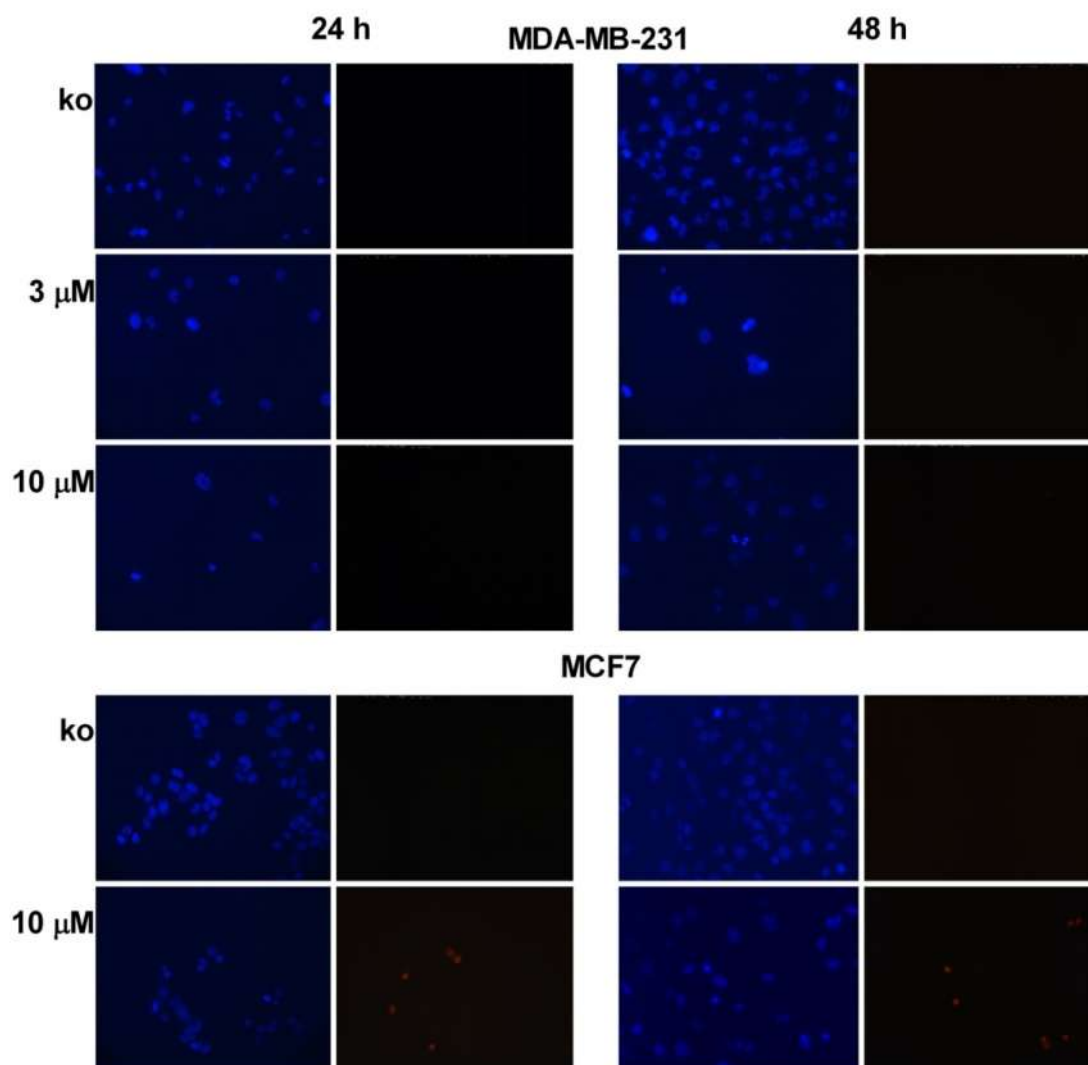
	Számított IC ₅₀ érték (μM)						Log P érték
	MCF7	MDA-MB-361	MDA-MB-231	T47D	HeLa	A431	
12a	4,5	12,2	2,3	12,9	8,4	3,0	-5,11
12b	7,7	>30	27,3	>30	5,3	14,4	-4,99
12c	19,9	>30	23,3	>30	7,9	14,8	-5,09
12d	>30	>30	>30	>30	23,2	27,9	-5,87
12e	13,2	>30	11,6	>30	3,8	12,0	-5,36
12f	>30	>30	>30	>30	>30	>30	-6,36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

Leghatékonyabbnak a **12a** vegyületet találtuk. Az alkaloidok összességében a HeLa sejtvonalra gyakorolták a legmarkánsabb hatást, amiben kiemelkedik a **12g**. A **12a** tumorszelektivitásának jellemzésére antiproliferatív tulajdonságát meghatároztuk nem malignus eredetű epiteliális immortalizált sejtvonalon (hTERT-HME1) is, ahol az IC₅₀ értéke 5,9 µM lett, szemben a referenciaként alkalmazott ciszplatin 2,0 µM értékével. A szerkezetileg rokon vegyületek esetében meghatároztuk a mesterséges membránon történő átjutás sebességét, a kapott koncentrációkból Log P értéket számítottunk (9. táblázat). A kapott Log P és a számított IC₅₀ értékek szoros korrelációt nem mutatnak, az azonban kitűnik, hogy fokozott vízdékonyság, ill. az alacsony Log P nem kedvez az antiproliferatív hatásnak.

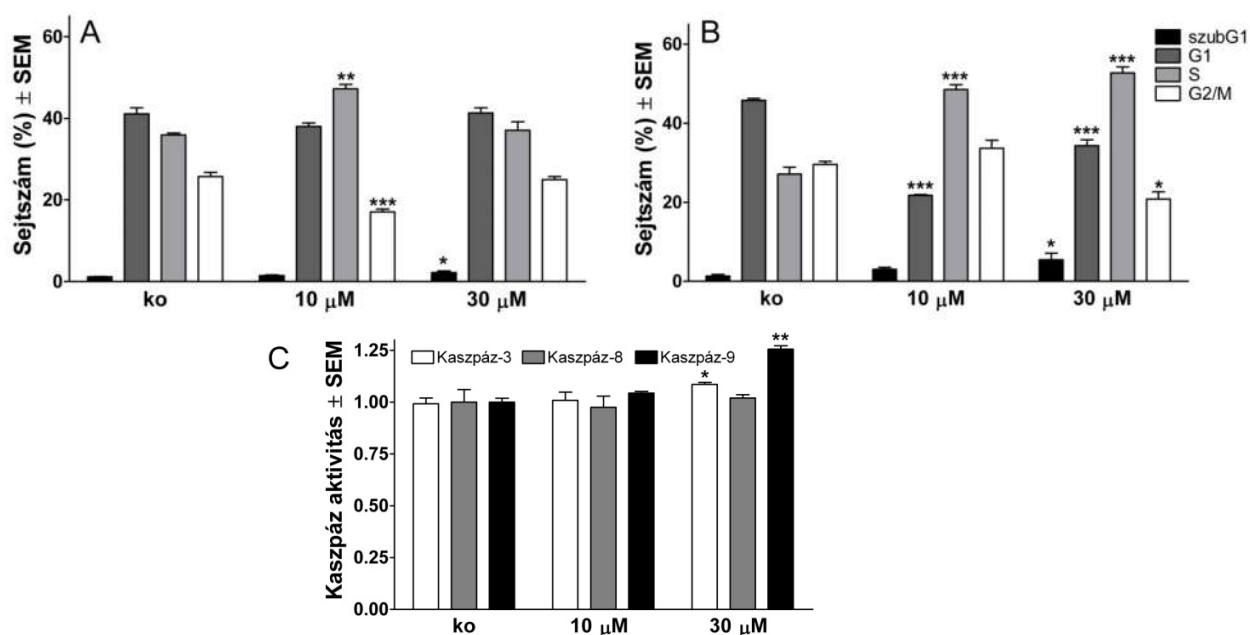
A tapasztalt hatás további jellemzésére a legpotensebb furanoakridon (**12a**) tulajdonságait vizsgáltuk a legérzékenyebbnek bizonyuló MDA-MB-231 sejteken. A fluoreszcens festést elvégeztük a szintén alacsony IC₅₀ értéket produkáló MCF7 sejteken is (41. ábra). Míg az MDA-MB-231 sejtek a koncentráció és a kezelési idő függvényében kiváltják a nukleáris kondenzációt és fragmentációt a sejtmembrán károsodása nélkül, addig az MCF7 sejteken minden esetben tapasztaltuk a PI felvételét.

A vegyület 24 órás kezelés során emelte az S fázis volumenét, ill. 30 µM mellett a hipodiploid állományt (42. ábra). Hosszabb – 48 órás – behatás esetén a sejtciklusra gyakorolt hatások markánsabban jelentek meg. A **12a** proapoptotikus hatásának további igazolására meghatároztuk a legfőbb kaspázok aktivitását. Azt találtuk, hogy a kiválasztott alkaloid 48 órás kezelés során növeli az MDA-MB-231 sejtekben a kaspáz-3 és -9 aktivitást, a fokozódás 30 µM mellett vált szignifikánssá.

Mivel rokon szerkezetű természetes és szintetikus vegyületekkel kapcsolatban beszámoltak multidrog rezisztencia revertáló effektusról, vizsgáltuk a vegyületek ezirányú hatását is, valamint kombináltuk az alkaloidokat doxorubicinnal (Krishnegowda *et al.*, 2002, Bayet *et al.*, 2007). A vegyületek L5178 MDR egérlimfóma sejteken kapott IC₅₀ adatait, valamint az interakcióban tapasztalt hatásait tartalmazza a 10. táblázat (Réthy *et al.*, 2008).



41. ábra A **12a** hatása az MDA-MB-231 és MCF7 sejtek morfológiájára 24 és 48 órás kezelés után. ko: kezeletlen kontroll.



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

10. táblázat A vizsgált akridonvázás 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	16,03	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	$20,2 \pm 4,8$	

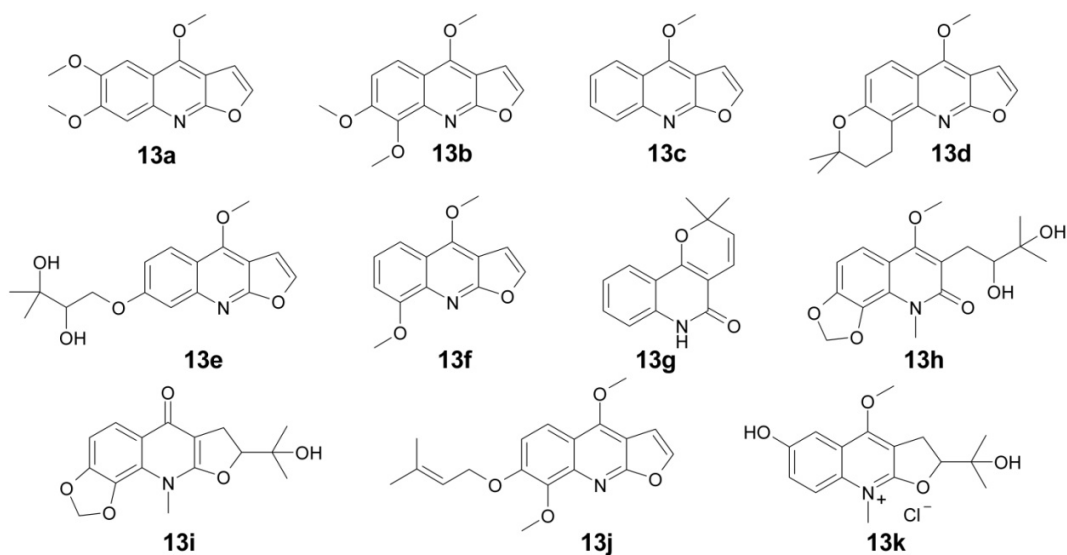
A FA és a kombinációk értékelésekor kapott FIX értékek szoros korrelációt ezúttal sem mutattak: a legjelentősebb rodamin akkumulációt eredményező alkaloid (**12c**) csak additív

interakcióba lépett a doxorubicinnal, míg a jóval szerényebb FA értéket mutató **12d** és **12e** szinergizmusra utaló, 0,5 alatti FIX eredményt mutatott. Két alkaloid – a **12a** és **12b** – csökkentette a doxorubicin hatását.

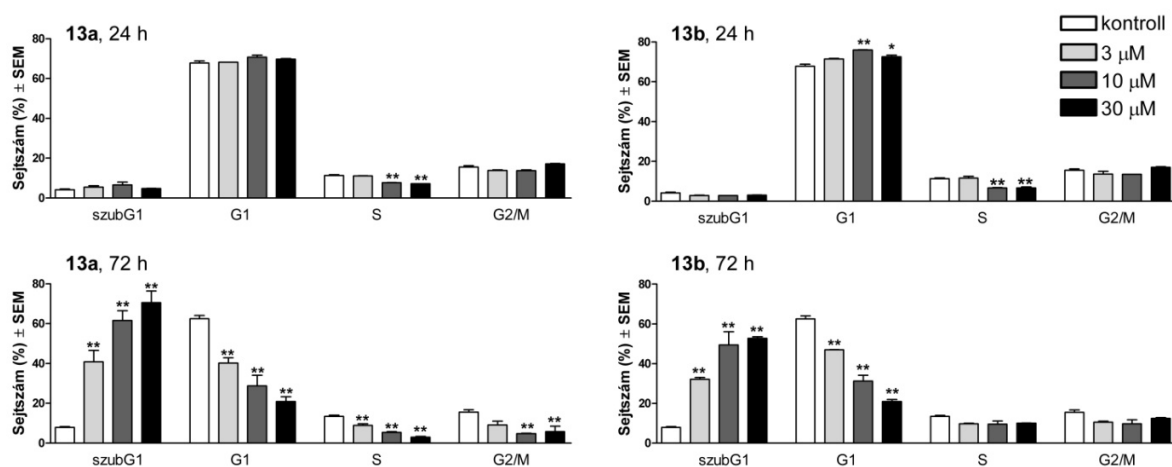
Mivel a két szinergizáló alkaloid hatása nem magyarázható egyértelműen az ABCB1 bénításával, meghatároztuk a transzporter mRNS-szintű kifejeződésére gyakorolt hatást is. Mindkét alkaloidot (**12d**, **12e**) 15 μM végkoncentrációban alkalmaztuk, a PCR vizsgálatot 48 óras kezelés után végeztük el. Azt találtuk, hogy mindkét vegyület csökkentette a transzporter expresszióját: a kezletlen kondíciót 100%-nak tekintve a **12d** $91,10 \pm 0,87\%$ -os ($p < 0,05$), míg a **12e** $86,31 \pm 1,48\%$ -os ($p < 0,01$) értéket mutatott ($n=3$). Mindezek alapján megállapítható, hogy a vizsgált akridon alkaloidok a direkt antiproliferatív és proapoptotikus hatás mellett több módon is csökkentik a tumorsejtek multidrog rezisztenciáját.

A vizsgált alkaloidok harmadik csoportját 11 Rutaceae növényfajokból izolált kinolinvázis vegyület alkotta (**13a–k**, 43. ábra). A vegyületek antiproliferatív hatását 4 humán sejtvonalon (HeLa, MCF7, A2780 és A431) vizsgáltuk. Jelentős – 10 μM mellett 40%-os gátlást elérő – hatásokat csak két vegyület (**13a** és **13b**) esetében tapasztaltunk, ezek is csak a HeLa sejteken mutattak aktivitást (Molnár *et al.*, 2013).

A HeLa sejteken a **13a** 10,4 μM , a **13b** 9,8 μM IC_{50} értéket mutatott, mialatt egyik alkaloid sem eredményezett 10%-ot meghaladó proliferáció gátlást MRC-5 sejteken még 30 μM jelenlétében sem. Mindkét aktív vegyület a behatási idő és a koncentráció függvényében hatott a kezelt sejtek sejtciklus-eloszlására (44. ábra). 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, jellemzően a G1 fázis rovására.



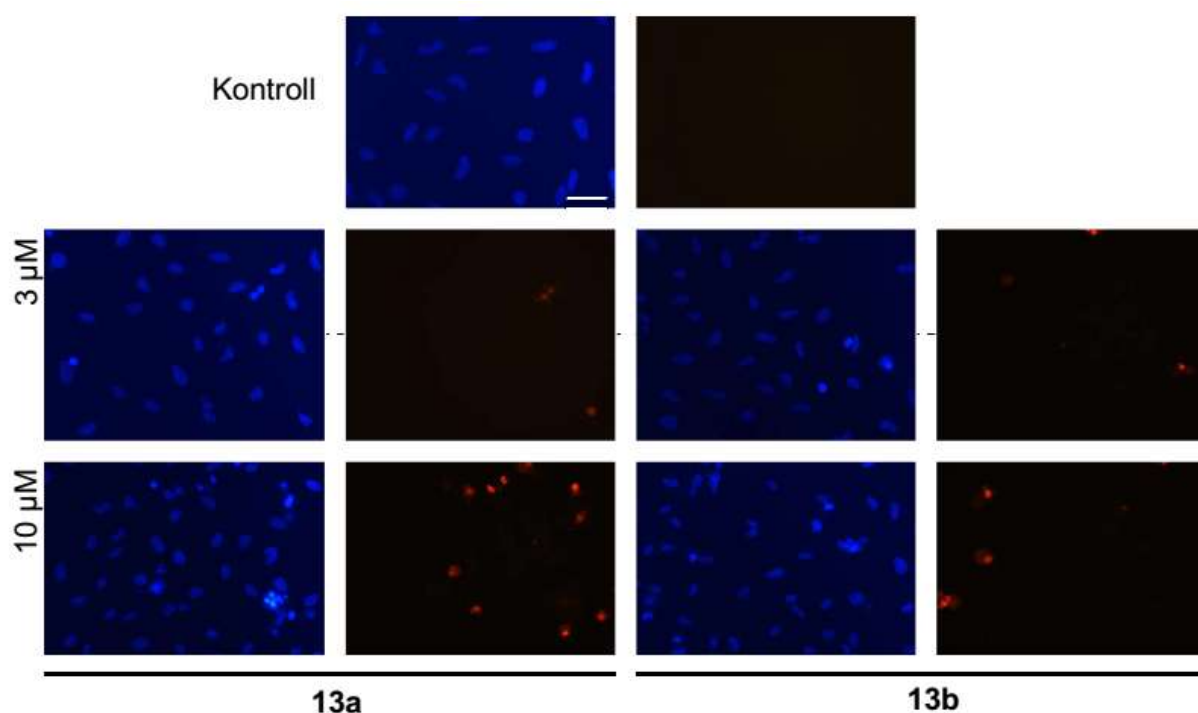
43. ábra A vizsgált kinolinvázis alkaloidok szerkezete. **13a**: kokuszagin, **13b**: szkimmianin, **13c**: diktamin, **13d**: dutadрупin, **13e**: evoxin, **13f**: γ -fagarin, **13g**: flinderzin, **13h**: hidroxilunidin, **13i**: hidroxilunin, **13j**: 7-izopenteniloxi- γ -fagarin, **13k**: ribalinium-klorid.



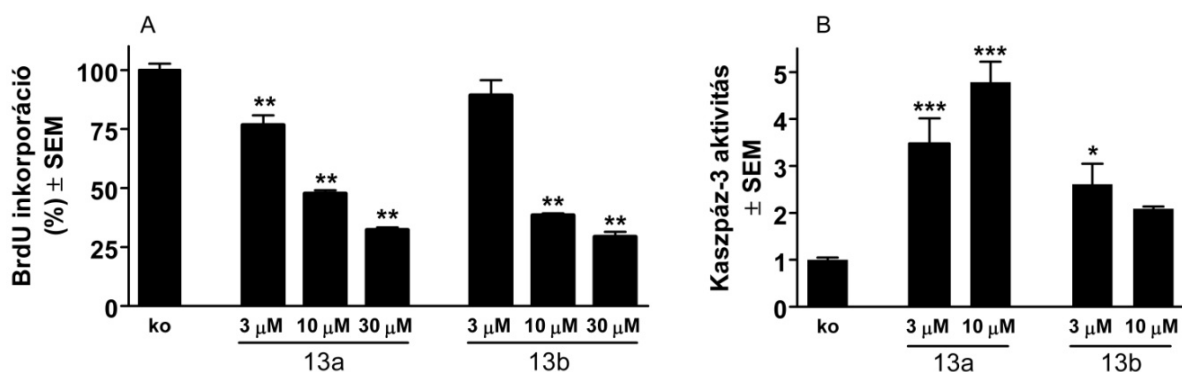
44. ábra A **13a** és **13b** hatása a HeLa sejtek sejtciklus-eloszlására 24 és 72 órás behatás esetén. n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$ ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.

