

**Szegedi Tudományegyetem**

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Gyógyszerhatástan, biofarmácia, klinikai gyógyszerészet Ph.D. program

Programvezető: Dr. Zupkó István Ph.D., D.Sc.

**Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet**

**Témavezetők:**

Dr. Minorics Renáta Ph.D.

Dr. Zupkó István Ph.D., D.Sc.

**Gyovai András**

**ÚJ, ANDROSZTÁN-ALAPÚ SZINTETIKUS SZTEROIDOK  
DAGANATELLENES HATÁSÁNAK JELLEMZÉSE**

**Szigorlati Bizottság:**

Elnök: Dr. Maróy Péter Ph.D., D.Sc.

Tagok: Dr. Kiricsi Mónika Ph.D.

Dr. Puskás László Ph.D., D.Sc.

**Bírálati Bizottság:**

Elnök: Dr. Martinek Tamás Ph.D., D.Sc.

Opponensek: Dr. Kiricsi Mónika Ph.D.

Dr. Puskás László Ph.D., D.Sc.

Tagok: Dr. Hunyadi Attila Ph.D.

Dr. Sovány Tamás Ph.D.

**Szeged**

**2019**

## 1 BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések máig megoldatlan, globális egészségügyi problémát jelentenek. A malignus kórképek a kardiovaszkuláris betegségeket követve a második helyet foglalják el a vezető halálokok között, 2015-ben mintegy 8,7 millió áldozatot követelve. 17 millió esetet regisztráltak ugyanebben az évben világszerte. Bár a daganatos megbetegedések mortalitási szempontból a fejlődő országokban a második helyet foglalják el, a fejlett országokban az első helyre kerültek.

A tumoros megbetegedések emelkedő epidemiológiai mutatói változásokat követelnek egészségügyi ellátó rendszerek részéről, eredményesebb prevenciót, valamint új megközelítést kívánnak a korai diagnózis és gyógyszerkutatás területén. Az új kemoterápiás szerek fejlesztése továbbra is kulcsfontosságú feladat, a daganatellenes terápia alappilléreinek egyike.

A szteroidok a biológiailag aktív vegyületek egy meghatározó csoportját képezik. Változatos biológiai hatásaik következtében számos életfolyamatban esszenciális szerepet töltenek be. Ebből adódóan szteroid vegyületek sokaságát alkalmazzák a gyógyászatban, fontos eszközei a hormonpótló terápiáknak és a fogamzásgátlásnak. Változatos biológiai hatásuknak köszönhetően fontos szerepet töltenek be a kachexia, nőgyógyászati kórképek, hormonfüggő daganatok terápiájában. Immunszuppresszív tulajdonságaik kulcsszerepet töltenek be szervátültetés során, valamint a krónikus gyulladással járó folyamatok, allergiás reakciók és autoimmun betegségek kezelésében.

Annak ellenére, hogy nagyszámú szteroid rendelkezik széles spektrumú biológiai aktivitással, onkológiai felhasználásuk főként endokrin hatásukra épül, alkalmazásuk a reproduktív rendszer hormonfüggő daganataira korlátozódik. Bár az utóbbi évtizedekben számos tumorellenes hatású szteroid vegyületet azonosítottak, a vegyületcsoport onkológiai célú hasznosítása viszonylag kiaknázatlan terület. Több, daganatellenes hatást hormonfüggetlen módon kiváltó szteroid molekulát írtak le, melyek hatásukat nem hormonális célpontokon (pl. mikrotubulusok, topoizomerázok) keresztül fejtik ki. Ezek körében szintetikus és természetes vegyületek egyaránt előfordulnak, több közülük jelentős terápiás értékkel bír.

Az androsztán váz egyszerűen módosítható kiindulási vegyületet biztosít új, szteroid alapú, tumorellenes hatóanyagok kifejlesztéséhez. A szakirodalmi közlemények számának emelkedése tükrözi ezen vegyületek daganatellenes kutatásban betöltött meghatározó szerepét, megannyi androsztán analóg antineoplasztikus hatását írták már le különböző malignus sejtvonalakon (pl. vastagbél, vese, prosztata, bőr és leukémia).

Mint ahogy a C-19 metil csoport eltávolítása csökkent androgén aktivitást von maga után, a 19-norszteroidok ígéretes alapvázat szolgáltatnak új, endokrin hatás nélküli terápiás hatóanyagok fejlesztéséhez. E vegyületek fontosságát a daganatellenes kutatás területén is felismerték, több 19-nortesztozsteron származék különböző malignus sejtvonalakon kiváltott antiproliferatív hatását írták le.

A szteroidok más molekulákkal történő hibridizációja gyakorta eredményez a kiindulási vegyületekétől eltérő biológiai hatást, amely kedvező lehet előnyös tulajdonságok megjelenése esetén. A szteroid vegyületek mellett több kinolin származék kiemelkedő tumorellenes hatását is megfigyelték. Miután szintetikus szteroid-kinolin hibrid molekulák előnyös hatásairól szintén beszámoltak, hasonló vegyületek létrehozása és vizsgálata a daganatellenes kutatás fontos feladatává vált.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja újonnan szintetizált szteroid-kinolin hibrid molekulák és 19-nortesztozsteron származékok antiproliferatív hatásának jellemzése. Az értekezés további célja a potens vegyületek lehetséges hatásmechanizmusának felderítése. A végrehajtott kísérletek a következőkre irányultak:

- Androsztán-alapú tesztanyagok antiproliferatív hatásának vizsgálata nőgyógyászati eredetű daganatos sejtvonalakon.  $IC_{50}$  értékek, citotoxicitás és tumorszelektivitás meghatározása a potens vegyületek esetében.
- A sejtciklusban bekövetkező változások vizsgálata áramlási citometria útján.
- A leghatékonyabb molekula apoptózist indukáló hatásának jellemzése sejtciklus analízis, fluoreszcens mikroszkópia, továbbá kaszpáz enzimek indukciójának vizsgálata segítségével.
- A legpotensebb tesztanyag mikrotubuláris rendszeren kifejtett közvetlen hatásának vizsgálata tubulin polimerizációs teszttel.
- A kiválasztott vegyület androgén hatásának meghatározása endokrin diszruptor teszt alkalmazásával.
- Szerkezet – hatás összefüggések megállapítása a kísérleti eredmények alapján.

