

**REZISZTENCIA MÓDOSÍTÓK ÖSSZEHASONLÍTÁSA
MULTIDROG REZISZTENS PROSZTATA, EGÉR LIMFÓMA
ÉS VASTAGBÉLRÁK SEJTVONALAKON**

Csonka Ákos

PhD-disszertáció



Szegedi Tudományegyetem
Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

Szeged

2015

1. BEVEZETÉS

A szív- és érrendszeri kórképek után a tumoros megbetegedések képezik a második leggyakoribb halálokot világszerte. A daganatok kialakulását a kontroll nélküli sejtproliferáció és a sejthalál hiánya jellemzi, amely abnormális sejtnövekedés, tumor kialakulásához vezet. A lokalizált tumorok elsődleges kezelési módja a műtét és a radioterápia, míg a metasztázis adók esetében a kemoterápia az elsődleges választás.

A prosztatatarák kialakulása összetett mechanizmus, a fő okok között szerepel a jelátviteli kaszkádok hibája, illetve a szerzett rezisztencia, amely következtében a programozott sejthalál elmarad. Az élettartam növekedése és a rendelkezésre álló jobb diagnosztikai módszerek miatt a prosztatatarák gyakorisága nő. Az EU-ban a prosztatatarák a leggyakoribb rosszindulatú betegség a középkorú férfiak körében. Az előregező társadalomban a férfi lakosság halálozási aránya a prosztatatarák miatt aránytalanul növekszik, és ennek az aggasztó tendenciának a magyarázata eddig még ismeretlen.

A limfoproliferatív kórképek morbiditása és mortalitása is jelentős: évente mintegy 450 000 új beteget és 225 000 halálesetet jelentenek világszerte. Ezek a betegségek meglehetősen heterogének, így pontos diagnosztikájukhoz a klinikai jellemzőkön és a klasszikus szövettani morfológián túl, az immunológiai fenotípus meghatározása, a citogenetikai és a molekuláris sajátosságok átfogó értékelése elengedhetetlen. Mindazonáltal az utóbbi időben korszerű és rendkívül pontos molekuláris biológiai technikákat fejlesztettek ki, amelyek elérhetővé váltak a laboratóriumi diagnosztika számára is. Többek között ezen módszerek közé tartoznak a microarray technikák és az új generációs szekvenálási eljárások, amelyek elősegítik a limfómák heterogenitásának megértését, és elősegíthetik a bizonyos limfóma altípusok megismerését.

A vastag- és végbélrák a harmadik leggyakoribb daganat, és a negyedik leggyakoribb halálokl világszerte, ez megközelítőleg 1,2 millió új beteget és 600 000 halálesetet jelent évente. 50 éves kor alatt előfordulása alacsony, de az életkor növekedésével incidenciája jelentősen emelkedik. A fejlett országokban a diagnózis felállításakor az átlagos életkor kb. 70 év. A legnagyobb számú előfordulást Európából, Észak-Amerikából és Óceániából jelentették.

A gyógyszer-rezisztencia kialakulása egy kiválasztódási folyamat, mely során a heterogén tumormasszából a domináns klónok kiszelektálódnak. A legtöbb kemoterápiás szerre létrejövő rezisztencia a gyógyszerrel történő ismételt kezelésekkkel is előidézhető. A gyógyszer-rezisztencia fő mechanizmusai: intracelluláris gyógyszer koncentráció csökkentése transzport fehérjék által, a kemoterápiás szer és a célmolekula kölcsönhatásának megváltozása, a celluláris javító mechanizmusok módosulása, és az apoptózist szabályozó gének működésében bekövetkező változások. A transzport mechanizmusok közül az egyik legismertebb a membránban lokalizálódó különböző típusú efflux pumpák fokozott kifejeződése. Ilyen efflux pumpák az ATP-kötő kazettát tartalmazó ABC-transzporterek, amelyek az egyik legnagyobb és legősibb fehérje szupercsalád. Napjainkig több mint 200 olyan fehérjét azonosítottak, amelyek az