Elvégeztük **13a** és **13b** fluoreszcens kettős festését 72 órás expozíció után. Mindkét vegyület kiváltotta a magállomány kondenzációját. Kisebb koncentrációban (3 μ M) jelentős membránkárosodás nélkül, míg 10 μ M jelenlétében intenzív PI felvételt tapasztaltunk (45. ábra).

24 órás kezelés után mindkét alkaloid gátolta a BrdU HeLa sejtekbe történő beépülését, a **13a** már 3 μM esetén is szignifikáns mértékben (46. ábra). A tartósabb kezelés során észlelt apoptotikus markerek megerősítésére meghatároztuk a kaszpáz-3 aktivitását. A **13a** már 3 μM mellett is jelentősen és koncentrációfüggő módon növelte az enzim aktivitását, a **13b** esetében csak a 3 μM okozott jelentős aktivitásbeli fokozódást (46. ábra).



45. ábra A **13a** és **13b** hatása a HeLa sejtek morfológiájára 72 órás kezelés után. Egy-egy kondíció esetén a bal oldali panelek a Hoechst 33258, a jobb oldaliak a PI fluoreszcenciáját mutatják. Indikátor a kontroll képen: 50 μm .



46. 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.

5.2.2. Növényi kivonatok és szeszkviterpének antiproliferatív hatásának vizsgálata

Növényi kivonatokkal végzett szisztematikus vizsgálataink közvetlen célja olyan fajok kijelölése, amelyek alkalmasak további kísérletekre, így a kivonataik hatásvezérelt frakcionálásán keresztül potens – és ideális esetben új – aktív tartalomanyagokhoz juthatunk el. Az Asteraceae család a zárvatermők legnépesebb családjá, a mintegy 23 000 faj között sok a gazdaságilag jelentős, ill. gyógyászati céllal alkalmazott növény (Barreda *et al.*, 2015). A család tumorellenes felhasználásáról, és a hatást magyarázó tartalomanyagokról jelentek meg tanulmányok, ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésre a közép-európai fajokkal kapcsolatban. Átfogó szűrővizsgálatunk a család Magyarországon előforduló, vagy termeszthető 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 (Réthy *et al.*, 2007b, Csupor-Löffler *et al.*, 2009a).

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 nagyobb kiindulási

sejtszámmal (25000/üreg). Ez utóbbi meghatározás eredménye alapján elkülöníthető a kivonat antiproliferatív és direkt citotoxikus tulajdonsága. A rövid behatás alatt ugyanis jelentős proliferáció nem történik, így a kontrollhoz viszonyított csökkent viabilitás a sejtek károsodására, azaz a kivonat közvetlen toxicitás hatására utal.

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. A további vizsgálatokra kiválasztott aktív kivonatok eredményeit tartalmazza a 11. táblázat.

11. táblázat Reprezentatív növényi kivonatok sejtvonalakon meghatározott értékei. Az antiproliferatív és citotoxikus hatások 30 µg/ml végkoncentrációra vonatkoznak 72, ill. 24 órás inkubáció mellett.

Faj	Növényi rész	kivonat	Sejtvonal	Számított antiproliferatív IC ₅₀ (µg/ml)	Antiproliferatív hatás (% ± SEM)	Citotoxikus hatás (% ± SEM)
<i>Erigeron canadensis</i>	gyökér	A	HeLa	6,5	85,8 ± 1,9	56,8 ± 2,3
			MCF7	3,3	88,9 ± 0,6	60,5 ± 2,6
			A431	9,5	87,0 ± 2,2	50,9 ± 0,9
	herba	A	HeLa	17,4	71,1 ± 1,2	32,3 ± 1,3
			MCF7	7,9	81,2 ± 1,8	<20 ⁵
			A431	11,6	72,6 ± 0,9	26,7 ± 0,9
<i>Centaurea jacea</i>	virágzat, termés	B	HeLa	4,4	91,5 ± 0,4	55,7 ± 2,1
			MCF7	10,1	75,4 ± 3,0	28,1 ± 2,8
			A431	11,4	84,5 ± 0,4	46,1 ± 1,5
	levél	B	HeLa	6,3	93,9 ± 0,7	48,9 ± 1,6
			MCF7	12,2	91,4 ± 1,0	47,3 ± 9,0
			A431	11,8	96,5 ± 0,9	82,0 ± 1,9
	gyökér	A	HeLa	8,8	92,9 ± 0,6	53,7 ± 2,1
			MCF7	17,7	69,0 ± 0,9	<20
			A431	>30	41,6 ± 0,9	35,4 ± 2,1
		B	HeLa	0,4	99,3 ± 0,3	36,1 ± 3,1
			MCF7	1,7	76,2 ± 3,1	31,3 ± 2,2
			A431	8,5	94,8 ± 1,2	33,5 ± 0,7
		C	HeLa	5,7	95,9 ± 0,4	24,9 ± 8,0
			MCF7	15,3	60,7 ± 2,7	<20
			A431	>30	<20	<20
<i>Anthemis ruthenica</i>	herba	B	HeLa	6,8	89,8 ± 0,7	53,8 ± 1,9
			MCF7	7,3	88,4 ± 0,4	44,2 ± 3,9
			A431	7,1	94,7 ± 0,7	67,7 ± 2,9
<i>Artemisia asiatica</i>	virágzat	B	HeLa	6,0	98,8 ± 0,2	67,3 ± 4,5
			MCF7	2,9	101,2 ± 0,2	43,0 ± 5,3
			A431	1,2	100,5 ± 0,1	52,7 ± 2,0

⁵ A 20%-nál alacsonyabb gátlási értékeket számszerűen nem adtuk meg.

<i>Onopordum acanthium</i>	levél	B	HeLa	10,4	$96,1 \pm 0,6$	$44,9 \pm 1,7$
			MCF7	10,5	$97,5 \pm 1,0$	$51,6 \pm 10,6$
			A431	5,0	$99,4 \pm 0,5$	$86,5 \pm 1,8$
	levél	B	HeLa	6,5	$98,3 \pm 0,4$	$45,4 \pm 5,8$
			MCF7	6,4	$98,8 \pm 0,2$	$71,7 \pm 8,3$
			A431	4,5	$98,1 \pm 1,3$	$93,8 \pm 1,7$
	gyökér	B	HeLa	6,1	$94,2 \pm 0,6$	$59,2 \pm 2,4$
			MCF7	4,4	$88,7 \pm 0,7$	$31,7 \pm 6,8$
			A431	10,3	$91,2 \pm 0,2$	$61,4 \pm 2,3$
<i>Xanthium italicum</i>	rügy, virágzat	A	HeLa	15,0	$93,0 \pm 0,3$	$33,3 \pm 4,6$
			MCF7	11,1	$95,3 \pm 0,3$	$42,0 \pm 5,5$
			A431	6,7	$94,9 \pm 0,5$	$44,1 \pm 1,5$
	rügy, virágzat	B	HeLa	2,8	$99,6 \pm 0,8$	$91,5 \pm 2,5$
			MCF7	2,7	$99,7 \pm 0,5$	$97,7 \pm 0,6$
			A431	0,8	$99,5 \pm 0,1$	$98,9 \pm 0,6$
	rügy, virágzat	C	HeLa	13,6	$85,3 \pm 1,4$	<20
			MCF7	10,0	$95,8 \pm 0,4$	<20
			A431	8,0	$94,1 \pm 1,0$	<20
	levél	B	HeLa	2,9	$94,2 \pm 3,3$	$79,6 \pm 2,6$
			MCF7	2,2	$99,1 \pm 0,7$	$97,3 \pm 0,3$
			A431	0,7	$100,4 \pm 0,1$	$96,5 \pm 0,4$
	gyökér	A	HeLa	10,6	$93,7 \pm 0,3$	$48,4 \pm 2,2$
			MCF7	9,6	$94,9 \pm 1,1$	$31,2 \pm 3,4$
			A431	9,8	$98,0 \pm 0,2$	$52,8 \pm 1,3$
	gyökér	B	HeLa	7,8	$92,9 \pm 0,6$	$36,6 \pm 3,7$
			MCF7	4,6	$96,4 \pm 0,4$	$60,4 \pm 2,2$
			A431	5,0	$97,7 \pm 0,1$	$59,9 \pm 1,5$

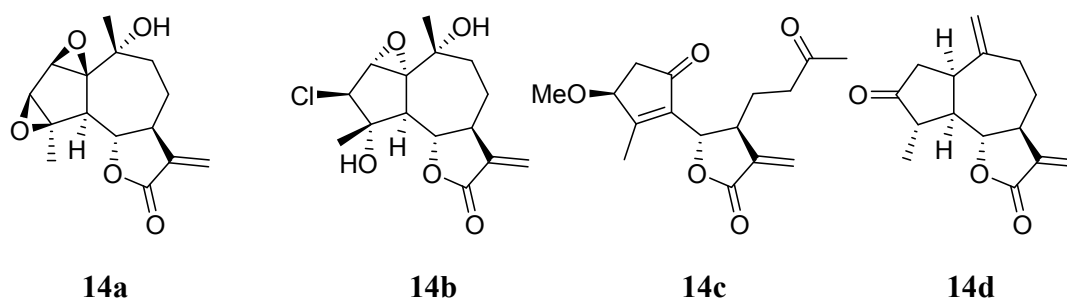
Az egyes növények, ill. kivonatok további vizsgálatokra történő kiválasztását a kiemelkedő antiproliferatív hatás mellett etnofarmakológiai és kemotaxonómiai szempontok is befolyásolták. E további vizsgálatok elsősorban hatásvezérelt frakcionálást jelentettek, aminek célja a hatásért felelős komponensek izolálása volt. 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 12. táblázat.

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

Faj, növényi rész	Azonosított tartalomanyagok	Referencia
<i>Conyza canadensis</i> , gyökér	Triterpének: epifridelanol, fridelin, taraxerol, szimiarenol Egyéb: spinaszterol, apigenin, 4Z,8Z-matrikária- γ -lakton, 4E,8Z-matrikária- γ -lakton, 9,12,13-trihidroxi-10(E)-oktadecénsav, konizapiron A, konizapiron B	(Csupor-Löffler <i>et al.</i> , 2011)
<i>Centaurea arenaria</i> , egész növény	Flavonoidok: eupatilin, eupatorin, 3'-metil-eupatorin, apigenin, izokempferid Lignánok: arktigenin, arktiin, matairezínol Egyéb: knicin, β -amirin, β -szitoszterin- β -D-glükózid, moschamin, <i>cisz</i> -moschamin	(Csapi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Anthemis ruthenica</i> , herba	Flavonoidok: centaureidin, centauridin Szeszkviterpének: krizanin, tanacin, szivaszinolid 6-O-angelát	(Hajdú <i>et al.</i> , 2010)
<i>Artemisia asiatica</i> , herba	Flavonoidok: eupatilin, hiszpidulin, jaceozidin, cirzilíneol, 5,7,4',5'-tetrahidrox-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 -kloro-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 -kloro-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: artemisia alkohol glükózid , dehidrolinalool oxid	(Hajdú <i>et al.</i> , 2014)
<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	(Csupor-Löffler <i>et al.</i> , 2014)
<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: 1 β -izobutanoil-2-angeloil-glükóz, 1 β ,2-diangeloil-glükóz, 1 β -(2-metil-butanoil)-2-angeloil-glükóz Lignán: trachelogenin	(Forgo <i>et al.</i> , 2012)
<i>Achillea millefolium</i> , herba	Flavonoidok: apigenin, luteolin, centaureidin, kaszticin, artemetin Szeszkviterpének: paulitin, izopaulitin, pszilosztachin C, dezacetyl-matrikarin, szintenin	(Csupor-Löffler <i>et al.</i> , 2009b)
<i>Xanthium italicum</i> , levél	Xantanolidok: xantatin, 4-epixantanol, 4-epiizoxantanol, 2-hidroxixantinozin	(Kovács <i>et al.</i> , 2009)

Az azonosított természetes vegyületek között voltak olyan kiemelkedően hatásos molekulák, melyek antiproliferatív hatásáról még nem számoltak be, vagy igen csekély adat áll rendelkezésre. Ilyenek az *A. asiatica*, ill. az *O. acanthium* szeszkviterpénjei (**14a–d**) (Molnár *et al.*, 2016).

A négy szeszkviterpén antiproliferatív hatását az adherens sejtvonalak mellett humán fibroblasztokon, valamint HL-60 leukémia sejteken is meghatároztuk (47. ábra). Ez utóbbi sejtvonalat mind a korábbiakban alkalmazott MTT módszer, mind a sejtszám közvetlen méréséhez felhasználtuk.



	Számított IC ₅₀ érték (μM)					
	MCF7	HeLa	A431	fibroblaszt	HL-60	HL-60 ⁶
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

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

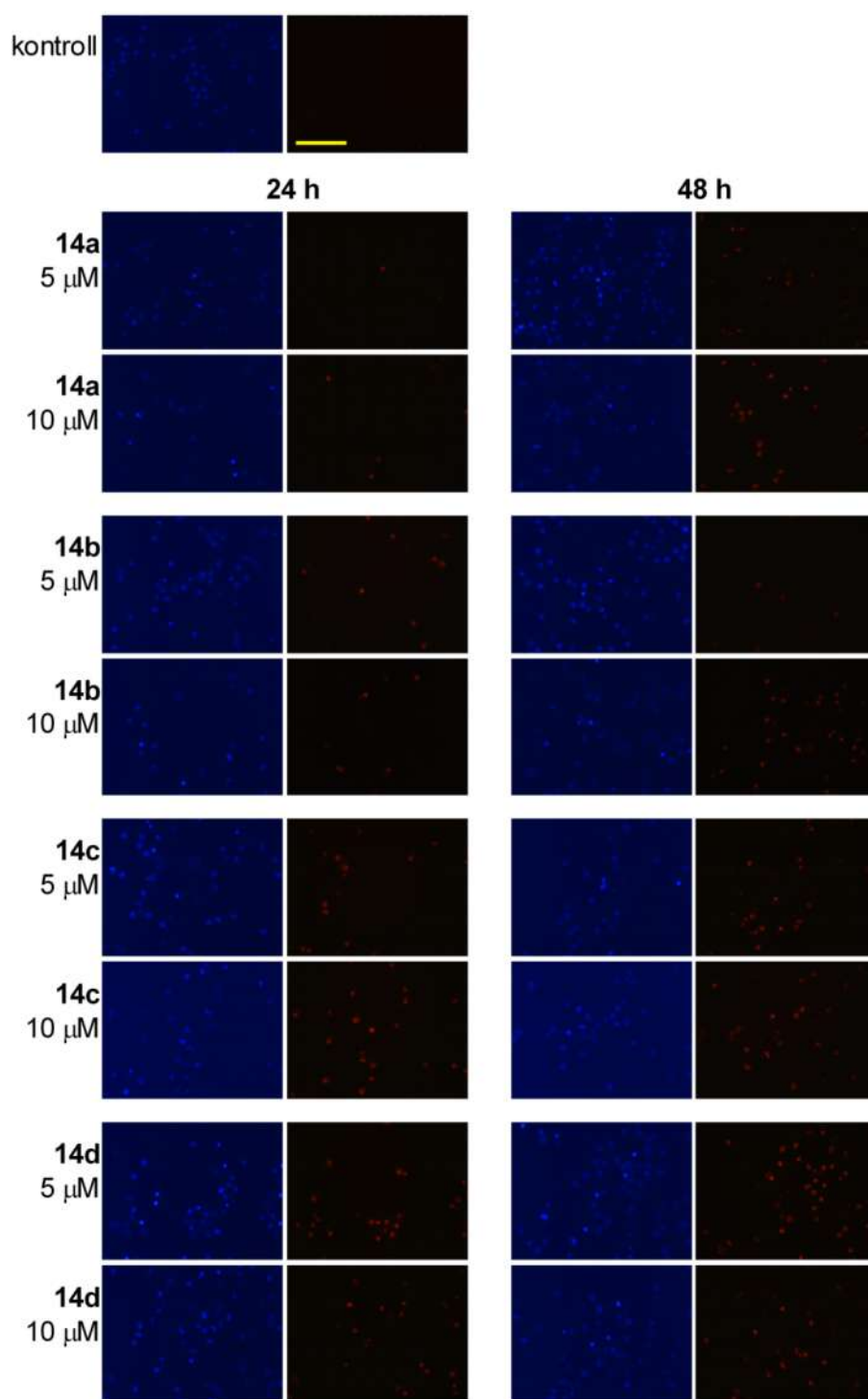
Valamennyi szeszkviterpén esetében elvégeztük a sejtciklus-analízist és az apoptózis igazolását célzó vizsgálatainkat 24 és 48 órás inkubáció után, 5 és 10 μM végkoncentrációban. A fluoreszcens festés során a sejtmag koncentráció- és időfüggő kondenzációját minden esetben megfigyeltük. A sejtmembrán károsodására utaló PI felvétel jóval intenzívebb volt a **14c** és **14d** vegyületek esetében (48. ábra). A sejtciklus fázisok megoszlása nem mutatott egységes képet, de a legjellemzőbb hatás a G1, ill. a G2/M fázisok gyarapodása, amit a S populáció megfogyatkozása kísért. A hipodiploid állomány a koncentrációtól függő mértékben emelkedett, ami a **14d** vegyület esetében nem ért el szignifikáns mértéket (49. ábra).

⁶ 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.

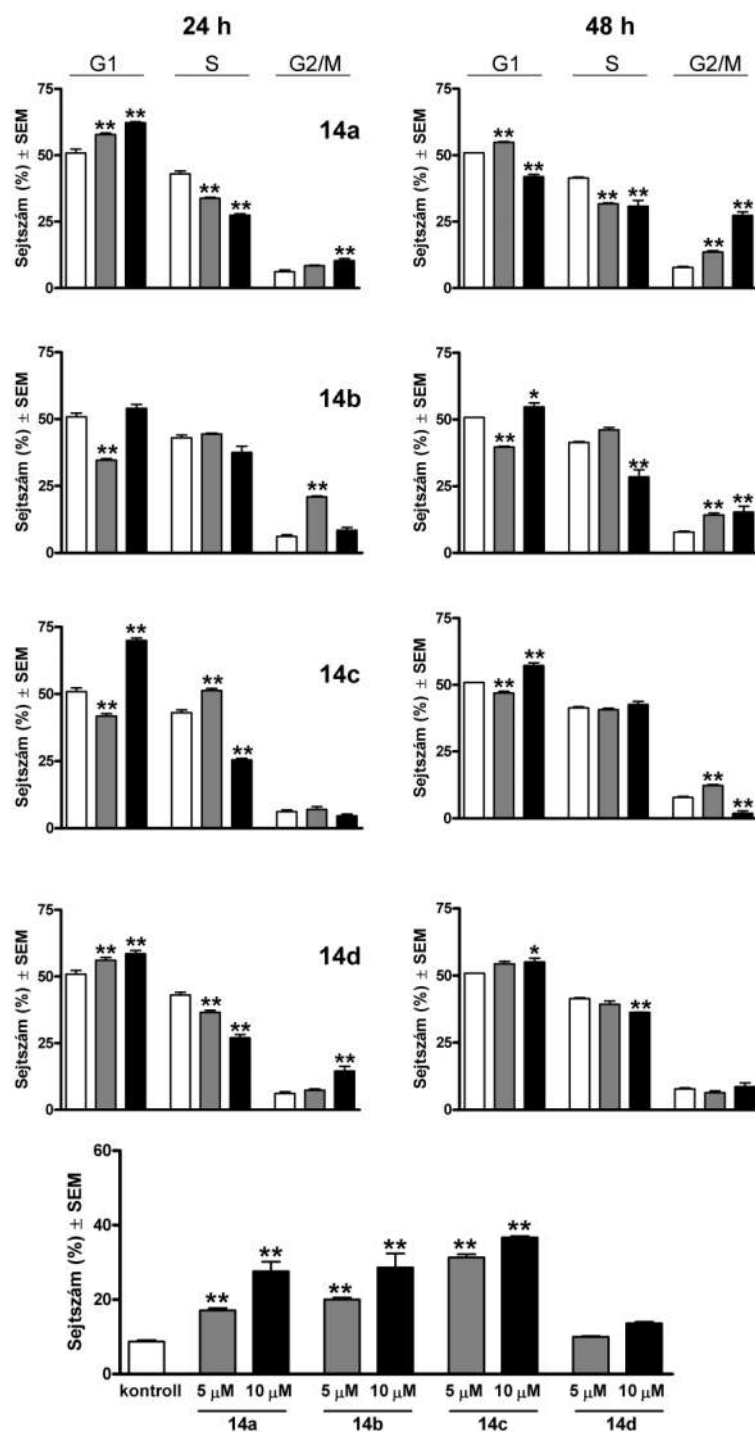
A vizsgált vegyületek proapoptotikus hatásának bizonyítására meghatároztuk a kezelt sejtek kaszpázainak aktivitását 24 órás behatás után (50. ábra). Mind a négy szeszkviterpén jelentősen fokozta a kaszpáz-3, és kisebb mértékben, de szignifikáns módon a kaszpáz-9 aktivitását. A legszerényebb hatást a **14d** fejtette ki. Ezen eredmények alapján a **14a** és **14b** tartalomanyagokat választottuk ki további, a mechanizmus feltárását célzó vizsgálatokra.