### 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

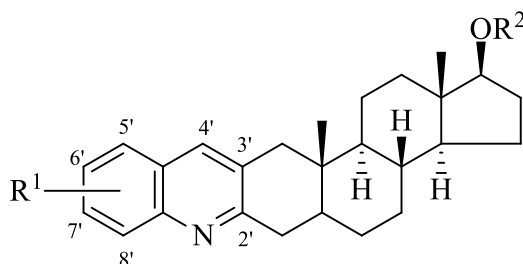
#### 3.1 Anyagok

##### 3.1.1 Tesztanyagok

A tesztanyagok szintézisét a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Karának Szerves Kémiai Tanszékén végezték.

##### 3.1.1.1 Sztteroid-kinolin hibrid molekulák

A tesztanyagok első csoportját A-gyűrűn fuzionált kinolint tartalmazó  $5\alpha$ -androsztánok alkották (1. ábra).

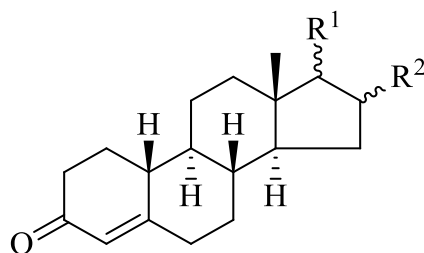


Vegyület	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>1</sub> helyzete
SQH1	Ac	H	-
SQH2	Ac	Me	6'
SQH3	Ac	MeO	6'
SQH4	Ac	Cl	6'
SQH5	Ac	Br	6'
SQH6	Ac	Cl	7'
SQH7	H	H	-
SQH8	H	Me	6'
SQH9	H	MeO	6'
SQH10	H	Cl	8'
SQH11	H	Cl	6'
SQH12	H	Br	6'
SQH13	H	Cl	7'
SQH14	H	Cl	5'
SQH15	H	Me	8'

1. ábra A vizsgált sztteroid-kinolin hibridek (SQH1-15) kémiai szerkezete.

##### 3.1.1.2 19-nortesztozteron származékok

A vizsgált vegyületek második csoportját 19-nortesztozteron C-16 és C-17 helyzetben különböző szubsztituenseket tartalmazó analógjai képezik (2. ábra).



Vegyület	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
NTD1	β-OH	β-CH <sub>2</sub> OH
NTD2	β-OH	α-CH <sub>2</sub> OH
NTD3	α-OH	β-CH <sub>2</sub> OH
NTD4	α-OH	α-CH <sub>2</sub> OH
NTD5	α-OH	H
NTD6	α-OAc	H
NTD7	α-OAcPh	H
NTD8	α-Cl	H
NTD9	α-OBz	H
NTD10	α-O-4-toluoyl	H
NTD11	α-O-4-OMe-Bz	H
NTD12	α-O-4-Br-Bz	H
NTD13	α-O-4-NO <sub>2</sub> -Bz	H
NTD14	α-O-2,4-NO <sub>2</sub> -Bz	H
NTD15	α-O-3,5-NO <sub>2</sub> -Bz	H
NTD16	α-O-2,4,6-Me-Bz	H
NTD17	α-O-2-I-Bz	H
NTD18	β-OAc	β-CH <sub>2</sub> OAc
NTD19	α-OAc	α-CH <sub>2</sub> OAc
NTD20	α-Br	H
NTD21	α-I	H
NAN*	β-OH	H

**2. ábra** A vizsgált 19-nortesztozteron származékok és a nandrolon\* (NAN), mint szerkezetileg analóg referencia vegyület kémiai szerkezete.

### **3.2 Sejtvonalak és sejtenyésztés**

Az antiproliferatív szűrővizsgálatokat humán petefészek (A2780), méhnyak (HeLa, SiHa, C33A) és emlő (MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-361) eredetű malignus sejtvonalakon végeztük. A tumoreszelektivitás vizsgálatához nem tumoros, főtális tüdő fibroblaszt (MRC-5) és immortalizált epitél (hTERT-HME1) sejteket alkalmaztunk. A hTERT-HME1 sejtvonal kivételével a sejteket 10% főtális borjúsérummal, 1-1% nem esszenciális aminosavval és antibiotikum-antimikotikum keverékkel kiegészített minimális esszenciális médiumban tenyésztettük. Az immortalizált epitél sejteket sérumentes, antibiotikum-antimikotikum keveréket, humán epidermális növekedési faktort, inzulint, hidrokortizont és szarvasmarha hipofízis extraktumot tartalmazó, emlő epitél sejt médiumban tartottuk fenn. Minden sejtet szöveti körülményeket biztosító inkubátorban tartottunk, 37°C hőmérsékleten, 5% CO<sub>2</sub> jelenléte mellett.

### **3.3 Antiproliferatív hatás meghatározása**

A tesztanyagok sejtosztódást gátló hatását MTT teszt útján határoztuk meg. A sejteket 96 üregű mikrotitráló lemezre telepítettük, az üregeket másnap a vizsgálandó vegyületeket tartalmazó médiummal egészítettük ki a megfelelő végkoncentráció (10 és 30 µM) elérésének érdekében. A 72 órás kezelést követően a sejteket MTT-oldattal inkubáltuk 4 órán át, majd a precipitált formazán kristályok dimetil-szulfoxidban történő feloldását követően az üregek abszorbanciáját fotométer segítségével határoztuk meg 545 nm-en. A hatékony tesztvegyületek esetében a tesztet egy koncentrációsor (0,1-30,0 µM) alkalmazó kezeléssel ismételtük meg, majd a mért értékekre szigmoid koncentráció-hatás görbét illesztve meghatároztuk azok IC<sub>50</sub> értékeit. A tumoreszelektivitás vizsgálatához a tesztet nem tumoros sejtvonalakon is végrehajtottuk megegyező kísérleti körülmények között.

### **3.4 Citotoxikus hatás meghatározása**

HeLa sejteket 96 üregű mikrotitráló lemezre telepítettük, az üregeket másnap a vizsgálandó vegyületeket tartalmazó médiummal egészítettük ki. 24 óra inkubációt követően a kezelt sejtekből felszabaduló laktát dehidrogenáz aktivitását kereskedelmi forgalomban kapható kolorimetriás teszt segítségével határoztuk meg.

