

**Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

Gyógyszerhatástan, biofarmácia, klinikai gyógyszerészet **Ph.D program**

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

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

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

Dr. Kulmány Ágnes Erika

**Új androsztán származékok antiproliferatív és antimetasztatikus
tulajdonságainak vizsgálata**

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Dr. Soós Gyöngyvér Ph.D.

Tagok: Dr. Ducza Eszter Ph.D.

Dr. Puskás László Ph.D., D.Sc.

Bírálati bizottság:

Elnök: Dr. Szakonyi Zsolt Ph.D., D.Sc.

Opponensek: Dr. Halmos Gábor Ph.D.

Dr. Spengler Gabriella Ph.D.

Tagok: Dr. Szakonyi Gerda Ph.D.

Dr. Rédei Dóra Ph.D.

1. Bevezetés

A rákos megbetegedések világszerte a legjelentősebb egészségügyi problémák és a vezető halálokok közé tartoznak, milliók halálát okozva évente. A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC) által kiadott Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) sorozat legutóbbi felmérése 19,3 millióra becsülte az új esetek számát, a daganatos megbetegedésekhez kapcsolódó haláleseteket pedig 9,6 millióra 2020-ban. A nők körében a leggyakrabban diagnosztizált ráktípus a halálozási statisztikákat is vezető emlő daganat, amely 2,26 millió új megbetegedésért és 685 000 halálesetért volt felelős, míg a méhnyakrák mind incidencia, mind mortalitás szempontjából a negyedik helyen áll, megközelítőleg 604 000 új esettel és 342 000 halálesettel. Bár a daganatos esetek igen nagy hányada sikeresen kezelhető lenne korai diagnózis esetén és a páciensek túlélési esélyei is javulnának, a korai stádiumú megbetegedések enyhe vagy tünetmentes volta, valamint az erőforrások és megfelelő protokollok hiányában azonban számos országban gyakran csak előrehaladott stádiumban sikerül őket azonosítani. Ezen kívül a terápia sikerességét csökkentik a daganatellenes szerekkel szemben *de novo* kialakuló vagy már meglévő rezisztenciák is. A preventív, diagnosztikai és terápiás stratégiák gyors fejlődése mellett a korábban leírt tények fényében azonban továbbra is égető szükség van új terápiás lehetőségekre a mell- és méhnyakrák kezelésében.

A szteroid vázzal rendelkező biológiailag aktív molekulák a szerves vegyületek változatos és kiterjedt csoportját alkotják. Természetes származékok százai találhatóak gombákban valamint növényi- és állati szervezetekben, míg félszintetikus és szintetikus származékaik előállítását a gyógyszerészeti kutatások egyik kiemelkedő területe. Közülük a szexuálszteroidok (ösztrogének, gesztagének és androgének) az emberi hormonrendszer elengedhetetlen részét képezik. Ezen vegyületek, valamint félszintetikus és szintetikus származékaik közül számosat alkalmazunk terápiás céllal is, úgymint anabolikumok, hormonális fogamzásgátlók vagy mint a hormonpótló kezelés részei. Fiziológias hatásuk mellett azonban több hormonfüggő, prosztatata-, emlő- és endometrium rák, és hormonfüggetlen daganattípusok, mint a húgyhólyag-, tüdő-, kolorektális- és agyi tumorok kialakulásában is szerepük van. Újabb tanulmányok pedig megerősítették, hogy néhány természetes androsztán származék valamint A- vagy D-gyűrűn módosított származékaik képesek az emlő- és nőgyógyászati tumorsejtek osztódását gátolni, sejtciklus eltéréseket okozni és apoptózis-indukáló, migrációgátló és antimetasztatikus tulajdonságokkal rendelkeznek hormonális hatás nélkül. A szerkezet-hatás összefüggések átfogó áttekintése pedig bizonyította, hogy nagyobb

térkitöltésű, heterociklusos csoport beépítése a D-gyűrűre ígéretes, hormonhatástól mentes daganatellenes gyógyszerjelöltek eredményezhet.

2. Célkitűzések

Kísérleteink során négy új, heterociklusos, D-gyűrűn módosított androsztán származékot vizsgáltunk. A 3β -hidroxi-17-[1'-(4''-cianofenil)-4'-hidroximetil-1'H-pirazol-3'-il]androsta-5,16-dién, ahogy arról korábban beszámoltunk, kifejezett antiproliferatív tulajdonságokat mutatott emlőrákos sejtvonalakon. A jelen tanulmány célja ezen ígéretes vegyületek sejtosztódásgátló, antimetasztatikus hatásainak vizsgálata és hatásmechanizmusuk feltárása volt *in vitro* és *in vivo* kísérletekkel emlő- és nőgyógyászati daganatos sejtvonalakon.

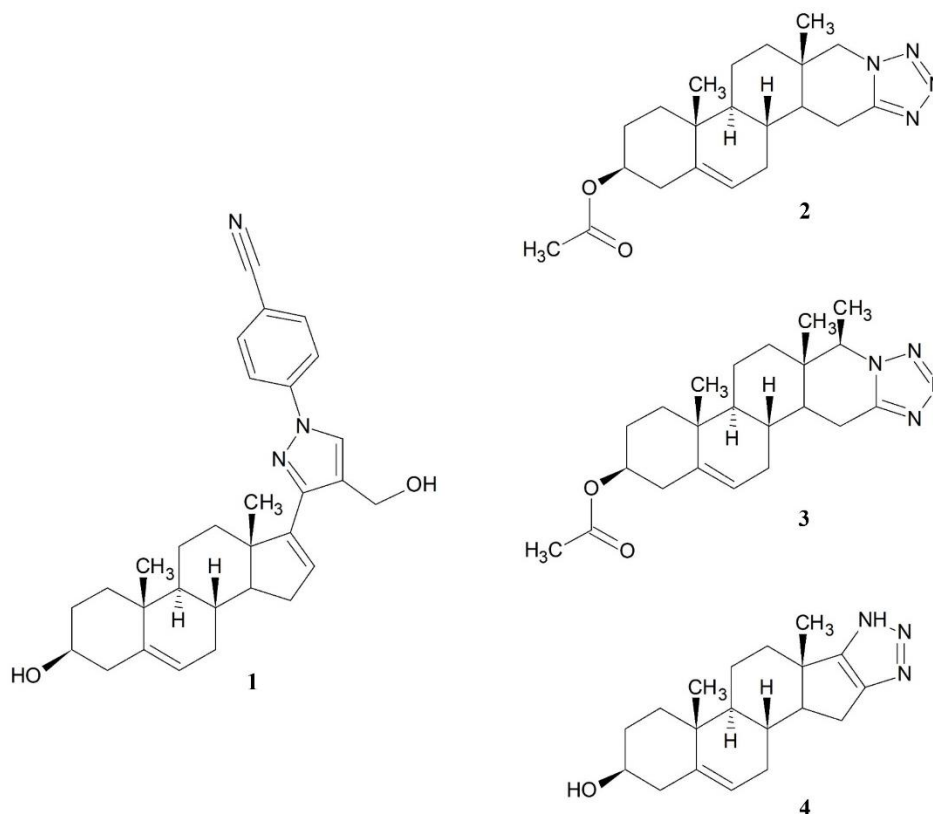
Az elvégzett kísérletek céljai a következők voltak:

- Az említett vegyületek sejtosztódásgátló tulajdonságainak jellemzése emlő- és nőgyógyászati tumoros sejtvonalakon, valamint az IC₅₀ értékeik meghatározása hagyományos MTT vizsgálattal.
- A tumorszelektivitási indexek becslése az összes vizsgált sejtvonalon egy nem tumoros sejtvonalhoz viszonyítva (NIH/3T3).
- Az apoptózis-indukáló hatásuk és annak eredetének felderítése Hoechst–propidium-jodid és Annexin V-propidium-jodid fluoreszcens kettősfestési eljárásokkal, sejtciklus analízissel, a kaszpáz-3 enzim aktivitásának kolorimetriás meghatározásával és mitokondriális membrán potenciál vizsgálatával (JC-1 módszer).
- Az androsztán váz miatt lehetséges androgén/antiandrogén aktivitások kimutatása élesztő-alapú androgén szűrővizsgálattal (YAS).
- A metasztázisok kialakulásának korai lépéseire, úgymint migráció, invázió és intravazáció, gyakorolt gátló hatások vizsgálata sebgyógyulási, Boyden kamrás és circular chemorepellent-induced defects (CCIDs) eljárásokkal.
- A tesztvegyületekkel történő kezelés hatására a tumor markerek expressziós szintjeiben bekövetkező változások elemzése.
- Az *in vivo* alkalmazás vizsgálata 4T1 ortotopikus egér emlőkarcinóma modellen.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Tesztvegyületek

A tesztvegyületek szintézise és kémiai jellemzése, ahogy arról korábban beszámoltunk Dr. Frank Éva és munkatársai, illetve az Újvidéki Egyetem Kémiai, Biokémiai és Környezetvédelmi Tanszékének munkatársai által történt.



1. ábra: A tesztvegyületek kémiai szerkezete (1-4).

3.2 Sejtvonalak

A HeLa, SiHa, C33A, A2780, MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 és NIH/3T3 sejtvonalakat 10% főtális borjúsérummal (FBS), 1% nem esszenciális aminosav (NEAA) keverékkel és 1% penicillin, sztreptomycin és amfotericin B keverékkel kiegészített Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) médiumban tartottuk fent 37°C-on párásított szén-dioxid (CO₂) atmoszférában. Az iLEC sejteket EGM-2MV médiumban növesztettük azonos körülmények között. Az MDA-MB-361 sejtvonalat 20% FBS-sel, 1% NEAA keverékkel és 1% antibiotikum/antimikotikum keverékkel komplettált L-15 médiumban tenyésztettük 37°C-on, párásított, szén-dioxid-mentes körülmények között. A 4T1 egér emlő daganatsejteket 10%

FBS-t és 1-1% NEAA keveréket és antibiotikum oldatot tartalmazó RPMI médiumban tenyésztettük CO₂ inkubátorban 37°C-on.

3.3 MTT vizsgálat (antiproliferatív vizsgálat)

A tesztvegyületek sejtek osztódására és életképességére gyakorolt hatását hagyományos MTT módszerrel vizsgáltuk. Az összes sejtípust a korábban leírt körülmények között tartottuk fent és 96-üregű mikrotiterlemezekre való telepítés után a vegyületek növekvő koncentrációival kezeltük őket (0.1-30 µM). 72 órás inkubációt követően MTT oldatot adtunk az üregekhez 4 órára, majd a kicsapódott formazán kristályokat DMSO-ban oldottuk. Végül az abszorbancia értékeket 545 nm-en egy mikroplate-olvasóval rögzítettük és a normalizált, hatpontos koncentráció-hatás görbét GraphPad Prism 5.01 szoftver segítségével illesztettük.

3.4 Hoechst – propidium-jodid fluoreszcens kettősfestés

A sejtek morfológiájában és membránjaik integritásában az apoptózishoz vagy nekrozishoz köthető változásokat Hoechst 33258 és propidium-jodid (PI) fluoreszcens festéssel vizsgáltuk. Az MCF-7 és SiHa sejtek szuszpenzióit 96-üregű lemezekre telepítettük és az 1 vegyület növekvő koncentrációival kezeltük 24 órán át. Ezután a sejteket 1 óráig sötétben, sejtenyészési körülmények között festettük és fényképeket készítettünk a mintákról QCapture Pro szoftver és Nikon Eclipse TS100 mikroszkóp segítségével. A fluoreszcenciát mutató sejtmagokat megszámloltuk és az intakt, apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát százalékban fejeztük ki.

3.5 Apoptózis vizsgálat

MCF-7, MDA-MB-231, C33A és SiHa sejteket 24-üregű lemezekre telepítettük és az 1 vegyület különböző koncentrációjú oldataival kezeltük őket 24 óráig. Ezután a sejteket foszfát puffer oldattal (PBS) mostuk, tripszin segítségével összegyűjtöttük és a felülúszókkal egyesítettük. A mintákat centrifugáltuk, majd a pelleteket Annexin V-kötő pufferben szuszpendáltuk és Annexin V-Alexa488 valamint PI oldattal 15 percig sötétben, szobahőmérsékleten festettük. Mintánként 10 000 eseményt rögzítettünk FACSCalibur citofluoriméterrel és az adatokat QuestTM szoftverrel elemeztük.

3.6 Sejtciklus analízis

Az MCF-7, MDA-MB-231, SiHa és C33A sejteket 24-üregű lemezekre oltottuk és a hatóanyagjelölt (1) hatásának tettük ki őket 48 vagy 72 órán át. A mintákat PBS-sel mostuk, a sejteket összegyűjtöttük, egyesítettük a hozzá tartozó felülúszókkal és centrifugáltuk. A festékoldatban szuszpendált sejtek DNS-tartalmát propídiium-jodiddal jelöltük 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten. Mintánként legalább 20 000 eseményt elemeztünk FACSCalibur áramlási citométerrel és Kaluza Analysis szoftver segítségével.

3.7 Kaszpáz-3 aktivitás meghatározása

SiHa sejteket sejtenyésztő flaskákban növesztettük standard körülmények között, majd 24, 48 és 72 órás kezelésnek vetettük őket alá. Ezután egy speciális sejtkaparó eszközzel összegyűjtöttük és megszámloltuk őket. A mintákat centrifugáltuk, majd a felülúszók óvatos eltávolítását követően megfelelő mennyiségű lízis pufferrel 20 percig jégen emésztettük a sejteket. Ezután a lizátumokat centrifugáltuk és a felülúszók 5 µl-es részleteit a gyártó ajánlásának megfelelően egy éjszakán át 10 µl szubsztrátot (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilid) tartalmazó assay pufferrel inkubáltuk 96-üregű lemezeken 37°C-on. Végezetül a kaszpáz-3 által hasított színes termékek abszorbanciáját a mintákban 405 nm-en fotometriás módszerrel határoztuk meg.

3.8 Mitokondriális membrán potenciál vizsgálat (JC-1 festés)

MCF-7, MDA-MB-231, SiHa és C33A sejteket standard sejtenyésztési körülmények között növesztettünk és gyűjtöttünk össze, majd 24-üregű lemezekre oltottuk őket. Az 1 vegyülettel való 12 (MCF-7, MDA-MB-231) vagy 24 órás (SiHa, C33A) kezelést követően a mintákat mostuk, összegyűjtöttük és centrifugáltuk. A pelleteteket újra szuszpendáltuk és JC-1 oldattal (5 µg/ml) festettük 5 percig 37°C-on. Végül a vörös és zöld fluoreszcenciát mutató sejteket FL2 (585/42 nm) - FL1 (530/30 nm) csatornákon, FACSCalibur áramlási citométerrel vizsgáltuk.

3.9 Élesztő-alapú androgén szűrővizsgálat (YAS)

Az élesztősejteket párásított környezetben, 31°C-on, orbitális rázógépen növesztettük. Ezt követően assay lemezekre telepítettük őket és CPRG szubsztrát jelenlétében a tesztvegyülettel és/vagy 5α-dihidrotesztoszteronnal (DHT) vagy flutamiddal, mint referencia vegyületekkel inkubáltuk őket 2 napig. Androgén aktivitás hatására a β-galaktoszidáz

expressziója a riporter génről indukálódik, mely enzim a sárga CPRG szubsztrátot vörös terméké képes alakítani. A minták abszorbanciáját 570 és 690 nm-en detektáltuk.

3.10 Sebgyógyulási vizsgálat

Kísérletünk során 10% FBS tartalmú EMEM médiumban MCF-7 és SiHa sejteket 24-üregű lemezekre helyeztünk, speciális szilikon inzertekbe telepítettünk. Egy éjszakán át történő inkubálást követően az inzerteket óvatosan eltávolítottuk és a meghatározott sejtmentes területet tartalmazó konfluens sejtrétegeket PBS-sel mostuk. Az **1** vegyület szub-antiproliferatív koncentrációit tartalmazó 2% FBS-sel kiegészített EMEM médiummal történő kezelést követő 0, 24 és 48 órában pedig fényképfelvételeket készítettünk a sejtekről Nikon Eclipse TS100 mikroszkóppal.

3.11 Boyden kamrás vizsgálat

A 24-üregű lemezre helyezett speciális Boyden kamrákban található polietilén-tereftalát (PET) membránok hidratációját követően, a vizsgált vegyület (**1**) szub-antiproliferatív koncentrációit tartalmazó, szérummentes EMEM médiummal készült sejtuszpenziót pipettáztunk a felső kamrába, míg az alsó részben kemoattraktánsként 10% FBS tartalmú EMEM médium került alkalmazásra. 24 órás kezelést követően az invazív sejteket jéghideg, 96%-os etanolban fixáltuk és 1%-os kristályibolya festékkel megfestettük. Nikon Eclipse TS100 mikroszkóppal fényképeket készítettünk és a membránon átlépő sejteket megszámláltuk.

3.12 Circular chemorepellent-induced defects módszer (CCIDs)

Elsőként metilcellulóz tartalmú EMEM médiumban szuszpendált MCF-7 sejteket 96-üregű, U-aljú lemezekre pipettáztuk és szferoidképződés céljából centrifugálást követően 3 napig inkubáltuk. A nem rákos, humán limfoendoteliális (iLEC) sejteket 24-üregű lemezekre telepítettük és megközelítőleg 100%-os konfluenciáig növesztettük. A mérést megelőzően az iLEC rétegeket CellTracker Green festékkel festettük meg. Ezt követően mind az endotél réteget, mind a kiválasztott tumor szferoidokat az **1** vegyülettel, defaktinibbel vagy epiandroszteronnal külön-külön 20 percig előkezelésnek vetettük alá. Majd a szferoidokat a sejtrétegre helyeztük és további 4 órán keresztül inkubáltuk együtt őket a tesztvegyülettel. Végül kondícióként legalább 12 szferoidról fotókat készítettünk egy Axiovert fluoreszcens mikroszkóppal.

3.13 Egysejt-tömegcitometria

MDA-MB-231 sejteket telepítést követően 72 óráig inkubáltuk az **1** vegyülettel. A kezelés után a sejteket mostuk, összegyűjtöttük és centrifugáltuk. A pelleteket PBS-ben szuszpendáltuk, majd a sejteket megszámloltuk. A sejtek életképességének demonstrálása céljából ciszplatinos kezelést végeztünk 3 percig jégen. A mintákat Maxpar Cell Staining pufferrel (MCSB) hígítottuk, centrifugáltuk és a nem-specifikus antitestkötődés megakadályozása érdekében TruStain FcX-szel inkubáltuk. Újabb centrifugálás után a mintákat szuszpendáltuk és a kapott antitest-keveréket adtuk hozzá. A 4 °C-on történő 60 perces inkubálást követően, a sejteket mostuk, centrifugáltuk és újra szuszpendáltuk a megmaradt térfogatban. A minták fixálása 1,6%-os formaldehid oldattal történt. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk és Cell-ID DNS-interkalátort adtuk hozzájuk egy éjszakára. További mosási lépések után a mintákat centrifugáltuk, majd a pelleteket 1 ml PBS-ben szuszpendáltuk. A méréshez a sejt számot 10% EQ kalibrálógyöngyöt tartalmazó mérőoldatban beállítottuk, majd a mintákat gravitációs filteren szűrtük. Kézi kapuzást követően a szingleteket Cytobank szoftver segítségével elemeztük.

3.14 *In vivo* egér emlőrák modell

A BALB/c egereket steril, HEPA szűrővel ellátott IVC ketrecekben tartottuk állandó 25°C hőmérsékleten. A kísérlet első napján FBS-mentes RPMI médiumban szuszpendált 4T1 emlőkarcinóma sejteket oltottunk az egerek emlőpadjaiba. A 12. napon az állatokat randomizáltuk és két csoportba osztottuk. A tesztcsoport tagjait az **1** vegyület DMSO : Solutol HS 15 : fiziológias sóoldat (1:3:10) keverékében oldott, 25mg/kg dózisával kezeltük intraperitoneálisan napi egyszer, heti 5 nap, két héten keresztül. A kontroll csoport állatait pedig a vivőanyag keverékével kezeltük. A tumorok méretét és az állatok testtömegét naponta meghatároztuk és a kezelési periódus 15. napján az állatokat feláldoztuk. Végezetül a sebészi módon eltávolított tumorszövetek súlyát megmértük.

3.15 Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai értékeléséhez GraphPad Prism szoftver 5.01 verzióját alkalmaztuk. A szignifikancia becsléséhez egyutas variancia analízist használtunk (ANOVA) Dunnett próbával kiegészítve. Az "Eredmények" fejezetben az összes bemutatott adat legalább három mérési eredmény átlaga \pm SEM érték formájában került megadásra. *, ** és *** szimbólumok $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ értékeket jelölnek kontroll mintákhoz viszonyítva.

4. Eredmények

4.1 MTT vizsgálat

Az **1** vegyület figyelemreméltó antiproliferatív aktivitást fejtett ki emlő- és méhnyakrákos sejtvonalak ellen, míg a **2**, **3** és **4** vegyület nem mutatott jelentékeny hatást a sejtek osztódására, ezért további kísérletek céljából az **1** hatóanyagjelölt lett kiválasztva. Összehasonlítás végett a terápiásan alkalmazott ciszplatin, mint referencia vegyület, azonos sejtvonalakon mért IC₅₀ értékei is feltüntetésre kerültek.

Sejtvonal	Számított IC ₅₀ érték (μM)					
	Vegyület	1	2	3	4	CIS
HeLa		1,13	>30	>30	>30	13,75
SiHa		0,78	>30	>30	>30	13,51
C33A		1,72	>30	>30	>30	3,09
A2780		2,34	>30	>30	29,58	1,30#
MCF-7		1,40*	>30	>30	>30	5,78#
T47D		1,20*	>30	>30	>30	9,78#
MDA-MB-361		1,60*	>30	>30	>30	3,74#
MDA-MB-231		1,80*	>30	>30	>30	19,13#

1. táblázat: Az **1-4** vegyület és a ciszplatin (**CIS**) számított IC₅₀ értékei nyolc emlő- és nőgyógyászati daganatos sejtvonalon. * és # szimbólumokkal jelölt adatok szakirodalmi eredetűek.

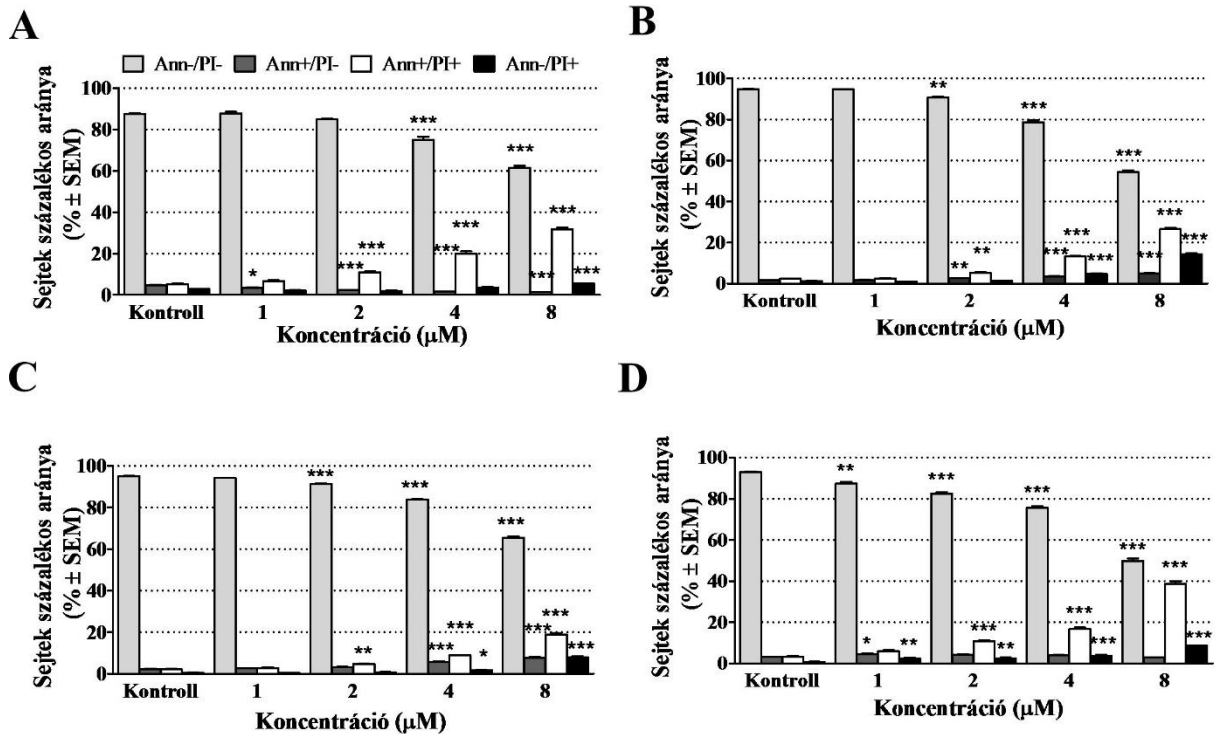
Annak érdekében, hogy információt nyerjünk a tumorszelektivitásról, a daganatos és nem daganatos (NIH/3T3) sejteken kapott IC₅₀ értékekből hányadost képeztünk. Az **1** vegyület esetében a tumorszelektivitási indexek 1 és 0.1 közé estek, melyek mérsékelt szelektivitást jeleznek.

4.2 Hoechst – propidium jodid fluoreszcens kettősfestés

Az MCF-7 és SiHa sejtek morfológiájában és membránjuk integritásában a kezelést követő 24 órával változásokat mutattunk ki. A fluoreszcens felvételek felfedték az életképes sejtek számának csökkenését, az apoptózis korai szakaszában jelentkező DNS kondenzáció miatt világoskék fluoreszcenciát kibocsátó sejtmagok és a sérült sejtmembránnal rendelkező, vörös fluoreszcenciát mutató másodlagos nekrotikus sejtek számának szignifikáns, koncentrációfüggő emelkedését.

4.3 Apoptózis vizsgálat

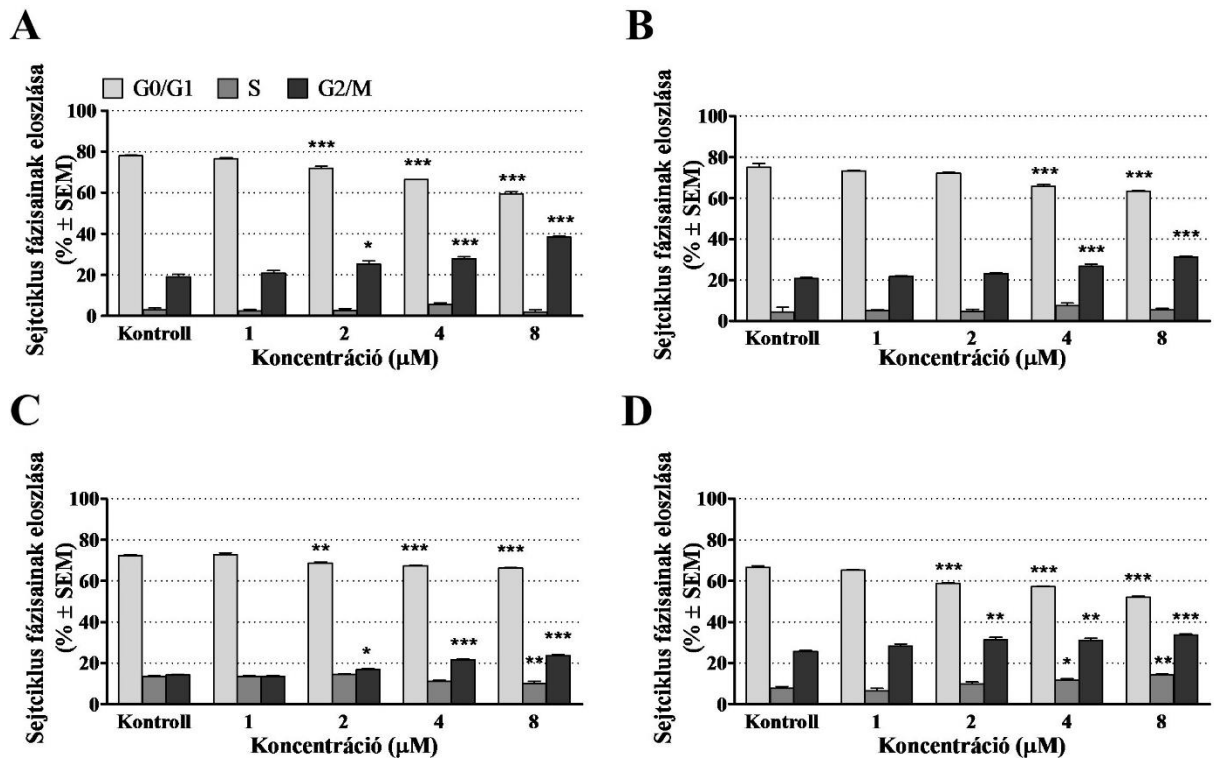
Az összes vizsgált daganatos sejtvonalon az **1** vegyület a foszfatidil-szerin kihelyeződésének koncentrációfüggő emelkedését idézte elő, amely az apoptotikus folyamat indikátorának tekinthető (korai apoptózis: AnnV+/PI-; késői apoptózis: AnnV+/PI+), masszív nekrotikus sejtpopuláció megjelenése nélkül. (nekrozis: AnnV-/PI+).



2. ábra: Az **1** vegyület a korai és/vagy késői apoptotikus sejtpopulációk felhalmozódását idézte elő. Az MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), SiHa (C) és C33A (D) sejtek intakt (AnnV-/PI-), korai apoptotikus (AnnV+/PI-), késői apoptotikus (AnnV+/PI+) és nekrotikus (AnnV-/PI+) populációiban bekövetkezett változásokat százalékban fejeztük ki. *, ** és *** jelölések $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ értékekre utalnak.

4.4 Sejtciklus analízis

Az apoptotikus folyamat jelének tekinthető, csökkent DNS-tartalmú sub-G1 populáció koncentrációfüggő emelkedését mutattuk ki mind a négy vizsgált sejtvonalon (MCF-7, MDA-MB-231, SiHa, C33A) 2 μM-lal vagy magasabb koncentrációkkal történő 48 órás kezelést követően. Emellett a G2/M fázis jelentős emelkedése a G0/G1 fázis rovására is minden daganatos sejtvonalon megfigyelhető volt.



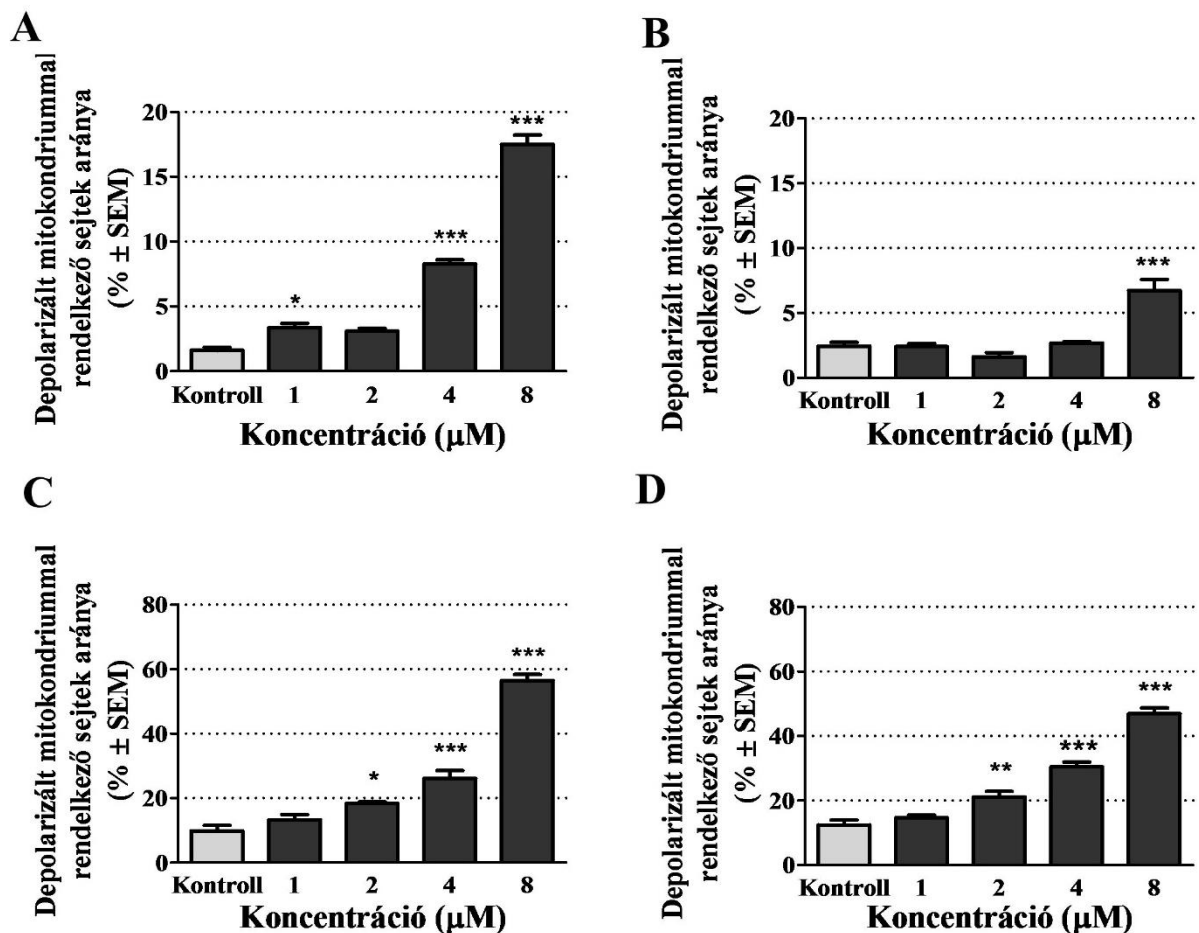
3. ábra: A tesztvegyület (1) sejtciklus eltéréseket indukált, melyek a sejtek G2/M fázisban történő felhalmozódása és G0/G1 fázis csökkenésének formájában jelentkeztek. A kísérleteket MCF-7 (A), SiHa (C) és C33A (D) sejtvonalon 48 órás, míg tripla-negatív emlőrákos sejtek esetén (B) 72 órás kezelést követően hajtottuk végre. *, ** és *** jelölések $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ értékekre utalnak.

4.5 Kaszpáz-3 aktivitás meghatározása

Az androsztadién analóg (1) a kaszpáz-3 enzim aktivitását SiHa sejtekben legalább 1,6-2,6-szorosára növelte ≥ 2 μM koncentrációk esetén 24, 48 vagy 72 órás kezelések során.

4.6 Mitokondriális membrán potenciál vizsgálat (JC-1 festés)

A JC-1 festékekkel jelölt MCF-7, MDA-MB-231, SiHa és C33A mintákban a zöld fluoreszcenciát mutató szub-populációk koncentrációfüggő emelkedését azonosítottuk.



4. ábra: MCF-7 (A) és MDA-MB-231 (B) sejtek esetén 12 órával a kezelés után, míg SiHa (C) és C33A (D) sejtekben 24 órás tesztvegyülettel (1) való inkubáció után jelentős, koncentrációfüggő változásokat mutattunk ki a sejtek mitokondriális membránjának integritásában. *, ** és *** szimbólumok $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ szignifikancia értékeket jelölnek kontrollhoz viszonyítva.

4.7 Élesztő-alapú androgén szűrővizsgálat (YAS)

Egy androgén-szenzitív, genetikailag módosított élesztő törzs (*S. cerevisiae*) jelenlétében az 1 vegyülettel kapcsolatban nem azonosítottunk jelentős androgén vagy antiandrogén aktivitást 48 órás kezelést követően DHT-hoz viszonyítva az agonista és flutamidhoz hasonlítva az antagonisták mérésben.

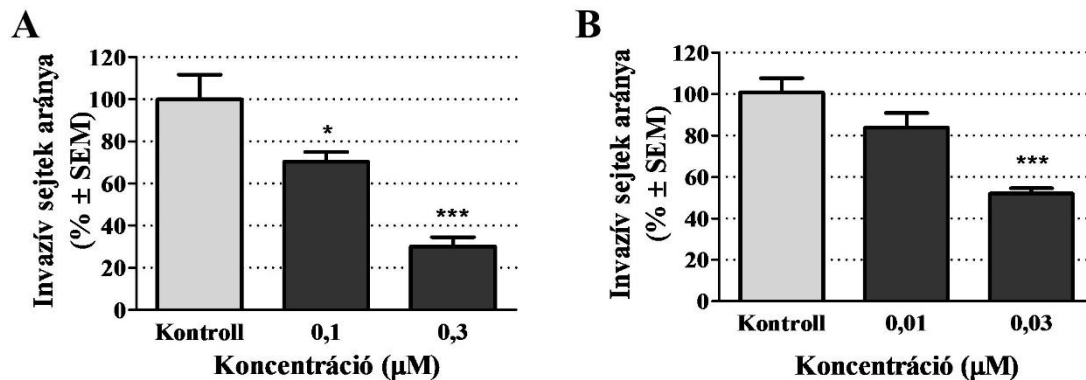
4.8 Sebgyógyulási vizsgálat

A kép analízis az MCF-7 sejtek migrációs kapacitásának jelentős, 30,8 és 22,8%-os csökkenését erősítette meg 0,3 μM alkalmazása esetén 24 és 48 órás kezelést követően kontrollhoz képest. Az 1 vegyület hasonlóan befolyásolta a SiHa sejtek migrációját is, a

szabzáródás mértéke szignifikánsan, 9,0 és 21,7%-kal csökkent 0,03 μM esetén 24 és 48 órával a kezelés után.

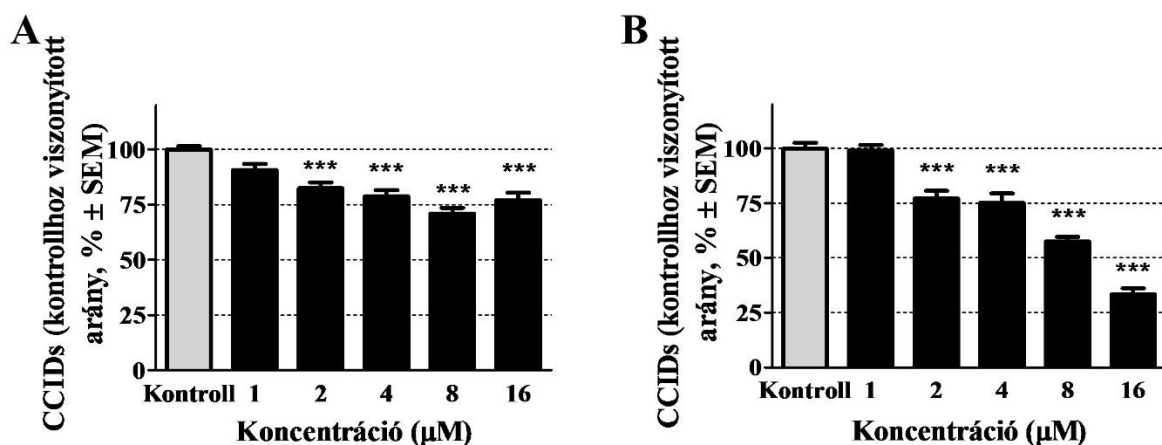
4.9 Boyden-kamrás vizsgálat

Ebben a rendszerben a membránon átlépő tripla-negatív MDA-MB-231 emlőrák sejtek száma megközelítőleg 70%-kal csökkent 0,3 μM hatására. Továbbá az inváziót mutató, méhnyakrák eredetű SiHa sejtek száma szignifikánsan, 48,9%-kal csökkent az 1 vegyület 0,03 μM -jának 24 órás alkalmazását követően.



5. ábra: A tesztvegyület (1) invázió-gátló tulajdonságát a membránon átlépő MDA-MB-231 (A) és SiHa (B) sejtek százalékos arányának jelentős csökkenése bizonyította a kezelt mintákban a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. * és *** jelölések $p < 0,05$ és $p < 0,001$ szignifikancia értékekre utalnak.

4.10 CCIDs vizsgálat



6. ábra: A tesztvegyületünk (A) és a defaktinib (B) is csökkentette a sejtmentes területek méretét 2 μM alkalmazásakor 4 órával a kezelést követően. *** jel $p < 0,001$ szignifikancia szintre utal kontrollhoz viszonyítva.

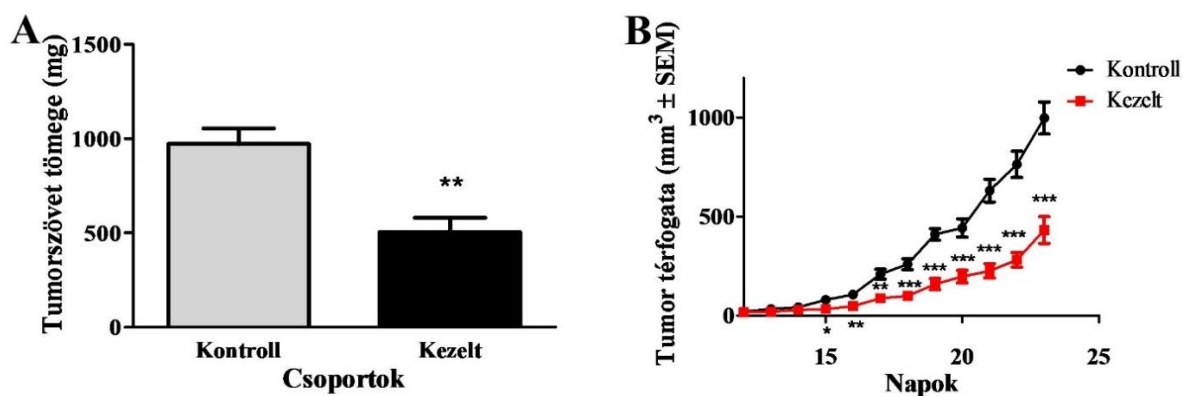
Az **1** vegyület vagy a pozitív kontrollként alkalmazott defaktinib $\geq 2 \mu\text{M}$ koncentrációi jelentősen, koncentrációfüggő módon gátolták az MCF-7 tumor szferoidok alatt, az iLEC sejtrétegen indukálódó sejtmentes területek kialakulását. Ezzel szemben a szerkezetileg hasonló epiandroszteron csupán gyenge invázió-gátló hatást fejtett ki $40 \mu\text{M}$ -ban.

4.11 Egysejt-tömegcitometria

Az MDA-MB-231 sejtvonal kemoszenzitív szubpopulációinak tumormarker profiljának jellemzése céljából 9 karcinómákra jellemző markert vizsgáltunk egysejtszintű felbontásban. Jelentős csökkenést tapasztaltunk az EGFR-, CD274- (PD-L1) és CD326- (EpCAM) pozitív sejtek százalékos arányában a hatóanyag-érzékeny populációban az **1** vegyülettel való kezelés hatására. Másrészt GLUT1, MCT4, Pan-Keratin, CD66 (a,c,e), Gal-3 és TMEM45A fehérjék emelkedett expressziós szintjét mutattuk ki a kemoszenzitív populációkban.

4.12 *In vivo* egér emlőrák modell

Az **1** vegyület 25 mg/kg dózisának 2 hetes intraperitoneális alkalmazása szignifikánsan csökkentette az indukált tumorok tömegét. Ráadásul a kezelési periódus negyedik napjától a kezelt csoportban a tumorok növekedési ütemének jelentős lassulását is feltártuk a kontroll állatokhoz viszonyítva, súlyos, életet veszélyeztető mellékhatások kiváltódása nélkül.



7. ábra: A sebészi úton eltávolított tumorszövetek ($n=7$) átlagos tömege jelentősen csökkent a kezelt csoportban 14 napos intraperitoneális alkalmazást követően (A). Az **1** vegyület *in vivo* mutatott szignifikáns tumornövekedést gátló hatását a tumornövekedési görbék bizonyítják (B). *, ** és *** szimbólumok $p<0,05$, $p<0,01$ és $p<0,001$ értékekre utalnak kontrollhoz viszonyítva.

5. Diszkusszió

A szexuáliszteroidok az emberi szervezetben jelentős hatást fejtenek ki a sejtsztódásra, de éppen emiatt felelősek lehetnek az olyan hormonfüggő, rosszindulatú elváltozások, mint az emlő- és a prosztaták kialakulásáért és progressziójáért is. Másrésztől szerkezetük lényeges pozíciókban, mint például az A- és/vagy D-gyűrűn történő módosítása viszont új, daganatellenes vegyületeket eredményezhet. A jelen tanulmány célja négy D-gyűrűn módosított androsztán származék farmakológiai hatásának meghatározása volt, különös tekintettel a sejtsztódásgátló és áttétképzést gátló hatásukra emlő- és nőgyógyászati daganatos sejt vonalakon.

Az esetek többségében a **2**, **3** és **4** vegyületek antiproliferatív hatása nem érte el az 50%-os gátlási küszöbértéket 30 μM koncentráció alkalmazásakor. A vezérmolekula (**1**) IC_{50} értékei azonban 2 μM alatt voltak mind méhnyak, mind emlő eredetű daganatos sejt vonalakon, ami legalább kétszeres érzékenységbeli növekedést jelent a terápiásan is alkalmazott referenciavegyület, a ciszplatin hatásához képest. Továbbá, az **1** vegyület korábban leírt módon számított tumorszelektivitási indexei 0,2 és 0,7 között voltak, szemben a ciszplatin értékeivel, melyek a szelektivitás teljes hiányát mutató 1,1-nél magasabb értékek formájában jelentek meg méhnyak- és emlőrákos sejteken. A korai apoptotikus sejtekben jelentkező kromatin kondenzációt és a nekrozison valamint másodlagos nekrozison átesett sejtek membrán-integritásának károsodását 24 órás kezelést követően fluoreszcens mikroszkóp alatt Hoechst33258/PI festéssel tettük láthatóvá, mely MCF-7 és SiHa mintákban is az apoptotikus és a nekrotikus sejt populációk szignifikáns növekedését jelezte. A mikroszkópos módszer korlátainak feloldása és a különböző sejtfrakciók, úgymint korai vs. késői apoptotikus és nekrotikus sejtek még részletesebb elkülönítése végett Annexin V-Alexa488/PI fluoreszcens kettős festést végeztünk áramlási citometriás módon. A késői apoptotikus sejtek (AnnV+/PI+) alpopulációjának szignifikáns emelkedése volt észlelhető ≥ 2 μM koncentráció esetén a nekrotikus sejtek (AnnV-/PI+) jelentősebb felhalmozódása nélkül az összes alkalmazott sejt vonalon. Továbbá a proapoptotikus jelleget erősítette meg az alkalmazott négy malignus sejt vonalon (MCF-7, MDA-MB-231, C33A, SiHa) a sub-G1 alpopuláció emelkedett aránya is a sejt ciklus analízis során. Minden esetben a sejtek jelentős felhalmozódását és leállást figyeltünk meg a G2/M fázisban a G0/G1 fázis rovására. Az apoptózis végrehajtó fázisának egyik fő enzime a kaspáz-3, mely a kromatin kondenzációjáért és a DNS fragmentálódásáért is felel. Ennek az enzimnek az aktivitása több mint 1,5-szeresére emelkedett az **1** vegyület 2 μM -jának való 24, 48 és 72 órás kitételt követően. Bár a kaspáz-3 enzim mind az apoptózis

intrinszik, mind az extrinszik útvonala során aktiválódhat, a JC-1 festés a mitokondriális membrán potenciáljának és integritásának felbomlását jelezte emlőkarcinóma sejtvonalak esetén 12, méhnyak eredetű sejtvonalak esetén 24 órás kezelést követően, mely alátámasztotta az apoptózis intrinszik eredetét. Korábbi eredmények és szerkezet-hatás összefüggések alapján feltételeztük, hogy egy nagy térkitöltésű szerkezeti elem, mint például az 1'-4"-cianofenil-4'-hidroximetil-1'H-pirazol-3'-il csoport, az adrosztadién váz C-17 pozíciójában csökkentheti vagy megelőzheti a tesztvegyület androgén receptorhoz való kötődését. Az androgén- vagy antiandrogén-aktivitás hiányát YAS módszer segítségével egy genetikailag módosított *S. cerevisiae* törzsön igazoltuk.

Az áttétképződés első állomása során a rákos sejtek szomszédos szövetekbe való migrációja és az alapmembránon keresztüli inváziója történik. Az *in vitro* kísérleti rendszerekben a hatóanyag jelölt (**1**) szignifikánsan gátolta SiHa és MCF-7 sejtek migrációját, valamint az erősen invazív MDA-MB-231 és SiHa sejtek invázióját már nanomólos koncentrációkkal történő 24 órás kezelés követően is. A 3D-s, kokultúras CCIDs módszer során az **1** vegyület 30%-kal csökkentette a sejtmentes területek nagyságát az MCF-7 tumorszferoidok alatti limfoendoteliális egysoros sejtrétegen 4 órás 8 μ M-os kezelést követően és egy potens FAK inhibitorral, a defaktinibbel összevethető hatást mutatott alacsonyabb koncentrációk esetén is. Ezek az értékek sokkal kifejezettebbek, mint azonos rendszerben egy szerkezeti analóg, az epiandroszteron által kifejtett gátlás.

Az **1** vegyülettel történő kezelés csökkentette az EGFR, CD274, és CD326 markerek expresszióját az MDA-MB-231 sejtek érzékeny alpopulációjában, míg a GLUT1, MCT4, Pan-Keratin, CD66, Gal-3 és TMEM45A emelkedett szintjét mutattuk ki. Ezek az adatok a sejtek fokozott kemoszenzitivitására és metabolikus átprogramozására utalhatnak, egyféle kompenzáló mechanizmusként a tesztvegyület által előidézett oxidatív stresszre válaszként. Érdekeségként a CD66(a,c,e)-pozitív és TMEM45A-pozitív sejtpopulációk átfedést mutattak.

Végül a vizsgált androsztadién származék (**1**) tumorelles tulajdonságait 4T1 emlőrák modellen teszteltük. Két hét intraperitoneális adagolást követően a fejlődő daganatok mérete kb. 50%-ka volt a kontroll mintákénak, súlyos, életet veszélyeztető mellékhatások kiváltódása nélkül.

Összegzésként elmondható, hogy kísérleti adataink felfedték az **1** vegyülete kedvező antiproliferatív és antimetasztatikus jellemzőit. A hatásmechanizmus részeként proapoptotikus tulajdonságokat azonosítottunk, úgymint az apoptózis intrinszik útvonalának aktiválódása mérsékelt tumorszelektivitással és erőteljes migráció-, invázió- és intravazáció-gátló hatásokkal kiegészülve, hormonális potenciál nélkül. Ezen eredmények fényében az androszta-5,16-dién

váz C-17 pozícióban heterociklusos csoporttal történő szubsztitúciója megfontolandó új, hatékony tumorellenes vegyületek tervezése és szintézise során.