E két kiválasztott anyaggal 24 órán át kezelt sejtek lizátumából megállapítottuk a mitokondriális eredetű apoptózis iniciálásában részt vevő Bax és Bcl-2, valamint a sejtciklus G2→M átmenetében kulcsszerepet játszó faktorok kifejeződését mRNS-szinten (51. ábra). Azt találtuk, hogy a **14a** a 10 µM, míg a **14b** 5 µM mellett fokozta a Bax/Bcl-2 arányt, ami az apoptózis intrinszik útjának egyik indikátora. Emellett mindkét vegyület a magasabb alkalmazott koncentrációban csökkentette a CDK1 és a ciklin B2 expresszióját, a **14a** fokozta a ciklin B1 kifejeződését, az utóbbi faktorra a **14b** nem hatott.

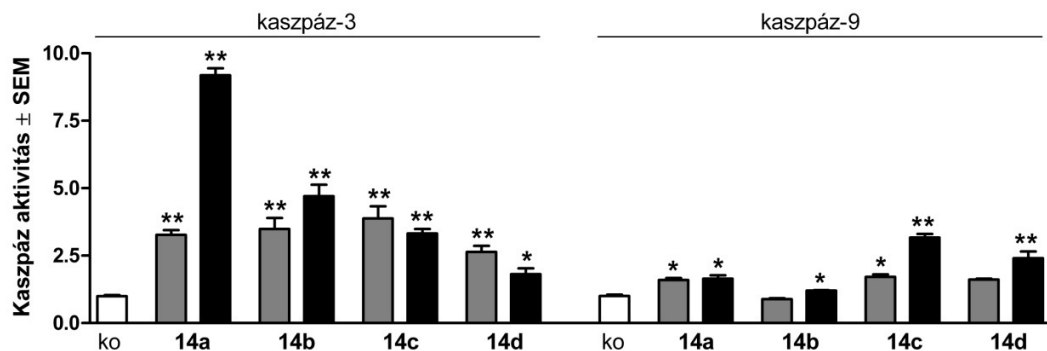
A prezentált eredmények alapján indokolt a vizsgált szeszkviterpének, ill. rokonvegyületeik további, antiproliferatív irányú vizsgálata.



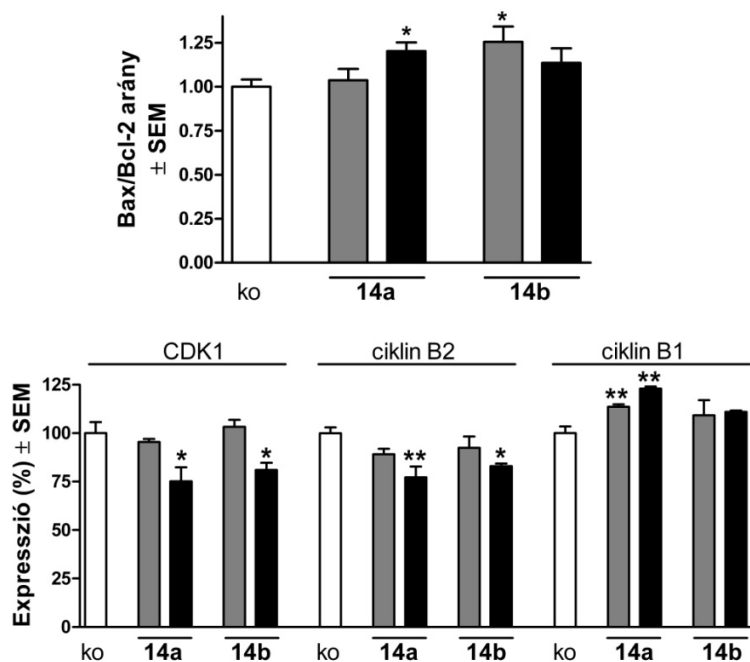
48. ábra A 14a–d vegyületek hatása a HL-60 sejtek morfológiájára 24 és 48 órás kezelés után. Indikátor a kontroll képen: 100 μ m.



49. ábra A 14a–d vegyületek hatása a HL-60 sejtek sejtciklus-eloszlására 5 (■) és 10 μ M (■) koncentrációban 24 és 48 órás behatás esetén. Alsó panel: a vegyületek hatása a hipodiploid (szubG1) állományra 48 órás kezelés után. n: 3, *, ill. **: $p < 0,05$ ill. $p < 0,01$ a kontroll kondícióhoz viszonyítva.



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



51. 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 μM (■) koncentrációban végzett kezelése után. n: 3, *, ill. **: p<0,05 ill. p<0,01 a kontroll kondícióhoz (ko) viszonyítva.

6. Diszkusszió

6.1. Szteroid analógok antiproliferatív hatása

6.1.1. Triazol szerkezeti elemet tartalmazó szteroid származékok antiproliferatív hatása

A triazolil-csoport citotoxikus irányú farmakofor tulajdonságát több alapszerkezetre is igazolták. A triterpén betulinsav 3-triazol analógjai HL-60 sejteken a kiindulási vegyületnél jelentősen alacsonyabb IC_{50} értékeket, valamint proapoptotikus hatást mutattak (Majeed *et al.*, 2013). A gyűrűt a podofillotoxin vázra építve az etopozidnál nagyobb potenciálú topoizomeráz bénítókat nyertek (Liu *et al.*, 2013). A csoport beépítése az értékes farmakológiai tulajdonságok mellett farmakokinetikai szempontból is kedvező: metabolikusan stabil, növeli a hordozó molekula biológiai hasznosíthatóságát (Zhou és Wang, 2012).

A szubsztituált triazol beépítése az ösztránváz D-gyűrűjébe eredményes volt, különösen a 15-ös és 16-os helyzetekben vezetett potens antiproliferatív molekulákhoz. Ez utóbbi helyettesítés kiemelkedően eredményes volt, mind a 13β -, mind pedig a 13α -ösztron sorban. Mindkét C-13 epimer csoportban azonosítottunk a referenciavegyületként használt ciszplatinnal összevethető, vagy potensebb analógokat (**1**, **2f–h**, ill. **5a–d**).

Egy tumorelles hatású farmakon fejlesztése során az *in vitro* mérhető potenciál mellett kulcskérdés a vegyület tumorszelektivitása. Egy kevésbé szelektív molekula az intakt sejtek viabilitását is csökkenti, így nem számíthatunk kedvező tolerálhatóságra. Az ilyen molekulák fejlesztését rendszerint korai stádiumban felfüggesztik. Egy nem malignus sejtvonalon (MRC-5) végzett viabilitási mérés (MTT teszt) és morfológiai vizsgálat természetesen nem helyettesítheti az *in vivo* toxicitási vizsgálatot. Figyelemre méltó viszont az, hogy a kiválasztott vegyületek kevésbé gátolták a fibroblasztok proliferációját, mint a klinikumban is használt ciszplatin. Az **1i**, a **2h** és az **5c** 30 μ M mellett sem okozott 50%-os gátlást, míg a ciszplatin IC_{50} értéke 4,5 μ M volt.

A tesztanyagok proapoptotikus potenciálja szintén lényeges eleme a vegyületek farmakológiai spektrumának. Az utóbbi évtizedben egyre inkább elfogadottá vált, hogy az apoptózis és nekrosis korábbi éles elkülönítése nem indokolt, a két jelenség sokkal inkább egy időbeli kontinuum kiemelt pontjaiként értelmezhető (Kanduc *et al.*, 2002). Mindemellett a jelenleg citosztatikumként alkalmazott szereink szinte mindegyike képes apoptózis kiváltására, így a molekulák szelekciója során ezt a tulajdonságot preferáljuk (Tolomeo és Simoni, 2002). A

korábban programozott sejthalálként leírt apoptózis morfológiai és biokémiai markerek alapján mutatható ki. Ilyenek a sejt zsugorodása, a kromatin kondenzációja, a sejtmag fragmentációja, mialatt az organellek és a sejtmembrán integritása – legalábbis a folyamat kezdetén – megtartott. *In vivo* körülmények között az apoptotikus sejtet fagociták veszik fel, így az ún. késői apoptotikus állapot jellemzően *in vitro* vizsgálatokban mutatható ki. A sejtfelszínen megjelenő, majd arról leváló apoptotikus testek a sejt kontrollált dezintegrációjának az egységei. A biokémiai markerek közül kiemelendő a DNS fragmentációja, kaszpázok aktiválódása, ill. az intakt sejt membránjára jellemző foszfolipid-aszimmetria felbomlása. Ez utóbbi jelenség során az intracelluláris oldalra jellemző foszfatidilszerin megjelenik az extracelluláris oldalon, amihez nagy affinitással kötődik az annexin V (Bedner *et al.*, 1999). A nekrozisra ezzel szemben a sejtek duzzadása, a membrán ruptúrája és az intracelluláris tartalom kiszabadulása jellemző. A folyamat citokinek felszabadulásával jár, így a környező túlélő szövetben gyulladás alakul ki (Festjens *et al.*, 2006).

Valamennyi kiválasztott triazolil-szteroid koncentrációfüggően váltotta ki az apoptózisra jellemző kromatin kondenzációt, az **5c** esetében markáns időfüggést is megállapítottunk. Ez utóbbi vegyület proapoptotikus potenciálját szerényebbnek találtuk, ami megmutatkozott abban, hogy a membránkárosodást mutató sejtek aránya már 24 órás kezelés után is meghaladta a korai apoptotikus állományt, valamint a szubG1 állomány – az **1i** és **2f-g** vegyületekkel ellentétben – csak 48 órás expozíció esetén gyarapodott. Ez a sejtpopuláció az apoptózis széleskörűen elfogadott indikátora. A csökkent DNS-tartalom oka az endonukleázok aktivációja, ill. a keletkező kis móltömegű fragmentumok eliminációja. A hipodiploid állomány PI festődése jelentős részben DNS töredékeknek és nukleoszómáknak tulajdonítható. A nekrozisra nem jellemző a intracelluláris DNS mennyiség csökkenése, így a nekrotikus állomány nem különül el az intakt sejtekre jellemző populációktól (G1, S és G2/M) (Vermees *et al.*, 2000).

Eddig 18 kaszpázt (cisztein-aszpartát specifikus proteázt) azonosítottak emlősekben, ezek egy része nem expresszálódik emberben. A család további tagjai (kaspáz-1, -4, -5, -11 és -12) gyulladásos folyamatban involváltak (Shalini *et al.*, 2015). Az apoptózisban érintet kaszpázok (kaspáz-2, -3 és -7-10) kaszkádszerű aktivációs láncot képeznek, melyben a 8-as és 9-es izoformát iniciátornak, a kaszpáz-3-at végrehajtó enzimnek tekintjük. Ez utóbbi közvetlenül aktiválja a sejt kontrollált lízisét végző enzimeket (Oropesa Avila *et al.*, 2015). A kaszkád iniciálása két úton történhet. Az extrinszik út egy ligand (pl. TNF α) halálreceptorhoz történő

kötődésével aktiválódik, minek hatására a receptor intracelluláris doménjén adaptorokon keresztül létrejön egy szupramolekuláris komplex, aminek része a prokaspáz-8. A komplexben az inaktív forma autoproteolízisre képes, így a sejtmembránhoz kötött képződményből kilép az aktív kaszpáz-8, ami aktiválja a végrehajtó kaszpázokat. Tumorellenes szerek hatására jellemzőbb az intrinszik, vagy mitokondriális aktiváció. Ekkor különböző eredetű bioenergetikai, ill. metabolikus stresszhelyzetekben (pl. DNS károsodás, citotoxikus hatóanyagok, oxidatív stressz) citokróm c szabadul fel a mitokondriumból, ami részt vesz egy másik szupramolekuláris komplex, az apoptoszóma létrejöttében. Erre a komplexre dokkol a prokaspáz-9, majd abból a prokaspáz-8-hoz hasonló módon felszabadul az aktív kaszpáz-9 és aktiválja a sejt apoptózis végrehajtó enzimmészletét (Lavrik *et al.*, 2005). Jóllehet az utóbbi években az apoptotikus kaszpázokkal kapcsolatban leírtak sejthaláltól független funkciókat, azok aktiválódási mintázata alkalmas az apoptózis igazolására, ill. eredetének feltárására (Connolly *et al.*, 2014). A kiválasztott tesztanyagaink (**2f**, **2g**) fokozták a kaszpáz-3 és -9 aktivitását, ugyanakkor nem hatottak a kaszpáz-8-ra, ami az apoptózis mitokondriális útjának aktiválódására utal.

Mivel a mitokondrium az apoptózist kiváltó citokróm c forrása, a külső membrán permeabilitása döntő módon hat a folyamat végeredményére. Ennek szabályozását a Bcl-2 fehérjecsald végzi, ami tartalmaz antiapoptotikus (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) és proapoptotikus tagokat (Bax, Bak) (Brinkmann és Kashkar, 2014). A két alsald legtöbbször vizsgált elemei a Bax és a Bcl-2; ezek expressziójának meghatározásából kitént, hogy a **2f** és **2g** fokozta a Bax/Bcl-2 arányt, ezzel a proteinek egyensúlyát eltolta a permeabilitás fokozódása felé.

A sejtciklus G2/M fázisban bekövetkező blokádja indokoltá tette a fázisátmenetet szabályozó faktorok vizsgálatát. A sejt mitotikus fázisba lépését a ciklin B – CDK1 komplex stimulálja, a CDK1 a sejtciklus többi részében a Wee1 kináz általi foszforiláció miatt inaktív. Aktiválódásához a Cdc25 család foszfatázaira van szükség, melyek közül a HeLa sejtekben a Cdc25B szerepéről számoltak be (Gabrielli *et al.*, 1996, Lindqvist *et al.*, 2005). A vizsgált farmakonok csökkentették mind a G2→M átmenetet előmozdító komplex elemeinek, mind pedig az azt aktiváló foszfatáz (Cdc25B) mRNS-szintű expresszióját, ami magyarázza a sejtciklus blokadját.

Az ösztroánvázas vegyületek hatásmechanizmusa, ill. az apoptotikus potenciálja mellett egy további fontos szempont az esetleges hormonális hatásuk, ami a tumorellenes főhatás mellett nem kívánatos. A vegyületek ösztrogénszerű hatását nem vizsgáltuk, ugyanakkor ismert

szerkezet-hatás összefüggések alapján nem várhatunk ilyen tulajdonságot (Anstead *et al.*, 1997). Az ösztránváz 16-os helyzetének szubsztituálásával jelentősen csökken a vegyület receptorhoz mutatott affinitása. 3-4 atomnyi csoport esetén 10% alatti relatív kötési affinitást mértek (az E2 affinitását tekintve 100%-nak), ennél nagyobb szubsztituensek még kevésbé kötődnek a receptorhoz. Ezen felül az **5a–c** vegyületek esetében a 13-as metilcsoport α térállása, és ennek következtében a gyűrűrendszer megváltozott térszerkezete szintén akadályozza az ösztrogén receptorhoz történő kötődést (Ayan *et al.*, 2011). Mindezek alapján megállapítható, hogy nem várható olyan mértékű ösztrogénszerű hatás, ami tumorelles irányú további fejlesztésüket kizárná.

6.1.2. Az ösztron-oximok antiproliferatív hatása

Az oxim molekulárisz tumorelles farmakonokba történő beépítése több alkalommal vezetett potens vegyülethez, ezek között voltak szteroid alapvázások is. Tengeri szivacsból izoláltak 6-os helyzetben hidroximino-csoportot tartalmazó citotoxikus szteroidokat, melyek alapján fokozott hatású szintetikus analógot terveztek (Poza *et al.*, 2007). A jelentős számú vegyület tesztelésével vázolhatók azok a szerkezet-hatás összefüggések, melyek birtokában további hatékony analógok célzott szintézise valósítható meg. Az antiproliferatív hatásnak kedvez a 13-as metilcsoport β helyzete, de az α térállás is lehet eredményes a 3-benzilszubsztitúció esetén (**6c**). Ezzel elsőként számoltunk be epiösztránvázat tartalmazó citosztatikus vegyületről. A kiválasztott 4 vegyület HeLa sejtvonalon fejtett ki legmarkánsabb hatást, közülük 3 (**6a–c**) 30 μ M fölötti IC_{50} értékkel hat a fibroblasztok proliferációjára, szelektivitásuk meghaladja a ciszplatin szelektivitását.

A kiválasztott legpotensebb analógok (**6a–d**) már 24 órás expozíció után is kiváltották az apoptózisra jellemző morfológiai és biokémiai jegyeket. Ezeket dokumentáltuk fluoreszcens kettős festéssel, a kaszpáz-3 aktivitásának meghatározásával, ill. sejtciklus-analízissel. Ez utóbbi kísérletek eredményei közül rövid – 24 órás – behatás esetén a legjellemzőbb a szintetikus fázis depressziója volt, míg hosszabb inkubáció után a hipodiploid állomány felszaporodása uralta a képet. Mivel mindezen túl a **6a** és **6b** 3 μ M koncentrációban is jelentősen gátolták a BrdU beépülését, indokoltnak láttuk a G1→S fázisátmenet legfőbb regulátorainak további vizsgálatát.

A sejt akkor léphet be az S fázisba, ha az Rb foszforilálódik, ezzel megszűnik az E2F transzkripció faktorokra gyakorolt gátló hatása. A foszforilációra két ciklin komplex képes: a CDK4/6-ciklin D és a CDK2-ciklin E. A ciklin D komplexére gátló hatást fejt ki számos tumorszuppresszor, melyek közül a p16 tűnik kiemelten jelentősnek (Katsumi *et al.*, 2011). A ciklin E komplexét gátolja a p27, a p21 és ez utóbbi induktora, a p53 (Sunley és Butler, 2010). Eredményeink szerint a két vizsgált vegyület nem hatott a CDK2-re és szabályozó faktoraira, ugyanakkor csökkent a CDK4 és fokozódott a p16 mRNS-szintű expressziója. Szintén csökkent az Rb kifejeződése és nem mértünk változást a CDK6 esetében. A p16 jelentőségét illusztrálja, hogy hipofunkciója okozója lehet kontrollálatlan proliferációnak, expressziójának prognosztikus értékét is igazolták (Borys *et al.*, 2012). Mivel a Rb poszttranszkripciószintetikus szabályozott, az mRNS-szintű expresszió csak korlátozottan írja le a kezelésre adott választ. Meghatároztuk tehát az aktív és inaktív forma protein-szintű expresszióját Western blot technikával. Mindkét vegyület csökkentette a foszforilált forma kifejeződését, gátolva ezzel a sejt belépését a sejtciklus S fázisába.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az ösztro-16-oximok között proapoptotikus hatású antiproliferatív vegyületek találhatók. A legpotensebb vegyületek (**6a–d**) a p16–CDK4–Rb–E2F jelátviteli útvonalra hatva gátolják a sejtciklus normál folyamatát.

6.1.3. A D-homoösztro-16-oxim antiproliferatív hatása

A D-gyűrűben bővített ösztro-16-oxim vegyületek citosztatikumként történő fejlesztése az ezirányú hatáson túl arra a felismerésre vezethető vissza, hogy a természetes ösztrogének kismértékű szerkezeti módosításával megszüntethető a hormonális hatás. A 2ME egy hormonhatástól mentes ösztrogén metabolit, ami a gyógyszerfejlesztés klinikai szakaszáig jutott. A vegyület D-gyűrűben bővített analógiát szintén I-es fázisú vizsgálatban értékelték (Zhou *et al.*, 2011).

