

**Szegedi Tudományegyetem**  
**Gyógyszerésztudományi Kar**  
**Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet**



**Félszintetikus terpén származékok tumorellenes hatásának vizsgálata**

**Ph.D. tézis összefoglaló**

**Nagy Viktória**

**Szeged**

**2023**

**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.

**Nagy Viktória**

**Félszintetikus terpén származékok tumorelles hatásának vizsgálata**

**Szigorlati bizottság:**

**Elnök:** Dr. Kiss Lóránd Ph.D., D.Sc.

**Tagok:** Dr. Borsodi Anna Ph.D.

Dr. Ducza Eszter Ph.D.

**Bíráló bizottság:**

**Elnök:** Dr. Szatmári István Ph.D., D.Sc.

**Opponensek:** Dr. Kiricsi Mónika Ph.D.

Dr. Tábi Tamás Ph.D.

**Tagok:** Dr. Matuz Mária Ph.D.

Dr. Rédei Dóra Ph.D.

**2023**

# 1. Bevezetés

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) statisztikai adatai alapján megállapítható, hogy a daganatos megbetegedések az egyik legjelentősebb terhet jelentik az egészségügy számára napjainkban. A szív és érrendszeri megbetegedéseket után a második helyet foglalják el a vezető halálokok között. A Nemzetközi Rákügnökség által kiadott legutóbbi felmérés alapján, 2020-ban az újonnan diagnosztizált esetek számát 19,3 millióra becsülték és az ebből bekövetkezett halálesetek száma 10 millió volt. A korábbi statisztikai adatokkal összehasonlítva, megállapítható, hogy az elmúlt 20 év epidemiológiai adatai növekvő tendenciát mutatnak a tumorok kialakulásában. Emellett, több tanulmány is azt sugallja, hogy az új daganatos megbetegedések éves száma elérheti 23,6 milliót 2030-ra, tovább növelve az egészségügyre nehezedő feladatokat.

A nőket érintő rosszindulatú daganatok közül az emlőrák az egyik leggyakrabban diagnosztizált ráktípus, a megbetegedések 25%-ért felelős, továbbá a halálozási statisztika élén helyezkedik el. A nőgyógyászati daganatok körében a méhnyakrák a negyedik helyet foglalja el az incidencia és a mortalitás szempontjából. A kiváltó okok közül elsőként megemlítendő a humán papilloma vírus (HPV) fertőzés. Szerencsére az elmúlt húsz évben a méhnyakrákhoz köthető halálesetek száma csökkent a védőoltásoknak és a szűrési programoknak köszönhetően.

A petefészekrák 3%-át képezi a nőgyógyászati daganatoknak, ugyanakkor a legmagasabb halálozási aránnyal bír, mivel a betegek ötéves túlélési aránya nem éri el a 45%-ot. Az elmúlt évtizedekben számos előrelépés történt az ováriumot érintő daganatok terápiajában, azonban a standard terápiát még mindig a citoreduktív műtét és a kemoterápia jelenti. Statisztikai adatok alapján elmondható, hogy az első vonalbeli terápiára a páciensek 80-90%-a jól reagál, ennek ellenére többségüknél a rák kiújul, továbbá a daganatellenes hatóanyaggal szemben gyakran rezisztencia alakul ki. Bár a petefészekdaganatok többsége sikeresen kezelhető lenne korai diagnózis esetén és a betegek túlélési arányai is tovább növekednének, sajnálatos módon nem állnak rendelkezésre megfelelő módszerek a korai felismerésre. A korai stádiumban észlelhető specifikus tünetek hiánya is hozzájárul az előrehaladott stádiumú diagnózishoz. A fent említett tények alapján, kijelenthető, hogy új terápiás lehetőségekre van szükség a nőgyógyászati daganatok, különösképpen a petefészek daganatok kezelésében.

Jelenlegi gyógyszerkincsünket tekintve, a természetes vegyületek csak 6%-át képezik a kis molekulájú új hatóanyagoknak. Azonban, ha a farmakonok körét kibővítjük a természetes anyagok származékjaival, továbbá a természetes molekulából származó építőelemet magába

foglaló szerekkel, akkor a hatóanyagok majdnem 80%-a visszavezethető valamilyen természetes eredetre. Az 1940-es évek óta bevezetett tumorellenes hatóanyagok 74,8%-a köthető valamilyen módon természetes vegyülethez. A növényvilágnak kiemelt szerepe van a farmakonok felfedezésében, illetve a rák elleni gyógyításban betöltött szerepük évtizedekre nyúlik vissza. Számos növényi hatóanyag került be a terápiába, klinikai gyakorlatba vagy modellmolekulaként használták fel szerkezetoptimalizáláshoz, jobban tolerálhatóbb és biztonságosabb gyógyszerek kifejlesztéséhez. A növényvilág egyik legváltozatosabb és legintenzívebben kutatott vegyületcsoportját képezik a terpének. A daganatok kialakulásának számos szakaszát képesek megcélozni, beleértve a sejtosztódást, a sejthalált, az angiogenezist és az áttétképződést.

## 2. Célkitűzések

Kísérleteink során az elsődleges célunk az újonnan szintetizált mono,- és diterpén származékok antiproliferatív tulajdonságának jellemzése volt nőgyógyászati daganatos sejtvonalakon. Több potens származék került azonosításra, végül kettő monoterpén származékot választottunk ki további vizsgálatokra. Jelen tanulmány célja ezen ígéretes vegyületek hatásmechanizmusának és antimetasztatikus hatásuknak vizsgálata *in vitro* kísérleti körülmények között petefészek adenokarcinóma sejtvonalon.

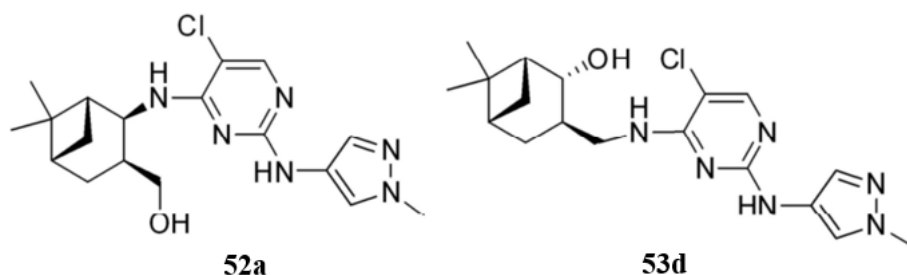
Az elvégzett vizsgálatok céljai a következők voltak:

- A szteviol és izo-szteviol vázzal rendelkező diterpének, továbbá az aminopirimidin hibridek antiproliferatív potenciáljának felmérése humán nőgyógyászati rákos sejtvonalakon hagyományos MTT vizsgálattal.
- A potens vegyületek esetében  $IC_{50}$  értékek meghatározása.
- A tumorszelektivitás meghatározása érdekében, a két kiválasztott monoterpén tesztanyag  $IC_{50}$  értékeinek meghatározása egy nem daganatos sejtvonalon (NIH/3T3).
- A leghatékonyabb vegyületek proapoptotikus tulajdonságainak kimutatása Hoechst 33258/propidium-jodid fluoreszcens kettős festéssel (HOPI) és sejtciklus analízissel.
- A kiválasztott vegyületek mikrotubulusokra gyakorolt hatásainak meghatározása sejtmertes tubulin-polimerizációs teszttel.
- A leghatásosabb vegyületek antimetasztatikus potenciáljának felmérése wound healing és Boyden kamrás vizsgálatokkal.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Tesztvegyületek

A mono,- és diterpén analógokat a Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi karán, Gyógyszerkémiai Intézetében szintetizálták Prof. Dr. Szakonyi Zsolt és munkatársai. Az első ábrán a két kiválasztott, legpotensebb monoterpén analóg szerkezeti képlete látható. (1.ábra)



1.ábra A két legpotensebb analóg szerkezeti képlete

#### 3.2. Sejtvonalak

Az antiproliferatív szűrést humán, adherens nőgyógyászati sejtvonalakon végeztük (emlőrák: MDA-MB-231, MCF-7, két különböző HPV-státuszú méhnyakrák: HeLa (HPV 18+ adenokarcinóma) és SiHa (HPV 16+ laphám karcinóma), valamint petefészek adenokarcinóma sejtvonalon: A2780). A tumor szelektivitás meghatározás során NIH/3T3 sejtvonalat alkalmaztunk. A sejteket minimális esszenciális médiumban (MEM) tenyésztettük, amely 10%-os főtális borjúszérummal (FBS), 1% nem esszenciális aminosav (NEAA) keverékkel és 1% penicillin, sztreptomycin és amfotericin B keverékkel volt kiegészítve, a szöveti körülményeket 37°C-os párásított 5%-os szén-dioxid atmoszféra biztosította.

#### 3.3. Antiproliferatív MTT vizsgálat

A tesztvegyületek sejtek osztódására gyakorolt hatását MTT módszerrel vizsgáltuk. Mindegyik sejttípust a korábban említett sejtenyésztési körülmények között tartottuk fent, majd 96 üregű lemezekre telepítettük meghatározott sejtszámban. Másnap a tesztvegyületek növekvő koncentrációival kezeltük őket 0,1 - 30,0  $\mu$ M intervallumban. 72 órás inkubációt követően MTT oldatot vittünk fel az üregekbe, 4 óra után a kivált formazán kristályokat DMSO-ban oldottuk. Az abszorbancia értékeket mikroplate olvasóval rögzítettük 545nm-en. A dózis-hatás görbéket GraphPAD Prism 5.01 szoftverrel segítségével illesztettük.

### **3.4. Hoechst-propídium-jodid fluoreszcens kettős festés (HOPI)**

A sejtek morfológiájában és a membrán integritásában bekövetkezett változásokat fluoreszcens kettős festéssel tettük láthatóvá. A2780 sejtuszpenziót 6 üregű mikroplate-re telepítettük és a tesztvegyületek növekvő koncentrációval kezeltük 24 és 48 órán át. Az inkubáció után Hoechst33258 (HO) és propídium-jodid (PI) festéket adtunk a sejtekhez, majd egy óra elteltével fényképeket készítettünk Nikon Ti-u mikroszkóp segítségével. A képek ugyanazon látótérből készültek a megfelelő filterek alkalmazásával. A fluoreszcenciát mutató sejtmagokat megszámloltuk, százalékos arányban fejeztük a különböző morfológiát mutató sejtek arányát.

### **3.5. Áramlási citometriás sejtciklus analízis**

A sejtek DNS tartalmának meghatározásához áramlási citometriás vizsgálatot végeztünk. A2780 sejteket 24-üregű lemezekre telepítettük meghatározott sejtszámban. Következő nap a tesztvegyületek növekvő koncentrációival kezeltük a sejteket 24 és 48 óráig tartó inkubációs idővel. A minták felülúszóit Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, ezután szobahőmérsékleten centrifugáltuk őket. A festékoldatban szuszpendált sejtek DNS tartalmát propídium-jóddal jelöltük, majd 30 perc inkubáció következett szobahőmérsékleten. A méréseket FACSCalibur áramlási citométerrel végeztük, a minták elemzése Kaluza Analysis szoftver segítségével történt. A sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtek arányáról oszlopdiagrammot készítettünk.

### **3.6. Tubulin polimerizációs teszt**

A tesztvegyületek tubulin polimerizációra kifejtett hatását, sejt működéstől független módszerrel vizsgáltuk, kereskedelmi forgalomban kapható kit segítségével. A tesztanyagok megfelelő koncentrációjú oldataival, illetve pozitív és negatív kontroll alkalmazásával, az abszorbancia értékeket mikroplate olvasóval rögzítettük 340 nm-en 60 percig. Kinetikai görbéket vettünk fel, amelyek segítségével maximális sebességértékeket számítottunk ( $V_{max}$ ,  $\Delta$ abszorbancia/perc) a statisztikai elemzés érdekében.

### **3.7. Sebgyógyulási vizsgálat**

A sejtek migrációs kapacitását sebgyógyulási (wound healing) teszttel vizsgáltuk. A2780 sejteket 2% FBS tartalmú MEM médiumban 12-üregű lemezekre helyezett speciális, szilikon inzertekbe telepítettük. A teljes konfluencia elérése után eltávolítottuk az inzerteket, a tesztvegyületek megfelelő koncentrációjú 2% FBS-t tartalmazó médiumban elkészített oldataival kezeltük a sejteket. Nikon Eclipse TS100 mikroszkóppal a 0. 24. és 48. órában

fényképeket készítettünk az inzert által kialakított seb területéről, amelyeket összehasonlítva információt kaptunk a sejtek migrációs képességéről.

### **3.8. A sejtek inváziójának vizsgálata Boyden kamra által**

Az A2780 sejtek inváziós képességét BD BioCoat Matrigel inváziós kamrák segítségével vizsgáltuk. A sejtuszpenziót, illetve a tesztanyagok megfelelő koncentrációjú oldatait szérumentes médiumban elkészítve a 24-üregű lemezre helyezett kamrák felső üregeibe telepítettük, majd kemoattraktánsként az alsó üregekbe 10% FBS-t tartalmazó médiumot helyeztünk. 24 és 48 órás inkubációt követően a kamrát eltávolítottuk és az invazív sejteket etanolban fixáltuk, 1%-os kristályibolya festéssel festettük és mikroszkóp segítségével fényképeket készítettünk. A membránon átlépő sejtek arányáról statisztikai analízist készítettünk.

### **3.9. Statisztikai analízis**

Az adatok statisztikai értékeléséhez GraphPad Prism szoftver 5.01 verzióját alkalmaztuk. A szignifikancia kimutatásához egyutas variancia analízist (ANOVA) és Dunett próbát használtunk. A következő fejezetben bemutatott eredmények legalább két mérési eredmény átlaga  $\pm$  SEM érték formájában kerül megadásra. \*, \*\* és \*\*\* szimbólumok  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  és  $p < 0,001$  értékeket jelölnek a kontroll mintákhoz viszonyítva.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. MTT VIZSGÁLAT

A munka első fázisában 86 újonnan szintetizált terpén származék antiproliferatív szűrése történt meg. A vegyület könyvtárak vizsgálata során, több potensnek bizonyuló tesztvegyület került azonosításra. Céljaink között szerepelt, hogy petefészek adenokarcinóma elleni jelölteket találjunk, ezért csak két potenciális vegyületet (**52a** és **53d**) választottunk ki a további vizsgálatokra. Ennek ellenére megállapítható, hogy a szerkezet és a sejtosztódást gátló hatásokat figyelembe véve, több potens vegyület szolgálhat kiinduló molekulaként a további tumorelles tesztvegyületek tervezése során.

A kiválasztott analógok figyelemreméltó antiproliferatív aktivitást fejtettek ki petefészek adenokarcinóma sejtvonalon, ennek megfelelően összehasonlításként a mai terápiában is alkalmazott ciszplatin lett feltüntetve, mint referencia vegyület. Annak érdekében, hogy a tumorszelektivitásról is információt kapjunk, a két potens vegyület  $IC_{50}$  értékeit meghatároztuk nem daganatos sejtvonalon (NIH/3T3) is. (**1-2.Táblázat**)

Sejttípus	$IC_{50}$ értékek ( $\mu M$ )		
	52a	53d	ciszplatin
HeLa	1,39	7,69	12,14
SiHa	2,14	16,70	5,31
MDA-MB-231	1,78	27,35	10,17
MCF-7	1,49	16,27	8,05
A2780	0,77	2,86	1,30
NIH/3T3	4,36	8,05	3,96

**1.Táblázat** A tesztanyagok és a ciszplatin számított  $IC_{50}$  értékei nőgyógyászati daganatos és intakt fibroblasztos sejtvonalakon, MTT teszttel vizsgálva, 72 óra inkubációs időt követően

Sejttípus	Tumor szelektivitási index		
	52a [ $IC_{50}$ tumoros sejt/ $IC_{50}$ NIH/3T3]	53d [ $IC_{50}$ tumoros sejt/ $IC_{50}$ NIH/3T3]	$IC_{50}$ ciszplatin/ $IC_{50}$ NIH/3T3
HeLa	0,32	0,95	3,06
SiHa	0,49	2,07	1,34
MDA-MB-231	0,41	3,39	2,56
MCF-7	0,34	2,02	2,03
A2780	0,17	0,35	0,32

**2.Táblázat** Tumorszelektivitási indexek az alkalmazott sejtvonalakon

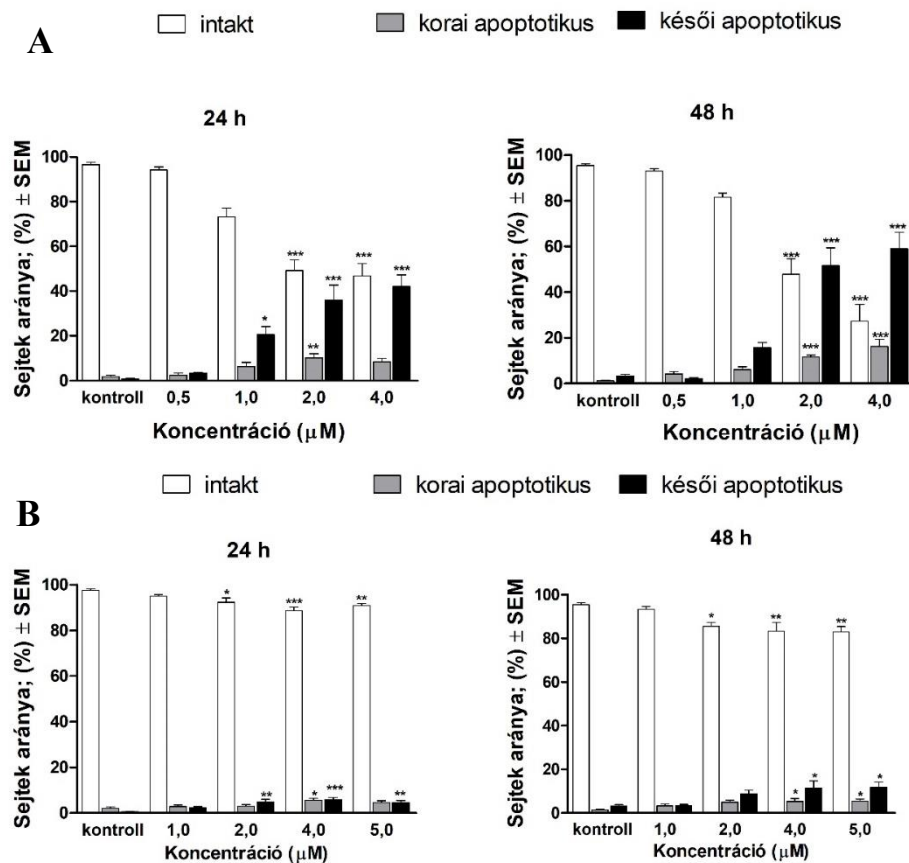
A tumorszelektivitás vizsgálata az intakt fibroblasztos sejtvonalon megmutatta, hogy a tesztvegyületek és a referencia vegyület (ciszplatin) hasonló tulajdonsággal bírnak. Tekintettel



a két monoterpén származék kémiai hasonlóságára és antiproliferatív aktivitására, további vizsgálatokat végeztünk a hatásmechanizmusuk feltárása érdekében.

## 4.2. Hoechst-Propídium-jodid fluoreszcens kettős festés

Az A2780 sejtek morfológiájában és membrán integritásában a kezeléseket követően 24 és 48 óra elteltével is változások voltak kimutathatóak. Az apoptózis korai szakaszában jelentkező DNS kondenzáció és a vörös fluoreszcenciát mutató másodlagos nekrotikus sejtek számának szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető a koncentráció függvényében mindkét tesztvegyület esetében. Megfigyelhető, hogy az **52a** analóg kifejezettebb apoptotikus, illetve nekrotikus károsodást idézett elő, nagyobb hatékonyságúnak bizonyult. Az **53d** analóg esetében többnyire a magasabb koncentrációkban (4–5  $\mu\text{M}$ ) és 48 órás inkubációs idő után volt változás a sejtek százalékos arányában. (**2.Ábra**)



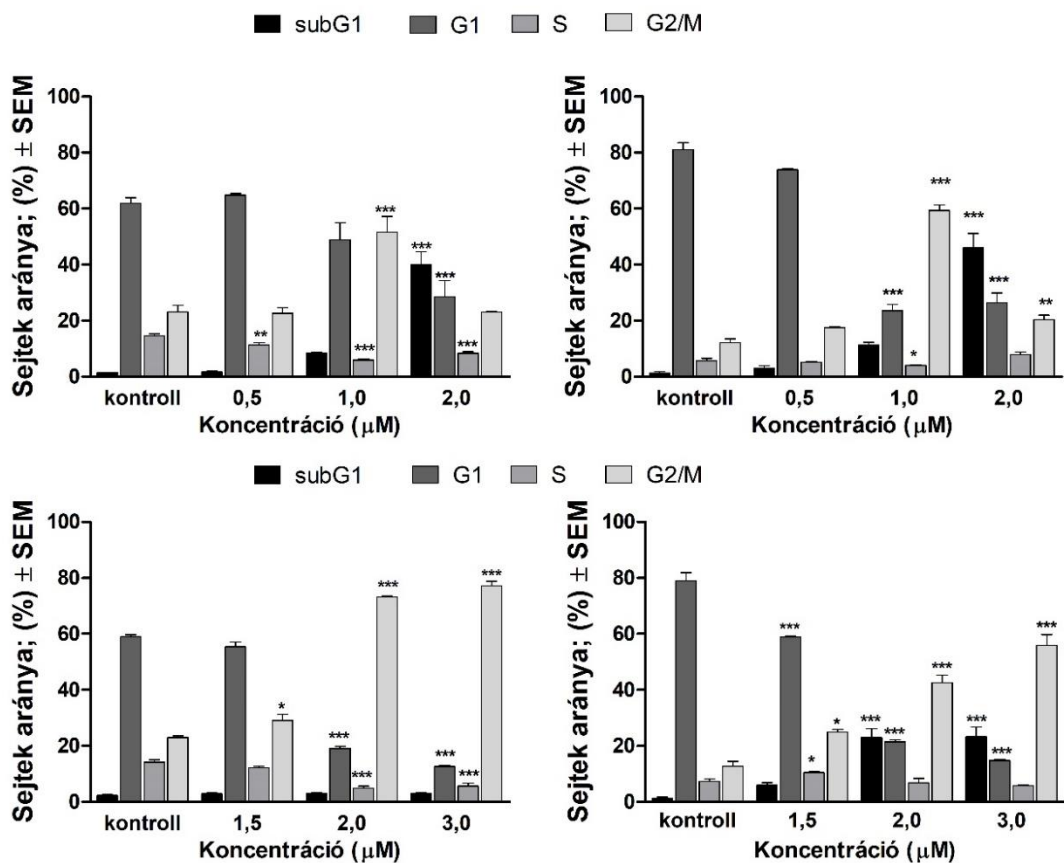
**2.ábra.** Morfológiai változások az A2780 sejteken a tesztvegyületek kezelésének hatására 24 és 48 órás inkubációs idő után. **A:** **52a** tesztanyag által előidézett apoptotikus és nekrotikus sejtek százalékos aránya **B:** **53d** tesztanyag által előidézett apoptotikus és nekrotikus sejtek százalékos aránya. Az eredmények a sejtek százalékos arányának átlaga  $\pm$  SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*, \*\* és \*\*\* jelölések  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , és  $p < 0,001$  értékekre utalnak, a nem szignifikáns értéket külön nem jelöltük.

### 4.3. Sejtciklus analízis

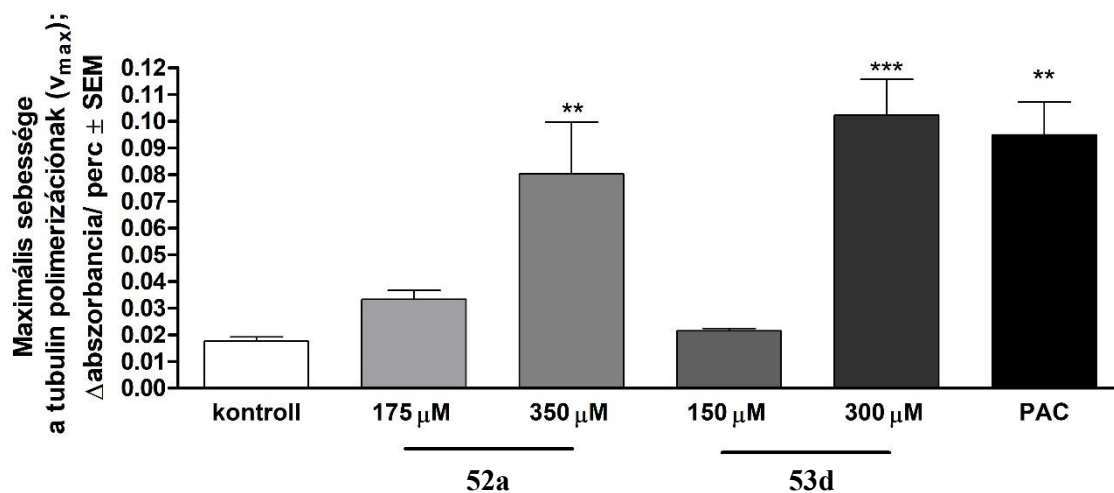
Mindkét tesztvegyület változásokat okozott az A2780 sejtek sejtciklusában, az inkubációs idő és a koncentráció függvényében a subG1 populáció emelkedést mutatott, amely az apoptotikus folyamatok jelének tekinthető. A tesztvegyületek alkalmazott koncentrációt az IC<sub>50</sub> értékekhez viszonyítva határoztuk meg. Az **52a** analóg 1 µM-os koncentrációjánál megfigyelhető, hogy a sejtek száma a G2/M fázisban felhalmozódik, amely az S fázisban lévő sejtek arányának csökkenését idézte elő 24 órás inkubáció után. A magasabb koncentráció (2 µM) alkalmazása nagy mértékű sejtciklus zavarhoz vezetett, amelyet a subG1 fázis emelkedése jellemez. A 48 órás inkubációs idő során még jobban felerősödtek ezek az elváltozások. Az **53d** analóg esetében, a G1 fázisban lévő sejtek számának szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető, amelyet a G2/M fázis emelkedése követet 24 óra után, továbbá a 48 órás kezelés a hipodiploid sejtek emelkedését eredményezte. A sejtciklus analízis során mért eredményeink arra engednek következtetni, hogy mindkét analóg koncentráció függő módon a sejtciklus megállását okozza a G2/M fázisban az A2780 sejteken. (**3. Ábra**)

### 4.4. Tubulin polimerizáció

A sejtciklus eredmények arra engedtek következtetni, hogy az analógok G2/M fázisban fejtik ki a hatásukat, a tubulin fehérje egyike a legvalószínűbb támadáspontnak az M fázis során. Következésképpen meghatároztuk a tesztanyagok tubulin polimerizációra kifejtett direkt hatását fotometriás kinetikai mérés során. A gyártó ajánlásának megfelelően alkalmaztuk a relatív magasabb koncentráció értékeket, a paclitaxel mint referencia vegyület volt feltüntetve. A kezeletlen kontroll mintákkal összehasonlítva mindkét tesztvegyület legmagasabb koncentrációi a tubulin polimerizációban jelentős gyorsulást idézték elő. Ezen túlmenően a tesztvegyületek magasabb koncentrációinál jelentős V<sub>max</sub> érték emelkedés volt megfigyelhető a referencia hatóanyaghoz, a paclitaxelhez képest. (**4. ábra**)



**3.ábra** A tesztvegyületek hatására bekövetkező változások az A2780 sejtciklus egyes fázisainak arányára (A): **52a** analóg kezelése hatására 24 és 48 órás inkubációs idővel; (B): **53d** analóg kezelés hatására 24 és 48 órás inkubációs idővel. Az eredmények a sejtek százalékos arányának átlaga ± SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*, \*\* és \*\*\* jelölések  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , és  $p < 0,001$  értékekre utalnak. A nem szignifikáns értékeket külön nem jelöltük.



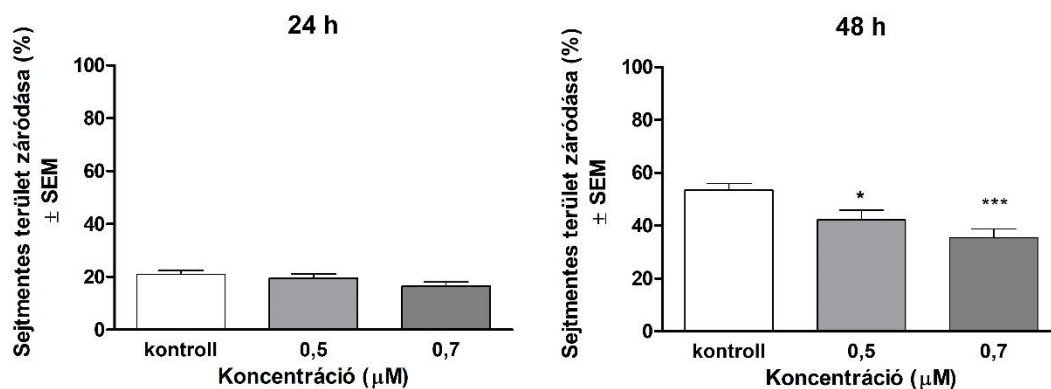
**4.ábra** A tesztvegyületek tubulin polimerizációra kifejtett hatásának statisztikai értékelésére számított maximális sebességértékek, in vitro, sejtmentes környezetben vizsgálva. Az eredmények átlagértékek ±

SEM. A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*\* és \*\*\* jelölések  $p < 0,01$ , és  $p < 0,001$  értékekre utalnak. A nem szignifikáns értékeket külön nem jelöltük.

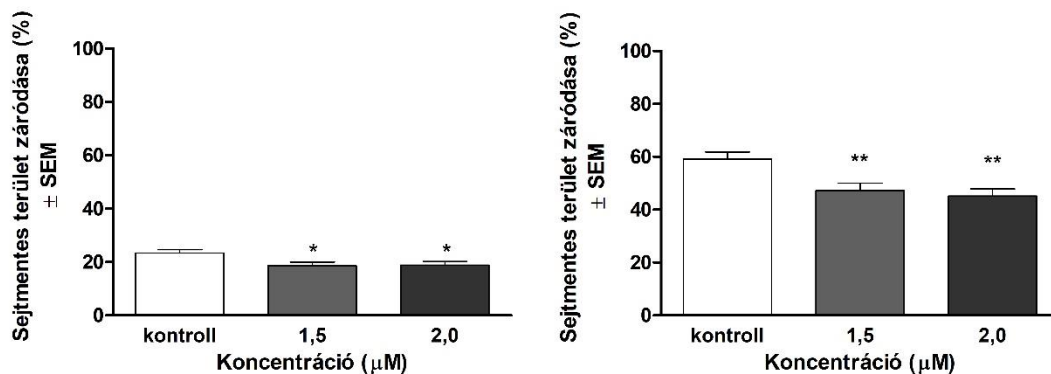
#### 4.5 A sejtek migrációjának vizsgálata sebgyógyulási teszttel

Az A2780 sejtek migrációs képességének változását a tesztvegyületekkel történő kezelés hatására sebgyógyulási teszttel vizsgáltuk. Az **52a** analóg esetében 24 óra elteltével nem észleltünk szignifikáns különbségeket. Azonban 48 órás inkubáció után mindkét koncentrációnál szignifikáns változást kaptunk. Másrészt az **53d** tesztanyag (1,5  $\mu\text{M}$  valamint 2,0  $\mu\text{M}$ ) koncentrációfüggő módon gátolta az A2780 sejtek migrációját 24 és 48 órás kezelés után a kontrollhoz viszonyítva. (5.ábra)

**A**



**B**

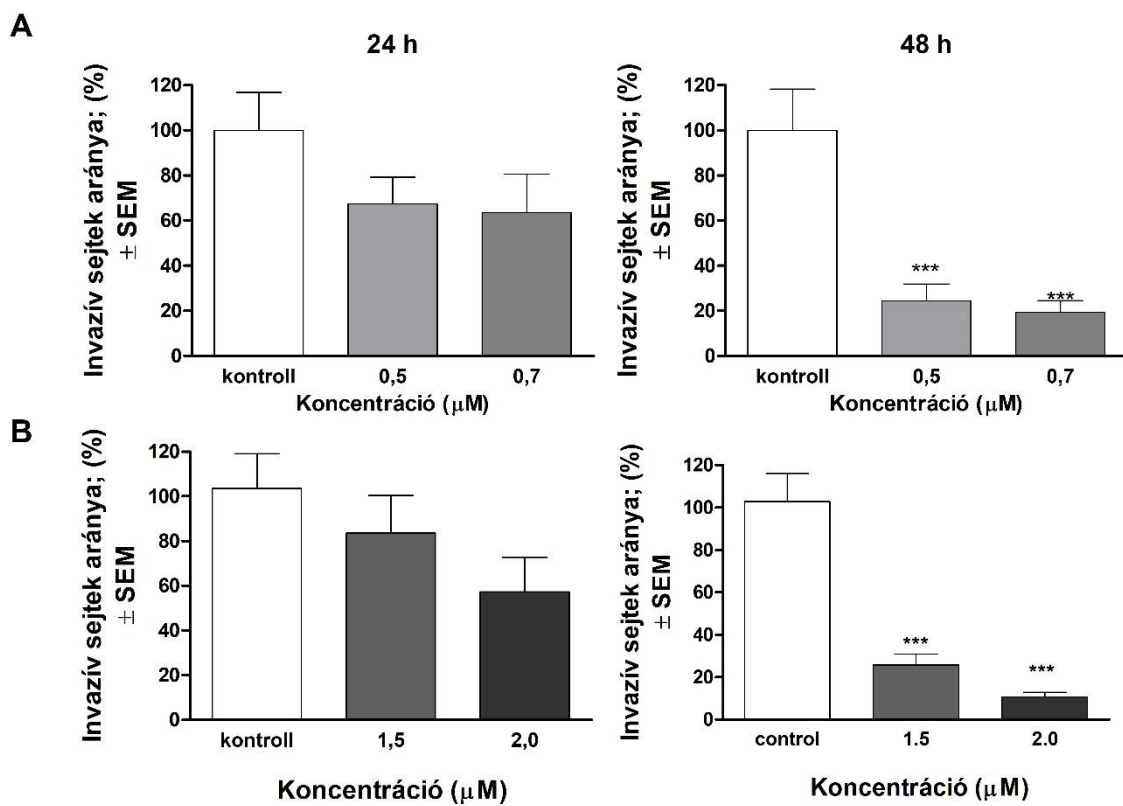


**5. ábra.** A2780 sejtek migrációs képessége a tesztvegyületekkel történő kezelést követően, **(A): 52a** analóg 24 és 48 óra inkubáció után, **(B): 53d** analóg 24 és 48 óra inkubáció után. A migráció mértékét a 0. és a 24. és 48. óra utáni sejtmentes területtől számítottuk. Az eredmények átlagértékek  $\pm$  SEM. A

szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*, \*\* és \*\*\* jelölések  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , és  $p < 0,001$  értékekre utalnak. A nem szignifikáns értékeket külön nem jelöltük.

#### 4.6 Boyden kamrás vizsgálat

A sejtek migrációja mellett a sejtek inváziója a környező szövetekbe is döntő fontosságú a tumoros áttétek kialakulásában, ezért a wound healing vizsgálatot kiegészítettük Boyden kamrás próbával. A 24 órás inkubációs idő után mindkét analóg szerény hatást fejtett ki az A2780 sejtek migrációjára, azonban a hosszabb ideig tartó kezelést követően mindkét testanyag szignifikánsan gátolta a petefészek adenokarcinóma sejtek mozgását. (6. ábra)



**6. ábra** A testvegyületek (52a és 53d) hatása az A2780 sejtek inváziójára, 24 és 48 órás inkubáció után követően, A szignifikancia értékek a kontrollhoz viszonyítva: \*\*\* jelölések  $p < 0,001$  értékekre utalnak. A nem szignifikáns értékeket külön nem jelöltük.

## 5 DISZKUSSZIÓ

Napjainkban az egyik legnagyobb kihívást a daganatellenesszerekkel szemben kialakuló rezisztencia mellett a metasztázis jelenti a rákkutatásban, éppen ezért kulcsfontosságú feladat az új terápiás hatóanyagok kutatása, farmakológiai vizsgálata. A terpének a másodlagos növényi metabolitok csoportjába tartoznak, amelyeket már régóta alkalmaznak gyógyászati hatóanyagként, illetve sokféle farmakológiai aktivitással rendelkeznek. Az utóbbi években több tanulmányt is publikáltak, amelyekben potenciális rákellenes szerként jellemzik őket. Az irodalmi adatok alapján a daganatellenes hatásukat a sejtciklus megállítása, valamint az apoptózis indukálása révén fejtik ki.

Jelen tanulmány célja az újonnan szintetizált terpén származékok farmakológiai jellemzése volt nőgyógyászati daganatos sejteken. A kiválasztott tesztvegyületek ( **52a** és **53d**) esetében célul tűztük ki hatásmechanizmusuk és antimetasztatikus tulajdonságuk vizsgálatát petefészek adenokarcinóma sejtvonalon.

Mindkét vegyület  $IC_{50}$  értéke összevethetőnek bizonyult a referenciavegyületként kiválasztott cisplatin értékeivel. A maximális gátlás feléhez tartozó koncentráció értékek az intakt sejtvonalon négyszer magasabbak volt, mint az A2780 sejtvonalon. Ezen eredmények alapján, az analógok tumorszelektivitása jobb, vagy megegyezőnek bizonyult a cisplatinnal. A kiválasztott analógok apoptózist indukáló hatását először fluoreszcens kettős festéssel igazoltuk. A korai apoptotikus sejtekben jelentkező kromatin kondenzációt, valamint a másodlagos nekrozison átesett sejtek membránintegritásának károsodását HOPI festéssel tettük láthatóvá 24 és 48 órás kezelést követően. Mindkét tesztvegyület proapoptotikus hatását megerősítették a rögzített morfológiai változások petefészek adenokarcinóma sejtvonalon. A koncentráció emelése a mindkét analóg esetében a késői apoptotikus vagy másodlagos nekrotikus sejtek kialakulásához vezetett, ezen sejtekre a membránfunkció elvesztése volt a jellemző, amelyet a propidium-jodid festéssel tettük láthatóvá. A rögzített eredményeink az analógok proapoptotikus tulajdonságára utaltak, amelyet a további vizsgálatok is megerősítettek, többek között a sejtciklus analízis. Amely igazolta, hogy az **53a** és **53d** tesztvegyület koncentráció függő módon zavart idéz elő az A2780 sejtek sejtciklusában. Általánosságban megfigyelhető volt a G2/M fázis emelkedése és a hipodiploid (subG1) sejtek felhalmozódása, melynek a következménye a G1 populáció csökkenése volt. A G2/M fázis növekedése a hosszabb kezelési idő után sokkal markánsabb volt mindkét tesztanyag esetében, mint a 24 órás inkubációs idő után. Ez a jelenség a sejtciklus megállására utalhat, amelyet szintén alátámasztott az apoptotikus sejtpopulációnak tekintett hipodiploid (subG1) frakció

szignifikáns növekedése és a korábban észlelt másodlagos apoptotikus sejtek arányának növekedése.

Több tanulmány is beszámolt arról, hogy a terpének a tubulin polimerizáció közvetlen befolyásolásával a sejtciklus megállását idézik elő. Vizsgálataink során mindkét tesztvegyület zavart okozott a tubulin polimerizációban. Amiből arra lehet következtetni, hogy egyensúlyzavar lépett fel a mikrotubulusok polimerizációja és depolimerizációja között, ami a sejtciklus leállításához és az apoptózis kiváltásához vezetett. Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált vegyületek úgynevezett mikrotubulust stabilizáló tulajdonsággal rendelkeznek, hasonlóképpen, mint a pozitív kontrollként feltüntetett paclitaxel.

Az sejtosztódástgátló és proapoptotikus hatás mellett további jelentős és egyben elvárt tulajdonság az újonnan szintetizált daganatellenes hatóanyagokkal szemben, hogy gátolják az áttétek kialakulását. A metasztázis megjelenése szoros kapcsolatban van a kedvezőtlen prognózissal, hiszen ez a daganatos sejtek a primer tumorból való kijutását jelenti a különböző szervekbe, ahol többszervi elégtelenséget okoznak és az esetek döntő többségében a beteg halálához vezet. Mint korábban említettük, a petefészek daganat az egyik legmagasabb halálozási rátával bír, amelynek legfőbb oka az áttétek kialakulása. Az *in vitro* kísérleti körülmények között mindkét vegyület gátolta az A2780 sejtek invázióját és migrációját 48 órás expozíció után. Eredményeink azt is kimutatták, hogy a sejtmozgás gátlása 0,5  $\mu\text{M}$  (**52a**) és a 1,5  $\mu\text{M}$  (**53d**) koncentrációjánál válik nyilvánvalóvá, amelyek az szub-antiproliferatív koncentráció alatt vannak.

Eredményeink alapján összegzésként elmondhatjuk, hogy a tesztvegyületek (**52a** és **53d**) sejtosztódástgátló és proapoptotikus tulajdonáguk mellett, a sejtmigrációra és -invázióra gyakorolt gátló hatásuk miatt ígéretes gyógyszerjelöltnek tekinthetők az antiproliferatív monoterpén vegyületek között. Mindezen túlmenően alapvegyületként is szolgálhatnak újabb, még hatékonyabb daganatellenes monoterpének tervezése során.