ABC fehérje szupercsalád tagjai és a multidrog rezisztenciában (MDR) is szerepet játszanak. Az ABC transzporterek transzmembrán glikoproteinek, amelyek elősegítik a szerkezetileg nem rokon vegyületek egyirányú transzlokációját a sejtmembránon keresztül, kihasználva az adenzin-trifoszfát (ATP) hidrolíziséből származó energiát. Az ABC transzportereket konzerált szerkezet és hatásmechanizmus jellemzi, mely a prokariótákból megőrződött az eukariótákban is. Az MDR-ABC fehérjék eliminálják a különböző anyagokat a sejtekből, beleértve mind az endo-, mind a xenobiotikumokat. Az MDR daganatsejtekben gyakran fellelhető az *ABCB1*-gén fokozott expressziója, amely a membránban lokalizált ABC transzporter B 1 fehérjét (ABCB1; P-glikoprotein) kódolja. Az ABCB1 efflux pumpát a nagy transzport kapacitás és széles szubsztrátspecificitás jellemzi. Az általa transzportált molekulák általában hidrofób, amfipatikus, töltetlen vagy bázikus vegyületek, de esetenként negatív töltésűeket is képes eliminálni az intracelluláris térből. Megállapítható, hogy az ABCB1 képes kölcsönhatásba lépni több mint 200 vegyülettel. Az ABCB1 pumpa szubsztrátjai és modulátorai különböző kémiai szerkezetű csoportokba osztályozhatóak. A legelterjedtebb megoldás, amely megváltoztatja az ABCB1 működését, a különböző inhibítorok használata. Napjainkig az ABCB1 inhibítorok három generációját azonosították, amelyek lehetnek kompetitív és nem kompetitív inhibítorok. Ahogy az elnevezésük is szemlélteti, a kompetitív inhibítorok versenyeznek a citotoxikus szerek kötőhelyéért. Ha kapcsolódásuk sikeres az ABCB1 efflux pumpához, a citotoxikus szer bejuthat a membránon keresztül az intracelluláris térbe. A nem kompetitív inhibítorok egy másik kötőhelyhez kapcsolódnak a fehérje molekulán belül, így annak konformációja megváltozik, és ennek eredményeként a kemoterápiás szer képessé válik a sejtbe történő bejutásra. Annak érdekében, hogy növeljük a már ismert kemoterápiás szerek hatékonyságát, amelyekre a tumorsejtek már rezisztenssé váltak, az efflux pumpák működésére ható új vegyületek kifejlesztése lehet az egyik lehetőség.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink elsődleges célja új perspektívák feltárása volt a kemoterápia során kialakuló multidrog rezisztencia (MDR) leküzdésére. Kísérleteink során szubsztituált szteroidok és különböző fenotiazin származékok között kerestünk nem toxikus, de hatékony vegyületeket az MDR gátlására. A vizsgált vegyületek MDR gátló hatását már ismert kemoterapeutikumokkal kombinálva elemeztük különböző sejtvonalakon *in vitro*. Az apoptózist indukáló hatást és a tumor progresszió gátlását egér T-limfóma és a prosztatarák sejtvonalakon vizsgáltuk.

- A vegyületek antiproliferatív hatását 3- (4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5-difenil-bromid (MTT) módszerrel vizsgáltuk L5178 egér T-limfóma szülői sejtvonalon (PAR), és humán *ABCB1*-génnel transzfektált vonalán (MDR, L5178Y), LNCaP és PC3 prosztatarák sejtvonalakon, valamint a multidrog rezisztens Colo 320 vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon.

- A vegyületek citotoxikus hatását MTT módszerrel vizsgáltuk PAR és MDR egér T-limfóma sejtvonalakon.
- Kísérleteink során a szubsztituált szteroid és thioridazin vegyületek ABCB1 moduláló hatását intracelluláris rhodamin 123 (R123) akkumulációval vizsgáltuk, áramlási citometria segítségével MDR egér T-limfóma sejtvonalon.
- Az ismert kemoterapeutikumok és a vizsgált szteroid és N-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazin vegyületek kölcsönhatását 96-lyukos mikrotitráló lemezen vizsgáltuk PC3 és MDR Colo 320 sejtvonalakon.
- Az amino- és amidocsoportokkal szubsztituált szteroid és a thioridazin vegyületek apoptózist indukáló hatását Annexin V-fluoreszcein izotiocianát (FITC) módszerrel vizsgáltuk áramlási citometria segítségével, MDR egér T-limfóma és PC3 prosztatarák sejtvonalakon.
- A vegyületek szerkezetével összefüggő hatásokat a biológiai kísérletek alapján elemeztük molekuláris docking módszerrel.
- A sztereoizoméria szerepét vizsgáltuk a tumorelles hatás tekintetében thioridazin vegyületek esetében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vegyületek

- Szteroid származékok

A **14**-es és **15**-ös aminoszteroid származékok a nekik megfelelő ketoszteroidok oximjaiból kerültek előállításra nátrium-tetrahidroborát redukcióval, nikkell-klorid jelenlétében. Az így kapott aminoszteroidokat *N-terc*-butiloxikarbonil (BOC)-védőcsoportot tartalmazó aminosavakkal acilálták kevert anhidrid módszerrel (**1–5** származék), és a védőcsoport eltávolítása száraz hidrogén-kloriddal történt dioxán oldatban, így keletkeztek a **6–12** jelzésű amin-hidroklorid származékok. Az alkil-aminometilén szteroidok szintézise a 16-hidroxi-metilén-17-ketoszteroidokból és primer aminokból történt, majd ezek a származékok ecetsav-anhidriddel kerültek acilezésre, így keletkeztek a **16–20** jelzésű származékok. A D-kondenzált heterociklusos szteroid (**21**) 16-hidroximetilén-3-metoxi-ösztro-1,3,5(10)-trién-17-onból, guanidinnel került szintézisre. A 16-aminometilandro sztén származék (**13**) a megfelelő 16-metilén-17-ke tonból, *n*-propilamin addíciójával és a teljesen acilezett termék szelektív *O,O*-deacilálásával jött létre. A fent említett vegyületek mintái DMSO-ban lettek oldva, a további vizsgálatokban 2 mg/ml-es törzsoldatokat használtunk. A pozitív kontrollként szolgáló verapamil, a DMSO és az *N*-BOC-izoleucin-*O*-pentaklorofenil-észter (**23**) a Sigma-Aldrichtól (St. Louis, MO, USA) került beszerzésre.