Elsőként mutattuk ki a D-homoösztro-16-oxim (**7a**) antiproliferatív hatását, ami összevethető a referenciaként alkalmazott ciszplatin hatásával. Az effektust csak HeLa sejteken észleltük, sem a további reproduktív eredetű sejtvonalakon (MCF7, Ishikawa, SiHa, C33A), sem a fibroblasztokon nem idézett elő proliferáció gátlást. Az észlelt hatás a szerkezet kismértékű eltérései esetén is elmaradt, így hatástalannak bizonyult a D-homoösztro-16-oxim 13-epimere és mindkét

vegyület 3-metil-étere. Az ilyen szerkezetérzékeny effektusok gyakoriak a farmakológiában és egy molekuláris targethez (pl. protein, DNS) történő kötődésre utalnak. A HeLa sejtvonal sajátossága a humán papillómavírus 18 (HPV18) pozitivitás, ami minden bizonnyal a primer tumor iniciációjában is részt vett, és a sejtvonal genomjába beépülve máig fennmaradt (Pater és Pater, 1985). A HPV18 által kódolt onkoprotein E6 immortalizálja a gazdasejtet, komplexet képez a p53 tumorsuppresszor proteinnel és fokozza annak degradációját (Scheffner *et al.*, 1990). Hasonló folyamat váltotta ki a HPV16 pozitív SiHa sejtek malignus transzformációját. A HPV18 és HPV16 által kódolt E6 proteinek legfőbb hatása – a p53 expressziójára gyakorolt effektus – közös, ám szerkezetük és további, kevésbé feltárt hatásaik nem feltétlenül azonosak. Ezek alapján nem váratlan és nem előzmények nélküli a HeLa és SiHa sejtek eltérő viselkedése sem annak ellenére, hogy mindkét sejtvonalban jelen van a virális E6 protein. Beszámoltak arról, hogy a p53 proteint nem expresszió cervikális sejtekben (HeLa és SiHa) leptomicin B kezelés hatására kimutathatóvá válik a tumorsuppresszor. Ugyanakkor az aktinomicin D kezelés hatására csak a HeLa sejtben történt jelentős p53 expresszió, ami a két sejtvonal onkoproteinjeinek különbözőségére utal (Hietanen *et al.*, 2000).

Több vegyület HeLa sejtekre szelektív tumorelles hatásáról számoltak be (pl. roszkovitin, 2-*O*- β -D-glükopiranozil-L-aszkorbinsav), melyek mind a p53 stabilizálásán, így funkciójának helyreállításán keresztül fejtették ki hatásukat (Wesierska-Gadek *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2011).

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a **7a** antiproliferatív hatásában is meghatározó szerepet játszik a p53 védelme és az általa mediált jelátviteli út támogatása.

A **7a** antiproliferatív hatásához proapoptotikus tulajdonság társul, ezt morfológiai markerek (fluoreszcens festés), sejtciklus-analízis és kaszpázok aktivitásának meghatározásával igazoltuk. A 24 órás kezelés hatására megjelent apoptotikus sejtek hosszabb behatás során nekrotikus vonásokat vettek fel, ami annak tudható be, hogy *in vitro* körülmények között nem működik az apoptotikus sejtek celluláris felvétele és lebontása. A sejtciklus-analízis a hatás módjával kapcsolatban is lényeges információt eredményezett: már 24 órás kezelés után növekedett a G2/M populáció, ami az expozíció növelésével kifejezettebbé vált. Ugyanakkor a szubG1 populáció szignifikáns emelkedéséhez 72 órás inkubációra volt szükség annak ellenére, hogy a morfológiai eredmények már 24 óra elteltével is apoptózisra utaltak. Az ellentmondás feloldását a G2/M fázisban bekövetkező sejtciklus-blokádban látjuk. Amennyiben ezek a sejtek

kezdenek kontrolláltan lebomlani, úgy a DNS állomány részleges lebomlásával még nem válnak hipodiploiddá, hanem DNS-tartalom alapján a G1 vagy az S fázisba tartoznak. Citosztatikus céllal szintetizált 2-etil-ösztron analógok hasonló viselkedést váltottak ki ösztrogén receptort nem expresszáló MDA-MB-231 sejteken (Stander *et al.*, 2011).

A referenciának tekintett 2ME is a G2/M fázisban állította meg a HeLaS3 sejtek ciklusát, ezen belül a sejtosztódás a mitózisban állt meg, ami magyarázható a 2ME tubulin polimerizációra gyakorolt gátló hatásával (Li *et al.*, 2004). Annak eldöntésére, hogy a **7a** hasonló mechanizmussal fejti-e ki hatását, meghatároztuk a tubulin polimerizációra gyakorolt hatását sejtmentes környezetben. A vegyület még 500 μM koncentrációban sem okozott jelentős eltérést a polimerizáció sebességében, így a 2ME-től lényegesen eltérő hatásmechanizmusa bizonyított. A mechanizmus további feltárására meghatároztuk a foszforilált hiszton H3 mennyiségét a kezelt sejtekben. A hiszton H3 protein foszforilációját az aurora kináz végzi a mitózis során, a metafázis végén már a defoszforiláció dominál (Prigent és Dimitrov, 2003). A referencia paklitaxel és a 2ME – a vártak megfelelően – fokozták a H3 foszforilációt, a mitózisban állították meg a HeLa sejtek osztódását. Ezzel szemben a **7a** jelentősen csökkentette a H3 foszforilációt, ami azt jelenti, hogy a G2/M blokádnál mögött más mechanizmus húzódik. A mitotikus sejtek aránya csökkent, a sejtek nem jutottak el a mitóziséig, igazoltuk, hogy a ciklus blokádját a G2 állapotban történt.

Mivel adataink alapján a **7a** tesztanyaggal kezelt sejtek nem jutnak el a mitóziséig, így érdemesnek tűnt megvizsgálni a vegyület G2→M átmenet regulációs faktoraira gyakorolt hatását. A progresszió végső promótere a ciklin-dependens kináz 1 (CDK1), mely a ciklin B1 és B2 proteinnel képez komplexet. A komplex foszforilált formában inaktív, a sejtciklus előrehaladásakor a sejtosztódási ciklus 25 protein (Cdc25) defoszforilálja azt, ezáltal maga a komplex aktívvá válik, foszforilációra lesz képes. A G2→M átmenetben a Cdc25 3 izoformája közül a Cdc25B és Cdc25C játszik meghatározó szerepet. A Cdc25 aktivitása is szoros kontroll alatt áll, inhibitorikus és aktiváló foszforilációs helyek sorát azonosították a protein N-terminális regulációs doménjén. A gátló foszforiláció legfőbb forrásai a DNS károsodás által iniciált jelátviteli útvonal részeként működő checkpoint kinázok (Chk1 és Chk2). Az ezek általi foszforiláció eredményeként a Cdc25 proteinek intracellulárisan szekvesztrálódnak, így a CDK1 defoszforilációja elmarad, ami egyben a sejtciklus blokádját is jelenti. A Cdc25 proteinek jelentőségét illusztrálja, hogy fokozott expressziójukat több tumorból kimutatták, ill. igazolták összefüggésüket a kedvezőtlen prognózissal (Boutros *et al.*, 2007).

A szintén G2→M átmeneten ható 2ME több sejtvonalon is csökkentette a CDK1 és ciklin B1 expresszióját, ami magyarázza a vegyület sejtciklus blokádját (Zoubine *et al.*, 1999, Gong *et al.*, 2011). Az általunk alkalmazott metodika nem ad információt sem a protein-szintű expresszióra, sem pedig a poszttranszlációs módosult formák (pl. foszforilált protein) arányára vonatkozóan. Kimutattuk ugyanakkor a ciklin B izoformák (B1 és B2) mRNS-szintű kifejeződésének csökkenését, ami a komplex csökkent működésére utal. A CDK1 egyik célproteinje a tubulin polimerizációját reguláló statmin. A nem foszforilált statmin köti a tubulin heterodimert, ezáltal csökkenti a polimerizációhoz rendelkezésre álló mennyiséget, kedvezve ezzel a depolimerizációnak. A foszforilált statmin ezt a funkciót nem látja el, így támogatja a mitotikus orsó felépülését (Belletti és Baldassarre, 2011). Eredményeink alapján a **7a** protein szinten nem hat a statmin expressziójára, ám a koncentráció függvényében csökkenti a foszforilált statmin mennyiségét, ami egyben a nem foszforilált forma felszaporodását is jelenti. Ez pedig a mikrotubulusok felépülésének gátlásához vezet, megerősítve azon korábbi mérési adatunkat, miszerint a kezelt sejtek a G2 fázisban rekednek, nem jutnak el a mitózisig.

A **7a** esetleges hormonális hatásainak detektálására végzett receptorkötési vizsgálatban a vegyület nem mutatott affinitást az ösztrogén receptorhoz (Wölfling *et al.*, 2003), ám az esetleges metabolit hormonhatásának detektálására *in vivo* uterotróp tesztben is értékeltük. Az ovariectomizált patkányok hét napon keresztül kezelése nem növelte az uterus relatív tömegét, így a vegyület indirekt úton – pl. prodrugként – sem vált ki ösztrogénszerű hatást. Az *in vivo* vizsgálat a **7a** tolerálhatóságára is utal: a kezelés célja nem a szer toxikológiai jellemzése volt, ám figyelemre méltó, hogy toxicitásra utaló tünetet nem tapasztaltunk.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az ösztroin közeli szerkezeti analógja, a **7a** hormonális hatással nem rendelkezik, ám gátolja a HeLa sejtek osztódását. Mutat ugyan rokon vonásokat a 2ME farmakológiai viselkedésével, attól lényegesen el is tér. A 2ME a tubulinhoz kötődve gátolja annak polimerizációját, ezzel a mitózis fázisában állítja meg a kezelt sejtet. Ezzel szemben a **7a** indirekt úton hatva, a regulációs proteineken keresztül akadályozza az osztódási mikrotubulus-rendszer kialakulását, ezzel G2 fázisban megállítja a HeLa sejtek sejtciklusát. Mindezek alapján a D-gyűrűben bővített ösztroin származékok alkalmasak lehetnek további antiproliferatív hatóanyagként történő fejlesztésre.

6.1.4. A szolanidin analógok antiproliferatív hatása

A szteroid szerkezetű növényi tartalomanyagok – alkaloidok, szapogeninek, ill. ezek glikozidjai – ismertén citosztatikusak, hatásaikat több adherens és leukémia sejtvonalon igazolták (Friedman, 2015). A csoport legismertebb tagjai a dioszgenin, a szolanidin és a tomatidin; tumorellenes hatásukkal kapcsolatban terjedelmes szakirodalom halmozódott fel. Egy szolaszodin glikozidokat tartalmazó készítményt randomizált klinikai vizsgálatban is értékelték. 94 bazaliómában szenvedő beteget kezeltek aktív szerrel, ill. vivőanyaggal 8 héten át, naponta kétszer lokálisan. Az aktív kezelést kapó betegek 66%-áról eliminálódtak a léziók, ezen betegek 78%-a egy év után is tünetmentes volt (Punjabi *et al.*, 2008).

Újonnan szintetizált vegyületeink jelentős része aktívnak bizonyult az alkalmazott adherens sejteken, IC_{50} értékük összevethető volt a referenciaként alkalmazott ciszplatin értékével. Az aktív analógok többsége fokozta a kezelt HeLa sejtek hipodiploid állományát, ami proapoptotikus hatásuk indikátora. Eredményeinkből felvázolhatók azok a kritikus szerkezeti elemek, melyek szükségesek, ill. előnyösek az antiproliferatív hatáshoz. Előbbiek közé tartozik a pirazolin gyűrű és az ahhoz kapcsolt aromás csoport szubsztitúciója, ami *para* helyzetben tűnik a legelőnyösebbnek. Kedvező továbbá a 3-as helyzetű hidroxilcsoport jelenléte. Eredményeink alátámasztják azon korábbi adherens sejteken nyert adatokat, miszerint a B-gyűrű kettős kötése szükséges a sejtosztódás gátlásához (Trouillas *et al.*, 2005).

A szolanidin tumorellenes hatásával kapcsolatban felhalmozódott ismeretanyag döntő része adherens sejteken keletkezett (Shih *et al.*, 2007, Ji *et al.*, 2008). Kevesebb adat áll rendelkezésre a csoport leukémia-ellenes hatásával kapcsolatban, jóllehet a dioszgenin ezirányú hatása is ismert (Liu *et al.*, 2005). Eredményeink összevetéséből kitűnik, hogy a HL-60 sejtek érzékenyebbek a vegyületsorra, mint az adherens sejtpanel. A rokon szerkezetű, ám szénhidrát egységeket tartalmazó dioszcín HL-60 sejteken $7,5\ \mu\text{M}$, HeLa sejtvonalon $4,5\ \mu\text{M}$ IC_{50} értéket mutatott, ami a **8c** és **9g** esetében igen közel van az általunk mért értékekhez (Wang *et al.*, 2001). A legpotensebb **8c** tesztanyag mechanizmusának feltárására elvégzett fluoreszcens festés már 8 órás inkubáció után markáns apoptotikus jelleget mutatott, ám a sejtek 24 óra elteltével már nekrotikusak voltak, membránjuk károsodott. A gyorsan kialakuló apoptózisnak ellent mond a sejtciklus-analízis eredménye: szignifikánsan emelkedett hipodiploid állomány csak 48 óra elteltével jelent meg. Úgy gondoljuk, hogy a sejtmag korai kondenzációjának ellenére a DNS

részleges eliminációjához hosszabb behatásra van szükség. Több tekintetben is hasonló viselkedést írtak le a dioszgeninről: a sejtciklus-eloszlásban már 24 órás inkubáció mellett is jelentős G2/M fokozódást okoz, a hipodiploid állomány felszaporodásához ugyanakkor 36–48 órás expozíció szükséges (Liu *et al.*, 2005).

A szabad gyökökre általában kóroki tényezőként tekintünk. Elsősorban neurodegeneratív és anyagcsere-betegségek létrejöttében játszanak szerepet, emellett a karcinogenezisben is érintettek. Így a természetes antioxidánsokat – elvi megfontolások és nagyszámú *in vitro* vizsgálat alapján – protektív hatásúaknak tartjuk, amit azonban kontrollált klinikai vizsgálatok ritkán támasztanak alá (Steinhubl, 2008). A szabad gyökök ugyanakkor részt vesznek élettani folyamatok mediálásában is. A dezoxiribonukleotidokat szintetizáló ribonukleotid reduktáz azon ritka enzimek egyike, melyek gyökös mechanizmussal látják el funkciójukat. Az enzim stabilizálja a tirozil gyököt; annak felezési ideje mintegy 4 nap, szemben a gyök oldatban mért milliszekundumos élettartamával (Stubbe és Riggs-Gelasco, 1998). Az enzim érzékeny antioxidánsokra, így azok képesek hatni az intracelluláris dezoxiribonukleotid mennyiségére, ezen keresztül a DNS szintézis sebességére. A **8c** által kiváltott sejtciklus-eloszlás eltérését nem tudjuk teljes mértékben magyarázni a direkt ribonukleotid reduktáz gátló tulajdonsággal, ám az minden bizonnyal részese az eredménynek. Az enzim gátlása visszavezethető a vegyület jelentős antioxidáns hatására, amit gyökfogó és lipidperoxidációt gátló effektusként is igazoltunk.

Az onkofarmakológia imponáló fejlődésen ment keresztül az elmúlt két évtizedben, egyre több malignus kórkép kezelésére rendelkezünk célzottan ható szerrel, sok esetben biológiai készítménnyel. Ezt az optimista helyzetértékelést árnyékolják be a hosszabb távú túlélési adatok, amit leginkább a multidrog rezisztencia kialakulásával magyarázunk (Chen *et al.*, 2016). A multidrog rezisztenciáért a kezelés hatására expresszáldó transzportereket tartjuk felelősnek. Eddig a 48 tagú ABC transzporter család 12 eleméről írták le, hogy farmakkal szembeni rezisztenciát vált ki, ugyanakkor a citosztatikus kezelés során 3 protein jelenik meg leggyakrabban: ABCB1, ABCC1 és ABCG2 (korábban használt neveiken P-gp, MRP1 és BCRP) (Szakács *et al.*, 2006). Elfogadott, hogy ezen transzporterek expressziója rontja a prognózist. A klinikai relevancia tekintetében legtöbb adat az elsőként felismert ABCB1-ről halmozódott fel. Előfordulása igen széles tartománnyal jellemezhető: az akut mieloid leukémia sejtek 18–80%-án, míg az emlőkarcinómák 14–100%-ában mutatták ki (Leonard *et al.*, 2003, Tiwari *et al.*, 2011).

Az ABC proteinek szubsztrátokkal szembeni aspecifikus viselkedését promiszkuitásként írja le a szakirodalom, és a transzportált hatóanyagok széles spektruma mellett értjük ez alatt a potenciális inhibitorok hosszú sorát is (Wong *et al.*, 2014). A tekintélyes számú, *in vitro* vizsgálatokban biztatónak talált transzporter gátló farmakon a klinikai vizsgálatokban nem váltotta be a csoporthoz fűzött reményeket, még az ún. harmadik generációs MDR gátlók (pl. tariquidar) sem növelték jelentősen a kombinációban adott citosztatikum hatékonyságát (Chen *et al.*, 2016). Az ABCB1 gátlói között a szteroid alkaloidok mellett megtaláljuk a szexuáliszteroidok származékait is. Androsztán származékok jelentősen fokozták az általunk is alkalmazott rezisztens egérlimfóma sejtek rodamin akkumulációját, ugyanakkor az ilyen vegyületeknek csak egy része fokozta a doxorubicin antiproliferatív hatását. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a transzporter *in vitro* rendszerben megfigyelhető gátlása nem jelent feltétlenül terápiás előnyt (Csonka *et al.*, 2015). Az általunk talált jelenség hasonló: a vizsgált vegyületek jelentős része okozott nagymértékű rodamin akkumulációt, de csak három – **8c**, **8e** és **8h** – fokozta jelentősen az alacsony koncentrációban alkalmazott doxorubicin hatását. Ezek közül kettő – **8c** és **8e** – jelentős, az adherens sejtekkel szembenihez hasonló antiproliferatív hatással rendelkezik az MDR egérlimfóma sejteken is, így a fokozott eredő hatás nem, ill. nem elsősorban a transzporter gátlásának következménye. A **8h** vegyület viszont az alkalmazott limfóma sejteken nem mutatott jelentős hatást 30 μ M végkoncentrációig, így a tapasztalt szinergizmus minden bizonnyal az ABCB1 által okozott csökkent érzékenység revertálására vezethető vissza.

Eredményeink alapján a heterociklussal kondenzált androsztán alapváz alkalmas lehet mind direkt citosztatikus, mind pedig multidrog rezisztencia revertáló szerek tervezésére és vizsgálatára. Jóllehet az utóbbi hatás érdekében fejlesztett molekulák klinikai jelentősége elmaradt a preklinikai adatok alapján elvárttól, a két efféktust együttesen hordozó molekula ideális hatóanyag-jelölt lehet.

6.1.5. A 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatása

Az ösztrogének lokális termelődése, ill. az abban involvált enzimek több hormonfüggő proliferatív megbetegedés (pl. nőgyógyászati tumorok, endometriózis) esetén jelenthetnek terápiás célpontot. Az ösztroen $\rightarrow$ E2 konverziót katalizáló 17 β -HSD1 növeli a lokális ösztrogénhatást, így farmakológiai bénításával gátolható a proliferáció. Az enzim kóroki

jelentőségét illusztrálja, hogy egyes hormonfüggő tumorokban fokozódik a 17β -HSD1 expressziója (Miyoshi *et al.*, 2001). Az enzimet expresszáló MCF7 sejtekkel egérben kiváltott tumor növekedése stimulálható ösztronnal, míg a parentális sejtek osztódása csak E2 bevitelével fokozható (Husen *et al.*, 2006). Az enzim gátlóit jelenleg is fejlesztik ösztrogéndependens kórképek kezelésére. Kézenfekvő, hogy az enzim inhibitorának esetleges direkt antiproliferatív hatása egy kettős mechanizmussal megvalósuló gyógyszerhatás alapja lehet. Hasonlóan kettős módon ható – aromatáz inhibitor és direkt citotoxikus tulajdonságokat mutató – szekoandrosztán származékokról beszámoltak a közelmúltban (Sakac *et al.*, 2008).

Az esetleges direkt hatás a vegyületek kémiai felépítése alapján is felvetődik; szerkezeti heterogenitásuk ellenére tartalmazznak rokon elemeket. A szteroidmimetikus struktúrára jellemző a központi hidrofób váz, ami megfelel a szteránváz B- és C-gyűrűjének, valamint két megfelelő távolságban elhelyezett fenolos szubsztituens, ami az ösztránok oxigénjeit helyettesíti. A természetes vegyületek széles köre rendelkezik hasonló szerkezettel (pl. kalkonok, flavonoidok, lignánok), ezek jelentős része mutat antiproliferatív, ill. kemopreventív hatást (Araujo *et al.*, 2011).

