

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerhatástan, biofarmácia és klinikai gyógyszerészet Ph.D program

Programvezető: Dr. Falkay György MTA doktor

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Témavezető: Dr. Zupkó István Ph.D.

Berényi Ágnes

**Ösztron származékok és nemszteroid 17 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz-
1 gátlók tumorelles hatásainak vizsgálata**

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Falkay György MTA doktor

Tagok: Dr. Havass Zoltán Ph.D.

Dr. Végh Ágnes MTA doktor

Bíráli bizottság:

Elnök: Dr. Máthé Imre MTA doktor

Opponensek: Dr. Molnár József MTA doktor

Dr. Perjési Pál Ph.D.

Tag: Dr. Regdon Géza Ph.D.

Titkár: Dr. Szakonyi Zsolt Ph.D.

BEVEZETÉS

A rák hatalmas népegészségügyi probléma, világszerte vezeti a mortalitási és morbiditási statisztikákat. A felmérések szerint a férfiak körében a tüdőrák, míg a nőknél az emlődaganat a vezető ráktípus. A tumorok kialakulását máig nem kellően feltárt multifaktoriális okokra vezetjük vissza, melyek minden esetben a sejtek ellenőrzés nélküli szaporodását és differenciálódását váltja ki.

Számos természetes szteroid szerkezetű vegyület és szintetikus analóg tumorelles hatását írták le, így ezeket innovatív hatóanyagjelöltek kiindulási anyagának tekinthetjük. A dioszgenin és számos szteroid alkaloid tumorelles hatása jól dokumentált. Az ezirányban legintenzívebben vizsgált ösztrán egy endogén ösztradiol metabolit, a 2-metoxiösztradiol, melynek hormonális hatása nincs, ám tumorelles hatása igen kifejezett.

Az emberi szervezetben a 17β -ösztradiol a legfontosabb ösztrogén, fontos szerepet játszik több hormonfüggő proliferatív megbetegedés kialakulásában, így a nőgyógyászati tumorokban vagy az endometriózisban. Az ösztrogén expozíció célszövetekben történő csökkentése része lehet az ilyen kórképek racionális terápiájának. Az ösztrogén gátlása történhet receptorális szinten, szelektív ösztrogén receptor modulátorokkal (SERM) vagy antagonistákkal, ill. a kevésbé potens ösztron átalakulását 17β -ösztradiollá konvertáló enzim, a 17β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz-1 (17β -HSD1) gátlásával. Mivel a legtöbb hormonfüggő rendellenesség közös jellemzője a proliferáció, elképzelhető, hogy a direkt antiproliferatív hatás és a 17β -HSD1 egyidejű gátlása előnyös lehet ezen betegségek kezelésében.

A sejtciklus G1–S átmenetének ellenőrző pontja fontos szerepet játszik a tumorok terápiás célú megközelítésében. A G1–S átmenet több összerendezett szabályzó faktor által felügyelt folyamat, meghatározó elemei a retinoblasztóma fehérje (Rb), a CDK2, a CDK4/6, a p16, a p21 és a p53. Az S fázisba való belépés és így a sejtproliferáció is gátolt, míg az Rb foszforilálatlan marad a ciklin E–CDK2 ill. ciklin D–CDK4/6 komplexek által. A foszforilált Rb (pRb) ledisszociál az E2F heterodimer komplexről, így lehetővé válik az S fázisra specifikus gének transzkripciója. A ciklin E–CDK2 komplex fő szabályzója a p21 tumorszuppresszor, melynek expresszióját a p53 protein szabályozza. Az útvonal fontosságát mutatja, hogy a legtöbb tumorban kimutatható mutáció a p53-t kódoló TP53 génben vagy a jelátviteli út valamely későbbi elemében. A p16 fehérje alulműködését számos tumorban igazolták, kifejeződése gyakran korrelál a kemoterápiára adott válasszal a szolid tumorokban. Ezek alapján a G1–S

átmenet, ill. az azt szabályozó faktorok a tumorterápia újabb és kiemelt jelentőségű támadáspontjai lehetnek.

CÉLKITŰZÉSEK

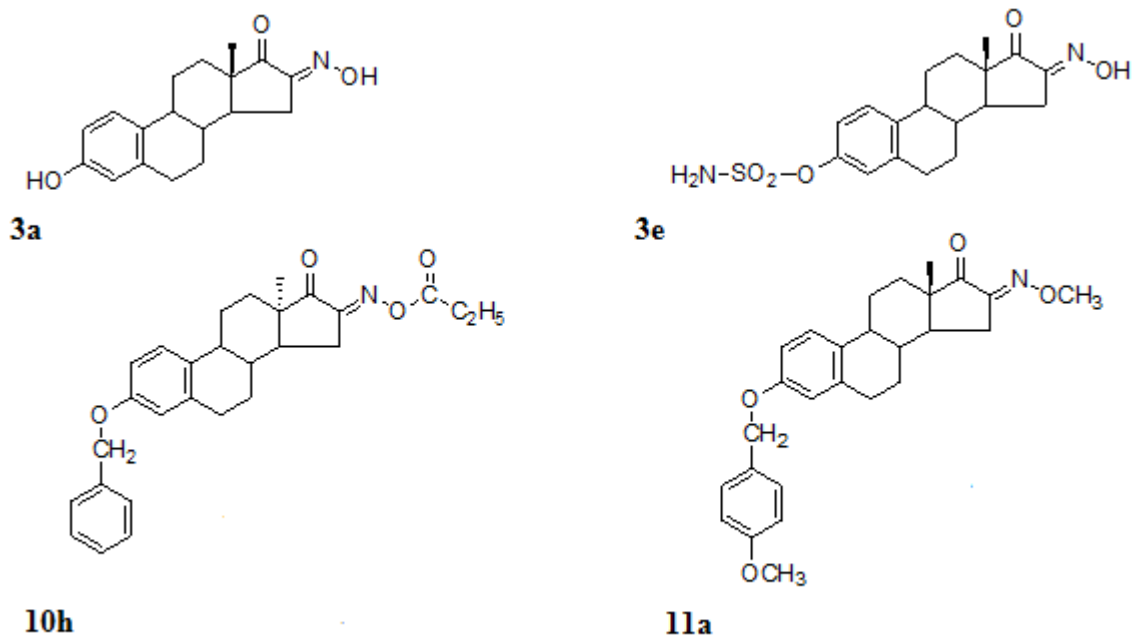
A jelen vizsgálataink fő célja a korábban leírt elméleti megfontolások alapján kiválasztott szintetikus vegyületek antiproliferatív tulajdonságainak meghatározása és mechanizmusuk feltárása volt:

- Újonnan szintetizált öszttron-16-oxim éterek antiproliferatív hatásának vizsgálata *in vitro*, humán tumoros sejtvonalakat használva. A leghatásosabb vegyületeket kiválasztottuk további kísérletsorozatra a lehetséges hatásmechanizmus leírása érdekében.
- Módosított ösztránvázias szteroid (aglikon és glikoszteroidok) antiproliferatív hatásainak vizsgálata.
- Korábban tervezett és szintetizált nem-szteroid 17 β -HSD1 inhibitorok antiproliferatív hatásának meghatározása *in vitro*. A leghatékonyabb vegyületeket szintén további *in vitro* vizsgálatoknak vetettük alá az észlelt hatás lehetséges mechanizmusának feltárására. Az alkalmazott módszerek a következők voltak: sejtciklus analízis, fluoreszcens festési eljárás, BrdU beépülés ill. kaszpáz-3 aktivitás meghatározása, valamint regulációs faktorok mRNS és protein szintű expressziójának vizsgálata (RT-PCR ill. Western blot technika).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

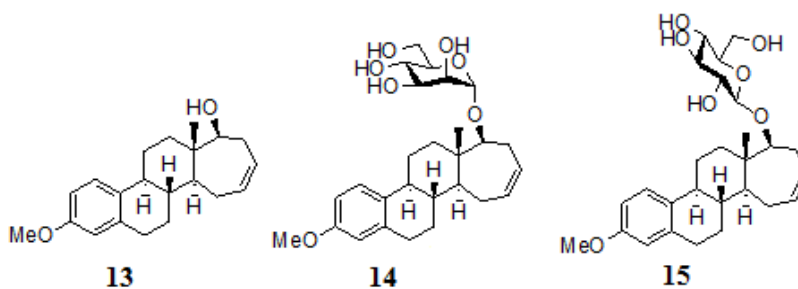
Vizsgált vegyületek:

A 63 vizsgált öszttron-16-oxim származék az A és D-gyűrűben, a 3 és 16 helyzetű funkcióscsoportokban tért el. Leghatásosabbnak azok a 16-oximok (**3a**, **3e**) bizonyultak, amelyek a 3-as szénatomon szabad fenolos hidroxil-funkciót vagy szulfamát csoportot tartalmaztak. Az oximészterek közül a 3-benzil-védőcsoportot tartalmazó propionát-észter (**10h**), míg az oximéterek közül a p-metoxibenzil-védőcsoportot tartalmazó oxim-metiléter (**11a**) mutatott kiemelkedő citosztatikus hatást.



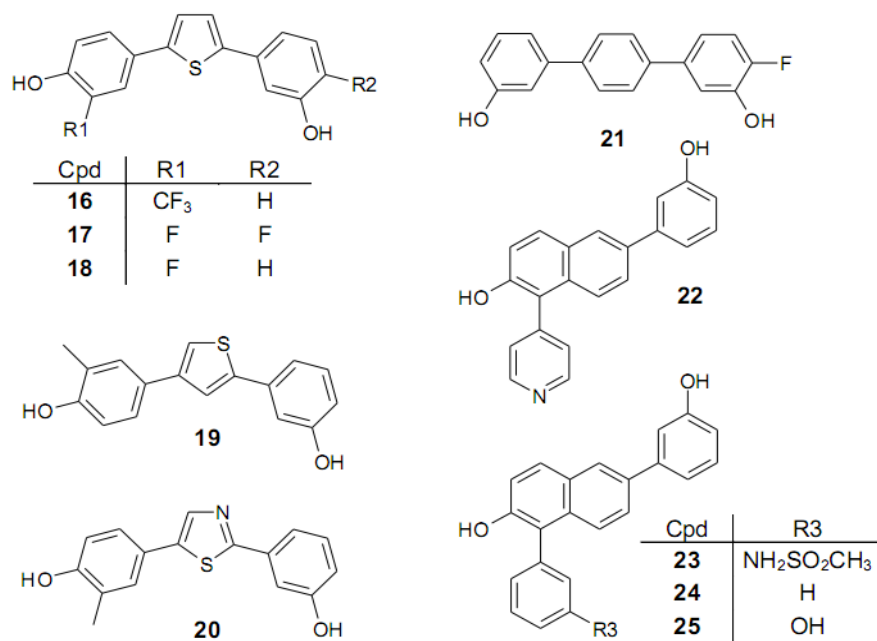
1. ábra. Kémiai szerkezete a négy vizsgált szteroid oxim vegyületnek.