### **3.5 Sejtciklus és apoptózis áramlási citometriás vizsgálata**

A sejtek megoszlása a sejtciklus fázisok (szubG1, G0/G1, S és G2/M) között a celluláris DNS tartalom meghatározásával kimutatható propidium-jodiddal történő festést követően. A sejteket 6 üregű lemezen kezeltük 24, 48 és 72 órán keresztül. Ezt követően az összegyűjtött sejteket fixáltuk, propidium-jodid oldattal festettük, majd áramlási citométerrel vizsgáltuk.

### **3.6 Morfológiai vizsgálatok fluoreszcens mikroszkópiával**

A vegyületek okozta morfológiai változásokat és apoptózis indukciót fluoreszcens festés segítségével mutattuk ki, DNS-kötő festékeket alkalmazva. A sejteket 96 üregű lemezen kezeltük, majd festékkoldattal inkubáltuk, végül fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az intakt, korai apoptotikus és nekrotikus morfológiájú sejtek számszerűsítése után az adatokat statisztikai elemzésnek vetettük alá.

### **3.7 Kaszpázok aktivitásának meghatározása**

A tesztanyagok apoptózist indukáló hatásának megerősítéséhez a kaszpáz-3 aktivációját vizsgáltuk kolorimetriás teszt segítségével. Az érintett szignalizációs útvonal azonosításának érdekében a kaszpáz-8 és -9 enzimek aktivitását határoztuk meg. A sejteket minden esetben sejttenyésztő flaskába telepítettük, majd 24, 48 és 72 órán át inkubáltuk a tesztanyaggal. A kezelést követően a sejteket összegyűjtöttük, lizáltuk, majd az enzimet tartalmazó felülúszóhoz kromogén szubsztrátot adtunk. Az enzim hatására a szubsztrátból felszabaduló kromofór mennyiségét fotometriás úton határoztuk meg.

### **3.8 Tubulin polimerizációs teszt**

A tesztanyagok mikrotubuláris rendszerre gyakorolt közvetlen hatását sejtmentes kísérleti rendszerben vizsgáltuk. A teszt reakcióit UV-transzparens mikrotitráló lemezen hajtottuk végre, melyekhez a vizsgált vegyületekkel kiegészített tubulin oldatokat használtunk. A polimerizációs reakciót fotometriás úton, 60 perces kinetikai méréssel vizsgáltuk. A felvett kinetikai görbék alapján kiszámítottuk a polimerizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ).

### **3.9 Endokrin hatás vizsgálata**

A vegyületek androgén aktivitását élesztő-alapú endokrin diszruptor teszt segítségével határoztuk meg. Az élesztő sejteket 96 üregű, kromogén szubsztrátot tartalmazó lemezen inkubáltuk a tesztanyag jelenlétében. A tesztanyag közvetítette génexpresszió hatására átalakult szubsztrát mennyiségét fotométeres úton határoztuk meg. A mért adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá, a vegyület agonista és antagonistá tulajdonságait meghatároztuk.

### **3.10 Statisztikai értékelés**

A kísérleti eredmények statisztikai értékeléséhez egyutas varianciaanalízist hajtottunk végre, GraphPad Prism 5 program segítségével. Az eredményeket átlag  $\pm$  standard hiba formájában mutattuk be. A különbségek szignifikanciájának meghatározásához Dunnett próbát alkalmaztunk. A legalább  $p < 0,05$  értékű különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 Szteroid-kinolin hibrid molekulák antiproliferatív tulajdonságai

#### 4.1.1 Szteroid-kinolin hibrid molekulák antiproliferatív hatása

Antiproliferatív hatásuk felderítéséhez 15 hibrid vegyület szűrővizsgálatát végeztük el. A 30  $\mu\text{M}$  koncentrációban 50%-ot meghaladó növekedésgátlást kifejtő testanyagok esetében a tesztet egy hígítási sorral is elvégeztük a megfelelő sejtvonalakon, majd meghatároztuk a vegyületek  $\text{IC}_{50}$  értékeit (1. táblázat). A legpotensebb testanyagnak az SQH9 bizonyult, amely ígéretes antiproliferatív hatást mutatott több malignus sejtvonalon. T47D sejtvonalon kifejtett növekedésgátló hatása ( $\text{IC}_{50}$ : 10.2  $\mu\text{M}$ ) a referencia vegyületével összevethető mértékű ( $\text{IC}_{50}$ : 9.8  $\mu\text{M}$ ). Ezen eredmények alapján az SQH9 hibridet további vizsgálatokra választottuk ki.

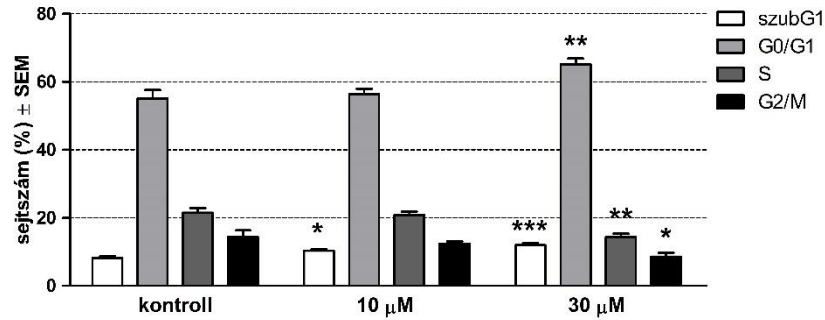
Vegyület	$\text{IC}_{50}$ értékek ( $\mu\text{M}$ )						
	HeLa	SiHa	C33A	MCF-7	MDA- MB- 231	MDA- MB- 361	T47D
SQH1	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
SQH2	>30	>30	16,2	>30	>30	>30	>30
SQH3	>30	>30	>30	>30	21,5	>30	>30
SQH4	>30	>30	>30	>30	>30	12,6	>30
SQH5	>30	23,6	26,5	27,9	>30	16,8	20,8
SQH6	20,3	>30	>30	17,6	>30	16,8	>30
SQH7	>30	>30	11,8	18,7	>30	>30	12,4
SQH8	>30	>30	20,1	>30	>30	>30	>30
SQH9	>30	>30	10,2	19,1	>30	>30	10,2
SQH10	>30	>30	15,4	29,9	18,7	12,8	27,1
SQH11	>30	>30	12,2	24,9	>30	>30	23,4
SQH12	>30	>30	12,3	23,3	>30	>30	18,5
SQH13	>30	>30	18,6	24,2	22,4	>30	>30
SQH14	>30	>30	20,5	16,4	>30	>30	24,0
SQH15	>30	>30	20,0	>30	>30	10,5	>30
CIS	12,4	7,8	1,8	5,8	19,1	3,7	9,8

1. táblázat A vizsgált szteroid-kinolin hibridek és a ciszplatin (CIS) számított  $\text{IC}_{50}$  értékei az alkalmazott daganatos sejtvonalakon, MTT teszttel vizsgálva, 72 óra inkubáció után.

#### 4.1.2 A kiválasztott szteroid-kinolin hibrid sejtcikluson kifejtett hatása

Az SQH9 T47D sejtciklus fázisait befolyásoló hatását áramlási citometria útján vizsgáltuk 48 óra behatást követően. A vegyület 10 és 30  $\mu\text{M}$  koncentrációjával történő kezelés markáns változásokat eredményezett, többek közt a hipodiploid állomány (szubG1) koncentrációfüggő gyarapodását idézte elő. A magasabb koncentrációval történő inkubáció a G1 populáció arányának jelentős emelkedéséhez vezetett (3. ábra). Ugyanakkor az S és G2/M fázisokban a sejtek jelentős számaránybeli csökkenése is megfigyelhető volt a 30  $\mu\text{M}$ -os expozíció mellett.

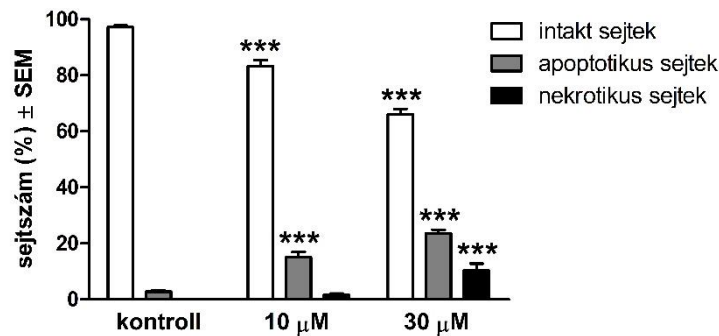




**3. ábra** Az SQH9 hatása T47D sejtek megoszlására a sejtciklus fázisai között, áramlási citometriával vizsgálva 48 órás kezelés után. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.3 Morfológiai változások és apoptózis indukció

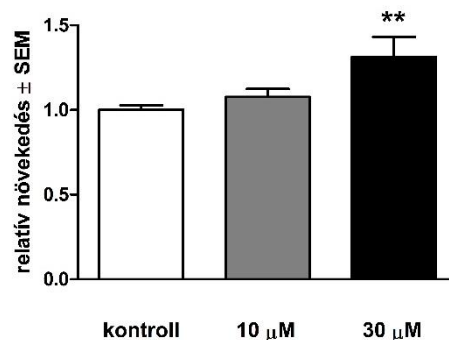
T47D sejtek morfológiai jegyeit kettős festés után fluoreszcens mikroszkópia útján vizsgáltuk, 48 órás SQH9 expozíciót követően. Megfigyeltük, hogy a vegyület koncentrációfüggő módon emeli az apoptotikus sejtek arányát az intakt sejtek rovására (4. ábra). Nekrotikus morfológiát mutató sejtek szignifikáns mennyiségben csak a tesztanyag magasabb koncentrációjának hatására jelentek meg.



**4. ábra** T47D sejteken végzett fluoreszcens kettős festés kvantitatív értékelése, 48 órás, 10 és 30 µM SQH9 kezelés után. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.4 A kiválasztott szteroid-kinolin hibrid kaspáz-3 aktivitásra gyakorolt hatása

A tesztanyag apoptózist indukáló hatásának megerősítéséhez vizsgáltuk a vegyület kaspáz-3 aktivitáson kifejtett hatását. 48 órás kezelést követően az SQH9 fokozta az enzim aktivitását T47D sejtekben, jóllehet szignifikánsan csak a magasabb koncentráció mellett (5. ábra).



**5. ábra** Kaspáz-3 indukció 10 és 30 µM SQH9 vegyülettel történő, 48 órás kezelést követően. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*\*  $p < 0,01$ .

## 4.2 19-nortesztozsteron származékok antiproliferatív tulajdonságai

### 4.2.1 19-nortesztozsteron származékok antiproliferatív hatása

Antiproliferatív hatásuk felderítéséhez 21 19-nortesztozsteron analóg szűrővizsgálatát végeztük el. A potens vegyületek esetében meghatároztuk azok  $IC_{50}$  értékeit (2. táblázat). Három tesztanyag (NTD8, 20 és 21) kiemelkedő és szelektív hatást fejtett ki HeLa sejteken, ugyanakkor hatásuk a többi sejtvonalon elenyészőnek mutatkozott. Ezen ígéretes halogénezett vegyületek  $IC_{50}$  értékei (1,2-1,7  $\mu\text{M}$ ) összevethetőek a nandrolon (0,7  $\mu\text{M}$ )  $IC_{50}$  értékével, ugyanakkor jelentősen meghaladták a CIS növekedésgátló hatását (12,4  $\mu\text{M}$ ) HeLa sejteken.

Vegyület	$IC_{50}$ értékek ( $\mu\text{M}$ )							
	HeLa	SiHa	C33A	A2780	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-361	T47D
NTD1	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD2	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD3	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD4	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD5	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD6	<b>16,7</b>	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD7	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD8	<b>1,2</b>	>30	<b>28,4</b>	>30	>30	>30	>30	>30
NTD9	<b>14,7</b>	>30	>30	<b>11,4</b>	<b>14,0</b>	>30	>30	>30
NTD10	<b>21,0</b>	>30	>30	<b>14,6</b>	<b>22,2</b>	>30	>30	>30
NTD11	>30	>30	<b>21,1</b>	<b>10,3</b>	<b>27,0</b>	>30	<b>28,7</b>	<b>25,1</b>
NTD12	<b>17,4</b>	>30	>30	<b>10,3</b>	<b>14,1</b>	>30	<b>26,2</b>	<b>15,7</b>
NTD13	>30	>30	>30	<b>17,0</b>	>30	>30	>30	>30
NTD14	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD15	>30	>30	>30	<b>15,1</b>	>30	>30	>30	>30
NTD16	>30	>30	<b>15,3</b>	<b>12,4</b>	<b>20,3</b>	>30	>30	>30
NTD17	<b>19,8</b>	>30	<b>13,6</b>	<b>12,4</b>	<b>24,4</b>	>30	>30	<b>29,5</b>
NTD18	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD19	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
NTD20	<b>1,7</b>	>30	>30	<b>26,7</b>	>30	>30	>30	>30
NTD21	<b>1,5</b>	>30	>30	<b>20,9</b>	>30	>30	>30	>30
NAN	<b>0,7</b>	>30	>30	>30	>30	>30	>30	>30
CIS	<b>12,4</b>	<b>7,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,3</b>	<b>5,8</b>	<b>19,1</b>	<b>3,7</b>	<b>9,8</b>

2. táblázat A vizsgált 19-nortesztozsteron analógok és a ciszplatin számított  $IC_{50}$  értékei az alkalmazott daganatos sejtvonalakon, MTT teszttel vizsgálva, 72 óra inkubáció után.

A potens analógok tumorszelektivitásának jellemzéséhez antiproliferatív hatásukat intakt fibroblaszt és immortalizált epitel sejtvonalakon határoztuk meg (3. táblázat). A tesztanyagok egyike sem fejtett ki releváns hatást fibroblaszt sejteken. Bár az NTD8 a fibroblaszt sejtek osztódását csak szerény mértékben gátolta, az immortalizált epitel sejteken markáns hatást

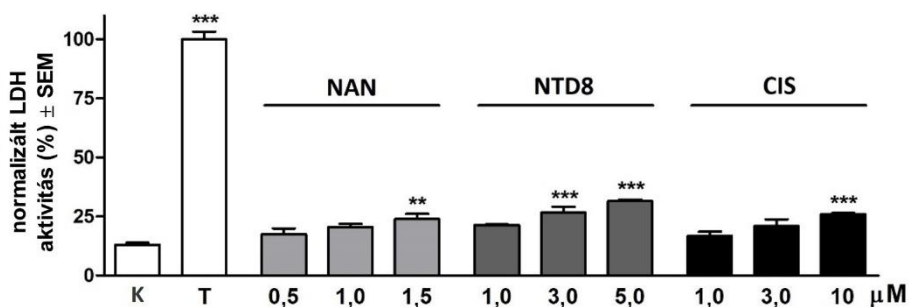
váltott ki ( $IC_{50}$ : 4,6  $\mu$ M), amely ugyanakkor kevésbé kifejezettnek bizonyult a CIS hatásához ( $IC_{50}$ : 2,5  $\mu$ M) képest. A vizsgált 19-nortesztozteron származékok közül az NTD8 bizonyult a legpotensebb tesztanyagnak HPV18+ méhnyak karcinóma sejteken ( $IC_{50}$ : 1,2  $\mu$ M), figyelemre méltó tumorszelektivitása mellett. Eredményeink alapján az NTD8 analógot további, a hatásmechanizmus részleteinek feltárására irányuló vizsgálatokra választottuk ki. HeLa sejteken kifejtett proliferációt gátló tulajdonságának következtében a NAN-t szintén további vizsgálatoknak vetettük alá.

Vegyület	Konc. ( $\mu$ M)	Növekedés gátlás (%) és $IC_{50}$ értékek [ $\mu$ M]	
		MRC-5	hTERT-HME1
NTD8	10	4,3 $\pm$ 3,7	76,2 $\pm$ 0,5
	30	8,0 $\pm$ 2,3	99,9 $\pm$ 0,1 [4,6]
NTD20	10	11,9 $\pm$ 2,3	n.v.
	30	20,4 $\pm$ 2,1	
NTD21	10	13,1 $\pm$ 1,9	n.v.
	30	13,8 $\pm$ 2,0	
NAN	10	5,4 $\pm$ 1,2	16,9 $\pm$ 1,2
	30	11,3 $\pm$ 0,5	37,1 $\pm$ 1,0
CIS	10	60,3 $\pm$ 3,3	97,9 $\pm$ 0,3
	30	61,9 $\pm$ 1,0 [6,2]	99,1 $\pm$ 0,3 [2,5]

3. táblázat A potens 19-nortesztozteron analógok és a referencia vegyület antiproliferatív hatása nem tumoros sejtvonalakon, MTT teszttel vizsgálva, 72 óra inkubáció után. n.v.: nem vizsgált

#### 4.2.2 19-nortesztozteron származékok citotoxikus hatása

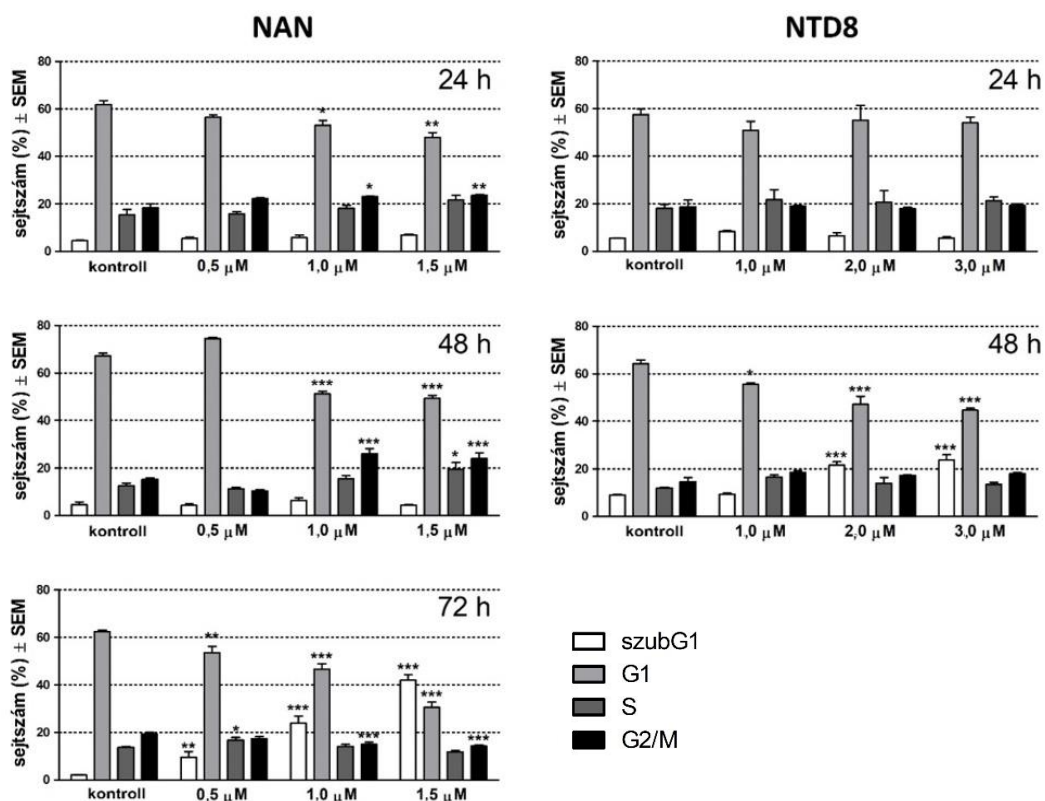
24 órás behatást követően a tesztanyagok mindegyike a membránintegritás megszűnését jelző laktát-dehidrogenáz enzim koncentrációfüggő felszabadulását váltotta ki (6. ábra). Míg a NAN szignifikánsan emelte az enzim aktivitását 1,5  $\mu$ M-os kezelés mellett, az NTD8 membránkárosító hatása csak 3,0  $\mu$ M-os és azt meghaladó koncentráció mellett jelent meg.



6. ábra Az NTD8, NAN és CIS citotoxikus hatásának vizsgálata HeLa sejteken 24 órás behatást követően. A maximális aktivitás (100%) a Triton X-100 (T) hatásával ekvivalens. Szignifikancia értékek a kontrollhoz (K) viszonyítva: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.3 19-nortesztozteron származékok sejtciklusra gyakorolt hatása

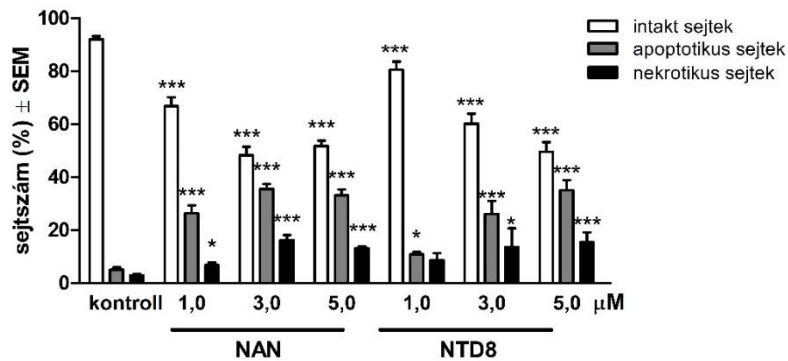
24 óra behatást követően a NAN koncentrációfüggő módon emelte a HeLa sejtek számát G2/M fázisban a G1 fázis rovására, szignifikánsan 1,0 és 1,5  $\mu\text{M}$ -os kezelés mellett (7. ábra). 48 óra expozíciót követően a hatás még kifejezettebbé vált, ugyanakkor a sejtek számaránya S fázisban szignifikáns növekedést mutatott 1,5  $\mu\text{M}$ -os behatás mellett. A 72 órás inkubáció az S és G2/M fázisok egy fordított tendenciáját idézte elő a hipodiploid populáció koncentrációfüggő emelkedésének következtében. Az S fázis 0,5  $\mu\text{M}$  melletti fokozódását leszámítva a sejtek aránya a sejtciklus minden fázisában szignifikáns redukción szenvedett a szubG1 fázis javára 72 órás NAN kezelést követően, amely intenzív apoptotikus fragmentációra utal. A 24 órás NTD8 kezelés csak elhanyagolható hatást fejtett ki a sejtcikluson, mely az S és G2/M populációk szerény növekedését, valamint a G1 fázis enyhe redukción eredményezte. 48 órás inkubációt követően azonban a G1 állomány a szubG1 sejtek javára történő koncentrációfüggő csökkenése volt megfigyelhető, mely a kezelés minden koncentrációja mellett szignifikánsnak mutatkozott. A hipodiploid populáció tekintélyes gyarapodása 2,0 és 3,0  $\mu\text{M}$ -os NTD8 expozíciót követően az apoptotikus testek megjelenésére utal.



7. ábra A NAN és az NTD8 hatása HeLa sejtek megoszlására a sejtciklus fázisai között, áramlási citometriával vizsgálva 24, 48 és 72 órás kezelés után. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.4 Morfológiai változások és apoptózis indukció

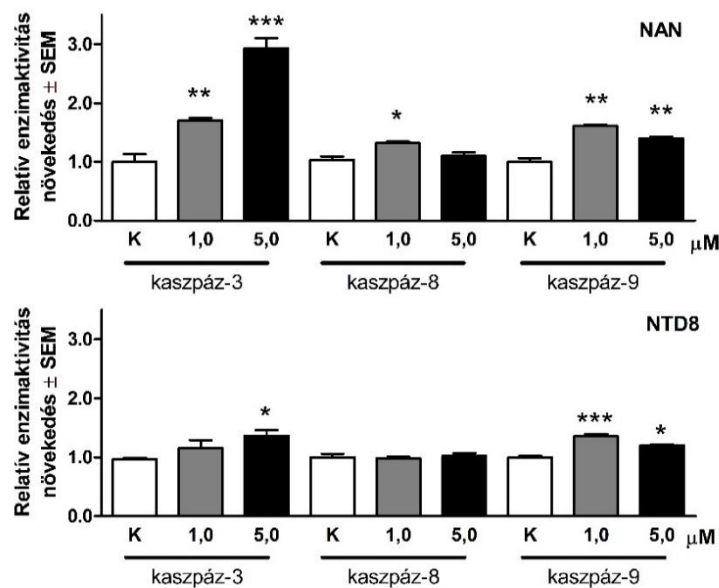
A 24 órás NAN kezelés minden koncentrációja mellett szignifikáns mértékben emelkedett az apoptotikus sejtek számaránya az intakt sejtek rovására (8. ábra). A vegyület már a legalacsonyabb koncentráció mellett is jelentősen növelte a nekrotikus sejtek előfordulását. Az NTD8 behatás tekintélyes, koncentrációfüggő módon emelte az apoptotikus sejtek arányát, hatása az intakt sejtek egyidejű fogyásával párosult. A 3,0 és 5,0  $\mu\text{M}$  expozíció a nekrotikus morfológiájú sejtek jelentős számbeli gyarapodását eredményezte.



8. ábra HeLa sejtek fluoreszcens kettős festésének kvantitatív értékelése 24 órás NAN és NTD8 kezelést követően. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.5 19-nortesztozteron származékok kaspáz-3, -8 és -9 aktivitására gyakorolt hatása

A tesztanyagokkal inkubált HeLa sejtekben három különböző, apoptózisban szerepet játszó enzim aktivitását határoztuk meg. 72 órás NAN kezelés a kaspáz-3 enzim aktivitásának koncentrációfüggő emelkedését váltotta ki (9. ábra).

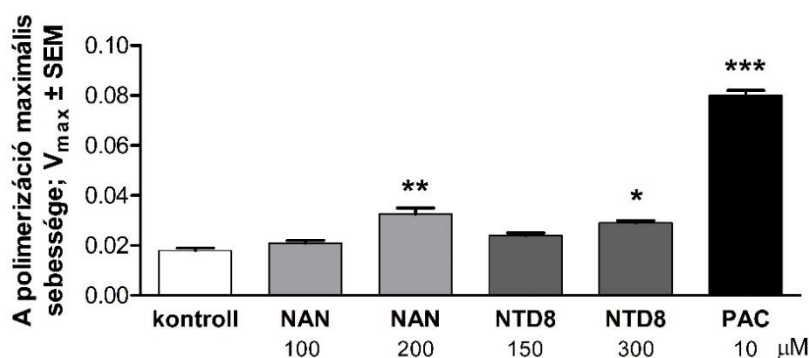


9. ábra Apoptotikus enzimek aktivációja HeLa sejtekben 72 órás NAN (felső panel) és 24 órás NTD8 (alsó panel) kezelést követően. A szignifikancia értékek a kontrollhoz (K) viszonyítva: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Az iniciátor kaszpázok szintén számottevő mértékben aktiválódtak a 72 órás expozíció hatására, bár a kaszpáz-8 aktivitása kevésbé kifejezettnak mutatkozott. A kaszpáz-3 koncentrációfüggő indukciója NTD8 esetében már 24 órás behatást követően is megfigyelhető volt. A vegyület a kaszpáz-9 enzim aktivitását szintén jelentős mértékben fokozta, ugyanakkor a kaszpáz-8 aktivitására nem volt hatással.

#### 4.2.6 19-nortesztozteron származékok tubulin polimerizáción kifejtett közvetlen hatása

A polimerizációs reakció növekedési szakaszának változását NAN és NTD8 tesztanyagok jelenlétében vizsgáltuk. Minden kondíció esetében kiszámítottuk a tubulin polimerizáció maximális sebességét ( $V_{max}$ ), majd azt statisztikai elemzésnek vetettük alá (10. ábra). Mindkét vegyület fokozta a mikrotubulusok képződésének maximális sebességét a hatóanyagmentes kontrollhoz viszonyítva, a tesztanyagok magasabb koncentrációja mellett a reakciósebesség szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető. A tesztelt vegyületek hatása hasonlóan, ugyanakkor számottevően szerényebbnek bizonyult a pozitív kontrollként alkalmazott paklitaxelhez (PAC) hasonlítva.



10. ábra A tesztanyagok hatása a polimerizációs reakció maximális sebességére. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.2.7 A kiválasztott 19-nortesztozteron származék androgén hatásának vizsgálata

Az NAN-t androgén receptorhoz mutatott tekintélyes, a dihidrotesztozteronéhoz (DHT) hasonló mértékű affinitásának köszönhetően közismert androgénként tartják számon, ebből kifolyólag az androgenitás vizsgálatához használt kísérleti rendszerben referencia vegyületként alkalmaztuk. Az extrém magas koncentrációktól eltekintve az NTD8 behatás jelentősen alacsonyabb riporter gén expressziót eredményezett a vizsgálatok során, mint a NAN expozíció, amely a tesztanyag kiemelkedően alacsony androgenitását jelzi. A NAN (34.3 nM) és az NTD8 (3.8  $\mu$ M)  $EC_{50}$  értékei közt jelentkező két nagyságrendnyi különbség a legpotensebb vegyület elhanyagolható androgén hatásáról tesz tanúbizonyságot. Meggegyező kísérleti körülmények között, ugyanakkor DHT jelenléte mellett a tesztanyag antagonist hatást nem fejtett ki.

## 5 DISZKUSSZIÓ

Bár számos tumorelles hatással rendelkező szteroidot írtak már le, soraikban androsztán vázas molekulák igen gyéren lelhetők fel. Vizsgálataink alapvető célja újonnan szintetizált, antiproliferatív tulajdonsággal rendelkező, androsztán-alapú molekulák farmakológiai jellemzése, melyek androsztán vázas szteroid-kinolin hibridekre és 19-nortesztozteron származékokra terjedtek ki. További célunk volt szerkezet-hatás összefüggések feltárása.

15 szteroid-kinolin hibridet vizsgáltunk sejtosztódást gátló hatásuk jellemzéséhez. A 6' metoxi kinolin csoportot tartalmazó, 17-hidroxi analóg (SQH9) mutatkozott a legpotensebb vegyületnek, figyelemre méltó antiproliferatív hatást fejtett ki több sejtvonalon. A tesztanyag effektivitása a referencia vegyületéhez hasonló mértékűnek mutatkozott T47D sejtek esetében, így a vegyületet további, a hatásmechanizmus feltárására irányuló vizsgálatoknak vetettük alá.

Kezelt T47D sejtek áramlási citometriás vizsgálata az SQH9 sejtciklust megrekesztő tulajdonságára hívta fel a figyelmet. A G1 sejtek S és G2/M fázisok rovására történő felszaporodása a G1→S átmenet gátlását jelezte. A szubG1 populáció gyarapodása a tesztanyag koncentrációfüggő apoptózis indukáló hatását igazolta.

Az SQH9 proapoptotikus hatásának megerősítéséhez az apoptózis indukciót Hoechst 33258-PI kettős festés után fluoreszcens mikroszkópiával mutattuk ki. 48 órás kezelést követően a sejtek morfológiájában bekövetkező változások jelentős, koncentrációfüggő apoptózis indukciót jeleztek. Az alkalmazott koncentráció emelése a nekrotikus sejtek gyarapodásával járt, mely a másodlagos nekrozis megjelenésének tekinthető.

Az apoptózis fő effektor enzimének biokémiai vizsgálata kezelt T47D sejtekben szintén megerősítette a legpotensebb vegyület proapoptotikus potenciálját. 48 órás behatást követően a kaszpáz-3 aktivitásának koncentrációfüggő fokozódását figyeltük meg. Ezen eredmények alátámasztották az SQH9 koncentrációfüggő, programozott sejthalált indukáló képességét.

A hibrid vegyületek mellett 21 eltérően szuszbituált 19-nortesztozteron analóg antiproliferatív hatását is tanulmányoztuk. A legpotensebb tesztanyagok (NTD8, 20 és 21) kiemelkedő sejtosztódást gátló hatást fejtettek ki HPV18+ méhnyak karcinóma sejteken. E halogén szubsztituált vegyületek a tumorszelektivitási vizsgálatok során lényegesen szerényebb hatást fejtettek ki a nem tumoros eredetű sejteken.

Amellett, hogy az NTD8 a legpotensebb, HeLa sejteken kimagasló antiproliferatív hatást mutató tesztanyag, tumorszelektivitása is számottevő. Ezen eredmények tükrében a vegyületet további, a hatásmechanizmus részleteinek felderítésére irányuló vizsgálatoknak vetettük alá. Mivel a NAN robusztus gátló hatást gyakorolt a HeLa sejtek növekedésére, a további vizsgálatok során mint analóg kémiai szerkezettel bíró referencia vegyületet alkalmaztuk.

Antiproliferatív tulajdonságuk mellett a legpotensebb analóg és a NAN mérsékelt, a CIS hatásához képest kevésbé kifejezett citotoxikus tulajdonsággal bír.

Kezelt HeLa sejtek áramlási citometriás vizsgálata során a tesztanyagok sejtciklust megrekesztő tulajdonságára derült fény. Mindkét tesztanyag a hipodiploid sejtek fokozott megjelenését idézte elő a G1 sejtek rovására. Minthogy a hipodiploid populáció a nukleáris fragmentáció markere, a vizsgálat alátámasztja a vegyületek proapoptotikus tulajdonságát. Az NTD8 behatás a G1 populáció gyors csökkenését váltotta ki, melyet a szubG1 fázis egyidejű gyarapodása kísért. A NAN expozíció egy lassabb, de hasonló hatást eredményezett. A folyamatot egy átmeneti G2/M populáció növekedés egészítette ki, melynek végül a tekintélyes szubG konverzió vetett véget.

A vegyületek apoptózist indukáló hatását fluoreszcens mikroszkópiával is igazoltuk. 19-nortesztozteron analógokkal történő inkubáció mellett az apoptotikus morfológiájú sejtek gyors, koncentrációfüggő megjelenését figyeltük meg. A proapoptotikus tulajdonságokat az NTD8 és a NAN hatására bekövetkező fokozott kaszpáz-3 aktiváció szintén alátámasztotta. Az iniciátor kaszpázok vizsgálatával betekintést nyertünk az apoptózis indukció molekuláris folyamatába, információt kaptunk annak szignalizációs mechanizmusáról. Mind a két vizsgált analóg a kaszpáz-9 aktivitásának tekintélyes fokozást idézte elő, amely a programozott sejthalál mitokondriális útjának aktiválódását jelzi.

Az NTD8 és a NAN mikrotubulusok képződésére gyakorolt hatását azok sejtmentes kísérleti rendszerben történő vizsgálatával mutattuk ki. A tesztanyagok jelentősen fokozták a tubulin polimerizáció maximális sebességét, a paklitaxeléhez hasonló, stabilizáló hatást fejtve ki.

A 19-nortesztozteron származékok kémiai struktúrája megengedi a magreceptorokhoz való kötődésüket. Élesztő-alapú kísérleti rendszerben az NTD8 nem fejtett ki számottevő androgén hatást, ugyanakkor antagonistá hatása sem mutatható ki. Eredményeink arra utalnak, hogy a legpotensebb tesztanyag nem mutat jelentős affinitást az androgén receptorhoz. A C-17 pozíció  $\beta$  térállása elősegíti a receptorhoz való kötődést, a  $17\alpha$  szubsztitúció ebből a szempontból kedvezőtlennek tűnik. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a 19-nortesztozteron váz  $17\alpha$ -halogén szubsztitúciója felelős az androgén hatás redukációjáért.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az A-gyűrűben módosított androsztánok megfelelő kiindulási alapvázat szolgáltatnak további antiproliferatív hatású vegyületek tervezéséhez. A kinolin rész beépítése kémiai módosítások sorát teszi lehetővé, melyek elősegíthetik az antiproliferatív tulajdonságok kialakulását. A  $17\alpha$ -halogén szubsztituált 19-nortesztozteron váz szintén értékes kiindulási szerkezetnek tekinthető hatékonyabb daganatellenes hatású, androgén hatással nem rendelkező vegyületek kifejlesztéséhez.



## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

- I. Baji Á, **Gyovai A**, Wölfling J, Minorics R, Ocsovszki 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 Advances* 2016; 6:27501-27516.
- II. Schneider G, Kiss A, Mernyák E, Benke Z, Wölfling J, Frank É, Bózsity N, **Gyovai A**, Minorics R, Zupkó I: Stereocontrolled synthesis of the four 16-hydroxymethyl-19-nortestosterone isomers and their antiproliferative activities. *Steroids* 2016; 105:113-120.
- III. **Gyovai A**, Minorics R, Kiss A, Mernyák E, Schneider G, Szekeres A, Kerekes E, Ocsovszki I, Zupkó I: Antiproliferative Properties of Newly Synthesized 19-Nortestosterone Analogs Without Substantial Androgenic Activity. *Frontiers in Pharmacology* 2018; 9:825.

## EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- I. 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* 2016; 112:36-46.
- II. Vollár M, **Gyovai A**, Szűcs P, Zupkó I, Marschall M, Csupor-Löffler B, Bérdi P, Vecsernyés A, Csorba A, Liktör-Busa E, Urbán E, Csupor D: Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Selected Bryophytes. *Molecules* 2018; 23:1520
- III. Kiss A, Wölfling J, Mernyák E, Frank É, **Gyovai A**, Kulmány Á, Zupkó I, Schneider Gy: Stereoselective synthesis of new type steroid hybrid molecules and their antiproliferative activities. *Steroids* 2019 (accepted for publication)