- Fenotiazin származékok

- a) A thioridazin-hidroklorid egy racém keveréke az enantiomereknek, ahol egy aszimmetrikus C-atom helyezkedik el a 2-es pozícióban a piperidil gyűrűn. A racém thioridazin a Sigma-Aldrich-től került megvásárlásra (Vallensbak Strand, Dánia). A thioridazint a klinikai gyakorlatban enantiomer keverékként alkalmazzák, amely egyenlő arányban tartalmazza a (+) és (-) enantiomereket. Az enantiomerek rezolválással kerültek elkülönítésre a kereskedelmi forgalomban kapható thioridazinból.
- b) A 26 vizsgált *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazin származék egy nemrég kidolgozott kémiai eljárással került előállításra. Az **1a–o** származékok az 1-es származékból Buchwald–Hartwig aminálással kerültek előállításra, R = Cl, továbbá a **2**-es származék a megfelelően szubsztituált dienil-fenotiazinok hidroborációs-oxidációs transzformációjának melléktermékeként keletkezett. A **3a–e** szulfoxidok és a **3f–j** szulfonok az 1-es fenotiazin *m*-kloroperoxi-benzoészav (m-CPBA) oxidációjával keletkezett. Az *N*-hidroxialkil-2-aminofenotiazin származékokat DMSO-ban oldottuk.

3.2. Sejtkultúrák

- L5178 egér T-limfóma sejtek (szülői, PAR) (ECACC Cat. No. 87111908) pHa MDR1/A retrovírussal lettek transzfektálva, az így keletkezett L5178Y egér T-limfóma sejtvonal expresszálja az *ABCBI*-gént, így multidrog rezisztens (MDR)
- Prostatarák sejtvonalak: hormon rezisztens PC3 (ATCC® Cat. No. CRL-1435) és hormon szenzitív LNCaP (ATCC® Cat. No. CRL-1740)
- Humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalak: Colo 205 doxorubicin érzékeny szülői sejtvonal (ATCC® Cat. No. CCL-222) és Colo 320/MDR-LRP doxorubicin rezisztens sejtvonal (ATCC® Cat. No. CCL-220.1)

3.3. Antiproliferatív hatás vizsgálata

A vizsgált vegyületek növekvő koncentrációinak sejtosztódásra gyakorolt hatását 96-lyukas mikrotitráló lemezben vizsgáltuk. A vegyületekből kettes léptékű hígítási sort készítettünk 100 µl McCoy's 5A vagy RPMI-1640 tápfolyadékban, az adott sejtvonaltól függően. 6×10^3 egér T-limfóma sejtet (PAR vagy MDR), 5×10^3 humán vastagbélrák sejtet (Colo 205 vagy Colo 320) 50 µl tápfolyadékban vagy 1×10^4 PC3 prostatarák sejtet 100 µl tápfolyadékban adtunk minden lyukhoz, a tápfolyadék kontroll lyukak kivételével. A lemezeket 37 °C fokon, 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban 72 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő végén 15 vagy 20 µL MTT oldatot adtunk a mintákhoz az 5 mg/ml-es MTT törzsoldatból, a végtérfogattól függően. Négy óra elteltével 100 µl 0.01 N HCl-el savanyított 10%-os nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) mértünk a mintákhoz. A lemezeket egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on. A sejtszaporodást az optikai denzitás (OD) meghatározásával mértük 540 nm-en (ref. 630 nm) Multiscan EX ELISA olvasó segítségével (Thermo Labsystem, Cheshire, WA, USA). A vizsgálatokban az alkalmazott oldószer mennyiségének nem volt hatása a sejtek növekedésére. A maximális gátló koncentráció 50%-át (IC₅₀) há-

rom párhuzamos mérés alapján GraphPad Prism szoftverrel (5.00 for Windows with nonlinear regression curve fit; GraphPad Software, San Diego, CA, USA; www.graphpad.com), az átlag standard hibájának (standard error of the mean, SEM) kiszámításával határoztuk meg.