A vizsgált **10a–j** vegyületeket a 17β -HSD1 gátlóként tervezték, a kívánt hatást nanomólos koncentrációban ki is fejtik, ugyanakkor – szteroidmimetikus szerkezetük ellenére – nem kötődnek az ösztrogén receptor egyik altípusához sem (Bey *et al.*, 2009, Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2009). A vegyületek egy része (**10a–g**) antiproliferatív hatást mutatott 3 adherens sejtvonalon, ami elvileg lehet az eredetileg leírt aktivitás következménye vagy attól független. Mindhárom alkalmazott sejtvonal expresszál redukív 17β -HSD enzimet, emellett a HeLa és az MCF7 szteroid-szulfatázt is, így képesek E2 szintézisére kisebb potenciálú intermedierekből, ill. metabolitokból (Speirs *et al.*, 1993, Fournier és Poirier, 2009, Šmuc és Rižner, 2009). Nem zárható ki, hogy a vegyületek kizárólag a proliferatív hatású E2 koncentrációját csökkentik a szintézis gátlásán keresztül, csökkentve ezzel a sejtek proliferatív készségét. A szteroidmentes médiumban nincsenek jelen az ösztrogénképzés szubsztrátjai, így direkt effektus hiányában nem várhatunk jelentős hatást a sejtek osztódására. A két ösztrogén receptort expresszáló sejten végeztük el az MTT tesztet szteroidmentes körülmények között. Jóllehet az így kapott IC_{50} értékek tendenciaszerűen magasabbak, ám az eltérés nem elég markáns ahhoz, hogy a tapasztalt hatást az E2 hiányának tulajdonítsuk. A vegyületek szteroidmentes milióban is gátolják a sejtosztódást, ami a direkt hatást támasztja alá. Emellett

szól az is, hogy a vegyületek antiproliferatív és 17 β -HSD1 gátló IC₅₀ értékei között nem látszik összefüggés (Berényi *et al.*, 2013b). A feltárt hatás tumorszelektívnek bizonyult, egyik szer sem hatott jelentősen az intakt fibroblasztok viabilitására.

A tesztanyagok előbb gátolták a sejtciklus szintetikus fázisát, majd – hosszabb expozíció mellett – hipodiploid felhalmozódást okoztak. Ez a viselkedés felveti a DNS szintézis gátlásának lehetőségét, ill. a következményes apoptózis indukciót. Ez utóbbi hatás-elemet a kaszpáz-3 aktiválódásának kimutatásával erősítettük meg két kiválasztott vegyület esetén (**10e**, **10f**). Az S fázis szuppressziójának további elemzéseként kimutattuk a DNS szintézisének jelentős gátlását viszonylag megtartott viabilitás mellett (**10a–c**, **10e–g**). Az észlelt effektus mögött a G1→S átmenetet szabályozó faktorok érintettségét feltételeztük, ezért meghatároztuk a legfontosabbak mRNS-szintű expresszióját.

A sejt mindaddig nem léphet az S fázisba, amíg a foszforilálatlan Rb gátolja az E2F családba tartozó transzkripciós faktorok működését. Amint a CDK2-ciklin E komplex foszforilálja az Rb-t, az ledisszociál a transzkripciós faktorokról és elkezdődhet a DNS megkettőzése (Sunley és Butler, 2010). A CDK2-ciklin E komplex legfőbb inhibitora a p21 protein, aminek expresszióját a p53 indukálja. A regulációs útvonal jelentőségét mutatja, hogy az gyakorlatilag minden tumorban sérült. Az ilyen esetek felében maga a TP53 gén által kódolt p53 mutált, a fennmaradó részben pedig az útvonal valamely másik eleme szenvedett károsodást (Cheok *et al.*, 2011). A kiválasztott vegyületek (**10a**, **10b** és **10f**) jelentősen emelték mindkét tumorszuppresszor kifejeződését, ezzel a jelátvitel funkcióját az élettani állapot irányába tolták el. Az egyik legintenzívebben kutatott flavonoid, a genistein szintén a p53-Rb jelátvitelen keresztül fejti ki tumorelles hatását, ami arra utal, hogy a hasonló kémiai szerkezet hasonló hatással és mechanizmussal jár együtt (Banerjee *et al.*, 2008).

A 17 β -HSD1 gátlók az ösztrogénfüggő – elsősorban proliferatív – állapotok farmakológiai befolyásolásának egy innovatív és vonzó módja. Mivel azonban az enzim szubsztrátja – az ösztroon – is rendelkezik hormonhatással, a proliferáció teljes blokádja kizárólag az enzim bénításával nem képzelhető el. Ha azonban a molekula rendelkezik egy 17 β -HSD1 gátló hatástól független antiproliferatív tulajdonsággal, akkor azzal – elvi megfontolások alapján – a sejtosztódás biztosabb kontrollját lehet elérni. Munkánk során elsőként azonosítottunk ösztroon→E2 konverziót gátló, emellett a sejtosztódást gátló és proapoptotikus kettős mechanizmussal ható farmakonokat.

6.2. Növényi eredetű tartalomanyagok antiproliferatív hatása

6.2.1. Növényi alkaloidok antiproliferatív hatása

A növényi alkaloidok kivételesen széles spektrumban mutatnak farmakológiai aktivitást. Több alapvető jelentőségű hatóanyagcsoport prototípusa volt egy-egy alkaloid (pl. atropin, kokain, fizosztigmin, morfin, d-tubokurarin, papaverin). A tumorelles szerek körében is találunk prototípusként szolgáló, ill. a klinikumban közvetlenül felhasznált alkaloidot (pl. kamptotecin, ill. vinkrisztin).

Az Amaryllidaceae családra unikális alkaloidok jellemzőek, ezek mindegyike a fenilalaninból és tirozinból szintetizált norbellaninra vezethető vissza. A csoport farmakológiai jelentőségét leginkább az indirekt paraszimpatomimetikumként a klinikumban is alkalmazott galantamin illusztrálja. E gyógyászati felhasználásig el nem jutott tartalomanyagok széles hatástani spektrumban mutatnak aktivitást: beszámoltak analgetikus (likorin, likorenin, hemantidin), antihipertenzív (**11b**, likorin, likorenin, hemantamin), broncholitikus (likorin) tulajdonságokról. Az élő kórokozókra gyakorolt effektusok is figyelemre méltóak; több vegyület mutat antivirális (pl. **11c**, **11d**, hemantamin) és protozoon-ellenes hatást (pl. likorin, galantamin, krinamin), de találhatunk példát antifungális (hippesztrin) és antibakteriális (pankracin) hatásokra is (Szlávik *et al.*, 2004, Bastida *et al.*, 2011).

A narciklazin antiproliferatív potenciáljának kimutatása (1967) után több rokon alkaloid ezirányú hatásáról beszámoltak, az egyik legkorábban felismert ilyen molekula a **11c** volt. Hatását a proteinszintézis gátlására vezették vissza, szelektivitására jellemző, hogy leukémiás egerek túlélését növelte (Furusawa *et al.*, 1976). A narciklazin mellett igen jelentős preklinikai adat halmozódott fel a pankratisztatinnal kapcsolatban, azonban oldódási tulajdonságai miatt a természetes formájában biztosan nem alkalmas klinikai vizsgálatokra (Pettit *et al.*, 2001). Mindez alátámasztja a természetes alkaloidok prototípus szerepét a gyógyszerkutatásban. Cerdón és mtsai. 7 Amaryllidaceae alkaloid 32 analógjának szintéziséről és *in vitro* vizsgálatáról számoltak be, két tartalomanyag esetében sikerült szerkezeti módosításokkal fokozni az antiproliferatív hatást (Cedrón *et al.*, 2015).

Az általunk tesztelt alkaloidok közül a **11c** mellett a **11b**, és **11d** vegyületekkel kapcsolatban beszámoltak antiproliferatív hatásról, ám ezek a vizsgálatok nem tértek ki az apoptózis kiváltására (Weniger *et al.*, 1995, Szlávik *et al.*, 2004). Ugyanakkor elsőként írtuk le a **11a** antiproliferatív hatását, valamint annak és a **11d** alkaloidnak proapoptotikus tulajdonságát tumorsejteken. A likorin az egyik legismertebb alkaloid a vegyületcsaládban, citosztatikus hatása ismert. A **11a** ennek közeli származéka (2-*O*-acetátja), így hasonló hatása nem tűnik meglepőnek. Ugyanakkor hasonló alkaloidokkal kapcsolatban leírtak szerény szerkezeti módosításokhoz társuló markáns farmakológiai eltéréseket. A narciklazin és tetraacetátja hasonló mértékű antiproliferatív hatást fejtenek ki HeLa sejtekre, ugyanakkor az előbbi vegyület nem befolyásolta a sejten inváziós képességét, míg a teraacetát jelentősen gátolta azt (Evidente *et al.*, 2009). Hasonlóan, a pretazettin citotoxikus potenciálja nagyságrendileg nagyobb, mint a tazettiné a közöttük lévő szerkezeti izoméria ellenére (Weniger *et al.*, 1995). Mindez indokolja a közeli rokon vegyületek külön entitásként történő vizsgálatát.

Az Amaryllidaceae alkaloidok MDR revertáló hatásával kapcsolatban kevés előzetes adat állt rendelkezésre. Hasonló módszert használva vizsgálták a likorin, a tazettin, a hemantidin és a hemantamin hatását, de egyik vegyület sem emelte jelentősen a rodamin akkumulációt (Hohmann *et al.*, 2002). Eredményeink alapján két vegyület (**11c** és **11d**) igen jelentősen fokozta a markerként használt rodamin intracelluláris koncentrációját, ugyanakkor a kombinációs MTT teszt során a **11a** és a **11c** szinergizált a doxorubicinnal. A várt egybeesés elmaradása a két módszer eltérő kondícióival magyarázható. A rodamin akkumulációs teszt során akut hatás éri a sejtet, míg a jóval hosszabb kombináció alatt egyes fehérjék expressziójának változásai is lehetségesek.

A mindössze egy növény családra jellemző akridonváz alkaloidokat tri- és tetraciklusos vegyületekre szokás osztani, utóbbi csoport többségét a piranoakridonok képezik (Michael, 2005). Legfőbb képviselőjük az akronicin, tumorellenes hatásának felismerése klinikai vizsgálatokig vezetett, így nem meglepő, hogy a piranoakridonok szerkezet-hatás összefüggéseit feltárták (Guilbaud *et al.*, 2002). Az ezekhez szerkezetükben nagyon közel álló furanoakridonok (**12a–f**), valamint a triciklusos arborinin (**12g**) antiproliferatív hatását elsőként tártuk fel (Réthy *et al.*, 2007a). Utóbbi alkaloid hatását később leukémia sejtvonalon megerősítették és igazolták markáns proapoptotikus tulajdonságát (Kuete *et al.*, 2015). A vizsgált furanoakridonok szerkezeti homológiája alapján feltételezhető a közös hatásmechanizmus, amelynek – a PAMPA módszerrel

végzett méréseink alapján – fontos meghatározója a vegyület lipofilitása. A kiválasztott képviselő (**12a**) kisebb mértékben gátolta a nem tumoros eredetű immortalizált sejtek osztódását, mint egyes tumorsejteket (MCF7, MDA-MB-231, A431), tumorszeletivitása kedvezőbb, mint a referencia ciszplatiné.

A kiválasztott **12a** vegyület legmarkánsabb hatása szokatlan módon az S fázis fokozása volt MDA-MB-231 sejteken. Hasonló jelenséget írtak le egy szintetikus, kiemelkedően potens akronicin analógról HT29 humán sejteken. A szerzők a ciklin E upregulációjával, a DNS szintézisének gátlásával és G1→S átmenet zavarásával járó egyedi hatásmechanizmussal magyarázzák a vegyület hatékonyságát (Leonce *et al.*, 2001). A kémiai analógia és a hasonló viselkedés alapján feltételezhető, hogy a vizsgált furanoakridon is ilyen hatáselemeken keresztül indukálja az észlelt apoptózist.

A furanoakridonvázis alkaloidok MDR revertáló hatásával kapcsolatban szintén elsőként közöltünk vizsgálati eredményeket. Az akridon alapvázat sikerrel alkalmazták hatóanyagjelöltek építőelemeként, a cél az ABCB1 és ABCG2 transzporterek gátlása, ill. az azok által kiváltott MDR revertálása volt (Mayur *et al.*, 2006, Boumendjel *et al.*, 2007). Az általunk vizsgált alkaloidok fokozták az ABCB1 transzportert expresszáló limfóma sejtek rodamin felvételét, ami a fehérje bénítására enged következtetni. Hosszabb behatás során a vegyületek egy része (**12d** és **12e**) potenciálta a doxorubicin antiproliferatív hatását, annak ellenére, hogy saját antiproliferatív tulajdonságuk szerénynek bizonyult. A szinergizáló vegyületek ezúttal sem estek egybe a rodaminfelvételt fokozó szerekkel, ami arra hívja fel a figyelmet, hogy maga a módszer kevésbé prediktív, nem minden esetben alkalmas az előnyös interakcióba lépő farmakonok kijelölésére. A revertáló szerek ugyanakkor csökkentették a transzporter expresszióját mRNS-szinten. Egyes természetes vegyületekről, így pl. az izokinolin elemeket tartalmazó trabektedinről ismert, hogy tumorelles hatásukat részben a kemoterápia-indukálta transzporter-expresszió gátlásával érik el (Jin *et al.*, 2000). Eredményeink alapján a furanoakridon szerkezet a direkt antiproliferatív effektus mellett alkalmas az ABCB1 funkciójának modulálására, ill. ismert citosztatikumok hatásának potenciálására.

A kinolin alkaloidok szintén a Rutaceae családra jellemző vegyületcsoport, széles farmakológia spektrummal. Az élő kórokozókra kifejtett hatások – antibakteriális, antivirális, gombaellenes, protozoon-ellenes – mellett a csoport több tagja gátolja a trombociták aggregációját, bénítja a foszfodiásterázt, ill. ösztrogénszerű hatásukról is beszámoltak (Chen *et*

al., 2000, Nazrullaev *et al.*, 2001, Nam *et al.*, 2005, Dolabela *et al.*, 2008, Yang és Chen, 2008, Duraipandiyán és Ignacimuthu, 2009). Az egyik legbehatóbban vizsgált kinolin alkaloid, a szkimmianin rendelkezik központi idegrendszeri depresszáns effektussal és vérnyomáscsökkentő hatást is mutatott állatkísérletek során (Cheng, 1986, Cheng *et al.*, 1990).

A kinolinvázis alkaloidok tumorelles tulajdonsága nem ismeretlen jelenség; több szer ezirányú hatásáról beszámoltak. A legtöbb ide vonatkozó közlemény preparatív jellegű, az alkaloidok izolálásán túl kitérnek ugyan azok citotoxikus, ill. antiproliferatív hatására, ám annak mechanizmusát nem részletezik. A legtöbb adat a szkimmianinnal (**13b**) kapcsolatban halmozódott fel. Több Rutaceae fajból is kimutatták, az egymástól független vizsgálatok eltérő metodikákat alkalmaztak, közös azonban, hogy a hatás detektálására alkalmazott humán sejtvonalak többségén szerény hatékonyságot mutatott (Setzer *et al.*, 2000, Mansoor *et al.*, 2013, Sandjo *et al.*, 2014). Jansen és mtsai. HeLa sejteken 48 órás kezelést követően 11,6 μM -os IC_{50} értéket mértek, ami szinte egybeesik az általunk meghatározott adattal (Jansen *et al.*, 2006). A hatás mechanizmusával kapcsolatban a legrészletesebb vizsgálatot Varamini és mtsai. végezték, megállapítva, hogy vegyület leukémia és limfóma eredetű sejtvonalakon mutat 50 μM alatti IC_{50} értékeket. A **13b** 48 órás behatására jelentősen fokozódott a Jurkat és Raji sejtek hipodiploid állománya (Varamini *et al.*, 2009). A hatás mechanizmusa nem kellően tisztázott. Byler és mtsai. a kinolin alapváz ismert tumorelles szerekekkel (pl. kamptotecin) mutatott szerkezeti hasonlóságából kiindulva *in silico* vizsgálatokkal a DNS láncba történő interkaláció és a következményes topoizoméráz I bénulás lehetőségét mutatták ki (Byler *et al.*, 2009).

A kinolinvázis alkaloidok adherens sejtekre gyakorolt proapoptotikus hatására vonatkozó adatokat elsőként közöltük (Molnár *et al.*, 2013). A két hatékonynak talált vegyület – **13a** és **13b** – a referenciaként használt ciszplatinnal ekviantiproliferatív, ugyanakkor szelektivitás tekintetében felülmúlják azt, 30 μM jelenlétében gyakorlatilag nem hatnak a fibroblasztok viabilitására. A vegyületek proapoptotikus hatását a jelenség morfológiai és biokémiai markereinek detektálásával igazoltuk. Mindezek alapján a kinolin alapváz optimálisnak tűnik tumorelles hatású innovatív vegyületek fejlesztésére.

6.2.2. Növényi kivonatok és szeszkviterpének antiproliferatív hatása

A növényvilág felfedező gyógyszerkutatásban betöltött meghatározó jelentősége vitathatatlan, különösen érvényes ez az élő kórokozókra ható szerekre. A klinikai gyakorlatban nélkülözhetetlen hatóanyagokat, ill. azok prototípusait izolálták növényi forrásokból. Az új, preklinikai és klinikai fejlesztés alatt álló molekulák jelentős hányada ma is valamilyen módon természetes eredetre vezethető vissza (Cragg és Newman, 2009).

A növényi kivonatokat tekinthetjük természetes eredetű vegyületkönyvtáraknak, melyekben a komponensek pontos száma nem ismert. A kivonat kedvező hatása esetén természetesen cél az aktív tartalomanyagok azonosítása, ami az esetek egy részében nehézkes. Egyrészt az eredeti kivonat hatásvezérelt frakcionálása során a minor komponensek azonosítását maga a csekély mennyiség is limitálhatja. Másrészt az is előfordulhat, hogy a kivonat eredő hatását az egyes komponensek szinergizmusa hozza létre, így nem vezethető vissza egy aktív vegyületre (Lewandowska *et al.*, 2014).

Az Asteraceae növény család fajainak számos népgyógyászati felhasználását dokumentálták, így ismerünk tumorelles hatásúnak tartott, ill. ilyen indikációval alkalmazott kivonatokat. A közölt vizsgálatok legnagyobb részét azonban az Európán kívül honos fajokkal végezték, az európai, ezen belül a magyarországi fajok tumorelles hatására vonatkozó adatok hiányosak (Heinrich *et al.*, 1998, Monks *et al.*, 2002, Ukiya *et al.*, 2002).

Az 51 növényfaj szisztematikus szűrővizsgálatával olyan adatállományt hoztunk létre, amely alkalmas arra, hogy kijelöljük a részletes vizsgálatokra, hatásvezérelt frakcionálásra alkalmas növényeket. A leghatékonyabb kivonatokat már a szűrővizsgálat során tovább jellemeztük: meghatároztuk azok IC_{50} értékét és elkülönítettük citosztatikus ill. citotoxikus hatásukat. A kiválasztáshoz használt hatékonysági adatra nincs általánosan elfogadott norma, ám az általunk alkalmazott határérték – 10 $\mu\text{g/ml}$ mellett minimum 50%-ban gátolt proliferáció – közelít az NCI által javasolt értékhez, ami kivonatokra 20 $\mu\text{g/ml}$, míg izolált vegyületekre 4 $\mu\text{g/ml}$ (Lee és Houghton, 2005).

A vizsgált minták között azonosítottunk olyanokat, amelyeknek forrásául szolgáló növényéről nem volt ismert annak tumorelles hatása (pl. *E. canadensis*, *A. ruthenica*, *X. italicum*). Ezen növények későbbi, jelen értekezésben nem részletezett hatáskövetett frakcionálása során sikerül azonosítani a hatásért felelős vegyületeket, melyek egy része újonnan

leírt természetes vegyületnek bizonyult. Az izolált vegyületeket kiemelkedő antiproliferatív aktivitás és annak limitált szakirodalmi ismertsége esetén további vizsgálatoknak vetettük alá, melyeknek célja a detektált effektus mechanizmusának feltárása volt. Az azonosított tartalomanyagok közül aktivitásuk alapján kiemelhető négy szeszkviterpén, az *A. asiatica*-ból izolált **14a–c** és az *O. acantium*-ból származó **14d**.

Az izolált szeszkviterpének tumorellenes hatásával kapcsolatban nem állt rendelkezésre kísérletes adat, mindössze közeli rokonvegyületeik hatásairól számoltak be. Így a **14c** acetoxi származéka gátolta a humán és állati glióma sejtek proliferációját, valamint kimutatták a vegyület proapoptotikus hatását is (Trifunovic *et al.*, 2014). A zaluzanin C 3 µg/ml alatti IC₅₀ értékkel gátolta humán adherens tumorsejtek proliferációját (Choi *et al.*, 2006). Ezek alapján célszerűnek tűnt a **14a–d** vegyületek antiproliferatív irányú vizsgálata, ill. hatásuk mechanizmusának jellemzése.

Mind a négy tartalomanyag kifejezett antiproliferatív hatást mutatott HL-60 leukémia sejteken, míg fibroblasztokon egy nagyságrenddel magasabb IC₅₀ értékeket mértünk, ami a vegyületek kielégítő tumorszelektivitására utal. A vegyületek proapoptotikus tulajdonságát mind morfológiai (fluoreszcens kettős festés), mind biokémiai úton (kaspázok aktiválódása, hipodiploid állomány halmozódása) sikerült igazolnunk. Az apoptózis mitokondriális útjának aktiválódását mutatja a fokozott kaspáz-9 aktivitás, ill. az emelkedett Bax/Bcl-2 arány.