A módosított ösztadiol-származék egy aglikonból (**13**) és annak két glikozidjából álltak (**14**, **15**). (2. ábra).



2. ábra. Ösztadiol származék szteroidok, aglikonok és glikoszteroidok kémiai szerkezete.

A vizsgált 17 β -HSD1 inhibitorok nem-szteroid szerkezettel rendelkeztek, közös tulajdonságuk egy aromás gyűrű két fenolos szubsztituenssel (3. ábra). A vegyületek közül öt tartalmaz tiofént (**16–19**) vagy tiazolt (**20**) mint központi részt. A **21**-es vegyület *para*-terfenil, míg a **22–25** vegyületek szubsztituált difenilnaftolok voltak.



3. ábra. A vizsgált 17 β -HSD1 inhibitorok kémiai szerkezete.

Sejtvonalak és sejtenyésztés

Vizsgálatainkhoz MEM médiumban tenyésztett HeLa (méhnyak adenokarcinóma), MCF7 (emlő adenokarcinóma) és A431 (bőr epidermoid karcinóma) valamint nem tumoros MRC-5 (humán tüdő fibroblaszt) sejteket használtunk. A petefészek rákból izolált A2780 sejteket RPMI médiumban tartottuk fenn. A sejtek CO₂ termosztátban (5% CO₂) 37 °C-on tartottuk.

MTT vizsgálat

A tumoros sejtek viabilitását MTT módszerrel határoztuk meg. Sejteket 96-üregű lemezre telepítettük, egy éjszakán át állni hagytuk, majd hozzáadtuk a vizsgálandó vegyületeket tartalmazó médiumot. Az életképességet 72 óra inkubációs idő után 20 μ L MTT oldat (5 mg/mL) hozzáadásával határoztuk meg. A kicsapódott formazán kristályokat DMSO-ban oldottuk fel, majd az abszorbanciát 545 nm-en határoztuk meg ELISA leolvasóval. Két egymástól független kísérletet végeztünk öt párhuzamos üreggel, referenciavegyületként ciszplatint használtunk. A mért értékekre szigmoid görbét illesztettünk, majd kiszámítottuk az IC₅₀ értéket GraphPad Prism 4.0 program segítségével.

Hoechst 33258-propídium jodid kettős festés és áramlási citometria analízis

HeLa sejteket telepítettünk 96-üregű lemezre, majd 24 órás inkubáció után hozzáadtuk a Hoechst 33258 (HO) és propídium jodid (PI) keverékét 5 µg/mL és 2 µg/mL végkoncentrációt kapva. A festés lehetővé teszi az élő, a korai és késői apoptotikus, valamint a nekrotikus sejtek azonosítását. A HO bejut az élő sejtbe és kékre festi a sejtmagokat. Apoptózisra utal a kromatin kondenzációja és a mag fragmentációja. A nekrotikus és késői apoptotikus sejteket PI felvételével azonosíthatjuk, amely jelzi a membrán integritásának elvesztését, a sejtmagot pirosra festve.

Áramlási citometria analízist a kezelt HeLa sejtek DNS tartalmának meghatározására végeztünk. 24 és 48 órás kezelést követően a sejteket PI-al festettük, majd a mintákat FACStar készülékkel analizáltuk. A kapott hisztogramokból winMDI2.9 programmal számítottuk ki az egyes sejtciklus-fázisokban (subG1, G1, S and G2/M) lévő sejtek arányát. A subG1 frakciót tekintik apoptotikus sejtpopulációnak.

BrdU beépülésének vizsgálata

Az 5-Bromo-2'-deoxiuridin (BrdU) beépülése a DNS-be BrdU Labeling and Detection Kit I és III segítségével történt a HeLa sejteken 24 órás tesztanyaggal való kezelés után. A BrdU beépül a timidin helyére, így alkalmas a DNS-szintézis intenzitásának jellemzésére. A DNS-t részlegesen emésztettük nukleáz kezeléssel, majd peroxidázzal jelölt és a BrdU-hoz kötődő antitestet adtunk a rendszerhez. Végül, a peroxidáz aktivitását kolometriásan mértük 405 nm-en, 492 nm referencia hullámhossz mellett (Kit III). Két egymástól független kísérletet végeztünk 4-4 párhuzamos üreggel. A Kit I esetében fluoreszceinhez kötött anti-egér antitestet alkalmaztunk, az eredményt fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a megfelelő optikai blokkot használva (ex: 465–495 nm, em: 515–555 nm, dikróm tükör: 505 nm), a BrdU pozitív sejtek arányát legalább 400 sejtől határoztuk meg.

Kaspáz-3 meghatározása

A kezelt sejtek kaspáz-3 aktivitását beszerezhető kolometriás kit segítségével határoztuk meg. A 48 órán át kezelt HeLa sejteket lízis pufferben szuszpendáltuk, a kaspáz-3 aktivitás mérésére Ac-DEVD-pNA szubsztrátot használtunk, a terméket (pNA) 405 nm-en mértük 17 óra inkubáció után.

Reverz transzkriptáz (RT-PCR) vizsgálatok

A kezelt HeLa sejtekből RT-PCR technikával határoztuk meg a G1–S átmenet szabályozásában meghatározó szerepet játszó faktorok mRNS-szintű expresszióját: retinoblasztóma fehérje (Rb), ciklin-dependens kináz 2 (CDK2), CDK4, CDK6, p16, p21, p27 és p53. 24 órás inkubáció után totál RNS-t izolálunk a sejtekből, majd cDNS-t preparáltunk reverz transzkriptáz (RT) jelenlétében. Kontrollként humán gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (hGAPDH) primert használtunk.