3.4. *Citotoxicitás vizsgálata*

A vizsgált vegyületek növekvő koncentrációinak sejtosztódásra gyakorolt hatását 96-lyukas mikrotitráló lemezben vizsgáltuk. A vegyületekből kettes léptékű hígítási sort készítettünk 100 µl McCoy's 5A tápfolyadékban. 2×10^4 egér T-limfóma sejtet (PAR vagy MDR) 50 µl tápfolyadékban adtunk minden lyukhoz, a tápfolyadék kontroll lyukak kivételével. A lemezeket 37 °C fokon, 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban 24 órán át inkubáltuk. Az inkubációs idő végén 15 µl MTT oldatot adtunk a mintákhoz az 5 mg/ml-es MTT törzsoldatból. Négy óra elteltével 100 µl 0.01 N HCl-el savanyított 10%-os nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) mértünk a mintákhoz. A lemezeket egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on. A sejtszaporodást az optikai denzitás (OD) meghatározásával mértük 540 nm-en (ref. 630 nm) Multiscan EX ELISA olvasó segítségével (Thermo LabSystem, Cheshire, WA, USA). A vizsgálatokban az alkalmazott oldószer mennyiségének nem volt hatása a sejtek növekedésére. A maximális gátló koncentráció 50%-át (IC₅₀) három párhuzamos mérés alapján GraphPad Prism szoftverrel (5.00 for Windows with nonlinear regression curve fit; GraphPad Software, San Diego, CA, USA; www.graphpad.com), az átlag standard hibájának (standard error of the mean, SEM) kiszámításával határoztuk meg.

3.5. *Rhodamin 123 akkumulációs vizsgálat*

Az L5178 PAR és L5178Y MDR sejtek számát 2×10^6 sejt/ml-re állítottuk be, a sejteket felszuszpendáltuk szérumentes McCoy's 5A tápfolyadékban és 0.5 ml-ként Eppendorf csövekbe mértük. A szteroid vegyületeket 2 µg/ml-es végkoncentrációban, a racém thioridazint és enantiomerjeit 0.25 és 2.5 µg/ml végkoncentrációban adtuk a mintákhoz, a kezelt sejteket 10 percig szobahőn inkubáltuk. Verapamilt alkalmaztunk pozitív kontrollként 10 µg/ml koncentrációban, DMSO-t használtunk oldószer kontrollként, a DMSO-nak nem volt sejtkárosító hatása. A következőkben 10 µl fluorokróm és ABCB1 szubsztrát rhodamin 123 festéket adtuk a sejtekhez 5.2 µM végkoncentrációban, majd a mintákat további 20 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd a sejteket kétszer mostuk PBS-sel. A vizsgálatához a sejteket 0.5 ml PBS-ben szuszpendáltuk fel. A mintákban található sejtpopuláció fluoreszcenciáját PartecCyFlow® áramlási citométerrel határoztuk meg (Partec, Münster, Németország). A populáció átlagos fluoreszcenciájának mértékét a PAR, valamint a kezelt és kezeletlen MDR sejtek esetén határoztuk meg. A fluoreszcencia aktivitási hányadost a következő képlet alapján határoztuk meg, a mért fluoreszcencia értékek alapján:

$$FAR = \frac{MDR_{kezelt} / MDR_{kontroll}}{PAR_{kezelt} / PAR_{kontroll}}$$

3.6. Apoptózis vizsgálat

A vegyületek apoptózist indukáló hatását MDR egér T-limfóma és humán PC3 prosztatarák sejteken vizsgáltuk. Egér T-limfóma sejtek esetén a sejtszámot 5×10^5 cells/ml-re állítottuk be, majd a sejtszuszpenziót 0.5 ml-ként szétmértük 24-lyukas lemezre. A vegyületeket 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es végkoncentrációban vizsgáltuk. Pozitív kontrollként az apoptózist indukáló 12H-benzo[α]fenotiazint (M627) használtuk 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es végkoncentrációban. Negatív kontrollként az M627-et és szteroid vegyületeket nem tartalmazó minták szolgáltak. A sejteket a vegyületekkel kezelve 37 °C-on inkubáltuk 1 órán át, az inkubációs periódus végén a tápfolyadékot eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk, majd 0.5 ml friss tápfolyadékot mértünk a sejtekhez. A mintákat 24-lyukas lemezre vittük át, majd egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO₂ tenzió mellett. A vegyületek apoptózist indukáló hatását Annexin-V FITC Apoptosis Detection Kit (Cat. No. PF 032 from Calbiochem) segítségével vizsgáltuk, a gyártó instrukciói szerint. A sejtpopuláció fluoreszcenciáját Partec CyFlow[®] áramlási citométerrel vizsgáltuk (Partec, Münster, Németország). A PC3 sejtek esetében a kezelést megelőzően egy éjszakán át inkubáltuk a sejteket, hogy kitapadjanak. A kezelést követően azonos protokollt alkalmaztunk.