A vegyületek HL-60 sejtekre gyakorolt ciklus-eloszlása alapján feltételezhető a G2→M átmenet diszregulációja, így meghatároztuk a jelenség legfőbb regulátorainak mRNS-szintű kifejeződését.

A CDK1 ciklin B jelenlétében olyan célfehérjék foszforilációját végzi, melyek közvetlenül kiváltják a mitózisra jellemző citoarchitektúra megjelenését. Ezen fehérjék között kiemelendő a nukleáris laminok és a vimentin. A ciklin B két izoformája (B1 és B2) azonos időbeliséggel oszcillál az osztódó sejtben; mindkettő a DNS teljes megkettőződése után jelenik meg és a metafázis során degradálódik (Gong és Ferrell, 2010). Térbeli kifejeződésük ugyanakkor eltérő; a B1 izoformát a mikrotubulusok, míg a B2-t a Golgi-készülék mentén mutatták ki HeLa sejtekben (Jackman *et al.*, 1995). A ciklin B1 fejlődéstani jelentőségét támasztja alá, hogy a proteint nem expresszáló transzgenikus egerek nem bizonyultak életképesnek, ugyanakkor a B2 izoforma hasonló hiánya nem okozott detektálható tüneteket (Brandeis *et al.*, 1998). Ugyanakkor humán tumorsejteken nyert eredmények szerint bármelyik

izoforma hiánya esetén a másik ciklin B átveszi a hiányzó funkciót, a két izoforma kölcsönösen kiváltja egymás hatását (Huang *et al.*, 2013). Ezen adatok ismeretében kézenfekvőnek tűnik, hogy a vizsgált szeszkviterpének által kiváltott sejtciklus blokádban alárendelt szerepet játszik a ciklinekre gyakorolt hatás, hiszen az a **14a** esetében a B1 és B2 formára nézve ellentétes, a **14b** esetében pedig szerény gátló hatást tapasztaltunk a ciklin B2-re. A CDK1 protein expressziójára nem jellemző a sejtcikluson belüli fluktuáció, a kináz aktivitását a ciklus során megjelenő és degradálódó ciklin B határozza meg (Hershko, 1999). Ezek alapján feltételezhető, hogy a vegyületek CDK1 expressziójára gyakorolt egyértelmű gátló hatása jelentősebb szerepet játszik a sejtciklus blokádjában, ezen keresztül az észlelt antiproliferatív tulajdonságban.

A szeszkviterpének jellemző farmakológiai tulajdonságait – egyebek mellett az antiproliferatív és gyulladásgátló effektust – a jellemző szerkezeti elemek, farmakofor csoportok hordozzák. Ezek az α -metilén- γ -lakton vagy telítetlen ciklopentanon gyűrűk. Ezeken túl az epoxid szerkezeti elem szintén meghatározó lehet a hatás kialakulásában; alkilálószerként hatva intracelluláris makromolekulák – elsősorban DNS – funkcionális károsítását idézik elő, hozzájárulva ezzel az észlelt hatáshoz (Gheeya *et al.*, 2010, Gach *et al.*, 2015). A vizsgált szeszkviterpének közül kettő – **14a** és **14b** – epoxidgyűrűt is tartalmaz, így ezek a molekulák bifunkcionális természetes vegyületeknek is tekinthetők.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a növényvilág szisztematikus, etnomedicinális adatokkal támogatott szűrővizsgálata a mai napig elvezethet olyan újonnan felismert vagy farmakológiailag aluljellemezett természetes vegyületekhez, melyek alkalmasak hatóanyag-jelöltként történő további fejlesztésre. Az Asteraceae-fajok antiproliferatív irányú és nagy volumenű vizsgálata során azonosított gvajanolid-típusú szeszkviterpének (**14a**, **14b**) rendelkeznek mindazokkal a farmakológiai tulajdonságokkal, amelyeket a tumorellenes szerek korai preklinikai fejlesztése során biztatónak tekintünk.

7. Az értekezés legfőbb megállapításai

Az értekezésben prezentált kísérletes munka legfőbb eredeti megállapításai a következőkben foglalhatók össze.

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. Megállapítottuk, hogy az észlelt hatást a sejtciklus G2/M fázisban bekövetkező blokádjá kíséri. Morfológiai és biokémiai módszerekkel igazoltuk a vegyületek mitokondriális úton kialakuló proapoptotikus hatását.

Kimutattuk ösztrolon-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).

Elsőként mutattuk ki a D-homoösztrolon (**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, ami pedig a statmin fehérje csökkent foszforilációjára vezethető vissza.

Igazoltuk szolanidin analógok antiproliferatív hatását adherens és leukémia sejtvonalakon. A kiválasztott leghatékonyabb vegyület (**8c**) kisebb mértékben zavarja a fibroblasztok proliferációját, mint a malignus sejtekét. 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.

Kimutattuk az ösztadiol lokális keletkezésének gátlására tervezett egyes 14 β -HSD1 inhibitorok hormonális hatástól független antiproliferatív effektusát adherens sejtvonalakon. A kiválasztott legpotensebb 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.

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.

Farmakológiai nem jellemzett akridonvázak alkaloidok közül kiemelkedően hatékonynak találtuk az izogravakridon-klorint (**12a**) emlőkarcinóma sejtpanelen és további adherens sejteken. A vegyület mitokondriális úton váltott ki apoptózist MDA-MB-231 sejtvonalon. A vegyületek jelentősen gátolták az ABCB1 transzporter aktivitását, de csak 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.

A Rutaceae növényfajokból származó kinolinvázak alkaloidok közül kettő (kokuszagin és szkimmianin) mutatott számottevő tumorszelektív hatást HeLa sejteken. Mindkét alkaloid kiváltotta az apoptózis morfológiai és biokémiai markereit, a jelenséget a DNS szintézisének gátlására sikerült visszavezetnünk.

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 kevésbé jellemzett vegyületeket és eddig nem ismert természetes molekulákat eredményezett. Ezek közül kiemelkedett négy szeszkviterpén (**14a–d**), melyek mind adherens, mind leukémia sejteken markáns 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.

Az értekezésben bemutatott eredmények jelentőségét egyrészt abban látom, hogy azok a kutatóhelyen egy újonnan elindított kutatási témában és részben újonnan kialakított kooperációk eredményeképpen jöttek létre. Másrészt maguk a generált experimentális adatok, ill. feltárt összefüggések vezérmolekuláknak tekinthető originális természetes és szintetikus molekulákhoz

vezethetnek. A hatékonyságuk és szelektivitásuk alapján kiválasztott ígéretes hatóanyagok behatóbb vizsgálata során feltártuk a hatásmechanizmus meghatározó elemeit, ezen adatok segíthetnek megérteni hasonló szerkezetű molekulák farmakológiai viselkedését. A vizsgált vegyületek egy része ugyanakkor közvetlenül is alkalmasak lehet arra, hogy prototípusként, modellként hasznosuljon a gyógyszerkutatás későbbi preklinikai szakaszában.

8. Irodalomjegyzék

- Ahua KM, Ioset JR, Ransijn A, Mauel J, Mavi S, Hostettmann K: Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. *Phytochemistry* **65**: 963–968 (2004)
- Ancuceanu RV, Istudor V: Pharmacologically active natural compounds for lung cancer. *Altern Med Rev* **9**: 402–419 (2004)
- Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA: The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **62**: 268–303 (1997)
- Aperia A: New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med* **261**: 44–52 (2007)
- Araujo JR, Goncalves P, Martel F: Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res* **31**: 77–87 (2011)
- Ayan D, Roy J, Maltais R, Poirier D: Impact of estradiol structural modifications (18-methyl and/or 17-hydroxy inversion of configuration) on the in vitro and in vivo estrogenic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**: 324–330 (2011)
- Banday AH, Shameem SA, Gupta BD, Kumar HM: D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *Steroids* **75**: 801–804 (2010)
- Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH: Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* **269**: 226–242 (2008)
- Barreda VD, Palazzesi L, Telleria MC, Olivero EB, Raine JJ, Forest F: Early evolution of the angiosperm clade Asteraceae in the Cretaceous of Antarctica. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 10989–10994 (2015)
- Bastida J, Berkov S, Torras L, Pigni NB, de Andrade JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F: Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: Munoz-Torrero D (ed). *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. Transworld Research Network: Kerala, 2011, pp 65–100.
- Bastow KF: New acridone inhibitors of human herpes virus replication. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**: 323–330 (2004)
- Bayet C, Fazio C, Darbour N, Berger O, Raad I, Chaboud A, Dumontet C, Guilet D: Modulation of P-glycoprotein activity by acridones and coumarins from *Citrus sinensis*. *Phytother Res* **21**: 386–390 (2007)
- Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z: Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* **35**: 181–195 (1999)
- Belletti B, Baldassarre G: Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* **15**: 1249–1266 (2011)
- Berényi Á, Minorics R, Iványi Z, Ocsóvszki I, Ducza E, Thole H, Messinger J, Wölfling J, Mótán G, Mernyák E, Frank É, Schneider G, Zupkó I: Synthesis and investigation of the anticancer effects of estrone-16-oxime ethers in vitro. *Steroids* **78**: 69–78 (2013a)

- Berényi Á, Frotscher M, Marchais-Oberwinkler S, Hartmann RW, Minorics R, Ocsóvszki 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 (2013b)
- Bey E, Marchais-Oberwinkler S, Negri M, Kruchten P, Oster A, Klein T, Spadaro A, Werth R, Frotscher M, Birk B, Hartmann RW: New insights into the SAR and binding modes of bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: influence of additional substituents on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) inhibitory activity and selectivity. *J Med Chem* **52**: 6724–6743 (2009)
- Borys D, Canter RJ, Hoch B, Martinez SR, Tamurian RM, Murphy B, Bishop JW, Horvai A: P16 expression predicts necrotic response among patients with osteosarcoma receiving neoadjuvant chemotherapy. *Hum Pathol* **43**: 1948–1954 (2012)
- Boumendjel A, Macalou S, Ahmed-Belkacem A, Blanc M, Di Pietro A: Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg Med Chem* **15**: 2892–2897 (2007)
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B: CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* **7**: 495–507 (2007)
- Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T: Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4344–4349 (1998)
- Brinkmann K, Kashkar H: Targeting the mitochondrial apoptotic pathway: a preferred approach in hematologic malignancies? *Cell Death Dis* **5**: e1098 (2014)
- Bu S, Blaukat A, Fu X, Heldin NE, Landstrom M: Mechanisms for 2-methoxyestradiol-induced apoptosis of prostate cancer cells. *FEBS Lett* **531**: 141–151 (2002)
- Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Groschen S, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingartner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lutjohann D, Hartmann T, Grimm MO: Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* **33**: 16072–16087 (2013)
- Byler KG, Wang C, Setzer WN: Quinoline alkaloids as intercalative topoisomerase inhibitors. *J Mol Model* **15**: 1417–1426 (2009)
- Cedron JC, Ravelo AG, Leon LG, Padron JM, Estevez-Braun A: Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules* **20**: 13854–13863 (2015)
- Cerioti G: Narciclasine: an antimitotic substance from *Narcissus* bulbs. *Nature* **213**: 595–596 (1967)
- Chao MW, Chen CH, Chang YL, Teng CM, Pan SL: α -Tomatine-mediated anti-cancer activity in vitro and in vivo through cell cycle- and caspase-independent pathways. *PLOS ONE* **7**: e44093 (2012)
- Chen KS, Chang YL, Teng CM, Chen CF, Wu YC: Furoquinolines with antiplatelet aggregation activity from leaves of *Melicope confusa*. *Planta Med* **66**: 80–81 (2000)
- Chen PS, Shih YW, Huang HC, Cheng HW: Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLOS ONE* **6**: e20164 (2011)
- Chen Y, Tang YM, Yu SL, Han YW, Kou JP, Liu BL, Yu BY: Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chin J Nat Med* **13**: 578–587 (2015)
- Chen Z, Shi T, Zhang L, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J: Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* **370**: 153–164 (2016)

- Cheng JT: Effect of skimmianine on animal behavior. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **281**: 35–43 (1986)
- Cheng JT, Chang SS, Chen IS: Cardiovascular effect of skimmianine in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **306**: 65–74 (1990)
- Cheok CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP: Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 25–37 (2011)
- Choi SH, Ahn JB, Kozukue N, Kim HJ, Nishitani Y, Zhang L, Mizuno M, Levin CE, Friedman M: Structure-activity relationships of α -, β (1)-, γ -, and δ -tomatine and tomatidine against human breast (MDA-MB-231), gastric (KATO-III), and prostate (PC3) cancer cells. *J Agric Food Chem* **60**: 3891–3899 (2012)
- Choi SZ, Yang MC, Choi SU, Lee KR: Cytotoxic terpenes and lignans from the roots of *Ainsliaea acerifolia*. *Arch Pharm Res* **29**: 203–208 (2006)
- Cholewinski G, Dzierzbicka K, Kolodziejczyk AM: Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacol Rep* **63**: 305–336 (2011)
- Connolly PF, Jager R, Fearnhead HO: New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol* **5**: 149 (2014)
- Cragg G, Newman D: Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev* **8**: 313–331 (2009)
- Cragg GM, Newman DJ: Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* **1830**: 3670–3695 (2013)
- Cunha F: The Ebers papyrus. *Am J Surg* **77**: 134–136 (1949)
- Cushman M, He HM, Katzenellenbogen JA, Lin CM, Hamel E: Synthesis, antitubulin and antimetabolic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site. *J Med Chem* **38**: 2041–2049 (1995)
- 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)
- Csonka A, Hamdoun S, Spengler G, Martins A, Vincze I, Efferth T, Molnár J: Substituted steroidal compounds containing amino and amido groups reverse multidrug resistance of mouse T-lymphoma and two human prostate cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res* **35**: 2105–2112 (2015)
- 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 (2009a)
- 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 (2009b)
- 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)
- 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)
- DeVita VT, Chu E: A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68**: 8643–8653 (2008)

- Doan HQ, Gulati N, Levis WR: Ingenol mebutate: potential for further development of cancer immunotherapy. *J Drugs Dermatol* **11**: 1156–1157 (2012)
- Dolabela MF, Oliveira SG, Nascimento JM, Peres JM, Wagner H, Povia MM, de Oliveira AB: In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine* **15**: 367–372 (2008)
- Duraipandiyan V, Ignacimuthu S: Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. *J Ethnopharmacol* **123**: 494–498 (2009)
- Ea S, Giacometti S, Ciccolini J, Akhmedjanova V, Aubert C: Cytotoxic effects of haplamine and its major metabolites on human cancer cell lines. *Planta Med* **74**: 1265–1268 (2008)
- Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WF, Van Slambrouck S, Kornienko A: Biological evaluation of structurally diverse amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Med* **75**: 501–507 (2009)
- Fabricant DS, Farnsworth NR: The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 1**: 69–75 (2001)
- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* **49**: 1374–1403 (2013)
- Fernandes MB, Scotti MT, Ferreira MJ, Emerenciano VP: Use of self-organizing maps and molecular descriptors to predict the cytotoxic activity of sesquiterpene lactones. *Eur J Med Chem* **43**: 2197–2205 (2008)
- Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1371–1387 (2006)
- 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)
- Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L: The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* **368**: 237–239 (1994)
- Fournier MA, Poirier D: Estrogen formation in endometrial and cervix cancer cell lines: involvement of aromatase, steroid sulfatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (types 1, 5, 7 and 12). *Mol Cell Endocrinol* **301**: 142–145 (2009)
- 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)
- 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)
- Friedman M: Chemistry and anticarcinogenic mechanisms of glycoalkaloids produced by eggplants, potatoes, and tomatoes. *J Agric Food Chem* **63**: 3323–3337 (2015)
- Furusawa E, Furusawa S, Lee JY, Patanavanich S: Therapeutic activity of pretazettine, a narcissus alkaloid on Rauscher leukemia: comparison with tazettine and streptonigrin. *Proc Soc Exp Biol Med* **152**: 186–191 (1976)

- Gabrielli BG, De Souza CP, Tonks ID, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA: Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci* **109** (Pt 5): 1081–1093 (1996)
- Gach K, Dlugosz A, Janecka A: The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **388**: 477–486 (2015)
- GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators: Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **385**: 117–171 (2015)
- Ghantous A, Sinjab A, Herceg Z, Darwiche N: Parthenolide: from plant shoots to cancer roots. *Drug Discov Today* **18**: 894–905 (2013)
- Gheeya J, Johansson P, Chen QR, Dexheimer T, Metaferia B, Song YK, Wei JS, He J, Pommier Y, Khan J: Expression profiling identifies epoxy anthraquinone derivative as a DNA topoisomerase inhibitor. *Cancer Lett* **293**: 124–131 (2010)
- Goldin AG, Safa AR: Digitalis and cancer. *Lancet* **1**: 1134 (1984)
- Gong D, Ferrell JE, Jr.: The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Mol Biol Cell* **21**: 3149–3161 (2010)
- Gong QF, Liu EH, Xin R, Huang X, Gao N: 2ME and 2OHE2 exhibit growth inhibitory effects and cell cycle arrest at G2/M in RL95-2 human endometrial cancer cells through activation of p53 and Chk1. *Mol Cell Biochem* **352**: 221–230 (2011)
- Guilbaud N, Leonce S, Tillequin F, Koch M, Hickman JA, Pierre A: Acronycine derivatives as promising antitumor agents. *Anticancer Drugs* **13**: 445–449 (2002)
- 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)
- 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)
- Harrison MR, Hahn NM, Pili R, Oh WK, Hammers H, Sweeney C, Kim K, Perlman S, Arnott J, Sidor C, Wilding G, Liu G: A phase II study of 2-methoxyestradiol (2ME2) NanoCrystal(R) dispersion (NCD) in patients with taxane-refractory, metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC). *Invest New Drugs* **29**: 1465–1474 (2011)
- Haux J: Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med Hypotheses* **53**: 543–548 (1999)
- Haux J, Lam M, Marthinsen ABL, Strickert T, Lundgren S: Digitoxin, in non toxic concentrations, induces apoptotic cell death in Jurkat T cells in vitro. *Z Onkol* **31**: 14–20 (1999)
- Haux J, Klepp O, Spigset O, Tretli S: Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. *BMC Cancer* **1**: 11 (2001)
- Heinrich M, Robles M, West JE, Ortiz de Montellano BR, Rodriguez E: Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 539–565 (1998)
- Hershko A: Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**: 1571–1575 (1999)
- Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP: Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8501–8506 (2000)
- Hohmann J, Forgo P, Molnár J, Wolfard K, Molnár A, Thalhammer T, Máthé I, Sharples D: Antiproliferative amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. *Planta Med* **68**: 454–457 (2002)

- Huang Y, Sramkoski RM, Jacobberger JW: The kinetics of G2 and M transitions regulated by B cyclins. *PLOS ONE* **8**: e80861 (2013)
- Husen B, Huhtinen K, Saloniemi T, Messinger J, Thole HH, Poutanen M: Human hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 expression enhances estrogen sensitivity of MCF-7 breast cancer cell xenografts. *Endocrinology* **147**: 5333–5339 (2006)
- Ireson CR, Chander SK, Purohit A, Perera S, Newman SP, Parish D, Leese MP, Smith AC, Potter BV, Reed MJ: Pharmacokinetics and efficacy of 2-methoxyoestradiol and 2-methoxyoestradiol-bis-sulphamate in vivo in rodents. *Br J Cancer* **90**: 932–937 (2004)
- Jackman M, Firth M, Pines J: Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J* **14**: 1646–1654 (1995)
- James J, Murry DJ, Treston AM, Storniolo AM, Sledge GW, Sidor C, Miller KD: Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of 2-methoxyestradiol alone or in combination with docetaxel in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer. *Invest New Drugs* **25**: 41–48 (2007)
- Jansen O, Akhmedjanova V, Angenot L, Balansard G, Chariot A, Ollivier E, Tits M, Frederich M: Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum A. Juss.* for their cytotoxic properties. *J Ethnopharmacol* **105**: 241–245 (2006)
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ: Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* **57**: 43–66 (2007)
- Ji YB, Gao SY, Ji CF, Zou X: Induction of apoptosis in HepG2 cells by solanine and Bcl-2 protein. *J Ethnopharmacol* **115**: 194–202 (2008)
- Jiang QW, Chen MW, Cheng KJ, Yu PZ, Wei X, Shi Z: Therapeutic Potential of Steroidal Alkaloids in Cancer and Other Diseases. *Med Res Rev* **36**: 119–143 (2016)
- Jin S, Gorfajn B, Faircloth G, Scotto KW: Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6775–6779 (2000)
- Johnson PH, Walker RP, Jones SW, Stephens K, Meurer J, Zajchowski DA, Luke MM, Eeckman F, Tan Y, Wong L, Parry G, Morgan TK, Jr., McCarrick MA, Monforte J: Multiplex gene expression analysis for high-throughput drug discovery: screening and analysis of compounds affecting genes overexpressed in cancer cells. *Mol Cancer Ther* **1**: 1293–1304 (2002)
- Jones AW: Early drug discovery and the rise of pharmaceutical chemistry. *Drug Test Anal* **3**: 337–344 (2011)
- Kádár Z, Molnár J, Schneider G, Zupkó I, 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)
- Kamal A, Reddy MK, Ramaiah MJ, Rajender, Reddy JS, Srikanth YV, Dastagiri D, Bharathi EV, Pushpavalli SN, Sarma P, Pal-Bhadra M: Synthesis and biological evaluation of estradiol linked pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) conjugates as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem* **19**: 2565–2581 (2011)
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E: Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* **21**: 165–170 (2002)
- Kaplan JG: Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Annu Rev Physiol* **40**: 19–41 (1978)

