

Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerhatástan, biofarmácia, klinikai gyógyszerészet program

Programvezető: Dr. Zupkó István Ph.D

Kaohsiung Medical University

Graduate Institute of Natural Products

Témavezetők:

Kanizsainé Dr. Minorics Renáta Ph.D.

Prof. Chin-Chung Wu

Dr. Zupkó István Ph.D.

Dr. Bózsity Noémi

**D-GYŰRŰBEN MÓDOSÍTOTT ŐSZTROGÉN ANALÓGOK
ANTIPROLIFERATÍV ÉS ANTIMETASZTATIKUS HATÁSA
CERVIKÁLIS EREDETŰ DAGANATOS SEJTVONALAKON**

PhD tézis összefoglaló

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Dr. Gáspár Róbert Ph.D.

Tagok: Dr. Földesi Imre Ph.D., Dr. Puskás László D.Sc.

Bíráló Bizottság:

Elnök: Dr. Fülöp Ferenc D.Sc.

Opponensek: Dr. Halmos Gábor Ph.D., Dr. Spengler Gabriella Ph.D.

Tagok: Dr. Baczkó István Ph.D., Dr. Hunyadi Attila Ph.D.

Szeged

2017

1 BEVEZÉS

Napjainkban a kardiovaszkuláris kórképek után a daganatos megbetegedések jelentik a második leggyakoribb halálokot világszerte. Epidemiológiai vizsgálatok bizonyították, hogy világszerte több mint 600 millió ember átesett a humán papillomavírus (HPV) infekción, és az összes daganatos betegségek mintegy 5 %-a kapcsolatba hozható a HPV fertőzéssel. Kimutatták, hogy HPV fertőzés áll fenn közel az összes cervikális eredetű daganat háttérében, az anális és vaginális eredetű tumorok nagy részében és egyre nagyobb számban a szájüregi- és garat daganatok esetében is. A vírus mintegy 18 variánsának bizonyították karcinogén hatását, amelyből a HPV 18-as és 16-os altípust az összes cervikális eredetű daganat mintegy 70%-ában azonosították. A védőoltás felfedezésével ugyan csökkent a megbetegedések száma, azonban a fejlődő országokban a védőoltás még nem áll kellő mennyiségben rendelkezésre, valamint a fejlett területeken is ugyanúgy veszélyeztettek a koruk vagy meggyőződésük miatt nem immunizált nők. A statisztikai adatok szerint ezek a speciális daganatok korai diagnózist követően mielőbbi és igen agresszív kezelésre szorulnak, ezért fontos új, nagyhatékonyságú, kedvezőbb mellékhatás profilú daganatellenes szerek fejlesztése.

A karcinogenezis egy komplex folyamat, amely magába foglalja a sejt növekedésében, differenciálódásában és viselkedésében bekövetkező különböző változásokat, amelyek az adott sejtek génexpressziójának dinamikus változásával magyarázhatóak. Általánosságban az onkovírusok nem kötelezően okoznak rákos elváltozásokat, de nagy valószínűséggel elősegítik a daganatok kifejlődését, jellemzően krónikus fertőzést követően és sokszor csak évekkel a primer fertőzés után. A vírusok okozta onkogenezis egy többlépcsős folyamat, amely során a vírus felborítja a fertőzött sejt homeosztázisát és olyan sejten belüli változásokat hoz létre, amelyek kedveznek a malignus folyamatok kialakulásának. Több ilyen általános mechanizmust is ismerünk, mint a „molekuláris-mimikri” („signaling mimicry”, mely során olyan vírus kódolta fehérjék termelődnek, amelyek megváltoztatják a gazdasejtek jelátviteli mechanizmusait), a DNS károsodásra adott válasz megváltozása (így instabillá válik a gazdasejt genetikai állománya és lehetővé válik a vírusreplikáció), valamint a krónikus gyulladáshoz vezető válasz kialakulása. Eddig több mint 150 HPV genotípust azonosítottak, melyek közül a magas rizikójú HPV altípusok egy kis csoport, amelynek képviselői képesek integrálódni a gazdasejtekbe és potens onkoproteineket termelni, ezáltal szoros kapcsolatba hozhatók a nyálkahártya és epitel eredetű daganatokkal.

Régóta ismert, hogy az endogén 17β -ösztadiol endokrin funkciói mellett a daganatos sejtek proliferációját is fokozza, azonban újabb eredmények szerint bizonyos származékok kifejezett sejtosztódást-gátló hatással rendelkeznek. Az első ilyen vegyület az endogén 2-metoxiösztadiol (2ME) volt, amely nem rendelkezik kifejezett ösztrogén aktivitással, azonban antiproliferatív, proapoptotikus, migrációt és angiogenezist gátló hatását bizonyították. Ma már számos ösztrogén vegyület daganatellenes hatását leírták, közöttük több D-gyűrűben módosított származékot is. A gyűrű módosításával (bővítésével, felnyitásával) daganatellenes hatású ösztrogénekhez juthatunk, amelyekről bebizonyosodott, hogy a gyűrűrendszer szerkezetváltoztatásával hormonhatásukat is elvesztették. Számos triazol-gyűrűt tartalmazó nem szteroid vegyület antiproliferatív és proapoptotikus hatását bizonyították, így a triazol gyűrű famakofornak tekinthető újabb daganatellenes szerek tervezésekor, ezáltal ezen csoport beépítése a szteroid szerkezetbe várható hatásnövekedést eredményezhet, ezt néhány D-szekooxim triazol származéknál már bizonyították. Így ezek a szerkezeti változtatások (gyűrűmódosítás és triazol beépítése) hormonhatás nélküli, potenciálisan daganatellenes hatással rendelkező új vegyületekhez és ösztrogén vázas csoportokhoz vezethetnek.

2 CÉLOK

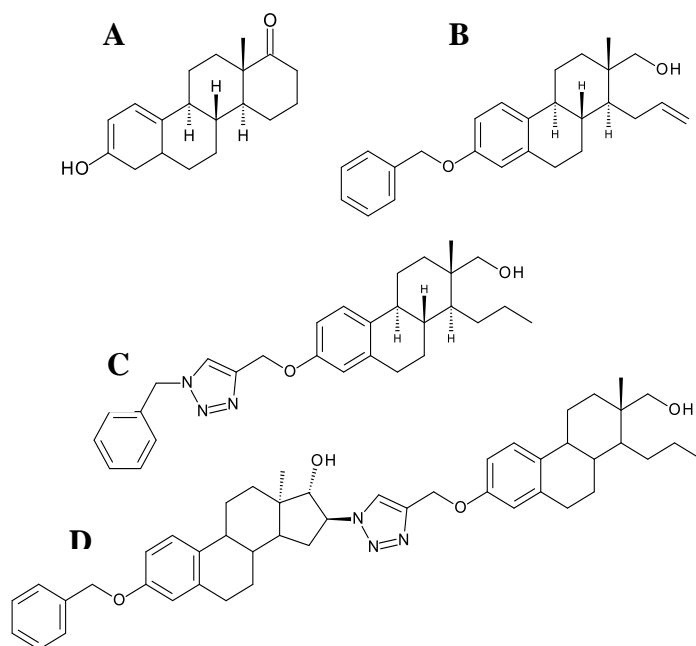
Az értekezés célja újonnan szintetizált D-gyűrűben módosított (D-homo- és D-szeko-) ösztrogén származékok daganatellenes hatásának jellemzése a következő megfontolások alapján:

- Az újonnan előállított ösztrogén vegyületek antiproliferatív szűrése humán, reprodukív rendszeri daganatos sejtvonalakon, *in vitro*. A leghatékonyabb vegyületek tumorszelektivitásának vizsgálata intakt sejtvonalakon.
- A vegyületek szerkezetbeli eltéréseit figyelembe véve hatékonyságuk összehasonlítása különböző patológiai háttérű cervikális daganatos sejtvonalakon.
- A leghatékonyabb származékok proapoptotikus hatásának vizsgálata, fluoreszcens kettős festés, áramlási citometria és kaspáz-3 enzim aktivitás meghatározásának segítségével.
- A kezelés hatására a sejtciklusban bekövetkező változások meghatározása áramlási citometria, molekuláris biológiai módszerek (polimeráz láncreakció-PCR, Western blot) és tubulin polimerizációs vizsgálat segítségével.
- A vegyületek daganatos sejtekre kifejtett migrációt és inváziót befolyásoló hatásának meghatározása.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Vegyületek

A D-gyűrűben módosított ösztrogén analógokat (D-homo és D-szekoszteroidok), triazollal szubsztituált valamint ezek dimer származékait a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Karán, a Szerves Kémiai Tanszéken szintetizálták. A négy, legpotensebb vegyület szerkezeti képlete látható az 1. Ábrán.



1. Ábra A farmakológiai vizsgálatokra kiválasztott vegyületek képletei: A: D-homoösztron (D-HE) B: D-szekoösztron, D-SE C: D-szekoösztron-triazol, D-SET D: D-szekoösztron és 13-epiösztron kapcsolt dimer, DIM

3.2 Sejtvonalak és sejtenyésztés

Az antiproliferatív szűrést humán, adherens nőgyógyászati tumoros sejtvonalakon végeztük (emlő: MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-361 és T47D, endometrium-: Ishikawa, petefészek-: A2780, bőr-: A431, valamint három különböző HPV státuszú méhnyak daganatos sejtvonal: HPV 18+ adenokarcinóma (HeLa), HPV 16+ laphám karcinóma (SiHa) és HPV – epitel eredetű karcinóma (C-33 A)). A sejtek 10% főtális borjúsérummal, 1-1% nem esszenciális aminosavval és antibiotikum-antimikotikummal kiegészített minimális esszenciális médiumban (EMEM) tenyésztettük, szöveti körülményeket biztosító 37 °C-os, 5 % CO₂-t biztosító inkubátorban.

3.3 Antiproliferatív MTT-teszt

A vegyületek sejtosztódást gátló hatását standard MTT festési eljárással határoztunk meg. A sejteket 96 lyukú mikrotiter lemezre telepítettük, majd másnap kezeltük, szűrés alkalmával a vegyületek 10-30 μM -os oldatával, a koncentráció-hatás görbékhez pedig koncentrációsort alkalmazva 0,1-30,0 μM intervallumban. 72 órás inkubációt követően MTT oldatot vittünk fel majd 4 óra után a kivált formazán kristályokat dimetil-szulfoxidban oldottuk és 545 nm-en mértük az abszorbanciát, ELISA olvasóval.

3.4 Hoechst 33258 – propídiium-jodid (HOPI) kettős festés

HeLa, C-33 A és SiHa sejteket telepítettünk 96-os mikrotiter lemezekre, másnap kezeltük a tesztanyagok megfelelő oldatával. 24 óra inkubáció után Hoechst 33258 (HO) és propídiium-jodid (PI) festéket adtunk a sejtekhez, majd 1 óra után a sejteket Nikon ECLIPSE TS100 fluorescens mikroszkóp alatt vizsgáltuk, a megfelelő szűrők segítségével. Ez a módszer lehetővé teszi, a korai és késői (másodlagos nekrosis) apoptotikus sejtek elkülönítését a sejtmag morfológiája és a membrán integritása alapján. Ehhez minden esetben két fénykép készült ugyanarról a látótérről, a különböző szűrők segítségével.

3.5 Áramlási citometriás sejtciklus analízis

A sejtek DNS tartalmának meghatározására áramlási citometriás mérést végeztünk. HeLa, C-33 A és SiHa sejteket telepítettünk 6 lyukú lemezekre, majd a kezelést követő 24 és 48 óra után a sejteket összegyűjtöttük, etanolban fixáltuk és propídiium-jodiddal festettük. A DNS állományt Partec CyFlow készülék segítségével vizsgáltuk, mintánként 20 000 beütést rögzítettünk és meghatároztuk a sejtciklus különböző fázisaiban (szubG1, G1, S és G2/M) lévő sejtek százalékos arányát ModFit LT 3.3.11 szoftver segítségével.

3.6 Kaszpáz-3 enzim aktivitásának meghatározása

A kaszpázok az apoptotikus folyamatok legfontosabb enzimeik. A vegyületek kaszpáz-3 aktivitást befolyásoló hatásának vizsgálatához 10^7 -en sejtet telepítettünk sejtenyészítő flaskába, majd a kezelést követő 24 és 48 órás inkubáció után a sejteket sejtszámra normalizált lizispuffer mennyiséggel lizáltuk. Ezt követően a kezelt és a kezeletlen kontroll lizátumok egyenlő részleteihez *p*-nitroanilinnel konjugált kaszpáz-3 szubsztrátot adtunk. Egy éjszakán át tartó inkubáció után mértük a *p*-nitroanilin abszorbanciáját 405 nm-en.

3.7 G2 és M fázisok elválasztása specifikus áramlási citometriás módszerrel

A G2 és az M fázisban lévő sejtek megkülönböztetésére specifikus, immunhisztokémiai módszerrel kiegészített áramlási citometriás vizsgálatot végeztünk. A H3 hiszton fehérje Ser10-es oldalláncának foszforilációja a G2-M fázisátmenet során történik meg, így ennek mérésével információt kaphatunk az M fázisban lévő sejtek arányáról. HeLa sejteket telepítettünk 6 lyukú lemezekre, majd 48 óra után kezeltük a tesztanyagokkal. 24 órás inkubáció után a sejteket a kereskedelmi forgalomban kapható FlowCellecTM G2/M analízishez alkalmazható sejtciklus kit segítségével előkészítettük és Partec CyFlow áramlási citometriás készülékkel vizsgáltuk. Mintánként 20 000 beütést rögzítettünk és az eredményeket Flowing Software segítségével értékeltük.

3.8 Reverz transzkriptáz (RT) PCR vizsgálatok

A G2/M fázisment a ciklin-dependens kinázok (CDK) és a ciklin fehérjék szigorú szabályozása alatt áll. RT-PCR-al vizsgáltuk a tesztvegyületek hatását ezen szabályozó faktorok mRNS expressziójára, HeLa sejteken. 48 órás inkubációt követően total RNS-t izoláltunk a sejtekből, amelyből reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-t készítettünk. A cDNS-t felhasználva PCR technikát alkalmaztunk CDK1, ciklin B1, ciklin B2, Cdc25B, Cdc 25C primerek felhasználásával. Belső kontrollként minden minta esetében gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (hGAPDH) alkalmaztunk.

3.9 Western blot vizsgálatok

A CDK1-ciklin B complex funkciójának ellenőrzéséhez megvizsgáltuk a foszforilált és az össz stathmin fehérjék expresszióját Western blot technikával. HeLa sejteket kezeltünk a tesztanyagokkal 48 órán keresztül, majd lizáltuk a sejteket. A mintákból 10 µg fehérjemennyiségnek megfelelő részleteket vizsgáltunk: gélelektroforézist követően nitrocellulóz membránra blottoltuk, majd blokkolást követően stathmin, foszforilált stathmin és β-aktin elsődleges poliklonáris nyúl antitestekkel inkubáltuk. Az antitest kötődést WesternBreeze kemilumineszcens immundetekciós kittel tettük láthatóvá.

3.10 Tubulin polimerizációs teszt

A vegyületek tubulin polimerizációra kifejtett hatását direkt, a sejtműködéstől független módszerrel vizsgáltuk, a kereskedelmi forgalomban kapható kit segítségével. 10 µl tesztanyag, pozitív és negatív kontroll alkalmazásával a tubulinoldatok abszorbanciáját mérve, 340 nm-en 50 perces kinetikai görbéket vettünk fel, percenkénti

mérésekkel. A statisztikai elemzéshez a görbék segítségével maximális sebességértékeket számítottunk (V_{\max} , Δ abszorbanca/perc).

3.11 A sejtek migrációjának vizsgálata sebgyógyulási teszttel

A sejtek migrációs kapacitását sebgyógyulási (wound healing) teszttel vizsgáltuk. HeLa sejteket telepítettünk a speciális inszert mindkét üregébe, majd egy éjszaka inkubációt követően az inszerteket eltávolítottuk és a sejteket kezeltük a vegyületek megfelelő koncentrációjú 1 % FBS-t tartalmazó médiumban elkészített oldataival. Azonnal a kezelést követően, valamint 24 órás inkubációs idő után mikroszkóp segítségével fényképeket készítettünk, ezeket összehasonlítva információt kapunk a sejtek migrációs képességéről.

3.12 A sejtek inváziójának vizsgálata Boyden kamra alkalmazásával

A HeLa sejtek inváziós képességét BD BioCoat Matrigel inváziós kamrák segítségével vizsgáltuk. HeLa sejteket telepítettünk a kamrák felső üregeibe, tesztanyagot tartalmazó és tesztanyag nélküli szérumentes médiumban, majd kemoattraktánsként az alsó üregekbe 10 % FBS-t tartalmazó médiumot helyeztünk. 24 órás inkubációt követően a kamrát eltávolítottuk és az invazív sejteket fixáltuk, festettük és mikroszkóp segítségével fényképeket készítettünk.

4 EREDMÉNYEK

4.1 Antiproliferatív MTT teszt

A munka első fázisában 46 újonnan szintetizált ösztrogén származék antiproliferatív szűrése történt meg, melynek eredményeként kiderült, hogy a négy legpotensebb vegyület a D-homoösztroon (D-HE), D-szekoösztroon (D-SE), D-szekoösztroon-triazol (D-SET), és a D-szekoösztroon és 13-epiösztroon kapcsolásával kapott dimer (DIM), ezért ezeket a vegyületeket választottuk a további, hatásmechanizmus meghatározását célzó vizsgálatokhoz.

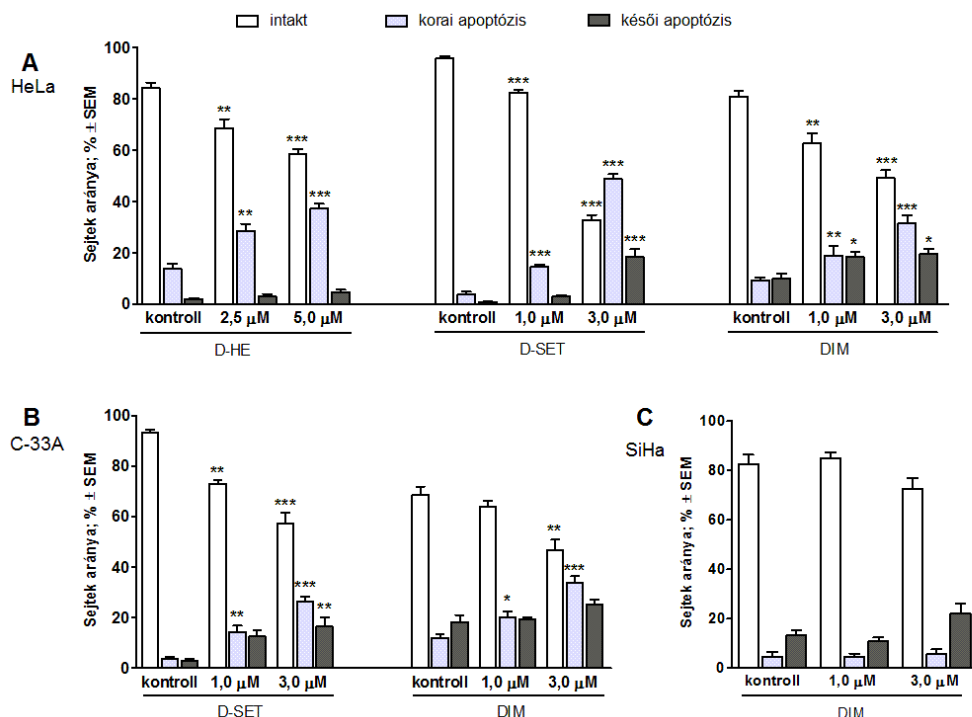
Az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált négy ösztrogén származéknak jelentősen különbözik az antiproliferatív spektruma a három különböző patológiai hátterű cervikális daganatos sejtvonalakon. A vegyületek tumorszelektivitása D-HE, D-SE, D-SET esetében jobbnak míg DIM esetében összevethetőnek bizonyult a széleskörűen alkalmazott ciszplatinhoz viszonyítva. (1. táblázat)

Sejttípus	HPV státusz	IC ₅₀ (µM)				
		D-HE	D-SE	D-SET	DIM	ciszpaltin
HeLa	18+	5.5	13.2	1.1	1.7	6.5
SiHa	16+	>30	13.6	>30	0.96	12.9
C33-A	–	>30	10.8	1.7	2.9	3.2
MRC-5		>30	n.t.	>30	1.2	3.7
bőr fibroblast		n.t.	>30	n.t.	3.0	21.6

1. Táblázat A tesztanyagok és a ciszpaltin számított IC₅₀ értékei a különböző cervikális daganatos sejtvonalakon és intakt human fibroblaszton, MTT teszttel vizsgálva, 72 óra inkubációs időt követően. n.t.: nem tesztelt

4.2 HOPI kettős festés

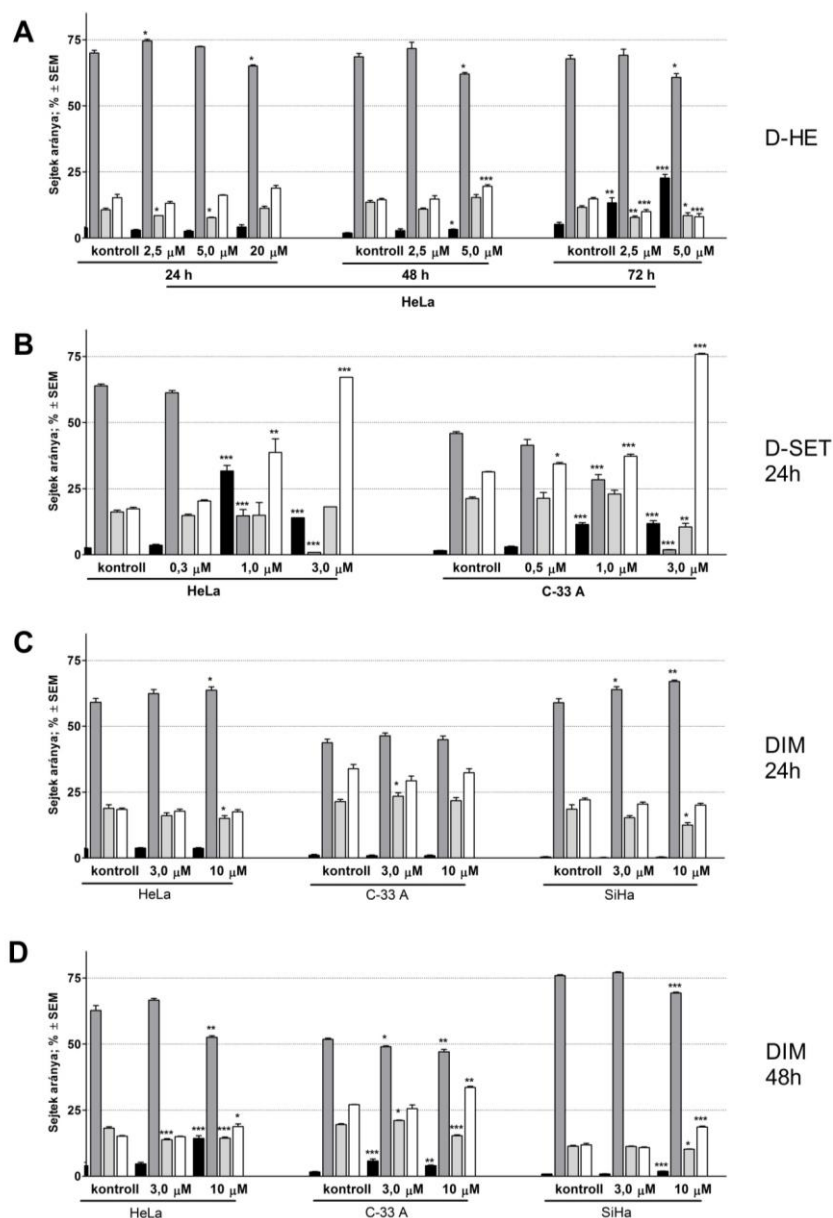
HeLa sejtek esetében 24 óra után mindhárom tesztanyag erős kromatin kondenzációt idézett elő, ami a korai apoptózis jele, és egyedül a magas koncentrációban alkalmazott D-SET kezelés következtében figyeltük meg a membrán integritásának csökkenését. A C-33 A sejtek esetében a magas fokú kromatin kondenzáció mellett a késői apoptotikus (másodlagos nekrotikus) sejtek jelenlétét is kimutattuk D-SET és DIM kezelést követően. A HPV 16 + SiHa sejteken egyedül a DIM vegyület mutatott jelentős antiproliferatív hatást a korábbi vizsgálatokban, azonban ez nem volt detektálható a 24 órás HOPI festés során. (2. Ábra).



2. Ábra. A tesztanyagok által előidézett apoptotikus és nekrotikus sejtek százalékos aránya, 24 órás inkubáció után, **A:** D-HE, D-SET és DIM kezelés után, HeLa, **B:** D-SET és DIM kezelés után C-33 A és **C:** DIM kezelés után SiHa sejteken. Az eredmények a sejtek százalékos arányának átlaga ± SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

4.3 Áramlási citometriás sejtciklus analízis

A D-HE kezelés 24 órás inkubációt követően nem mutatott jelentős változást a sejtciklusban, azonban 48 óra után a szubG1 és a G2/M fázisok szignifikáns emelkedését tapasztaltuk a G1 populáció kárára. 72 óra után a szubG1 fázis koncentrációfüggő emelkedését figyeltük meg, a G1 és G2/M fázisok egyidejű csökkenésével (3/A ábra). ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a D-HE képes a G2/M fázisban megállítani a sejtciklust.



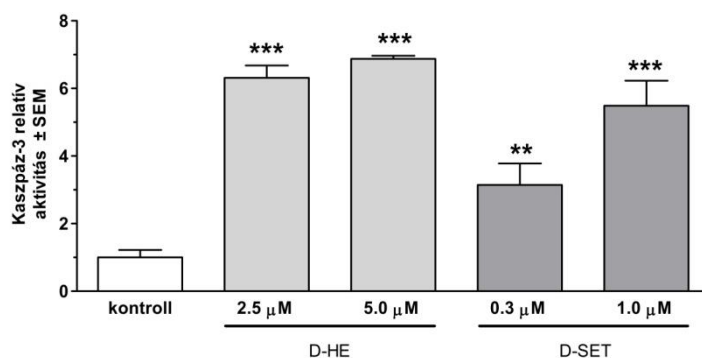
3. Ábra A tesztvegyületek hatására bekövetkező változások a sejtciklus egyes fázisainak arányára **A:** D-HE kezelés után, 24, 48 és 72 órás inkubációt követően, HeLa, **B:** D-SET kezelés után, 24 órás inkubációt követően, HeLa és C-33 A, **C:** DIM kezelés után, 24 órás inkubációt követően, HeLa, C-33 A és SiHa, valamint **D:** DIM kezelés után, 48 órás inkubációt követően, HeLa, C-33 A és SiHa sejtek esetében. Az eredmények a sejtek százalékos arányának átlaga \pm SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

A D-SET kezelés után sokkal markánsabb hatás volt kimutatható már 24 óra után is. A szubG1 fázis jelentős emelkedése mellett a G2/M fázis szignifikáns és koncentrációfüggő emelkedését tapasztaltuk, a G1 fázis csökkenése mellett, mindkét vizsgált sejtvonalon (3/B Ábra), ami szintén a G2/M fázisban bekövetkező blokádra utal.

24 órás inkubációt követően a DIM vegyülettel kezelt sejtek nem mutattak szignifikáns változást a sejtciklusban, HeLa és C-33 A sejtek esetében, míg SiHa sejteknél enyhe G1 fázis növekedés és S fázis csökkenés volt megfigyelhető (3/C Ábra). 48 óra után azonban már függetlenül a HPV státusztól az apoptotikus szubG1 valamint a G2/M fázisok emelkedését és párhuzamosan a G1 fázis csökkenését tapasztaltuk (3/D Ábra). Az előző két vegyülethez hasonlóan a DIM szintén a sejtciklus G2/M fázisában képes beavatkozni a sejtciklus folyamatába.

4.4 Kaszpáz-3 enzim aktivitásának meghatározása

A tesztanyagok proapoptotikus hatásának igazolására meghatároztuk a kaszpáz-3 enzim aktivitát, HeLa sejtekben. Az inkubációs időket a szubG1 fázisok emelkedése alapján határoztuk meg, így D-HE esetében 48, D-SET esetében 24 óra után végeztük el a mérést. Az eredmények azt mutatják, hogy az kaszpáz enzim aktivitása szignifikánsan és koncentrációfüggően nőtt mindkét vizsgált tesztanyag esetében (4. Ábra).

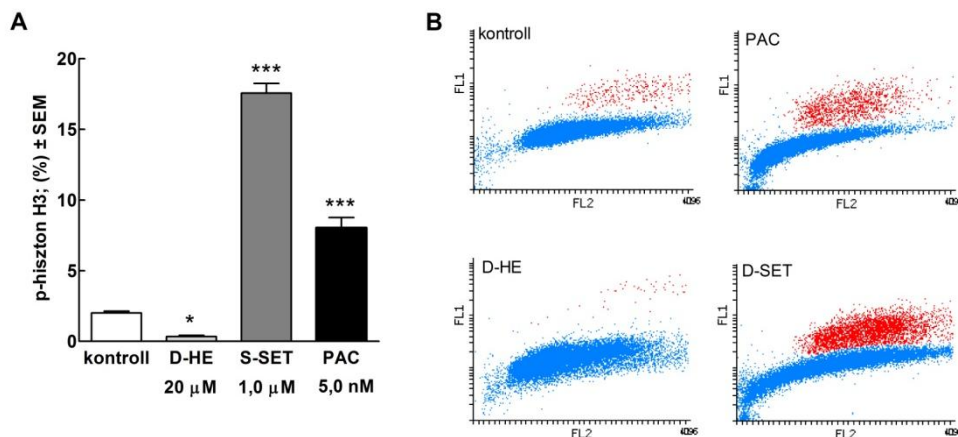


4. Ábra Az *in situ* kaszpáz-3 enzim aktivitásának relatív változása D-HE és D-SET kezelést követően, 48 és 24 órás inkubáció után, HeLa sejteken. Az eredmények a kaszpáz enzim aktivitásának növekedését mutatják a kezeletlen kontroll mintához viszonyítva. Az eredmények átlagértékek \pm SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

4.5 G2 és M fázisok elválasztása specifikus áramlási citometriás módszerrel

Egy specifikus antitestkötődésen alapuló áramlási citometriás módszerrel végeztük a G2/M fázisban lévő sejtek elválasztását, a korábbi vizsgálatokban legérzékenyebbnek bizonyult HeLa sejteken. 24 óra inkubáció után D-HE kezelés szignifikánsan csökkentette, míg a D-SET kezelés emelte a foszforilált hiszton H3-at

tartalmazó sejtek arányát, hasonlóan mint a pozitív kontrollként alkalmazott paklitaxel (PAC) (5. Ábra). Az eredmények alapján a D-HE G2, míg a D-SET az M fázisban fejt ki hatását a sejtciklus során.

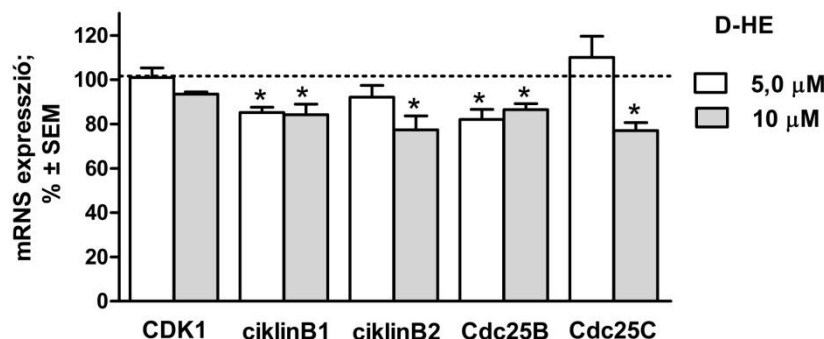


5. Ábra Az M fázisban lévő sejtek elkülönítése a foszforilált hiszton H3 (Ser10) fehérje jelölésével, 24 órás inkubációs időt követően, 20 μM D-HE, 1,0 μM D-SET és 5,0 nM PAC kezelés után, HeLa sejteken. **A:** az eredmények statisztikai értékelése **B:** Reprezentatív régió analízis a kapott felhő diagramon (az M fázisban lévő sejtek pirosan jelöltek). Az eredmények átlagos sejtszám adatok ± SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.6 A G2/M átmenet vizsgálata

4.6.1 Reverz transzkriptáz (RT) PCR vizsgálatok

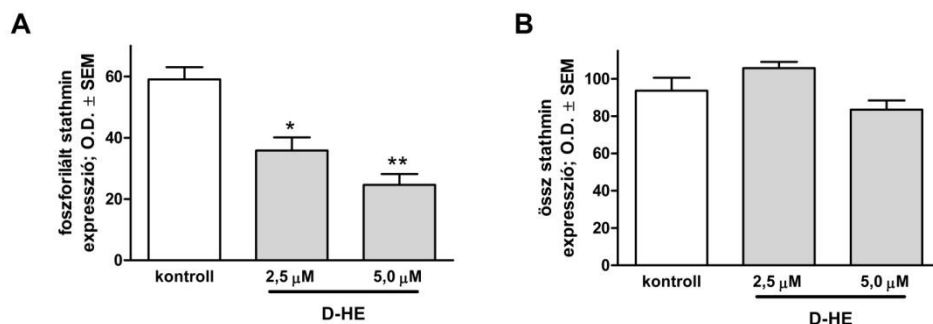
A CDK1 fehérje egy fontos végrehajtó enzim a G2/M fázisátmenet folyamatában, melynek aktiválásáért a ciklin B fehérje a felelős. Habár vizsgálataink során 48 órás D-HE kezelést követően a CDK1 mRNS expressziója nem mutatott szignifikáns változást, a ciklin B mindkét izoformájának (B1 és B2) mRNS expressziója szignifikánsan csökkent, csakúgy, mint a CDK1-ciklin B komplex szabályozásában részt vevő Cdc25B és Cdc25C fehérjéké is, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (6. Ábra).



6. Ábra A G2/M ellenőrzőpontot szabályozó legfontosabb faktorok mRNS expressziója 5,0 és 10 μM D-HE kezelést követően, 48 órás inkubáció után, HeLa sejteken, RT-PCR-al vizsgálva. Az eredmények átlagértékek ± SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: * $p < 0,05$, a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

4.6.2 Western blot vizsgálatok

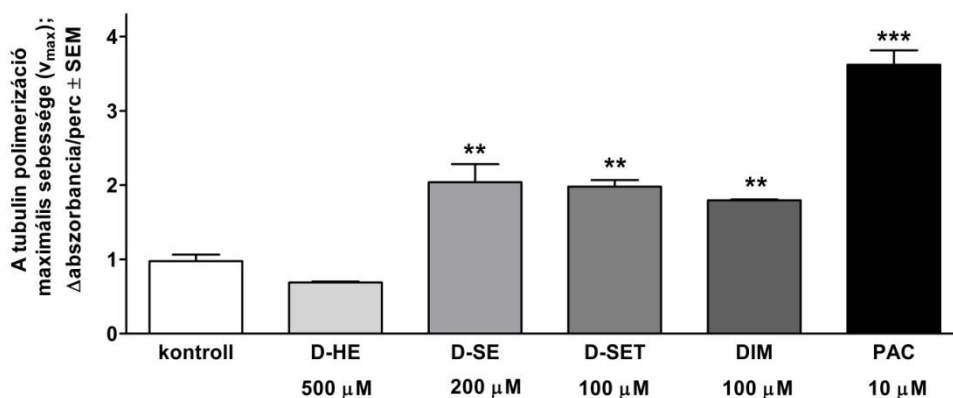
A CDK1-ciklin B komplex funkciójának ellenőrzésére megvizsgáltuk a komplex által szabályozott egyik fontos fehérje a stathmin expresszióját, 48 órás D-HE kezelést követően, Western blot technikával. Habár az össz stathmin fehérje kifejeződése nem mutatott jelentős eltérést a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (7/A Ábra), az inaktív, foszforilált forma (ezt az inaktiválást végzi a CDK1-ciklin B komplex) expressziója szignifikánsan csökkent (7/B Ábra).



7. *Ábra* A foszforilált (A) és az össz (B) stathmin fehérje expressziója 2,5 és 5,0 μM D-HE kezelést követően, 48óra inkubáció után, HeLa sejtekben. Az eredmények átlagértékek ± SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

4.7 Tubulin polimerizációs teszt

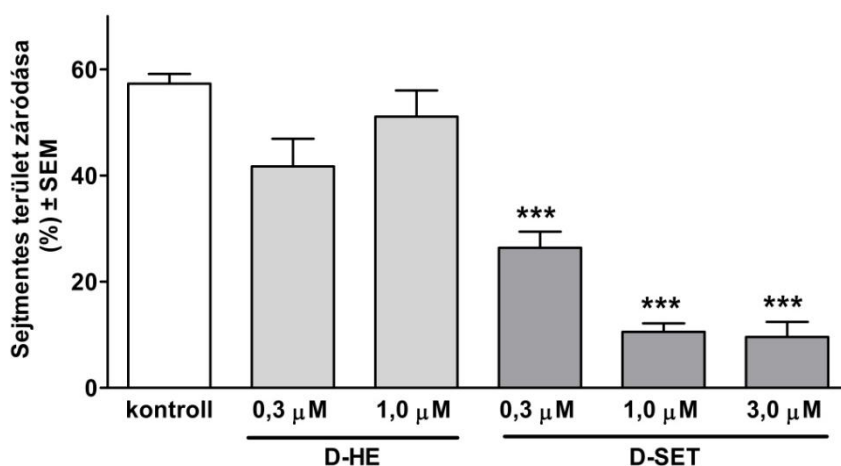
A tubulin fehérje egyike a legvalószínűbb támadáspontoknak az M fázis során, ezért meghatároztuk a tesztanyagok tubulin polimerizációra kifejtett direkt hatását, fotometriás kinetikai mérés során. Míg a D-HE nem mutatott kifejezett hatást a tubulin polimerizációra, addig a D-szekoösztrom származékok (D-SE, S-SET, DIM) szignifikánsan emelték a számított v_{max} értékeket, hasonlóan, mint a közismerten mikrotubulus stabilizáló paklitaxel (8. Ábra).



8. *Ábra* A tesztvegyületek tubulin polimerizációra kifejtett hatásának statisztikai értékelésére számított maximális sebességértékek, in vitro, sejtmentes környezetben vizsgálva. Az eredmények átlagértékek ± SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

4.8 A sejtek migrációjának vizsgálata sebgyógyulási teszttel

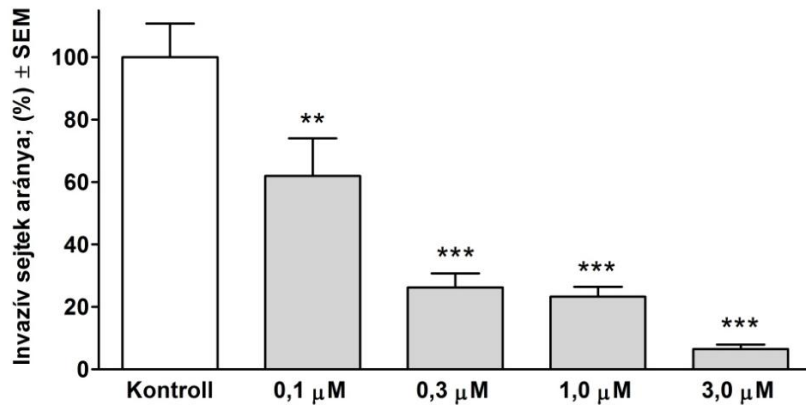
A sejtek migrációs képességének változását D-HE és D-SET kezelés hatására sebgyógyulási teszttel vizsgáltuk, HeLa sejteken. A D-HE-vel kezelt sejtek esetében nem volt megfigyelhető jelentős eltérés a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva, míg a D-SET-tel kezelt sejtek képtelenek voltak a rendelkezésükre álló terület elfoglalására, a D-SET tehát koncentráció-függően gátolta a vizsgált HeLa sejtek migrációját (9. Ábra).



9. Ábra HeLa sejtek migrációs képessége D-HE és D-SET kezelést követően, 24 óra inkubáció után, sebgyógyulási tesztek eredményeként. A migráció mértékét a 0. és a 24. óra utáni sejmentes területből számítottuk. Az eredmények átlagértékek ± SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: *** $p < 0,001$, a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

4.9 A sejtek inváziójának vizsgálata Boyden kamra alkalmazásával

Miután kísérleteinkben a D-SET szignifikánsan gátolta a daganatos sejtek migrációs képességét, a vegyület invázióra kifejtett hatását is megvizsgáltuk egy speciális Matrigél bevonatot tartalmazó Boyden kamra segítségével. Azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált D-SET szignifikánsan gátolta a HeLa sejtek invázióját a kezeletlen kontroll mintákhoz képest (10. Ábra). Ez a gátlás már antiproliferatív koncentrációnál jóval kisebb koncentráció-tartományban detektálható volt és a hatás koncentrációfüggően erősödött.



10. Ábra A Boyden kamrán keresztüli invázió mértéke D-SET kezelést követően, 24 óra inkubáció után, HeLa sejtekkel vizsgálva. Az eredmények átlagértékek \pm SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a nem szignifikáns értékek külön nem jelöltek.

5 DISZKUSSZIÓ

Szteroid szerkezetet tartalmazó vegyületek daganatellenes alkalmazása eleinte különböző gyógynövényeken keresztül történt. Később kiderült, hogy ezek a természetes növényi szteroidok mellett van néhány humán endogén szteroid metabolit is, mint például a 2-ME vagy a konjugált ösztrogén metabolitok, amelyek szintén jelentős daganatellenes hatással rendelkeznek. Ezek az aktív természetes vegyületek és metabolitok kiváló kiindulási anyagok a szintetikus kémia számára új, még hatékonyabb gyógyszerjelöltek tervezéséhez és fejlesztéséhez. Intézetünkben a D-gyűrűben módosított vegyületekkel foglalkozunk. A D-HE-ről bebizonyosodott, hogy nem rendelkezik ösztrogén aktivitással egy *in vivo* uterotroph vizsgálat során. Emellett *Jovanovic-Santa és munkatársai* bebizonyították, hogy a D-szekoösztroon származékok a D-gyűrű felnyitásának köszönhetően teljesen elvesztik ösztrogén aktivitásukat.

Antiproliferatív vizsgálataink során kiderült, hogy a 46 új ösztrogén analóg vegyület közül 3 D-homoösztrogén, 13 D-szekoösztrogén és 1 dimer vegyület képes hatékonyan gátolni a különböző nőgyógyászati daganatos sejtek osztódását *in vitro*. Ezekből további vizsgálatokra kiválasztottuk a 4 leghatékonyabb vegyületet, melyek között a legszembetűnőbb különbség az eltérő hatékonyság volt a különböző patológiai hététerű cervix sejteken. A D-HE szelektívnek bizonyult a HPV 18+ sejteken, a D-SET gátolta mind a HPV 18+, mind pedig a HPV– negatív sejteket, míg a D-SE és a DIM mutatta a legszélesebb hatásspektrumot, mindhárom vizsgált sejtvonalat hatékonyan gátolták (HPV 18+, HPV– negatív és HPV 16+). Ezekből arra következtethetünk, hogy a D-gyűrű felnyitása szélesebb antiproliferatív spektrumot eredményez. A vizsgált vegyületek

tumorselektivitása jobb volt, vagy megegyezett a cervikális daganatok terápiájában ma is rutinszerűen alkalmazott ciszplatin szelektivitásával.

Az antiproliferatív hatásmechanizmus vizsgálata során az apoptózist indukáló hatást három, egymástól független módszerrel bizonyítottuk. A kezelés hatására bekövetkező morfológiai változások alátámasztják a tesztvegyületek koncentráció-függő proapoptotikus hatását a vizsgált sejtvonalakon. A sejtciklus analízis során kiderült, hogy mindegyik tesztvegyületünk, az érintett sejtvonalakon képes megemelni a szubG1 populáció százalékos arányát, amely emelkedés a progresszív DNS károsodásra utal, ami az apoptózis egyik jele. Mindezek mellett a D-HE és a D-SET szignifikánsan emeli a kaszpáz-3, az apoptózis egyik fő végrehajtó enzimének aktivitását. ezek az adatok alapján elmondható, hogy a vizsgált vegyületek mindegyike jelentős proapoptotikus hatással rendelkezik, melynek eredményeként beindulnak az apoptotikus folyamatok, mint a különböző morfológiai változások, a DNS fragmentáció és a kaszpáz enzim aktiválódása.

Habár a hagyományos áramlási citometriás vizsgálatok során kiderült, hogy a széleskörűen vizsgált 2-ME-hez hasonlóan a D-HE, D-SET és a DIM is képes befolyásolni a normál sejtciklust, és G2/M fázis blokádot előidézni, a részletesebb vizsgálatok során kiderült, hogy ezt mégsem egyfőrmán érik el. A D-HE a G2 fázisban fejt ki a hatását a CDK1/ciklin B komplex funkciójának zavarát okozva a G2/M ellenőrzőpontban. Ezzel szemben a D-SET és DIM vegyületek az M fázisban idézik elő a sejtciklus megrekedését, a tubulin polimerizációra kifejtett hatásuk következtében. A nyitott gyűrűvel rendelkező szekoösztrogén származékok ugyanis eltolják a mikrotubulusok és a tubulin dimerek között fennálló dinamikus egyensúlyt a mikrotubulus képződés javára, amelynek következtében rendellenes orsóképződés és mitózis zajlik, melynek következtében a szekoösztrogénnel kezelt sejtek nem tudják folytatni az osztódást és felhalmozódnak az M-fázisban, amelynek hatására apoptotikus folyamatok indulnak be. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a D-gyűrű különböző változtatása eltérő hatással van a sejtciklus mechanizmusára.

Az antiproliferatív és proapoptotikus hatás mellett a metasztázisok kialakulásának gátlása egy újabb fontos részlete lehet egy-egy új daganatellenes hatóanyag hatásmechanizmusának. A metasztázis megjelenése szoros kapcsolatban van a rossz prognózissal, hiszen a rákos sejtek szóródása a primer tumorból a különböző szervekbe többszervi elégtelenséget okoz és az esetek döntő többségében ez vezet a páciens halálához.

Az endogén 17β -ösztradiolról jól ismert, hogy serkenti a sejtek inváziós képességét a különböző cervikális, endometriális és petefészek daganatos sejtvonalak esetében. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy számos daganatos sejtvonalon az A-gyűrűben módosított ösztrogének metasztázist gátló hatással rendelkeznek. Vizsgálataink során az antiproliferatív koncentráció alatti tartományban vizsgáltuk a vegyületek migrációra kifejtett képességét és azt tapasztaltuk, hogy a D-HE nem volt képes gátolni a sejtek migrációját, míg a D-SET, a széleskörűen vizsgált 2-ME-hez hasonlóan már szubantiproliferatív koncentrációban jelentősen gátolta a sejtek migrációját és invázióját. Ez a koncentrációtartomány a tumorspecificitásnak egy fontos eleme, hiszen ebben a tartományban a vegyületeknek még nincs semmiféle toxikus hatása az intakt sejtekre (amelyeknek nincs változás a motilitásában), ezáltal csökken a mellékhatások kialakulásának valószínűsége. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a D-gyűrű felnyitása olyan potens anti-metasztatikus vegyületekhez vezet, amelyek szignifikánsan gátolják a sejtek motilitását.

Összefoglalásképp tehát elmondható, hogy habár az utóbbi években jelentősen nőtt az érdeklődés az antiproliferatív ösztrogének iránt, a kutatásunkat megelőzően senki sem vizsgált D-gyűrűben módosított származékokat. Eredményeink szerint a D-homo- és D-szekoösztrogének különböző szelektivitással és hatásmechanizmussal rendelkeznek az egyes sejtvonalak tekintetében. A 6-tagúra bővített gyűrűszerkezettel rendelkező D-HE a CDK/cikin B komplex funkciójának zavarát okozza, amelynek következtében a sejt megreked a sejtciklus folyamatában és nem képes belépni a mitózisba, ami az apoptotikus folyamatok beindulását eredményezi. Ezzel szemben a D-gyűrű nyitása után kapott vegyületek a tubulin polimerek stabilizálásával okozzák a sejtek M fázisban bekövetkező akkumulációját, amely folyamat végül ugyancsak a programozott sejthalál aktiválódásához vezet. A D-SET ezen kívül migrációt és inváziót gátló hatásával jelentős antimetasztatikus tulajdonságokat mutat, amely képes kivédeni a daganatos sejtek testszerte történő szóródását.

Összevetve az eredményeket arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált D-gyűrűben módosított ösztrogén származékok ígéretes, új hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszerjelöltnek tekinthetők az antiproliferatív szteroid vegyületek között, valamint alkalmas alapvegyületek lehetnek, újabb, még hatékonyabb daganatellenes szteroidok tervezése során.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK:

1. Bózsity N, Minorics R, Szabó J, Mernyák E, Schneider G, Wölfling J, Wang HC, Wu CC, Ocsovszki I, Zupkó I. Mechanism of antiproliferative action of a new d-secoestrone-triazole derivative in cervical cancer cells and its effect on cancer cell motility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017; 165:247-257 (IF₂₀₁₆: 4.561)
2. Szabó J, Jerkovics N, Schneider G, Wölfling J, Bózsity N, Minorics R, Zupkó I, Mernyák E. Synthesis and *in vitro* antiproliferative evaluation of C-13 epimers of triazolyl-D-secoestrone alcohols: The first potent 13 α -D-secoestrone derivative. *Molecules*. 2016; 21:611 (IF₂₀₁₆: 2.861)
3. Minorics R, Bózsity N, Molnár J, Wölfling J, Mernyák E, Schneider G, Ocsovszki I, Zupkó I. A molecular understanding of D-homoestrone-induced G2/M cell cycle arrest in HeLa human cervical carcinoma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2015; 19:2365-2374 (IF₂₀₁₅: 4.938)
4. 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-secoestrones. *Steroids*. 2014; 87:128-136 (IF₂₀₁₄: 2,639)
5. Minorics R, Bózsity N, Wölfling J, Mernyák E, Schneider G, Márki Á, Falkay G, Ocsovszki I, Zupkó I. Antiproliferative effect of normal and 13-epi-D-homoestrone and their 3-methyl ethers on human reproductive cancer cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2012; 132:168-175 (IF₂₀₁₂: 3,984)

Egyéb közlemények

1. Szabó J, Pataki Z, Wölfling J, Schneider G, Bózsity N, Minorics R, Zupkó I, Mernyák E. Synthesis and biological evaluation of 13 α -estrone derivatives as potential antiproliferative agents. *Steroids*. 2016; 113:14-21 (IF₂₀₁₆: 2.282)
2. Schelz Z, Ocsovszki I, Bózsity N, Hohmann J, Zupkó I. Antiproliferative effects of various furanoacridones isolated from *Ruta graveolens* on human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*. 2016; 36:2751-2758 (IF₂₀₁₆: 1.937)
3. 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 (IF₂₀₁₆: 2.282)
4. Ványolós A, Kovács B, Bózsity N, Zupkó I, Hohmann J. Antiproliferative activity of some higher mushrooms from Hungary against human cancer cell lines. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2015; 17:1145-1149 (IF₂₀₁₅: 1.357)