3.7. Checkerboard kombinációs vizsgálat

A checkerboard vizsgálatot 96-lyukas mikrotitráló lemezen végeztük, így határoztuk meg az *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazinok és a doxorubicin kölcsönhatását ABCB1 transzportert túltermelő vastagbél adenokarcinóma Colo 320 sejteken. A gyógyszer-kölcsönhatásokat a szubsztituált szteroid származékok és doxorubicin között PC3 prosztatarák sejteken is vizsgáltuk. A doxorubicin kettes léptékű hígításait horizontálisan 100 μl -ben végeztük, az *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazinok vagy szteroid vegyületek hígításait vertikálisan, 50 μl -ben végeztük. A sejteket (1×10^4 Colo 320 sejtet vagy 6×10^3 PC3 sejtet) a megfelelő tápfolyadékban felvéve, 50 μl -ben a mikrotitráló lemez lyukaiba mértük. A lemezeket 72 órán át, 37 °C-n tartottuk CO₂ termosztátban. A sejtszaporodást MTT festéssel határoztuk meg. A kombinációs index (combination index, CI) az 50%-os növekedés gátlásnál (ED₅₀) került meghatározásra, CompuSyn szoftver segítségével, négy vagy öt adatpontot figyelembe véve mindegyik kombináció esetén. A CI értékek meghatározzák a kölcsönhatás típusát, vagyis CI < 1 szinergizmus, CI = 1 additív hatás vagy indifferens hatás, illetve CI > 1 antagonizmus.

3.8. Molekuláris docking

A vegyületek 2D-s kémiai szerkezetének megrajzolása után történt a 3D-s kép megrajzolása Corina Online Demo szoftverrel. Minden 3D-s szerkezet PDB formátumban került elmentésre, amely lehetővé tette a docking vizsgálatokat. A molekuláris docking a korábbi Zhao-féle protokoll alapján történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Antiproliferatív hatás vizsgálata

A 23 szubsztituált szteroid származék antiproliferatív hatását vizsgáltuk PAR, MDR, LNCaP és PC3 sejtvonalakon. A **8** és a **10-14** vegyületeknek volt a legmarkánsabb antiproliferatív hatása szülői egér T-limfóma sejtvonalon, ahol az IC_{50} értékek $<5 \mu\text{g/ml}$ mutattak. A **9** és a **13** kivételével az összes fent említett vegyület és a **22** is aktivitást mutatott MDR sejteken. A két különböző prosztatarák sejtvonalat illetően a leghatékonyabb vegyület a **3, 12, 18, 19** és **23** volt az LNCaP sejtvonalon, valamint a **12** a PC3 sejtvonalon. Így a **12** volt az egyetlen olyan vegyület, amely jelentős aktivitást mutatott mind a négy vizsgált sejtvonalon.

Az N-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazin származékok nagyobb antiproliferatív hatást eredményeztek a rezisztens vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon, mint az érzékeny Colo 205 sejtvonalon. Az IC_{50} értékek alapján a fenotiazinokat a Colo 205 sejtvonalat illetően négy csoportba oszthatjuk: $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$: **1i, 3f, 3g, 3h** és **3i**; $IC_{50} 20\text{--}55 \mu\text{M}$: **1a, 1b, 1d, 1f, 1g, 1l, 1n, 3a, 3b, 3c** és **3e**; $IC_{50} 10\text{--}19 \mu\text{M}$: **1c, 1j, 1m, 2, 3d** és **3j**; és ahol az $IC_{50} 5\text{--}9 \mu\text{M}$: **1e, 1h** és **1k**. A vegyületek szelektívebbek voltak az MDR Colo 320 sejtvonalon, amint azt az alacsonyabb IC_{50} értékek is jelzik. A Colo 320 sejteknél a vegyületek három csoportba sorolhatók: $IC_{50} 10\text{--}40 \mu\text{M}$: **1a, 1b, 1d, 1e, 1f, 1g, 1i, 1l** és **3a**; $IC_{50} 3\text{--}10 \mu\text{M}$: **1c, 1h, 1j, 1m, 1n, 2, 3c, 3d, 3e, 3f, 3i** és **3j**; és végül ahol az IC_{50} érték $<3 \mu\text{M}$: **1k, 1o, 3b, 3g** és **3h**.

Nem észleltünk szignifikáns különbséget a racém thioridazin és a (+) és (-) enantiomerjei között az antiproliferatív aktivitást tekintetében MDR egér T-limfóma sejtvonalon.

4.2. Citotoxicitás vizsgálata

A szubsztituált szteroid származékok enyhe citotoxikus hatással rendelkeztek. Nem volt szignifikáns különbség a szülői és az MDR egér T-limfóma sejtvonalon mutatott hatás között. A legaktívabb vegyületek a **4, 9** és **12** voltak.