- Katsumi Y, Iehara T, Miyachi M, Yagyu S, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, Tamura S, Kuwahara Y, Tsuchiya K, Kuroda H, Sugimoto T, Houghton PJ, Hosoi H: Sensitivity of malignant rhabdoid tumor cell lines to PD 0332991 is inversely correlated with p16 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **413**: 62–68 (2011)
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M, Takemura Y, Ju-ichi M, Ito C, Furukawa H: The antiproliferative effect of acridone alkaloids on several cancer cell lines. *J Nat Prod* **62**: 587–589 (1999)
- Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G: Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 221–237 (2011)
- Khoury HJ, Cortes J, Baccarani M, Wetzler M, Masszi T, Digumarti R, Craig A, Benichou AC, Akard L: Omacetaxine mepesuccinate in patients with advanced chronic myeloid leukemia with resistance or intolerance to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* **56**: 120–127 (2015)
- Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ: Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res* **57**: 81–86 (1997)
- Kontoghiorghes CN, Andreou N, Constantinou K, Kontoghiorghes GJ: World health dilemmas: Orphan and rare diseases, orphan drugs and orphan patients. *World J Methodol* **4**: 163–188 (2014)
- 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)
- Krings U, Berger RG: Antioxidant activity of some roasted foods. *Food Chemistry* **72**: 223–229 (2001)
- Krishnegowda G, Thimmaiah P, Hegde R, Dass C, Houghton PJ, Thimmaiah KN: Synthesis and chemical characterization of 2-methoxy-N(10)-substituted acridones needed to reverse vinblastine resistance in multidrug resistant (MDR) cancer cells. *Bioorg Med Chem* **10**: 2367–2380 (2002)
- Krstic NM, Bjelakovic MS, Zizak Z, Pavlovic MD, Juranic ZD, Pavlovic VD: Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities. *Steroids* **72**: 406–414 (2007)
- Kuete V, Sandjo LP, Seukep JA, Zeino M, Mbaveng AT, Ngadjui B, Efferth T: Cytotoxic compounds from the fruits of *Uapaca togoensis* towards multifactorial drug-resistant cancer cells. *Planta Med* **81**: 32–38 (2015)
- Lavie Y, Harel-Orbital T, Gaffield W, Liscovitch M: Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transport and multidrug resistance in human cancer cells. *Anticancer Res* **21**: 1189–1194 (2001)
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH: Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* **115**: 2665–2672 (2005)
- Lee CC, Houghton P: Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* **100**: 237–243 (2005)
- Lee KR, Kozukue N, Han JS, Park JH, Chang EY, Baek EJ, Chang JS, Friedman M: Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J Agric Food Chem* **52**: 2832–2839 (2004)
- Leonard GD, Fojo T, Bates SE: The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**: 411–424 (2003)
- Leonce S, Perez V, Lambel S, Peyroulan D, Tillequin F, Michel S, Koch M, Pfeiffer B, Atassi G, Hickman JA, Pierre A: Induction of cyclin E and inhibition of DNA synthesis by the

- novel acronycine derivative S23906-1 precede the irreversible arrest of tumor cells in S phase leading to apoptosis. *Mol Pharmacol* **60**: 1383–1391 (2001)
- Lewandowska U, Gorlach S, Owczarek K, Hrabec E, Szewczyk K: Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **68**: 528–540 (2014)
- Li L, Bu S, Backstrom T, Landstrom M, Ulmsten U, Fu X: Induction of apoptosis and G2/M arrest by 2-methoxyestradiol in human cervical cancer HeLaS3 cells. *Anticancer Res* **24**: 873–880 (2004)
- Lindqvist A, Kallstrom H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal CK: Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* **171**: 35–45 (2005)
- Liu JF, Sang CY, Xu XH, Zhang LL, Yang X, Hui L, Zhang JB, Chen SW: Synthesis and cytotoxic activity on human cancer cells of carbamate derivatives of 4beta-(1,2,3-triazol-1-yl)podophyllotoxin. *Eur J Med Chem* **64**: 621–628 (2013)
- Liu MJ, Wang Z, Ju Y, Wong RN, Wu QY: Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca^{2+} homeostasis. *Cancer Chemother Pharmacol* **55**: 79–90 (2005)
- Liu P, Qin Y, Wu L, Yang S, Li N, Wang H, Xu H, Sun K, Zhang S, Han X, Sun Y, Shi Y: A phase I clinical trial assessing the safety and tolerability of combretastatin A4 phosphate injections. *Anticancer Drugs* **25**: 462–471 (2014)
- Lopez-Munoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C: The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat* **1**: 329–343 (2005)
- Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, Giannakakou P: 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* **3**: 363–375 (2003)
- Maddocks K, Wei L, Rozewski D, Jiang Y, Zhao Y, Adusumilli M, Pierceall WE, Doykin C, Cardone MH, Jones JA, Flynn J, Andritsos LA, Grever MR, Byrd JC, Johnson AJ, Phelps MA, Blum KA: Reduced occurrence of tumor flare with flavopiridol followed by combined flavopiridol and lenalidomide in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Am J Hematol* **90**: 327–333 (2015)
- Madlener S, Saiko P, Vonach C, Viola K, Huttary N, Stark N, Popescu R, Gridling M, Vo NT, Herbacek I, Davidovits A, Giessrigl B, Venkateswarlu S, Geleff S, Jager W, Grusch M, Kerjaschki D, Mikulits W, Golakoti T, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T, Krupitza G: Multifactorial anticancer effects of digalloyl-resveratrol encompass apoptosis, cell-cycle arrest, and inhibition of lymphendothelial gap formation in vitro. *Br J Cancer* **102**: 1361–1370 (2010)
- Majeed R, Sangwan PL, Chinthakindi PK, Khan I, Dangroo NA, Thota N, Hamid A, Sharma PR, Saxena AK, Koul S: Synthesis of 3-O-propargylated betulinic acid and its 1,2,3-triazoles as potential apoptotic agents. *Eur J Med Chem* **63**: 782–792 (2013)
- Mansoor TA, Borralho PM, Luo X, Mulhovo S, Rodrigues CM, Ferreira MJ: Apoptosis inducing activity of benzophenanthridine-type alkaloids and 2-arylbenzofuran neolignans in HCT116 colon carcinoma cells. *Phytomedicine* **20**: 923–929 (2013)
- Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M, Ziegler E, Werth R, Kruchten P, Messinger J, Thole H, Hartmann RW: Structure-activity study in the class of 6-(3'-hydroxyphenyl)naphthalenes leading to an optimization of a pharmacophore model for 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1) inhibitors. *Mol Cell Endocrinol* **301**: 205–211 (2009)

- Marchais-Oberwinkler S, Henn C, Moller G, Klein T, Negri M, Oster A, Spadaro A, Werth R, Wetzell M, Xu K, Frotscher M, Hartmann RW, Adamski J: 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: Protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**: 66–82 (2011)
- Mayer AM, Gustafson KR: Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer* **44**: 2357–2387 (2008)
- Mayur YC, Padma T, Parimala BH, Chandramouli KH, Jagadeesh S, Gowda NM, Thimmaiah KN: Sensitization of multidrug resistant (MDR) cancer cells to vinblastine by novel acridones: correlation between anti-calmodulin activity and anti-MDR activity. *Med Chem* **2**: 63–77 (2006)
- 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)
- Michael JP: Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat Prod Rep* **22**: 627–646 (2005)
- Michalakakis J, Georgatos SD, Romanos J, Koutala H, Georgoulas V, Tsiftsis D, Theodoropoulos PA: Micromolar taxol, with or without hyperthermia, induces mitotic catastrophe and cell necrosis in HeLa cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**: 615–622 (2005)
- Min YD, Kwon HC, Yang MC, Lee KH, Choi SU, Lee KR: Isolation of limonoids and alkaloids from *Phellodendron amurense* and their multidrug resistance (MDR) reversal activity. *Arch Pharm Res* **30**: 58–63 (2007)
- 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)
- Minorics R, Bózsity N, Wölfling J, Mernyák E, Schneider G, Márki A, Falkay G, Ocsóvszki 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)
- 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)
- Miyoshi Y, Ando A, Shiba E, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S: Involvement of up-regulation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *Int J Cancer* **94**: 685–689 (2001)
- Molnár J, Szabó D, Mándi Y, Mucsi I, Fischer J, Varga A, König S, Motohashi N: Multidrug resistance reversal in mouse lymphoma cells by heterocyclic compounds. *Anticancer Res* **18**: 3033–3038 (1998)
- 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)
- 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)
- 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)
- Molnár T, M. Barna K: Demográfiai jellemzők Magyarországon és az Európai Unióban, különös tekintettel a daganatos megbetegedések okozta halálozásra. *Statisztikai Szemle* **90**: 544–558 (2012)
- Monks NR, Ferraz A, Bordignon S, Machado KR, Lima MFS, Rocha AB, Schwartzmann G: In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. *Pharm Biol* **40**: 494–500 (2002)
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55–63 (1983)
- Mueck AO, Seeger H: 2-Methoxyestradiol - biology and mechanism of action. *Steroids* **75**: 625–631 (2010)
- Nair JJ, Rárová L, Strnad M, Bastida J, van Staden J: Mechanistic insights to the cytotoxicity of Amaryllidaceae alkaloids. *J Nat Prod* **10**: 171–182 (2015)
- Nam KW, Je KH, Shin YJ, Kang SS, Mar W: Inhibitory effects of furoquinoline alkaloids from *Melicope confusa* and *Dictamnus albus* against human phosphodiesterase 5 (hPDE5A) in vitro. *Arch Pharm Res* **28**: 675–679 (2005)
- Nazrullaev SS, Bessonova IA, Akhmedkhodzhaeva KS: Estrogenic activity as a function of chemical structure in *Haplophyllum* quinoline alkaloids. *Chem Nat Comp* **37**: 551–555 (2001)
- Newman DJ, Cragg GM: Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **75**: 311–335 (2012)
- Olila D, Opuda-Asibo J, Olwa O: Bioassay-guided studies on the cytotoxic and in vitro trypanocidal activities of a sesquiterpene (Muzigadial) derived from a Ugandan medicinal plant (*Warburgia ugandensis*). *Afr Health Sci* **1**: 12–15 (2001)
- Oropesa Avila M, Fernandez Vega A, Garrido Maraver J, Villanueva Paz M, De Laveria I, De La Mata M, Cordero MD, Alcocer Gomez E, Delgado Pavon A, Alvarez Cordoba M, Cotan D, Sanchez-Alcazar JA: Emerging roles of apoptotic microtubules during the execution phase of apoptosis. *Cytoskeleton* **72**: 435–446 (2015)
- Pater MM, Pater A: Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* **145**: 313–318 (1985)
- Pettit GR, Melody N, Herald DL: Antineoplastic agents. 450. Synthesis of (+)-pancratistatin from (+)-narciclasine as relay. *J Org Chem* **66**: 2583–2587 (2001)
- Peyrat JF, Brion JD, Alami M: Synthetic 2-methoxyestradiol derivatives: structure-activity relationships. *Curr Med Chem* **19**: 4142–4156 (2012)
- Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R: Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* **27**: 6407–6418 (2008)
- Poza J, Rega M, Paz V, Alonso B, Rodríguez J, Salvador N, Fernández A, Jiménez C: Synthesis and evaluation of new 6-hydroximinosteroid analogs as cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem* **15**: 4722–4740 (2007)
- Prigent C, Dimitrov S: Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* **116**: 3677–3685 (2003)
- Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatin NM, Simpkins JW, Prokai L: Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. *Steroids* **73**: 280–288 (2008)
- Punjabi S, Cook LJ, Kersey P, Marks R, Cerio R: Solasodine glycoalkaloids: a novel topical therapy for basal cell carcinoma. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group, multicenter study. *Int J Dermatol* **47**: 78–82 (2008)

- Rates SMK: Plants as source of drugs. *Toxicon* **39**: 603–613 (2001)
- Réthy B, Zupkó I, Minorics R, Hohmann J, Ocsóvszki 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 (2007a)
- 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 (2007b)
- Réthy B, Hohmann J, Minorics R, Varga A, Ocsóvszki 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)
- Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG: A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* **5**: 12 (2005)
- Rocha M, Banuls C, Bellod L, Jover A, Victor VM, Hernandez-Mijares A: A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Curr Pharm Des* **17**: 4061–4075 (2011)
- Rodriguez-Fonseca C, Amils R, Garrett RA: Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23 S-like rRNAs deduced from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes. *J Mol Biol* **247**: 224–235 (1995)
- Saiko P, Steinmann MT, Schuster H, Graser G, Bressler S, Giessrigl B, Lackner A, Grusch M, Krupitza G, Bago-Horvath Z, Jaeger W, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T: Epigallocatechin gallate, ellagic acid, and rosmarinic acid perturb dNTP pools and inhibit de novo DNA synthesis and proliferation of human HL-60 promyelocytic leukemia cells: Synergism with arabinofuranosylcytosine. *Phytomedicine* **22**: 213–222 (2015)
- Sakac M, Gakovic A, Stojanovic S, Djurendic E, Kojic V, Bogdanovic G, Gasi KP: Synthesis and biological evaluation of a series of A,B-ring modified 16,17-secoandrosterane derivatives. *Bioorg Chem* **36**: 128–132 (2008)
- Sandjo LP, Kuete V, Tchangna RS, Efferth T, Ngadjui BT: Cytotoxic benzophenanthridine and furoquinoline alkaloids from *zanthoxylum buesgenii* (Rutaceae). *Chem Cent J* **8**: 61 (2014)
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129–1136 (1990)
- Scholz 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)
- 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)
- Setzer WN, Setzer MC, Schmidt JM, Moriarity DM, Vogler B, Reeb S, Holmes AM, Haber WA: Cytotoxic components from the bark of *Stauranthus perforatus* from Monteverde, Costa Rica. *Planta Med* **66**: 493–494 (2000)
- Shaikenov TE, Adekenov SM, Williams RM, Prashad N, Baker FL, Madden TL, Newman R: Argabin-DMA, a plant derived sesquiterpene, inhibits farnesyltransferase. *Oncol Rep* **8**: 173–179 (2001)
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S: Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* **22**: 526–539 (2015)

- Shen KH, Liao AC, Hung JH, Lee WJ, Hu KC, Lin PT, Liao RF, Chen PS: α -Solanine inhibits invasion of human prostate cancer cell by suppressing epithelial-mesenchymal transition and MMPs expression. *Molecules* **19**: 11896–11914 (2014)
- Shibata K, Ajiro K: Cell cycle-dependent suppressive effect of histone H1 on mitosis-specific H3 phosphorylation. *J Biol Chem* **268**: 18431–18434 (1993)
- Shih YW, Chen PS, Wu CH, Jeng YF, Wang CJ: Alpha-chaconine-reduced metastasis involves a PI3K/Akt signaling pathway with downregulation of NF-kappaB in human lung adenocarcinoma A549 cells. *J Agric Food Chem* **55**: 11035–11043 (2007)
- Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M, Konishi N: Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis* **24**: 1067–1075 (2003)
- Shiratori O: Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: in vitro and in vivo studies. *Gann* **58**: 521–528 (1967)
- Šmuc T, Rižner TL: Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogen-metabolizing enzymes in different cancer cell lines. *Chem Biol Interact* **178**: 228–233 (2009)
- Speirs V, Jenkins S, White MC: Growth factor regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in a human ovarian cell line: modulation by 17 beta-estradiol. *Anticancer Res* **13**: 1399–1403 (1993)
- Stander A, Joubert F, Joubert A: Docking, synthesis, and in vitro evaluation of antimitotic estrone analogs. *Chem Biol Drug Des* **77**: 173–181 (2011)
- Steinhubl SR: Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol* **101**: 14D–19D (2008)
- Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O, Holmquist J, Nordin B, Westman-Naeser S: Cardiac glycosides and breast cancer. *Lancet* **1**: 563 (1979)
- Stenkvist B, Bengtsson E, Dahlqvist B, Eriksson O, Järkrans T, Nordin B: Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. *N Engl J Med* **306**: 484 (1982)
- Stenkvist B: Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncol Rep* **6**: 493–496 (1999)
- Stocks J, Gutteridge JM, Sharp RJ, Dormandy TL: Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med* **47**: 215–222 (1974)
- Stubbe J, Riggs-Gelasco P: Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends Biochem Sci* **23**: 438–443 (1998)
- Sun L, Zhao Y, Li X, Yuan H, Cheng A, Lou H: A lysosomal-mitochondrial death pathway is induced by solamargine in human K562 leukemia cells. *Toxicol In Vitro* **24**: 1504–1511 (2010)
- Sunley K, Butler M: Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol Adv* **28**: 385–394 (2010)
- Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM: Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 219–234 (2006)
- Szekeres T, Gharehbaghi K, Fritzer M, Woody M, Srivastava A, van't Riet B, Jayaram HN, Elford HL: Biochemical and antitumor activity of trimidox, a new inhibitor of ribonucleotide reductase. *Cancer Chemother Pharmacol* **34**: 63–66 (1994)
- Szlávik L, Gyuris A, Minárovits J, Forgo P, Molnár J, Hohmann J: Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med* **70**: 871–873 (2004)

- Tadi K, Ashok BT, Chen Y, Banerjee D, Wysocka-Skrzela B, Konopa J, Darzynkiewicz Z, Tiwari RK: Pre-clinical evaluation of 1-nitroacridine derived chemotherapeutic agent that has preferential cytotoxic activity towards prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **6**: 1632–1637 (2007)
- Tinley TL, Leal RM, Randall-Hlubek DA, Cessac JW, Wilkens LR, Rao PN, Mooberry SL: Novel 2-methoxyestradiol analogues with antitumor activity. *Cancer Res* **63**: 1538–1549 (2003)
- Tiwari AK, Sodani K, Dai CL, Ashby CR, Chen ZS: Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* **12**: 570–594 (2011)
- Tolomeo M, Simoni D: Drug resistance and apoptosis in cancer treatment: development of new apoptosis-inducing agents active in drug resistant malignancies. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2**: 387–401 (2002)
- Tompá A: A daganatos betegségek előfordulása. A hazai és a nemzetközi helyzet ismertetése. *Magyar Tudomány* **172**: 1333–1345 (2011)
- Trifunovic S, Isakovic AM, Isakovic A, Vuckovic I, Mandic B, Novakovic M, Vajs V, Milosavljevic S, Trajkovic V: Isolation, characterization, and in vitro cytotoxicity of new sesquiterpenoids from *Achillea clavennae*. *Planta Med* **80**: 297–305 (2014)
- Trouillas P, Corbiere C, Liagre B, Duroux JL, Beneytout JL: Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg Med Chem* **13**: 1141–1149 (2005)
- Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, Suzuki H, Mukainaka T, Ichiishi E, Yasukawa K, Kasahara Y, Nishino H: Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Lett* **177**: 7–12 (2002)
- Valente I, Reis M, Duarte N, Serly J, Molnár J, Ferreira MJ: Jatrophone diterpenes from *Euphorbia mellifera* and their activity as P-glycoprotein modulators on multidrug-resistant mouse lymphoma and human colon adenocarcinoma cells. *J Nat Prod* **75**: 1915–1921 (2012)
- Van Goietsenoven G, Mathieu V, Lefranc F, Kornienko A, Evidente A, Kiss R: Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarbostryls are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. *Med Res Rev* **33**: 439–455 (2013)
- Van Quaquebeke E, Simon G, Andre A, Dewelle J, El Yazidi M, Bruyneel F, Tuti J, Nacoulma O, Guissou P, Decaestecker C, Braekman JC, Kiss R, Darro F: Identification of a novel cardenolide (2"-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. *J Med Chem* **48**: 849–856 (2005)
- Varamini P, Javidnia K, Soltani M, Mehdipour AR, Ghaderi A: Cytotoxic activity and cell cycle analysis of quinoline alkaloids isolated from *Haplophyllum canaliculatum* Boiss. *Planta Med* **75**: 1509–1516 (2009)
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C: Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* **243**: 167–190 (2000)
- Vogel HG (ed) *Drug Discovery and Evaluation. Pharmacological Assays*. Springer Verlag: Berlin, 2002.
- Wang TC, Chen IL, Lu PJ, Wong CH, Liao CH, Tsiao KC, Chang KM, Chen YL, Tzeng CC: Synthesis, antiproliferative, and antiplatelet activities of oxime- and methyloxime-containing flavone and isoflavone derivatives. *Bioorg Med Chem* **13**: 6045–6053 (2005)