Western blot vizsgálatok

Az Rb és foszforilált Rb (pRb) fehérje-szintű expresszióját szintén HeLa sejtekből határoztuk meg, 24 órás kezelést követően. Teljes sejt extraktumot készítettünk, majd a proteint 4–12% NuPAGE Bis–Tris Gelen elektroforizáltuk, majd nitocellulóz membránra vittük iBlot Gel Transfer System segítségével. Az antitest kötődés detektálása WesternBreeze Chromogenic Western blot immunodetection kit segítségével történt.

EREDMÉNYEK

MTT vizsgálat

Az ösztron-oximok közül 4 vegyület (**3a**, **3e**, **10h** és **11a**) mutatott jelentős – a ciszplatinnal összevethető – hatást a HeLa sejtek proliferációjára, míg az MCF7, A413 és A2780 sejtek kevésbé voltak érzékenyek (1. táblázat). A nem tumoros fibroblaszt sejtvonal (MRC-5) proliferációjára csak a **11a** volt hatással. A szubsztituátlan oxim funkciójú vegyületek (**3a** és **3e**) HeLa-szelektívnek tekinthetők, némi szerény hatással a petefészek tumor (A2780) sejtvonalra, míg a **10h** és **11a** vegyületek szélesebb hatásspektrumot mutattak.

A módosított ösztradiol származékok – egy aglikon és két glikoszteroid – (**13–15**) szerény antiproliferatív hatást fejtettek ki az alkalmazott sejtvonalakon.

A **16–22** vegyületek antiproliferatív aktivitása HeLa sejteken összevethető a referenciavegyületével, míg az MCF7 és A2780 általában kevésbé voltak érzékenyek, az MRC-5 sejtekre 30 μ M-ig nem hatottak. A tesztelt difenilnaftolok (**23–25**) gyakorlatilag nem mutattak antiproliferatív hatást.

Táblázat 1. A vizsgált vegyületek számított IC₅₀ értékei.

Vegyületek	IC ₅₀ értékek (µM)				
	HeLa sejtek	MCF7 sejtek	A431 sejtek	A2780 sejtek	MRC-5 sejtek
3a	4.41	–	–	18.28	–
3e	4.04	–	–	11.96	–
10h	3.52	4.13	–	4.61	–
11a	5.63	–	13.25	12.62	6.94
13	15.68	19.91	15.20	10.45	–
14	10.82	12.40	10.39	–	–
15	–	27.45	–	19.88	–
16	5.29	25.23	–	–	–
17	6.84	13.88	–	–	–
18	3.81	16.11	–	–	–
19	14.53	–	–	–	–
20	5.66	–	–	–	–
21	1.41	–	–	–	–
22	5.30	25.51	–	9.71	–
23	–	–	–	25.87	n.d
24	–	–	–	–	n.d
25	–	–	–	–	n.d
Ciszplatin	5.66	7.99	8.81	0.86	4.13

–: Átlag érték 30 µM fölött. n.d: nem meghatározott

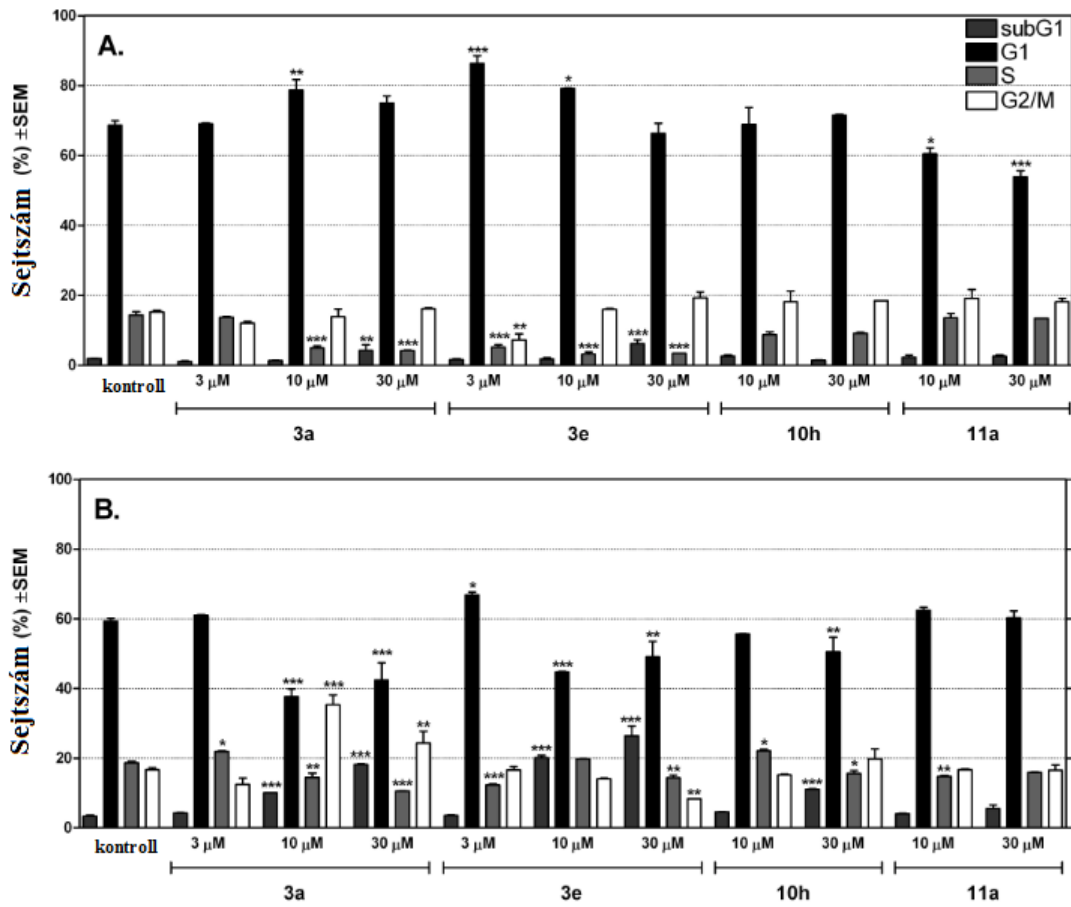
Morfológiai tanulmányok és sejtciklus eloszlás

A nekrozis és apoptózis jelenlétét a sejt morfológiája és membrán integritása alapján határoztuk meg. A HOPI festéssel megfigyelhető a sejtmag kondenzációja és fragmentációja, valamint a membrán permeabilitásának növekedése. A membrán integritás legmarkánsabb zavara a **3e** vegyület esetében volt megfigyelhető, míg a **10h** vegyülettel való kezelés után kifejezett volt a mag kondenzációja enyhe membránhatás mellett, ami apoptotikus folyamatra utal. 24 óra után a szubsztituátlan oximok (**3a** és **3e**) jelentős csökkenést okoztak a sejtciklus szintetikus (S) fázisában és növekedést a szubdiploid (subG1) populációban (4. ábra). A 17β-HSD1 gátlók esetében a **18** mutatta legmarkánsabban az apoptózis jeleit, míg a **20** eredményezte a legjelentősebb változást a membrán integritásában. A sejtciklus-eloszlásban 24 órás kezelés után a legmarkánsabb változás az S fázis csökkenése volt, 48 óra alatt minden hatásos tesztanyag jelentősen növelte a hipodiploid populáció (subG1) arányát (5. ábra).

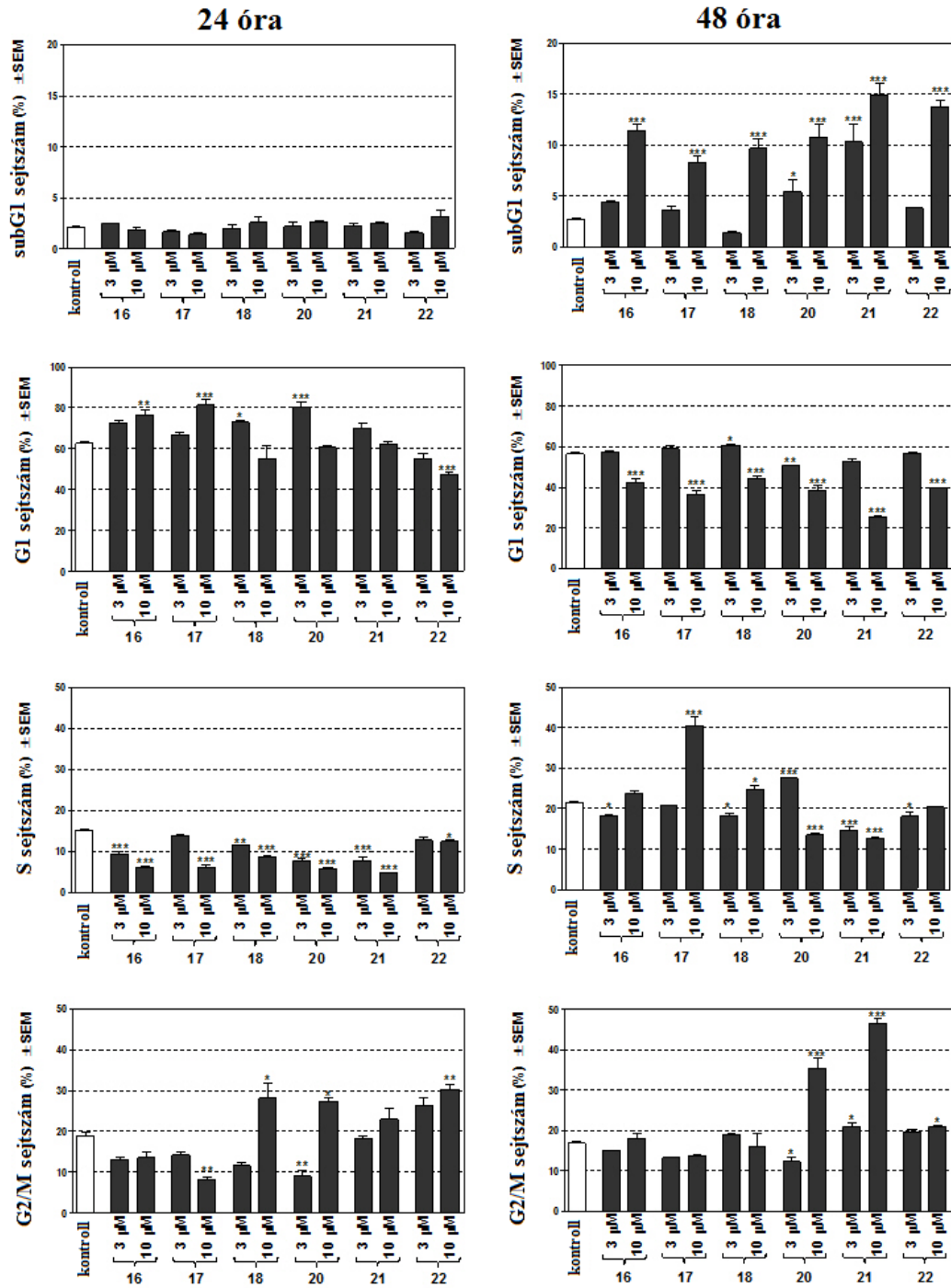
BrdU beépülésének vizsgálata

A BrdU DNS-be történő beépülését valamennyi kiválasztott vegyület szignifikáns mértékben gátolta. Az oximok közül a **3a** és **3e** gátolta legnagyobb mértékben a DNS szintézist, ezek hatása

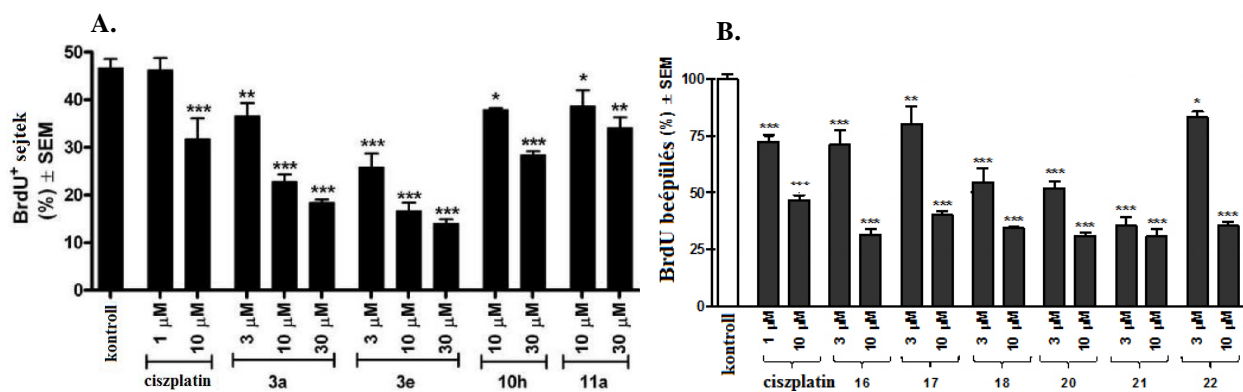
összevehető a ciszplatinnal kapott eredménnyel (6. ábra). A 17 β -HSD1 gátlók esetében a **21** vegyület volt a leghatékonyabb e tekintetben, több mint 50% gátlást kifejtve már 3 μ M mellett.



4. ábra. A **3a**, **3e**, **10h** és **11a** vegyületek hatására a HeLa sejtek ciklus- eloszlására 24 (A panel), ill. 48 óra (B panel) után. *, ** és *** $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.001$ a kontroll sejtekhez viszonyítva.



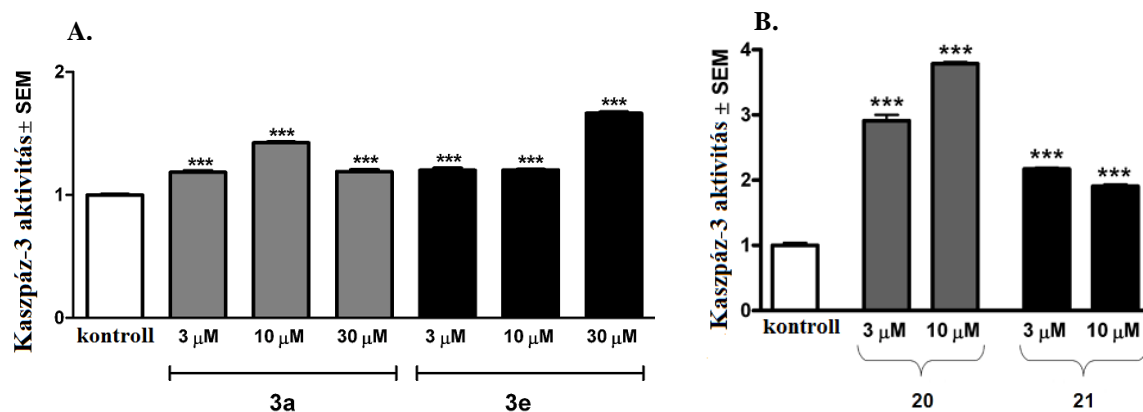
5. ábra. A 16–18 és 20–22 vegyületek hatására a HeLa sejtek ciklus-eloszlása 24 (bal oldal) és 48 (jobb oldal) órás inkubáció után. *, ** és *** $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.001$, a kontroll sejtekhez viszonyítva.



6. ábra. A BrdU beépülése a HeLa sejtekbe 24 órás oximokkal (A panel), ill. 17β-HSD1 gátlókkal (B panel) történt kezelés után. *, ** és *** jelzi $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.001$ a kontroll sejtekhez viszonyítva.

Kaspáz-3 aktivitás meghatározása

A sejtciklus eredményei alapján a **3a**, **3e**, **20** és **21** vegyületeket választottunk ki további kísérletekre, annak érdekében, hogy megállapítsuk a hatásukat a kaspáz-3 aktivitáson. Ezek a vegyületek közül mindegyik szignifikánsan növelte az apoptózis-végrehajtó enzim aktivitását (7. ábra).