4.3. Rhodamin 123 akkumuláció vizsgálata egér T-limfóma sejtvonalon: ABCB1 gátlás vizsgálata

A szubsztituált szteroid származékok hatását MDR sejteken R123 intracelluláris akkumulációjának elemzésével vizsgáltuk, rövid inkubációs periódust (30 perc) és alacsony koncentrációt alkalmazva. Ebben a kísérletben 2×10^6 sejtet használtunk fel, a vizsgált vegyületeket $2 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban adtuk a mintákhoz, majd 10 perc inkubáció után R123-at adtuk a sejtekhez. Az aminoszteroid vegyületek, melyek BOC aminosavakkal acilezettek (**1-5** és **9**), és az egyszerű N-acetil származékok (**13, 16, 18** és **19**) kifejezett aktivitást mutattak az MDR egér T-limfóma sejtvonalon, a FAR értékek 29 és 77 között változtak. A szabad aminocsoportokat tartalmazó szteroidok vagy aminhidroklorid szubsztituensek bizonyítottan gyengébb vagy semmilyen aktivitást nem mutattak az ABCB1 gátlását tekintve. Érdekes, hogy a vizsgált koncentrációban a **12** csak mérsékelt gátlásra volt képes. A μM -ban kifejezett hatáserős-

ség esetében a **18**-as molekula volt a legaktívabb 77.41 FAR értékkel, 4.4 μM koncentrációnál. A **16**, **13**, **1**, **19** és **3** vegyületek is igen hatékonyak voltak.

A racém és a (+) és (-) thioridazin enantiomerek R123 intracelluláris akkumulációját határoztuk meg MDR egér T-limfóma sejtvonalon 0.25 és 2.5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. A 0.25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációnál a thioridazin és enantiomerjei mérsékelten gátolták az ABCB1 aktivitását az MDR egér T-limfóma sejtvonalban, míg 2.5 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció esetén a gátlás erősebb volt anélkül, hogy a sztereospecifitásuknak szerepe lett volna a hatást illetően.

4.4. A checkerboard kombinációs vizsgálat eredményei

A szubsztituált szteroid vegyületek és a doxorubicin kombinációs vizsgálatokban mutatott aktivitása a hatástalantól az erős szinergizmusig változott. Öt vegyület esetében volt jelentős szinergizmus doxorubicinnel: **4**, **9**, **10**, **14** és **22**. Mérsékelt szinergizmust figyeltünk meg az **1**, **2**, **8**, **12**, **16**, **17**, **19** és **23** vegyület esetében, míg a **3** és **18** vegyületek hatástalanok voltak. Az IC_{50} értéket az **5–7**, **11**, **13**, **15**, **20** és **21** vegyület esetében nem lehetett kiszámítani, ezért a doxorubicinnel való kölcsönhatást ezen vegyületek esetében nem lehetett meghatározni.

Az R123 vizsgálatban effektív *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazin származékokat tanulmányoztuk kombinációs kísérletekben doxorubicinnel. Mindegyikük szinergista aktivitást mutatott doxorubicinnel a Colo 320 sejtvonalon. Az *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazin származékok és a doxorubicin aránya ezekben a vizsgálatokban 12:1 volt. Az eredményekből arra lehet következtetni, hogy az *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazin vegyületek közül a **3j** volt a legaktívabb, és erős szinergista hatású volt doxorubicinnel kombinálva az MDR vastagbél adenokarcinóma sejtvonalon.

4.5. A szubsztituált szteroid és a thioridazin vegyületek apoptózist indukáló hatása

A szubsztituált szteroid vegyületek apoptózist indukáló hatását PC3 prosztatarák sejtvonalon vizsgáltuk, 4 $\mu\text{g/ml}$ nem toxikus koncentrációt alkalmazva. A vegyületeknek nem volt releváns apoptózist indukáló aktivitása; a korai apoptózis 1–6%, a késői apoptózis és nekrozis 1–5%, és a sejtpusztulás 1% körüli volt. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezeltlen kontrollal történő összehasonlítás során.

A thioridazin racém, (+) és (-) enantiomerek apoptózist indukáló hatását elemeztük 2.5 és 5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban MDR egér T-limfóma sejtkultúrában. A thioridazin racém és (+) vagy (-) enantiomerjei között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az apoptózist indukáló hatásban, ami arra enged következtetni, hogy a sztereoselektivitás nem játszik szerepet az apoptózist indukáló hatásokban. Mind a racém thioridazin, mind az enantiomerjei korai apoptózist indukáltak PC3 sejtekben, de nem volt szignifikáns különbség a hatások között. Eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a racém thioridazin és enantiomerjei lényegében azonos aktivitást produkálnak a replikáció és az apoptózis indukáció tekintetében a különböző sejtvonalon.