- Wang Z, Zhou J, Ju Y, Zhang H, Liu M, Li X: Effects of two saponins extracted from the polygonatum Zanolanscianense pamp on the human leukemia (HL-60) cells. *Biol Pharm Bull* **24**: 159–162 (2001)
- Weniger B, Italiano L, Beck JP, Bastida J, Bergonon S, Codina C, Lobstein A, Anton R: Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med* **61**: 77–79 (1995)
- Wesierska-Gadek J, Wandl S, Kramer MP, Pickem C, Krystof V, Hajek SB: Roscovitine up-regulates p53 protein and induces apoptosis in human HeLaS(3) cervix carcinoma cells. *J Cell Biochem* **105**: 1161–1171 (2008)
- Wilson WR, Denny WA, Twigden SJ, Baguley BC, Probert JC: Selective toxicity of nitracrine to hypoxic mammalian cells. *Br J Cancer* **49**: 215–223 (1984)
- Wilson ZE, Brimble MA: Molecules derived from the extremes of life. *Nat Prod Rep* **26**: 44–71 (2009)
- Wohnsland F, Faller B: High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem* **44**: 923–930 (2001)
- Wong K, Ma J, Rothnie A, Biggin PC, Kerr ID: Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem Sci* **39**: 8–16 (2014)
- Wölfling J, Mernyák E, Frank E, Falkay G, Márki A, Minorics R, Schneider G: Synthesis and receptor-binding examinations of the normal and 13-epi-D-homoestrones and their 3-methyl ethers. *Steroids* **68**: 277–288 (2003)
- Yang G, Chen D: Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. *Chem Biodivers* **5**: 1718–1722 (2008)
- Zhang Z, Liu X, Wu T, Liu J, Zhang X, Yang X, Goodheart MJ, Engelhardt JF, Wang Y: Selective suppression of cervical cancer Hela cells by 2-O-beta-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. *Cell Biol Toxicol* **27**: 107–121 (2011)
- Zhou CH, Wang Y: Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr Med Chem* **19**: 239–280 (2012)
- Zhou Q, Gustafson D, Nallapareddy S, Diab S, Leong S, Lewis K, Gore L, Messersmith WA, Treston AM, Eckhardt SG, Sidor C, Camidge DR: A phase I dose-escalation, safety and pharmacokinetic study of the 2-methoxyestradiol analog ENMD-1198 administered orally to patients with advanced cancer. *Invest New Drugs* **29**: 340–346 (2011)
- Zoubine MN, Weston AP, Johnson DC, Campbell DR, Banerjee SK: 2-methoxyestradiol-induced growth suppression and lethality in estrogen-responsive MCF-7 cells may be mediated by down regulation of p34cdc2 and cyclin B1 expression. *Int J Oncol* **15**: 639–646 (1999)
- Zupkó I, Réthy B, Hohmann J, Molnár J, Ocsóvszki I, Falkay G: Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In Vivo* **23**: 41–48 (2009)
- 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)

9. Publikációs adatok

9.1. 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: 1,430⁷
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

⁷ Az impakt faktor (IF) értékek a közlemények megjelenésének évére vonatkoznak, a 2015-2016-os kölemények a 2014. évi IF értékekkel szerepelnek.

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**⁸, 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, Ocsosvski 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, Ocsosvski 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, Ocsosvski I, Ducza E, Thole H, Messinger J, Wölfling J, Móttyan 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
19. Molnár J, Ocsosvski 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, Ocsosvski 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, Ocsosvski 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

⁸ A közleményben megosztott levelező szerzőként megjelölve.

24. Minorics R, Bózsity N, Molnár J, Wölfling J, Mernyák E, Schneider G, Ocsosvski 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, Ocsosvski I, Schönecker B, Wölfling J, **Zupkó I**: A click approach to novel D-ring-substituted 16 α -triazolyloestrone 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, Ocsosvski 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, Ocsosvski 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

9.2. Az értekezés témaköreiben megjelent idézhető absztraktok

1. Réthy B, **Zupkó I**, Hohmann J, Falkay G: Investigation of cytotoxic activity of naturally occurring acridone alkaloids. *Sci Pharm* **73 Suppl 1**: S98 (2005)
2. Réthy B, Hohmann J, Ocsosvski I, Molnár J, **Zupkó I**, Falkay G: Apoptosis induction by acridone alkaloids and effects on reversal of multidrug resistance. *Acta Pharmacol Sin* **27 Suppl 1**: 346 (2006)
3. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Réthy B, **Zupkó I**, Falkay G, Forgo P, Hohmann J: Activity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Achillea collina*. *Planta Med* **73**: 984 (2007)
4. Hajdú Z, Csupor-Löffler B, Hohmann J, Réthy B, **Zupkó I**, Falkay G, Máthé I: Magyarországon előforduló Asteraceae fajok in vitro antiproliferatív hatásának szűrővizsgálata. *Rev Med Farm* **53 Suppl 4**: 181 (2007)
5. Kovács A, Vasas A, **Zupkó I**, Réthy B, Forgo P, Hohmann J: Antitumor activity of xanthanolides from *Xanthium italicum* Moretti. *Planta Med* **73**: 986 (2007)
6. **Zupkó I**, Réthy B, Minorics R, Ocsosvski I, Molnár J, Falkay G, Hohmann J: A *Ruta graveolens* tumorellenes hatású akridon-vázis alkaloidjainak vizsgálata in vitro. *Gyógyszerészet* **52 Suppl**: 3 (2008)
7. Hohmann J, Hajdú Z, Csupor-Löffler B, Csapi B, **Zupkó I**, Csedő K: Tumorsejtek proliferációját gátló hatású vegyületek izolálása Kárpát-medencében honos Asteraceae fajokból. *Orvostudományi Értesítő* **82 Suppl 1**: 18–19 (2009)
8. Hajdú Z, **Zupkó I**, Réthy B, Forgo P, Hohmann J: Antiproliferative sesquiterpenes and flavonoids from *Anthemis ruthenica* L. *Planta Med* **75**: 971–972 (2009)

9. **Zupkó I**, Hohmann J: Növényi eredetű citosztatikumok kutatása. *Gyógyszerészet* **53 Suppl 1**: S50 (2009)
10. **Zupkó I**, Berényi Á, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M: Direct antiproliferative effect of novel nonsteroidal 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **107 Suppl 1**: 692 (2010)
11. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, **Zupkó I**, Molnár J, Forgo P, Kele Z, Hohmann J: New dihydropyrone derivatives and further antitumour compounds from *Conyza canadensis*. *Planta Med* **76**: 1257 (2010)
12. Hajdú Z, Csapi B, **Zupkó I**, Berényi Á, Forgo P, Hohmann J: Antiproliferative activity of the extracts and compounds of *Centaurea arenaria* on human tumour cell lines. *Planta Med* **76**: 1256 (2010)
13. Minorics R, Szekeres T, Krupitza G, Saiko P, Giessrigl B, Wölfling J, Frank É, **Zupkó I**: Antiproliferative activity of some solanidine analogs on HL-60 cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **107 Suppl 1**: 458 (2010)
14. **Zupkó I**, Minorics R, Berényi Á, Bózsity N, Mernyák E, Wölfling J, Schneider G: The anticancer action of novel estrogen-like compounds. *Int J Mol Med* **32 Suppl 1**: S46 (2013)
15. Minorics R, Bózsity N, Mernyák E, Schneider G, Wölfling J, **Zupkó I**: A d-homoösztron antiproliferatív hatásának mechanizmusa HeLa sejten. *Magy Onkol* **57 Suppl 1**: 40–41 (2013)
16. Molnár J, Lajter I, Hajdú Z, Szekeres T, Saiko P, Hohmann J, **Zupkó I**: Investigation of the antiproliferative effect of natural sesquiterpene lactones on human cancer cell lines. *Endocr Abstr* **31**: P156 (2013)
17. Kovács I, Sinka I, Sere P, Wölfling J, Mernyák E, **Zupkó I**: 13 α -Ösztрон származékok tumorellenes hatásának vizsgálata. *Gyógyszerészet* **58 Suppl 1**: S98 (2014)
18. Molnár J, Hajdú Z, Csupor-Löffler B, Szekeres T, Saiko P, Ocsovszki I, Hohmann J, **Zupkó I**: Növényi eredetű szeszkviterpének tumorellenes hatásának vizsgálata in vitro. *Gyógyszerészet* **58 Suppl 1**: S98 (2014)
19. Frank É, Kovács D, Wölfling J, **Zupkó I**: Synthesis and in vitro pharmacological effects of novel 17-oxadiazolyl androstenes. *Chem Listy* **108**: s108 (2014)
20. Hajdú Z, Hohmann J, Forgo P, Máthé I, Molnár J, **Zupkó I**: Antiproliferative activity of *Artemisia asiatica* cultivated in Central Europe. *Planta Med* **80**: P2B30 (2014)
21. **Zupkó I**, Gyovai A, Baji Á, Ocsovszki I, Minorics R, Frank É: Antiproliferative properties of ring A-fused steroidal quinolines in vitro. *Int J Mol Med* **36**: S113 (2015)
22. Schelz Z, Ocsovszki I, Hohmann J, **Zupkó I**: Investigation of cytotoxic effects of various furanoacridones isolated from *Ruta graveolens*. *Planta Med* **81**: 1479 (2015)
23. Bózsity N, Minorics R, Mernyák E, Szabó J, Schneider G, Wölfling J, Wang HC, Wu CC, **Zupkó I**: D-Secoestrone-triazol: a new secoestrone derivative with antiproliferative and antimigration effects in cervical cancer cells. *Int J Mol Med* **36**: S113 (2015)

9.3. Az értekezés témaköreihez közvetve kapcsolódó válogatott közlemények

1. **Zupkó I**, Kamuhabwa AR, D'Hallewin MA, Baert L, De Witte PA: In vivo photodynamic activity of hypericin in transitional cell carcinoma bladder tumors. *Int J Oncol* **18**: 1099–1105 (2001)
2. Delaey EM, Obermueller R, **Zupkó I**, De Vos D, Falk H, de Witte PA: In vitro study of the photocytotoxicity of some hypericin analogs on different cell lines. *Photochem Photobiol* **74**: 164–171 (2001)
3. Chen B, **Zupkó I**, de Witte PA: Photodynamic therapy with hypericin in a mouse P388 tumor model: vascular effects determine the efficacy. *Int J Oncol* **18**: 737–742 (2001)
4. Delaey E, **Zupkó I**, Chen B, Derycke A, van Laar F, De Vos D, De Witte P: Comparison of hexamethylhypericin and tetrabromohypericin to hypericin for their in vivo efficacy as PDT tools. *Int J Oncol* **23**: 519–524 (2003)
5. Csomós P, **Zupkó I**, Réthy B, Fodor L, Falkay G, Bernáth G: Isobrassinin and its analogues: Novel types of antiproliferative agents. *Bioorg Med Chem Lett* **16**: 6273–6276 (2006)
6. Réthy B, Kovács A, **Zupkó I**, Forgo P, Vasas A, Falkay G, Hohmann J: Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. *Planta Med* **72**: 767–770 (2006)
7. Kovács A, Forgo P, **Zupkó I**, Réthy B, Falkay G, Szabó P, Hohmann J: Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* **68**: 687–691 (2007)
8. Alpan AS, Zencir S, **Zupkó I**, Coban G, Réthy B, Gunes HS, Topcu Z: Biological activity of bis-benzimidazole derivatives on DNA topoisomerase I and HeLa, MCF7 and A431 cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* **24**: 844–849 (2009)
9. Coban G, Zencir S, **Zupkó I**, Réthy B, Gunes HS, Topcu Z: Synthesis and biological activity evaluation of 1H-benzimidazoles via mammalian DNA topoisomerase I and cytostaticity assays. *Eur J Med Chem* **44**: 2280–2285 (2009)
10. Fürst R, **Zupkó I**, Berényi Á, Ecker GF, Rinner U: Synthesis and antitumor-evaluation of cyclopropyl-containing combretastatin analogs. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 6948–6951 (2009)
11. Janicsák G, **Zupkó I**, Nikolova MT, Forgo P, Vasas A, Máthé I, Blunden G, Hohmann J: Bioactivity-guided study of antiproliferative activities of *Salvia* extracts. *Nat Prod Commun* **6**: 575–579 (2011)
12. Vasas A, Sulyok E, Rédei D, Forgo P, Szabó P, **Zupkó I**, Berényi Á, Molnár J, Hohmann J: Jatrophone diterpenes from *Euphorbia esula* as antiproliferative agents and potent chemosensitizers to overcome multidrug resistance. *J Nat Prod* **74**: 1453–1461 (2011)
13. Dehelean CA, Feflea S, Molnár J, **Zupkó I**, Soica C: Betulin as an antitumor agent tested in vitro on A431, HeLa and MCF7, and as an angiogenic inhibitor in vivo in the CAM assay. *Nat Prod Commun* **7**: 981–985 (2012)
14. Dehelean CA, Soica C, Ledeti I, Aluas M, **Zupko I**, Galuscan A, Cinta-Pinzaru S, Munteanu M: Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. *Chem Cent J* **6**: 137 (2012)

15. Ekholm FS, Berényi Á, Lagerquist L, Saloranta T, **Zupkó I**, Schneider G, Wölfling J, Leino R: Cytotoxic activity of some glycoconjugates including saponins and anthracyclines. *Carbohydr Res* **356**: 295–298 (2012)
16. Iványi Z, Szabó N, Huber J, Wölfling J, **Zupkó I**, Szécsi M, Wittmann T, Schneider G: Synthesis of D-ring-substituted (5'R)- and (5'S)-17 β -pyrazolinylandrosterone epimers and comparison of their potential anticancer activities. *Steroids* **77**: 566–574 (2012)
17. Kovács D, Kádár Z, Mótyán G, Schneider G, Wölfling J, **Zupkó I**, Frank É: Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel 17-isoxazoles in the estrone series. *Steroids* **77**: 1075–1085 (2012)
18. Martins A, Tóth N, Ványolós A, Béni Z, **Zupkó I**, Molnár J, Báthori M, Hunyadi A: Significant activity of ecdysteroids on the resistance to doxorubicin in mammalian cancer cells expressing the human ABCB1 transporter. *J Med Chem* **55**: 5034–5043 (2012)
19. Sarikaya BB, Zencir S, Somer NU, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, Berényi Á, **Zupkó I**, Topcu Z: The effects of arolycoricidine and narcipramine on tumor cell killing and topoisomerase activity. *Rec Nat Prod* **6**: 381–385 (2012)
20. Soica CM, Dehelean CA, Peev C, Aluas M, **Zupkó I**, Kása P, Jr., Alexa E: Physico-chemical comparison of betulinic acid, betulin and birch bark extract and in vitro investigation of their cytotoxic effects towards skin epidermoid carcinoma (A431), breast carcinoma (MCF7) and cervix adenocarcinoma (HeLa) cell lines. *Nat Prod Res* **26**: 968–974 (2012)
21. Vasas A, Sulyok E, Martins A, Rédei D, Forgo P, Kele Z, **Zupkó I**, Molnár J, Pinke G, Hohmann J: Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia falcata* modulate resistance of cancer cells to doxorubicin. *Tetrahedron* **68**: 1280–1285 (2012)
22. Wölfling J, Kovács-Pénzes P, **Zupkó I**, Schneider G, Frank É: Synthesis, stereochemistry and cytotoxic activity of novel steroidal 16-spiro-1,3,2-dioxaphosphorinanes. *J Mol Struct* **1013**: 39–44 (2012)
23. Danciu C, Borcan F, Bojin F, **Zupkó I**, Dehelean C: Effect of the isoflavone genistein on tumor size, metastasis potential and melanization in a B16 mouse model of murine melanoma. *Nat Prod Commun* **8**: 343–346 (2013)
24. Kovács D, Wölfling J, Szabó N, Szécsi M, Kovács I, **Zupkó I**, Frank É: An efficient approach to novel 17-5'-(1',2',4')-oxadiazolyl androstenes via the cyclodehydration of cytotoxic O-steroidacylamidoximes, and an evaluation of their inhibitory action on 17 α -hydroxylase/C_{17,20}-lyase. *Eur J Med Chem* **70**: 649–660 (2013)
25. Lajter I, **Zupkó I**, Molnár J, Jakab G, Balogh L, Vasas A, Hohmann J: Antiproliferative activity of Polygonaceae species from the Carpathian Basin against human cancer cell lines. *Phytother Res* **27**: 77–85 (2013)
26. Mavrynsky D, Rahkila J, Bandarrra D, Martins S, Meireles M, Calhorda MJ, Kovács IJ, **Zupkó I**, Hanninen MM, Leino R: Cytotoxicities of polysubstituted chlorodicarbonyl(cyclopentadienyl) and (indenyl)ruthenium complexes. *Organometallics* **32**: 3012–3017 (2013)
27. Lajter I, Vasas A, Béni Z, Forgo P, Binder M, Bochkov V, **Zupkó I**, Krupitza G, Frisch R, Kopp B, Hohmann J: Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. *J Nat Prod* **77**: 576–582 (2014)
28. Mernyák E, Fiser G, Szabó J, Bodnár B, Schneider G, Kovács I, Ocsóvszki I, **Zupkó I**, Wölfling J: Synthesis and in vitro antiproliferative evaluation of d-secooxime derivatives of 13 β - and 13 α -estrone. *Steroids* **89**: 47–55 (2014)

29. Mernyák E, Szabó J, Bacsa I, Huber J, Schneider G, Minorics R, Bózsity N, **Zupkó I**, Varga M, Bikádi Z, Hazai E, Wölfling J: Syntheses and antiproliferative effects of d-homo- and d-secoestrone. *Steroids* **87**: 128–136 (2014)
30. Soica C, Danciu C, Savoiu-Balint G, Borcan F, Ambrus R, **Zupko I**, Bojin F, Coricovac D, Ciurlea S, Avram S, Dehelean C, Olariu T, Matusz P: Betulinic acid in complex with a gamma-cyclodextrin derivative decreases proliferation and in vivo tumor development of non-metastatic and metastatic B164A5 cells. *Int J Mol Sci* **15**: 8235–8255 (2014)
31. Szakonyi Z, **Zupkó I**, Sillanpää R, Fülöp F: Stereoselective synthesis and cytoselective toxicity of monoterpene-fused 2-imino-1,3-thiazines. *Molecules* **19**: 15918–15937 (2014)
32. Danciu C, Soica C, Dehelean C, **Zupkó I**, Csányi E, Pinzaru I: Preliminary in vitro evaluation of genistein chemopreventive capacity as a result of esterification and cyclodextrin encapsulation. *Anal Cell Pathol* **2015**: ID 262930 (2015)
33. Szabó N, Iványi Z, Szécsi M, Julesz J, Mernyák E, Huber J, Wölfling J, Minorics R, **Zupkó I**, Schneider G: Synthesis of methoxycarbonylpyrazolylandrostene derivatives, and their potential inhibitory effect on androgen biosynthesis and cell proliferation. *Steroids* **98**: 143–152 (2015)
34. Ványolós A, Kovács B, Bózsity N, **Zupkó I**, Hohmann J: Antiproliferative activity of some higher mushrooms from Hungary against human cancer cell lines. *Int J Med Mushrooms* **17**: 1145–1149 (2015)
35. Baji Á, Gyovai A, Wölfling J, Minorics R, Ocsóvski I, **Zupkó I**, Frank É: Microwave-assisted one-pot synthesis of steroid-quinoline hybrids and an evaluation of their antiproliferative activities on gynecological cancer cell lines. *RSC Adv* **6**: 27501–27516 (2016)
36. Mótyán G, Kovács F, Wölfling J, Gyovai A, **Zupkó I**, Frank É: Microwave-assisted stereoselective approach to novel steroidal ring D-fused 2-pyrazolines and an evaluation of their cell-growth inhibitory effects in vitro. *Steroids* **112**: 36–46 (2016)

9.4. Tudománymetriai összefoglaló táblázat

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

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		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 folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket 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 tudományometriai 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
idézettsége	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 tudományometriai adatok között tünteti fel az összesítés

⁵ Nem idézett absztrakt itt nem kerül be az összesítésbe.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet mindazoknak, akik tudományos kutatómunkám során támogattak, akik segítsége, 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 citometriaival kísérletekben 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.