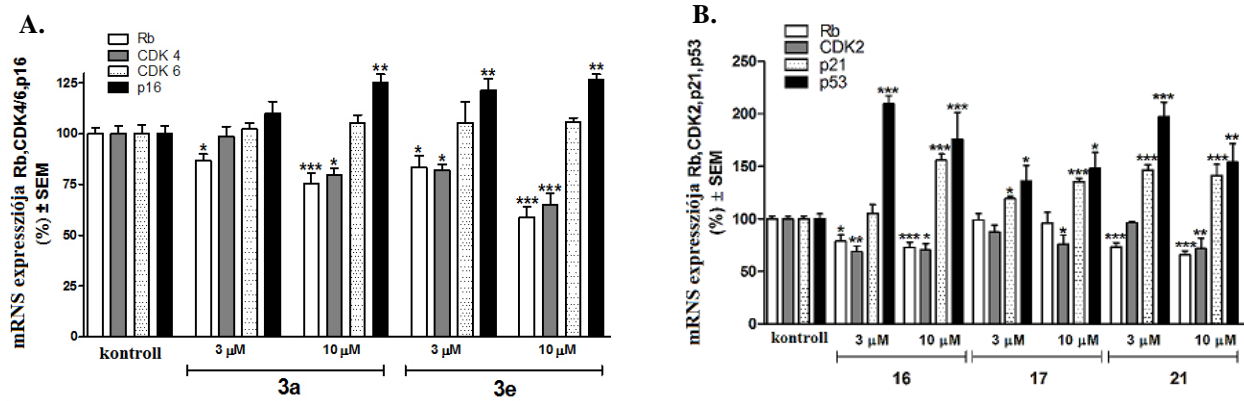


7. ábra. Kaspáz-3 aktivitás fokozódása **3a** és **3e** (A) valamint a **20** és **21** (B) vegyületekkel történő 48 órás inkubáció után. A kezeltlen sejtek aktivitását egy egységnek vettük. *** $p < 0.001$ a kontroll sejtekhez viszonyítva.

RT-PCR vizsgálatok

A sejtciklus G1–S átmenetében kulcsfontosságú szabályozó faktorok (CDK2, CDK4/6, p16, p21, p53 és Rb) mRNS-szintű expresszióját szemikvantitatív RT-PCR technikával vizsgáltuk. A p16 tumorszuppresszor gén kifejeződését mRNS szinten jelentősen növelték a vizsgált oximok (**3a** és **3e**). A kezelés koncentrációfüggő csökkenést eredményezett a CDK4 és Rb expressziójában, míg a CDK6 esetében nem észleltünk változást. A 17β-HSD1 gátlók (**16**, **17** és **21**) szignifikánsan

növelték a p53 és p21 tumorszuppresszor gének kifejeződését, míg koncentrációfüggő csökkenést észleltünk CDK2 és Rb esetében (8. ábra).



8. ábra. Az Rb, CDK4, CDK6 és p16, mRNS szintjének kifejeződése a **3a** és **3e** vegyületek 24 órás inkubációja után (A panel). A p53, p21, CDK2 és Rb, mRNS szintjének kifejeződése 24 órás inkubáció után a **16**, **17** és **21** vegyületekkel (B panel). *, ** és *** $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.001$, kontroll körülményekhez viszonyítva.

Western blot vizsgálat

A Western blot vizsgálatot az indokolta, hogy az egy Rb posztszintetikus foszforilációval regulált szabályozó faktor. A relatív pRb expressziót Rb/pRb denzitás aránnyal fejeztük ki. Ez az érték a kontroll sejteknél 1,53 volt, az oximok (3 μM és 10 μM, 24 óra) 0,59 és 0,46 (**3a**), ill. 1,06 és 0,80 (**3e**) lett (9. ábra). A vizsgált 17β-HSD1 gátlók (**16**, **17** és **21** vegyületek) szintén csökkentették pRb fehérje kifejeződését a kontroll HeLa sejtekhez viszonyítva, a **21** bizonyult a legmarkánsabb hatásúnak.



9. ábra. Az Rb és a pRb kifejeződése fehérje szinten **3a** és **3e** (A panel), ill. 17β-HSD1 gátló vegyületekkel **16**, **17** és **21** (B panel) történt 24 órás kezelés után. Az alsó sávban a β-aktin látható, amely kontrollként szolgált.

DISSZKUSSZIÓ

Az oxim funkció széleskörűen elfogadott szerkezeti elem az innovatív antiproliferatív hatóanyagjelöltek tervezésére. A vizsgálatba vont új ösztron-16-oximok gátolták a humán adherens tumorsejtek proliferációját, a legpotensebbeket további *in vitro* vizsgálatokra választottuk ki az észlelt hatás mechanizmusának feltárására. Ezek a vegyületek kiváltották az apoptózis morfológiai jellemzőit, fokozták a hipodiploid sejtek arányát, valamint a kaszpáz-3 aktivitását. Kezelés hatására csökkent a BrdU beépülés, ami a DNS-szintézis gátlására utal, valamint a sejtciklus S fázisában levő sejtpopuláció is. A talált hatásokat visszavezettük a sejtciklus G1–S átmenetét reguláló faktorokra, így emelkedett a p16 kifejeződése, csökkent a CDK4 és a Rb expressziója, valamint az utóbbi foszforilációja.

A vizsgált módosított ösztránvázas vegyületek (egy aglikon és két glikozidja) nem rendelkeznek számottevő tumorelles tulajdonsággal.

A vizsgált és természetes polifenollokkal szerkezeti hasonlóságot mutató 17β -HSD1 gátlók között szintén találtunk a referenciavegyülethez hasonló hatékonyságú származékokat. Ezek is előidéztek a programozott sejthalál morfológiai és biokémiai jegyeit, melyek összhangban vannak a regulációs faktorok expressziójában talált változásokkal. A leghatékonyabb inhibitorok csökkentették a Rb és CDK2 kifejeződését, fokozták egyes tumorsuppresszorok (p21, p53) expresszióját, csökkentették a Rb foszforilációját.

A 17β -HSD1 gátlása egy kellően szelektív beavatkozási pont az ösztrogénfüggő kórképek terápiájára. Az ilyen rendellenességek proliferatív jellegűek (endometriózis, tumor), így az alkalmazott szerek hormonális hatásain túl előnyösnek tűnik a direkt antiproliferatív tulajdonság. Eredmények bizonyítják, hogy e két farmakológiai tulajdonság összeegyeztethető, megalapozva ezzel egy új, kettős támadáspontú hatóanyagcsoportot. További – feltehetően *in vivo* – vizsgálatok dönthetik el, van-e gyakorlati előnyük az ilyen vegyületeknek a „tisza” hatású farmakonokkal szemben.

Összefoglalva, eredményeink hozzájárulhatnak újabb szteroid-szerkezetű, ill. újszerű hatásmechanizmusú antiproliferatív hatóanyagjelöltek tervezéséhez.

FÜGGELÉK

Értekezés alapját képező közlemények:

- I. **Berényi Á**, Minorics R, Iványi Z, Ocsovszki I, Ducza E, Thole H, Messinger J, Wölfling J, Mótyán 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 (2013). **IF₂₀₁₁: 2.829**
- II. **Berényi Á**, Frotscher M, Marchais-Oberwinkler S, Hartmann RW, Minorics R, Ocsovszki I, Falkay G, Zupkó I. Direct antiproliferative effect of nonsteroidal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors in vitro. *J Enzyme Inhib Med Chem* in press (2012). **IF₂₀₁₁: 1.617**
- III. 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**: 295–8 (2012). **IF₂₀₁₁: 2.332**

Egyéb közlemények:

- I. Fürst R, Zupkó I, **Berényi Á**, Ecker GF, Rinner U. Synthesis and antitumor–evaluation of cyclopropyl–containing combretastatin analogs. *Bioorg Med Chem Lett* **19**(24): 6948–51 (2009). **IF₂₀₀₉: 2.650**
- II. Csapi B, Hajdú Zs, Zupkó I, **Berényi Á**, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. Bioactivity–guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res* **24**(11): 1664–9 (2010). **IF₂₀₁₀: 1.878**
- III. 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**(6): 1453–61 (2011). **IF₂₀₁₁: 3.128**
- IV. Ndonsta BL, Tatsimo JSN, Csupor D, Forgo P, Berkecz R, **Berényi Á**, Tene M, Molnár J, Zupkó I, Hohmann J, Tane P. Alkylbenzoquinones with antiproliferative effect against human cancer cell lines from stem of *Ardisia kivuensis*. *Phytochemistry Letters* **4**: 227–30 (2011). **IF₂₀₁₁: 1.222**

- V. Sarikaya BB, Zencir S, Somer NU, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, **Berényi Á**, Zupkó I, Topcu Z. The effects of arolycoricidine and narciprimine on tumor cell killing and topoisomerase activity. *Rec. Nat. Prod.* **4**: 381–85 (2012). **IF₂₀₁₁: 1.508**

Egyéb kivonatok:

- I. Wölfling J, Bóna Á, Frank É, Schneider G, **Berényi Á**, Zupkó I. Synthesis and cytotoxic activity of 16–benzylidene estrone 3–methyl ethers. Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 24–27 June, 2009, Budapest, Hungary.
- II. Zupkó I, **Berényi Á**, Marchais-Oberwinkler S, Frotscher M. Direct antiproliferative effect of novel nonsteroidal 17beta–hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 17–23 July, 2010, Copenhagen, Denmark.
- III. Fürst R, Nowikow C, **Berényi Á**, Ecker GF, Schmid W, Zupko I, Rinner U. Synthesis and biological evaluation of novel carbocycle–containing combretastatin A-4 analogs. 240th National ACS Meeting and Exposition, August 22–26, 2010, Boston, MA.
- IV. **Berényi Á**, Schneider G, Wölfling J, Ocsosvzki I, Zupkó I. Investigation of antiproliferative effect of estrone–16–oxime ethers in vitro. 3th Pharm Sci Fair, 13–17 June, 2011, Prague, Czech Republic.
- V. Molnár J, Ocsosvzki I, **Berényi Á**, Hohmann J, Zupkó I: Investigation of antiproliferative effect of quinoline and acridone alkaloids isolated from Rutaceae plants in vitro. 3th PharmSciFair, 13–17. June, 2011, Prague, Czech Republic.
- VI. Zupkó I, Molnár J, **Berényi Á**, Kádár Z, Wölfling J: Antiproliferative action of novel triazol-containing estranes. *Frontiers in Medicinal Chemistry*. Joint German-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry, 20–23. March, 2011, Saarbrücken, Germany.
- VII. Zupkó I, Molnár J, Ocsosvzki I, **Berényi Á**, Hohmann J: Investigation of antiproliferative effect of kokusagine and skimmianine in vitro. 4th International Conference on Drug Discovery & Therapy, 12–15. February, 2012, Dubai, UAE.

VIII. Fürst R, Nowikow C, **Berényi Á**, Ecker GF, Schmid W, Zupkó I, Rinner U: Novel carbocycle-containing combretastatin analogs: Synthesis and biological evaluation. 3rd European Chemical Biology Symposium - 2nd Vienna Drug Action Conference, 1–3. July, 2012, Vienna, Austria.