4.6. Molekuláris docking

A molekuláris docking egy hatékony módszer, amely képes a kötési energia kiszámítására egy adott vegyület és egy fehérje között. A számítások alapján kimutatható az ideális fehérje-kapcsolódási konfiguráció. Az algoritmus alapján előrevetíthető, hogy melyik aminosav vesz részt a hidrofób és a hidrogénkötések létrehozásában. A molekuláris docking eredmények azt mutatták, hogy a tesztelt vegyületek gátolják az ABCB1 fehérje (P-glikoprotein) aktivitását, és azonos helyen kötődnek a fehérjéhez, mint a verapamil. A szubsztituált szteroid vegyületek és a P-glikoprotein közötti kölcsönhatást *in silico* vizsgálatokkal modelleztük, ahol a verapamilt mint pozitív kontrollt használtuk. Mind a 23 szteroid vegyület alacsonyabb kötési energiával rendelkezett, mint a verapamil. A kötési energiák -6,43 -9,88 kcal/ml értékek között változtak. A feltételezett gátlási állandók 0,1–10,1 μM közötti értékek voltak.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A **8**, **10-12**, **14** és **22** szubsztituált szteroid vegyületek jelentős antiproliferatív aktivitást mutattak ABCB1-et expresszáló MDR egér T-limfóma sejtvonalon. Ezek a vegyületek amino-acilamid sók, amelyek három különböző szteroid vázhoz (androsztán, androsztén és pregnándién) kapcsolódnak. A **22** egy ösztron-éter származék, amely egy kéttagú α -hidroxi-metilunketon elrendezést tartalmaz a D-gyűrűn, amely lehetővé teszi az 1,4-hidrogén donor-akceptor kapcsolatot. Másrészt, a **3**, **12**, **18**, **19** és **23** hatékonynak bizonyult az antiproliferatív vizsgálatokban hormonszenzitív LNCaP prosztatarák sejtvonalon. Az MDR gátlás tekintetében a vizsgált vegyületek többsége hatékony, mint pl. **1-5**, **9**, **13** és **16-20**. Ezzel szemben a **6**, **8**, **10-12**, **14**, **15** és **21** gyenge hatást mutatott. Ezen utóbbi molekulák vagy amin-hidroklorid vegyületek vagy különleges szerkezettel rendelkeznek mint a **14**, **15**, és **21** ösztron-éter-származékok. Azok az amino-szteroidok, melyek primer bázikus aminocsoportokat tartalmaznak, gyakorlatilag hatástalanok voltak. A molekuláris docking eredmények azt igazolták, hogy a tesztelt vegyületek gátolják az ABCB1 aktivitást, és a verapamillal azonos a kötődési helyük. A legtöbb hatásos vegyület és a verapamil is egy vagy több aminosavat tartalmaz a kapcsolódási pontján. Úgy tűnik, hogy jelentős összefüggés van a kötési energiák és a FAR értékek között. Nagyszámú szteroid származék volt képes fokozni a doxorubicin aktivitását a PC3 sejtvonalon kombinációs kísérletekben. Eredményeink alapján a **9**-es vegyület tölthet be vezető szerepet a további vizsgálatokat illetően, míg a **12**-es ígéretes lehet mint hatékony antiproliferatív kemoterapeutikum.

A vizsgált N-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazinok ígéretes antiproliferatív hatásúak az MDR vastagbél adenokarcinóma sejtekben. Természetesen a szubsztituens csoportok markánsan befolyásolták a rákellenes aktivitását. A vegyületek szerkezete és aktivitása közötti kapcsolat elemzése során arra a következtetésre jutottunk, hogy a szekunder aminokkal szubsztituáltak (morfolin, dietilamin vagy N-metilpiperazin) az N-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazin gyűrű 2-es pozíciójában (**3c**, **3d** és **3f**) voltak a leginkább hatékonyak. Továbbá, az IC_{50} értékek alapján

elmondható, hogy a kénatom oxidációs állapota (szulfoxid vagy szulfon) jelentős szerepet játszott az adott vegyület hatékonyságát illetően (**3h**, **3i** és **3j**). Azok a vegyületek, melyek a gyűrű 2-es pozíciójában primer amint vagy savamidot tartalmaznak, mint például az **1c**, **1h**, **1j**, **1m** és **1n**, kevésbé hatékonyak, mint a fent említett származékok. Feltételezhető, hogy a hasonló szerkezeti elemek (szekunder amin a gyűrű 2-es pozíciójában, 2-hidroxi-csoport az alkilláncban, szulfoxid vagy szulfon forma) felelős a vegyületek, mint például az **1c**, **3d**, **3g**, **3h**, **3i** és **3j** molekula doxorubicinnel együtt tanúsított szinergizmusáért. Az antiproliferatív vizsgálatok egyértelműen bizonyítják, hogy a kén oxidációja az **1h** molekulában vezetett a legaktívabb, a **3j** molekula létrejöttéhez. Azt is megállapíthatjuk, hogy ez a szerkezeti változtatás egyértelműen növelte a biológiai aktivitást.

A mindennapi orvosi gyakorlatban különösen nagy figyelem fordul a gyógyszerek sztereoizomériai szerkezetéhez köthető biológiai hatások felé. Eredményeink alapján leszögezhetjük, hogy a thioridazin vegyületek sztereoizomériája esetében nem találtunk összefüggést a sejtproliferáció gátlása, az apoptózis indukció vagy az ABCB1 gátlás tekintetében MDR egér T-limfóma és PC3 prosztatarák sejtvonalakon.

6. KONKLÚZIÓK

- Az aminoacilamid sókkal szubsztituált szteroidok hatékony sejtosztódást gátló aktivitást produkálnak az MDR egér T-limfóma és LNCaP prosztatarák sejtvonalakon.
- A primer aminocsoportot tartalmazó szteroidoknak nem volt hatásuk a prosztatarák sejtvonalakon.
- Nem találtunk szignifikáns különbséget a racém és a (+) és (-) thioridazin enantiomerek antiproliferatív aktivitása között MDR egér T-limfóma-sejtvonalon.
- Az egy enantiomer önálló használata úgy tűnik, nem nyújt semmilyen előnyt az MDR tumorok elleni terápiában.
- Az N-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazinok esetében a gyűrű 2-es pozíciójában lévő szekunder aminoknak, illetve a kénatom oxidációs állapotának (szulfoxid vagy szulfon) van szerepe a vegyületek antiproliferatív hatását illetően MDR vastagbél adenokarcinóma sejtkultúrán.
- Nagyszámú szubsztituált szteroid vegyület fokozta a doxorubicin aktivitását kombinációs kísérletekben, PC3 prosztatarák sejtvonalon.
- Az N-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazinok esetében a doxorubicinnel való szinergizmust a gyűrű 2-es pozíciójában lévő szekunder aminok, a 2-hidroxi-csoport az alkilláncban, és a szulfoxid vagy szulfon csoport biztosítja.
- Sem a szubsztituált szteroidok, sem a thioridazin származékok nem tudtak apoptózist indukálni PC3 prosztatarák vagy MDR egér T-limfóma sejtvonalon.
- A molekuláris docking módszer segítségével meghatározható a kötési energia egy adott vegyület és egy fehérje között. A vizsgált szteroid vegyületek gátolták az ABCB1 aktivitást, és kötődési helyük megegyezett a verapamil kötődési helyével.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Prof. Dr. Molnár Józsefnek** a lehetőséget, hogy kutatócsoportjában dolgozhattam. Hálás vagyok az irántam tanúsított bizalmáért és tanácsaiért, melyekkel önálló kutatómunkára ösztönzött. Köszönöm az áldozatos munkáját, mindenre kiterjedő figyelmét, nélkülözhetetlen segítségét és türelmét.

Köszönöm **Prof. Dr. Varga Endrének** és **Prof. Dr. Simonka János Aurélnak**, hogy lehetővé tették számomra a kutatómunka végzését a betegellátás mellett.

Hálával tartozom **Dr. Burián Katalinnak** és **Prof. Dr. Mándi Yvettenek**, hogy lehetővé tették számomra az intézetben való munkát, és észrevételeikkel segítették kutatásaimat.

Külön köszönöm **Dr. Spengler Gabriellának**, **Vigyikánné Váradi Anikónak**, **Dr. Ana Martinsnak** és **Prof. Dr. Leonard Amaralnak**, hogy mindig barátsággal fordultak hozzám és értékes tanácsaikkal és ötleteikkel segítették munkámat.

Hálásan köszönöm **Dr. Gárgyán István** és **Dr. Süveges Gábor** klinikai főorvos uraknak, hogy együttműködésükkel segítették klinikai munkámat.

Köszönet illeti **Dr. Ocsovszki Imrét** az áramlási citometriás mérésekben nyújtott segítségért.

Végtelen hálával tartozom feleségemnek és családomnak az odaadó támogatásukért és türelmükért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm minden munkatársamnak, hogy támogattak és segítettek munkám elvégzésében.

A disszertációt betegeim gyógyulásának ajánlom.

8. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

1. Csonka Á, Spengler G, Martins A, Ocsovszki I, Christensen JB, Hendricks O, Kristiansen JE, Amaral L, Molnár J: Effect of thioridazine stereoisomers on the drug accumulation of mouse lymphoma and human prostate cancer cell lines *in vitro*. In Vivo 27(6): 815–820, 2013. **IF:1.148**
2. Csonka Á, 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 Research 35(4): 2105–2112, 2015. **IF:1.872**
3. Takács D, Csonka Á, Horváth Á, Windt T, Gajdács M, Riedl Zs, Hajós Gy, Amaral L, Molnár J, Spengler G: Reversal of ABCB1 related multidrug resistance of colon adenocarcinoma cells by phenothiazines. Anticancer Research 35(6): 3245–3252, 2015. **IF:1.872**

9. TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Hozzájárulok ahhoz, hogy a doktorjelölt a disszertációban felsorolt közös publikációkat és a benne foglalt eredményeket a védési eljárásban felhasználja.

Kijelentem, hogy a felsorolt közleményből felhasznált eredményeket más PhD-eljárásban nem használtuk és a jövőben sem használjuk fel:

- antiproliferatív hatás vizsgálata *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazinok jelenlétében vastagbél adenokarcinóma sejteken;
- *N*-hidroxi-alkil-2-aminofenotiazinok és doxorubicin kölcsönhatásának vizsgálata vastagbél adenokarcinóma sejteken.

Szeged, 2015. július 24.

.....

Dr. Spengler Gabriella

SZTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet