

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

**Új, D-gyűrűben módosított ösztron-származékok
tumorelleses hatásvizsgálata *in vitro* és *in vivo***

Ph.D. tézis összefoglaló

Bartha Sándor



Szeged

2026

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Képzési program: Gyógyszerhatástan, biofarmácia és klinikai gyógyszerészet

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

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Témavezető: Kanizsainé Dr. Minorics Renáta, Ph.D.

Új, D-gyűrűben módosított öszttron-származékok
tumorelles hatásvizsgálata *in vitro* és *in vivo*

Bartha Sándor

Szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Ilisz István, Ph.D., D.Sc.

Tagok: Prof. Dr. Borsodi Anna, Ph.D. D.Sc.

Prof. Dr. Balogh György Tibor, Ph.D., D.Sc.

Bíráló bizottság:

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

Opponensek: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D., D.Sc.

Dr. Földesi Imre, Ph.D.

Tag: Dr. Matuz Mária, Ph.D.

Titkár: Dr. Kiss Tivadar, Ph.D.

1. Bevezetés

A daganatos betegségek világszerte továbbra is a vezető halálokok közé tartoznak. 2022-ben mintegy 20 millió új esetet diagnosztizáltak, illetve 9,7 millió halálesetet regisztráltak. A rák előfordulása a következő évtizedekben várhatóan tovább emelkedik, elsősorban a népesség előregedése és az életmódbeli tényezők változása miatt. Az incidencia és a mortalitás régióként jelentős eltéréseket mutat. A magas humán fejlettségi mutatóval (HDI) rendelkező országokban az incidencia jellemzően magasabb a hosszabb élettartam és a széles körben elérhető szűrések miatt, ugyanakkor az alacsonyabb halálozási arányt a korai diagnózis és a fejlettebb terápiák magyarázzák. Ezzel szemben az alacsonyabb HDI-jű régiókban a késői felismerés és az egészségügyi ellátáshoz való korlátozott hozzáférés következtében magasabb a mortalitás jellemző.

A daganatok kialakulása külső (dohányzás, alkoholfogyasztás, egészségtelen étrend, fertőzések) és belső tényezők, elsősorban genetikai hajlam komplex kölcsönhatásának eredménye. A *BRCA1*, *BRCA2* és *TP53* tumorszupresszor gének csíravonalbeli mutációi jelentősen növelik a rák kockázatát, azonban a daganatos halálozások mintegy 90%-áért nem az elsődleges tumor, hanem az áttétek (metasztázisok) felelősek. A metasztatikus folyamatot a daganatsejtek fokozott motilitása és invazivitása, a keringésben való túlélés, valamint a távoli szervek kolonizációja jellemzi, ami a klinikai kezelés egyik legnagyobb kihívását jelenti. Ezért a metasztázis molekuláris mechanizmusainak feltárása és új, célzott hatóanyagok fejlesztése kulcsfontosságú a túlélés javítása szempontjából.

Az emlőrák világszerte a leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú daganatos megbetegedés, valamint a nőket érintő rák miatt bekövetkező halálozás vezető oka. 2022-ben 2,3 millió új esetet és több mint 665000 halálozást jelentettek. Kialakulása többlépcsős folyamat, amelyben genetikai eltérések, hormonális jelátvitel, a tumor-mikrokörnyezet interakciói, valamint az immunrendszer megkerülése egyaránt szerepet játszanak. Az emlőrák prognosztikai és terápiás jelentőségük alapján hormonreceptor-pozitív, HER2-pozitív és tripla-negatív altípusokra osztható. Az esetek 70–80%-a ösztrogénreceptor-pozitív (ER+), amelyre ösztrogénfüggő növekedés és általában kedvezőbb kimenetel jellemző.

Az ER+ emlőrák növekedését döntően az ösztrogén jelátvitel irányítja, ezért az endokrin terápia az egyik alapvető terápiás stratégia mind az adjuváns, mind a metasztatikus kezelési protokollokban. Premenopauzában a tamoxifen, egy szelektív ösztrogénreceptor-modulátor (SERM) számít elsővonalbeli szernek, míg posztmenopauzában az aromatázgátlók (AI-k), például az anasztrozol, a letrozol vagy az exemesztán alkalmazása preferált. Magas

kiújulási kockázat esetén az endokrin terápia akár 10 évig történő meghosszabbítása standard eljárás, mivel csökkenti a kiújulás esélyét és javítja a túlélést. Ennek ellenére az intrinzik és szerzett rezisztencia komoly akadályt jelent, különösen metasztatikus betegségben.

Az ER⁺ emlőrák kezelésében mérföldkövet jelentett a fulvestrant, az egyik elsőként kifejlesztett szelektív ösztrogénreceptor-degradáló (SERD). Alacsony biohasznosulása és parenterális alkalmazása azonban új, kedvezőbb farmakokinetikai tulajdonságú, orálisan is hatékony SERD-ek fejlesztését teszi szükségessé.

A szteroidok biológiailag aktív vegyületek sokrétű csoportját alkotják, amelyeket általában alacsony citotoxicitás és jó biohasznosulás jellemez. A szteroidok és a daganatos folyamatok közötti kapcsolatot a 20. század közepe óta vizsgálják, és ismertté vált, hogy a szexuálszteroidok kulcsszerepet játszanak a hormonérzékeny szövetek sejtproliferációjában.

Az *in silico* módszerek fejlődése tovább bővítette ismereteinket arról, hogy a szteroidok miként befolyásolják a daganatsejtek működését. A klinikumban jelenleg is több szteroid szerkezetű rákellenes hatóanyagot alkalmaznak, amelyek vagy a hormonszintézist gátolják (pl. exemesztán), vagy a hormon-receptor kölcsönhatást zavarják meg (pl. fulvestrant, ciproteron-acetát). Tekintettel arra, hogy a szteroidok közvetlen szerepet játszhatnak daganatok kialakulásában, a kutatók aktívan vizsgálnak új szteroid-vegyületeket, különösen a nemi hormonokhoz szerkezetileg hasonlókat, amelyek potenciális növekedésgátló hatással rendelkezhetnek.

Az ösztrogénvázas vegyületek biológiai hatásait illetően kutatócsoportunk (Zupkó és munkatársai) több mint egy évtizede vizsgálja e molekulacsoport *in vitro* antiproliferatív és antimetasztatikus potenciálját. Ismert, hogy bizonyos szerkezeti módosítások, például heterociklusok bevezetése, a szteroid oldalláncok megváltoztatása vagy heteroatomok beépítése a szteroid vázba jelentősen módosíthatják a biológiai tulajdonságokat.

Jelen tanulmányban elsőként az ösztron D-gyűrűjének térszerkezetileg jól hozzáférhető 16 α - és 17 α -pozícióiban fűzionált, aril-szubsztituált oxazolinok *in vitro* antiproliferatív hatásának vizsgálatára összpontosítottunk, amelyet különböző szerves foszfátcsoportokkal szubsztituált 16-metilén-13 α -ösztron 3-metil- és 3-benzil-éterek onkofarmakológiai jellemzése követett. Ezen módosított szerkezettel rendelkező vegyületek a 13-as szénatom térállásának inverziója miatt ösztrogénhatással nem rendelkeznek.

2. Célkitűzés

Jelen kutatás elsődleges célja több, D-gyűrűben módosított ösztro-16 α ,17 α -oxazolin, valamint 16-metilén-13 α -ösztro-származék daganatellenes potenciáljának meghatározása volt. A vizsgált vegyületek kezdeti szűrését *in vitro* viabilitási vizsgálattal végeztük, amelyhez női emlő-, nőgyógyászati és fej-nyaki daganat eredetű humán adherens sejtvonalak paneljét alkalmaztuk. A legígéretesebb vegyület további vizsgálata több kiegészítő *in vitro* és *in vivo* módszert is magában foglalt annak érdekében, hogy részletesebb képet kapjunk antiproliferatív és antimetasztatikus tulajdonságairól, valamint hatásmechanizmusáról.

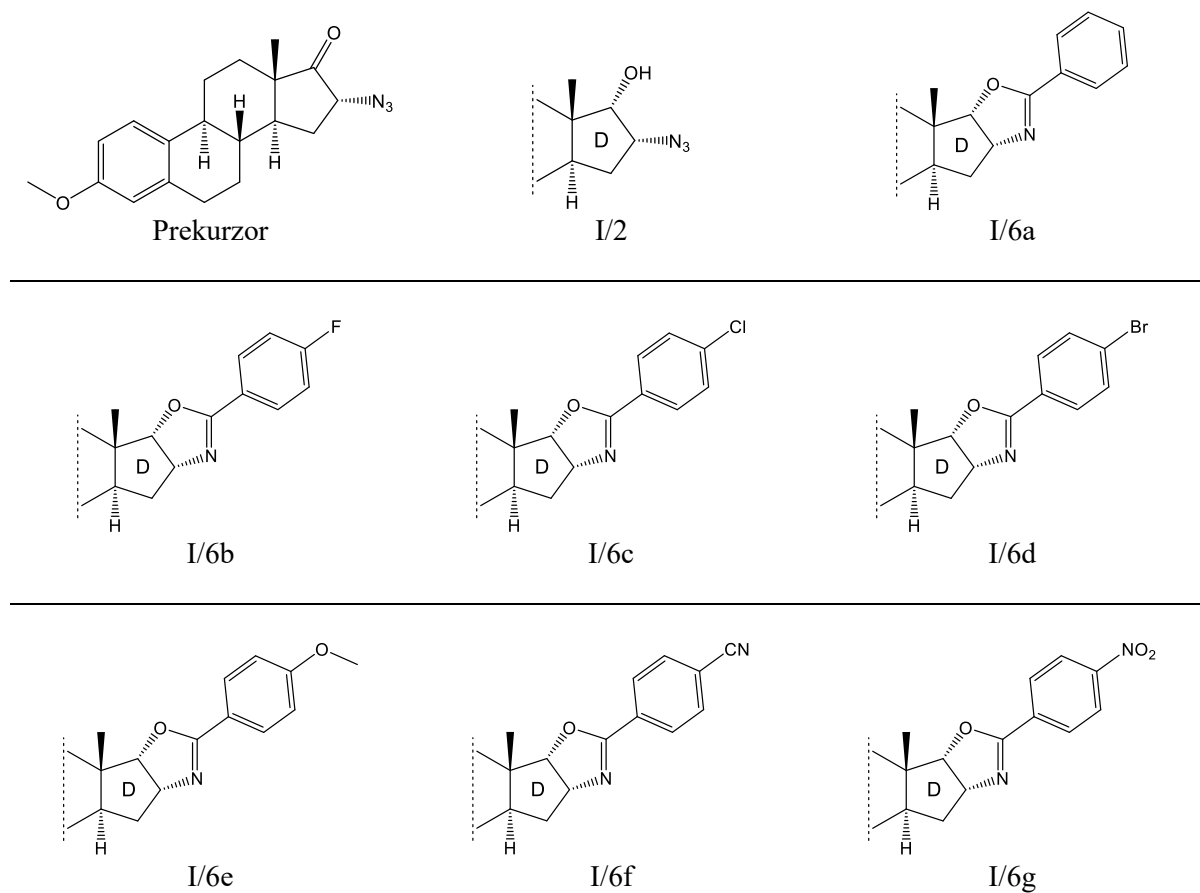
Ennek megfelelően az alábbi célokat tűztük ki:

- Kilenc, D-gyűrűben szubsztituált ösztro 16 α ,17 α -oxazolin-származék antiproliferatív potenciáljának vizsgálata humán adherens nőgyógyászati és női emlődaganat-sejtvonalakon MTT-vizsgálat alkalmazásával, valamint a leghatékonyabb vizsgált vegyületek IC₅₀ értékeinek meghatározása.
- Tizennégy 16-metilén-13 α -ösztro-származék antiproliferatív potenciáljának meghatározása humán adherens nőgyógyászati daganat-sejtvonalakon MTT-vizsgálattal, továbbá a leghatékonyabb vizsgált vegyületek IC₅₀ értékeinek meghatározása.
- A leghatékonyabb vizsgált vegyület ösztrogén-aktivitásának *in vitro* meghatározása luciferáz riportergén vizsgálat alkalmazásával, amelyhez egy kereskedelmi forgalomban elérhető, stabilan transzfektált T47D sejtvonal használtunk fel.
- Az ösztrogén-aktivitás vizsgálata *in vivo*, valamint a vizsgált vegyület hormonális tulajdonságainak feltérképezése uterotróf vizsgálat alkalmazásával.
- A legígéretesebb vegyület sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálata propídium-jodid alapú sejtciklus-analízissel.
- A leghatékonyabb vizsgált vegyület antimetasztatikus tulajdonságainak meghatározása sebgyógyulási (wound healing) és Boyden-kamrás vizsgálatok segítségével.

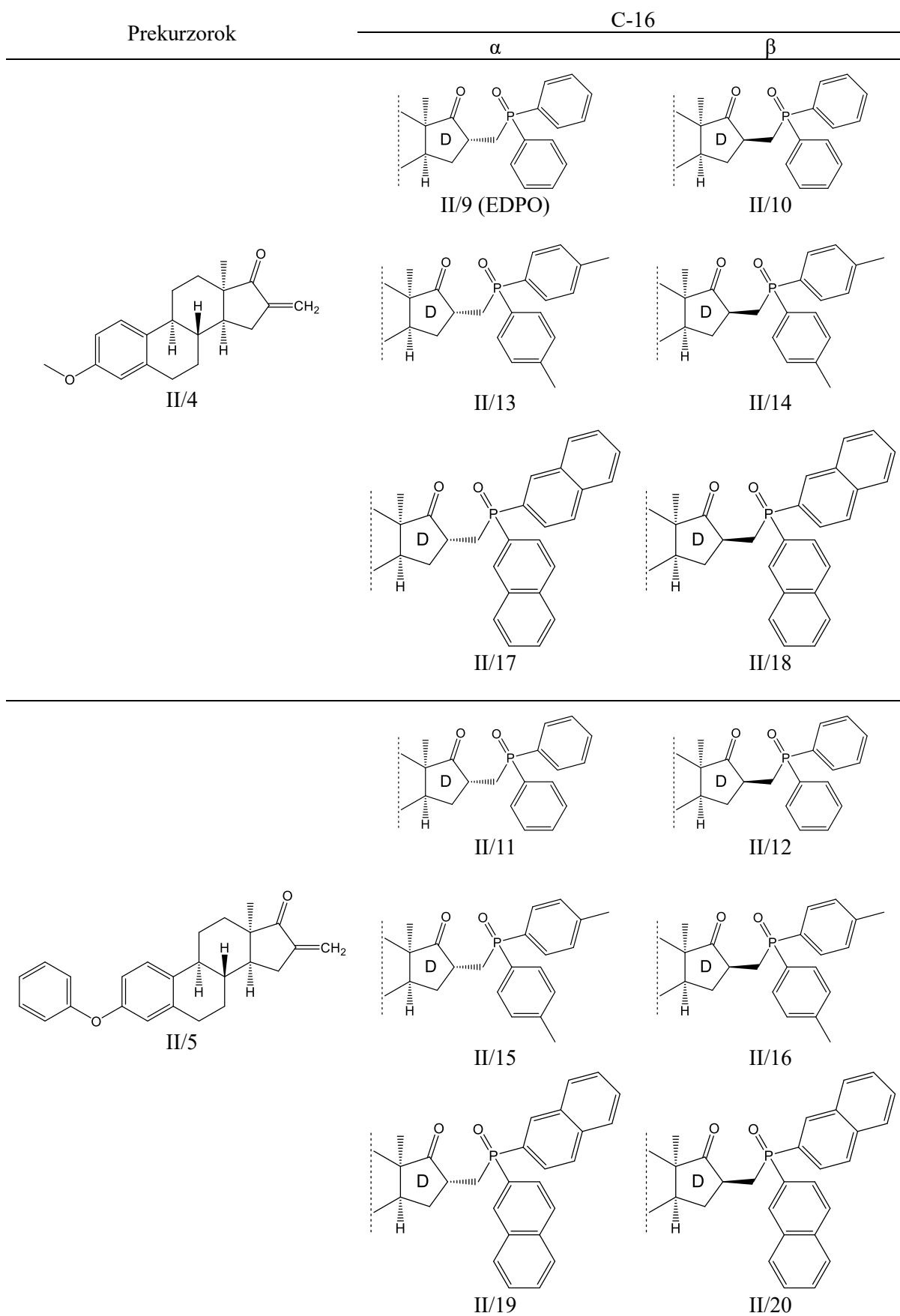
3. Anyagok és Módszerek

3.1. Az új, D-gyűrűben módosított ösztron-származékok szerkezeti képletei

A vizsgált ösztron 16 α ,17 α -oxazolin-származékokat (1. ábra), valamint a szerves foszfátcsoport-tartalmú 16-metilén-13 α -ösztion-származékokat (2. ábra) rendre Kiss és mtsi., illetve Mernyák és mtsi. szintetizálták, a korábban publikált eljárásoknak megfelelően.



1. ábra: A vizsgált ösztion 16 α ,17 α -oxazolin-származékok szerkezeti képletei



2. ábra: A vizsgált 16-metilén-13 α -öszttron-származékok szerkezeti képletei

3.2. Sejtvonalak

A tanulmány során az alábbi nőgyógyászati (HeLa, SiHa, C33A és A2780), női emlő (T47D, MCF-7 és MDA-MB-231), valamint fej-nyaki (UPCI-SCC-131, UPCI-SCC-154) eredetű humán adherens daganatsejtvonalakat alkalmaztunk a vizsgált vegyületek daganatellenes tulajdonságainak meghatározására. A tumorszelektivitás meghatározásához egér fibroblaszt (NIH/3T3) sejtvonalat használtunk. A sejteket minimális esszenciális médiumban (MEM) tenyésztettük, amelyet 10% főtális borjúsérummal (FBS), 1% nem esszenciális aminosav-keverékkel, 1% L-glutaminnal és 1% antimikrobiális keverékkel egészítettünk ki. Továbbá, az (anti)ösztrogén hatás meghatározására a T47D-KBluc sejtvonalat alkalmaztuk. Ezen a sejteket fenolvörös-mentes RPMI médiumban tenyésztettük, amely szintén az említett kiegészítőelemeket tartalmazta. Valamennyi sejtvonalat 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó, párásított légkörben inkubáltunk.

3.3. Antiproliferatív (MTT) vizsgálat

A vizsgált vegyületek antiproliferatív hatását a korábban ismertetett sejtvonal-panelen MTT-vizsgálat segítségével értékeltük. A daganatszelektivitás meghatározásához az NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat alkalmaztuk. A sejteket 10 vagy 30 µM koncentrációjú vegyületoldatokkal kezeltük, majd 72 órán át inkubáltuk. Ezt követően MTT-vizsgálatot végeztünk, és a minták abszorbanciáit sejtenyészítő lemez-olvasóval 545 nm hullámhosszon határoztuk meg. Az aktív vegyületek esetében (ha a sejtosztódás gátlása elérte az 50%-ot 10 vagy 30 µM koncentrációnál) a vizsgálatot hígítási sorozattal (0,1–30 µM) megismételtük. Az így kapott adatokra a GraphPad Prism 5.01 szoftver segítségével szigmoid koncentráció-hatás görbéket illesztettünk, majd kiszámítottuk a vegyületek IC₅₀ értékét. Referenciaanyagként ciszplatint alkalmaztunk.

3.4. Luciferáz riportergén vizagálat

A továbbiakban a vizsgálatok tárgyát képező EDPO elnevezésű vegyületnek, illetve annak 3-benziloxi-származékának (3-BEDPO) *in vitro* antiösztrogén hatását vizsgáltuk a T47D-KBluc sejtvonalon. Ez a sejtvonal egy olyan ERα-pozitív emlőrák modell, amely egy ösztrogénre érzékeny, stabilan transzfektált ERE-luciferáz riportergén kazettát hordoz magában. A sejteket 17β-ösztradiollal (E2), valamint fulvestranttal vagy a vizsgált vegyületekkel kezeltük 24 órán keresztül. A lumineszcenciát FLUOstar OPTIMA luminométerrel mértük. Az így kapott relatív lumineszcencia egységeket (RLU) százalékos

értékekre normalizáltuk, majd a GraphPad Prism 9.5.1 szoftver segítségével szigmoid koncentráció-hatás görbéket illesztettünk.

3.5. *In vivo* uterotróf vizsgálat

Az *in vitro* luminometriás analízis eredményeit követően célul tűztük ki az EDPO *in vivo* antiösztrogén hatásának vizsgálatát is. Ivaréretlen Sprague-Dawley patkányokat öt kísérleti csoportba osztottunk: vivőanyag (növényi olaj); E2 (0,1 µg/g E2); E2 + FULV (0,1 µg/g E2 + 0,3 µg/g fulvestrant); E2 + EDPO (60) (0,1 µg/g E2 + 60 µg/g EDPO); E2 + EDPO (600) (0,1 µg/g E2 + 600 µg/g EDPO), csoportonként 6-7 állattal. Három, egymást követő napon történő kezelés után, a negyedik napon, mély altatásban sebészi úton eltávolítottuk a méhszöveteket. A méhszövet minták nedves tömegét feljegyeztük, majd a kezelt csoportokban kapott eredményeket a pozitív kontrollcsoport adataival hasonlítottuk össze. Az állatkísérletet a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyezte (engedélyszám: IV./397/2023).

3.6. Sejtciklus-analízis

Az EDPO lehetséges hatásmechanizmusának vizsgálatára az ER α -pozitív T47D emlőrák sejtvonalban propídium-jodid alapú áramlási citometriával elemeztük a sejtciklus-eloszlást. A sejteket fulvestranttal vagy EDPO-val kezeltük 12, 24, 48 és 72 órán keresztül. Ezt követően a DNS-tartalmat CytoFLEX áramlási citométerrel, illetve a CytExpert szoftverrel határoztuk meg, mintánként 20 000 esemény rögzítésével. Az adatokat a ModFit LT 3.3.11 és a GraphPad Prism 5.01 szoftverek segítségével elemeztük. A kezeletlen sejtek kontrollként szolgáltak. A sub-G1 sejtpopulációt apoptotikus sejtekként azonosítottuk.

3.7. Sejtmigrációs (sebgyógyulási) vizsgálat

Az EDPO sejtmigrációra gyakorolt hatását sebgyógyulási vizsgálattal mértük meg, amely során speciális, kétkamrás inzerteket alkalmaztunk. A T47D sejteket az EDPO szubantiproliferatív koncentrációival kezeltük, majd a sebterület irányába történt sejtmozgást inverz fáziskontraszt mikroszkóppal (Nikon Eclipse TS100) követtük nyomon a kezelést követő 0., 24. és 48. órában. A sejtmigráció mértékét a fennmaradó sejtmentes terület mérésével határoztuk meg, és az adott időpontokban a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítottuk ImageJ szoftver segítségével.

3.8. Sejtinváziós (Boyden-kamrás) vizsgálat

A EDPO sejtinvázióra gyakorolt hatásának kiértékelésére Boyden-kamrás inváziós vizsgálatot végeztünk el. Ehhez vékony, porózus PET membránnal ellátott, Matrigel alapmembrán-mátrixszal bevont speciális inzerteket alkalmaztunk. A T47D sejteket az EDPO

szubantiproliferatív koncentrációival kezeltük 48 órán keresztül. Ezt követően a teljes membránról felvételeket készítettünk, és a sejtek inváziójának mértékét területméréssel számszerűsítettük. Végezetül a kezelt csoportokban kapott értékeket a kezeletlen kontrollokéval kapott adatokkal hasonlítottuk össze.

3.9. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai értékelését egyutas varianciaanalízissel (one-way ANOVA), majd Newman-Keuls-féle post-hoc teszttel végeztük a GraphPad Prism 5.01 vagy 9.5.1 szoftverek használatával. Az adatpontokat átlag $\pm$ standard hiba (SEM) vagy átlag $\pm$ szórás (SD) formájában fejeztük ki.

4. Eredmények

4.1. Antiproliferatív (MTT) vizsgálat

Amint azt korábban ismertettük, ebben a tanulmányban a D-gyűrűben módosított ösztrom-származékok két csoportját vizsgáltunk. A vegyületek kezdeti szűrését standard MTT-vizsgálat alkalmazásával végeztük.

4.1.1. Ösztrom 16 α ,17 α -oxazolin-származékok

Az újonnan szintetizált, D-gyűrűben módosított ösztrogén-analógok antiproliferatív hatását humán nőgyógyászati és női emlődaganat-sejtvonalak paneljén értékeltük. Ezek a tesztvegyületek a 16 α -azido-3-metoxi-ösztrom-1,3,5(10)-trién-17 α -ol származékai, és egy, a D-gyűrűhöz fuzionált oxazolin gyűrűt tartalmaznak, amely szubsztituált 2'-fenilcsoporttal rendelkezik. A sejtnövekedés-gátlási százalékok és az IC₅₀ értékek alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált vegyületek alacsony vagy közepes antiproliferatív aktivitást mutattak valamennyi vizsgált sejtvonalon. IC₅₀ értékeket kizárólag az I/6e és I/6g vegyületek esetében határoztunk meg, mivel csak ezek váltottak ki legalább 75%-os gátlást 30 μ M koncentrációnál. Az I/6e IC₅₀ értéke 13,0 μ M volt HeLa sejtekben, míg az I/6g IC₅₀ értéke 16,5 μ M volt az MCF-7 sejtekben (1. táblázat).

Vegyület.	Konc. (μM)	Növekedésgátlás; % $\pm$ SEM [számított IC ₅₀ érték; μM]	
		Hela	MCF-7
I/6e	10	35.02 $\pm$ 2.41	51.30 $\pm$ 2.03
	30	76.75 $\pm$ 1.12 [12.97]	71.07 $\pm$ 1.39
I/6g	10	32.88 $\pm$ 1.43	42.88 $\pm$ 2.08
	30	52.03 $\pm$ 2.63	80.76 $\pm$ 1.46 [16.52]
Cisplatin	10	42.61 $\pm$ 2.33	66.91 $\pm$ 1.81
	30	99.93 $\pm$ 0.26 [12.43]	96.80 $\pm$ 0.35 [5.78]

1. táblázat: A vizsgált ösztrom 16 α ,17 α -oxazolin-származékok antiproliferatív hatása

4.1.2. 16-metilén-13 α -ösztrom-származékok

A jelen tanulmányban tizenkét újonnan szintetizált, 16-os helyzetben szubsztituált, 13 α -ösztrom-alapú α - és β -ketofoszfín-oxid, valamint ezek prekursorainak *in vitro* antiproliferatív aktivitását vizsgáltuk humán nőgyógyászati és női emlődaganat-sejtvonalak, továbbá fej-nyaki daganatsejtvonalak paneljén. A tumorszelektivitás megállapítására nem daganatos egér embrionális fibroblaszt sejteket alkalmaztunk (2. táblázat).

Vegyület	Konc. (μM)	Növekedésgátlás; % $\pm$ SEM [számított IC ₅₀ érték; μM]				
		UPCI-SCC-131	MCF-7	MDA-MB-231	T47D	NIH/3T3
II/4	10	99.80 $\pm$ 0.36	99.52 $\pm$ 0.51	99.97 $\pm$ 0.71	99.68 $\pm$ 0.74	101.1 $\pm$ 0.67
	30	99.88 $\pm$ 0.39 [3.17]	99.83 $\pm$ 0.44 [3.70]	94.64 $\pm$ 2.26 [3.97]	99.92 $\pm$ 0.71 [3.46]	100.9 $\pm$ 0.71 [2.79]
II/5	10	99.54 $\pm$ 0.33	99.70 $\pm$ 0.43	97.15 $\pm$ 1.46	100.2 $\pm$ 0.28	100.8 $\pm$ 0.16
	30	99.94 $\pm$ 0.44 [2.38]	100.6 $\pm$ 0.31 [3.35]	98.57 $\pm$ 0.89 [4.07]	101.3 $\pm$ 0.47 [3.47]	100.3 $\pm$ 0.25 [2.74]
II/9 (EDPO)	10	63.42 $\pm$ 1.41	21.29 $\pm$ 2.79	–	57.45 $\pm$ 3.15	–
	30	99.35 $\pm$ 0.27 [5.30]	93.08 $\pm$ 1.60 [13.67]	99.03 $\pm$ 0.73 [23.49]	93.77 $\pm$ 0.55 [7.20]	96.55 $\pm$ 0.86 [20.44]
Cisplatin	10	95.63 $\pm$ 1.49	66.91 $\pm$ 1.81	–	40.41 $\pm$ 1.25	76.74 $\pm$ 1.26
	30	95.09 $\pm$ 1.57 [1.22]	96.80 $\pm$ 0.35 [5.78]	71.47 $\pm$ 1.20 [19.13]	56.84 $\pm$ 1.16 [19.24]	96.90 $\pm$ 0.25 [4.73]

2. táblázat: A vizsgált 16-metilén-13 α -ösztrom-származékok antiproliferatív hatása

(–: A növekedésgátlás kevesebb, mint 20%)

A két prekursor molekula (II/4 és II/5) valamennyi vizsgált sejtvonalon magas antiproliferatív aktivitást mutatott, azonban ezek a vegyületek a nem daganatos sejtek

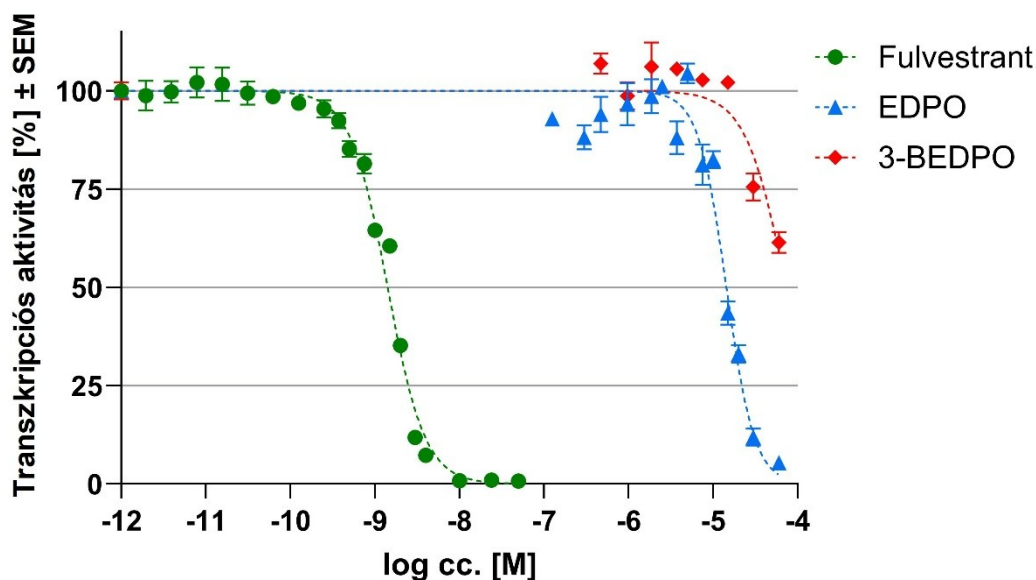
proliferációját is hasonló koncentrációkban gátolták, mint amelyek a daganatsejtek esetében szükségesek voltak, ami a tumorszelektivitás hiányára utal.

A prekursor molekulák C-16 helyzetben szubsztituált származékai közül a II/9 (EDPO) vegyület mutatta a legjelentősebb antiproliferatív aktivitást az UPCI-SCC-131 és a T47D sejtvonalakon, rendre 5,3 és 7,2 μM IC_{50} értékekkel. Az EDPO emellett jelentős tumorszelektivitást is mutatott: az NIH/3T3 sejtvonalon mért IC_{50} értéke 20,44 μM volt, amely megközelítőleg négyszer magasabb az UPCI-SCC-131, illetve háromszor magasabb a T47D sejtvonalakon mért értékeknél.

Az MTT-vizsgálat alapján az EDPO-t azonosítottuk a legerősebb és leginkább tumorszelektív vegyületként, amely kifejezett antiproliferatív aktivitást mutatott $\text{ER}\alpha$ -pozitív daganatsejtvonalakban. Legnagyobb mértékben a T47D és UPCI-SCC-131 sejteket gátolta, mérsékelt aktivitást mutatott az MCF-7 sejtekben, míg a tripla-negatív MDA-MB-231 sejtvonalon viszonylag gyenge hatást fejtett ki. Az EDPO szignifikánsan hatékonyabb volt daganatsejtekben, mint nem daganatos fibroblasztokban, ami kifejezett tumorszelektivitásra utal. Az $\text{ER}\alpha$ -expresszió és az IC_{50} értékek közötti inverz korreláció azt sugallja, hogy az EDPO preferenciálisan az $\text{ER}\alpha$ -pozitív sejteket célozza, alátámasztva azt a hipotézist, miszerint antiproliferatív hatása $\text{ER}\alpha$ -függő jelátvitelen keresztül valósulhat meg.

4.2. Luciferáz riportergén vizsgálat

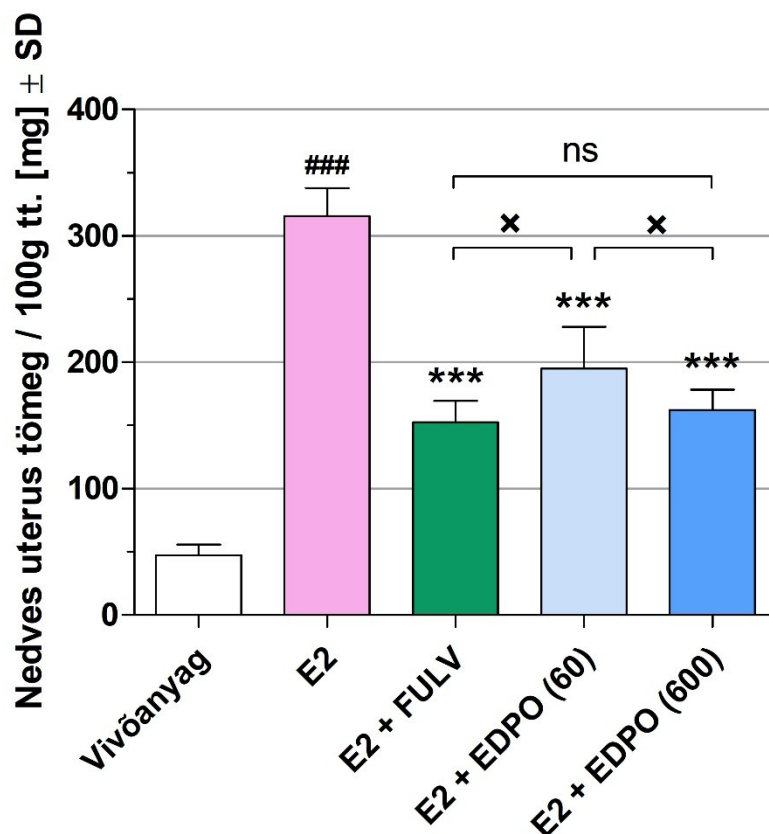
Hipotézisünk vizsgálatára az EDPO antiösztrogén tulajdonságait a fulvestrantéval összehasonlítva értékeltük a T47D-KBluc sejtvonalon. Az EDPO egyértelmű antiösztrogén aktivitást mutatott, koncentrációfüggő módon gátolva az ER α -mediált transzkripciót 10^{-5} M IC₅₀ értékkel, míg a 3-BEDPO esetében jelentősen alacsonyabb gátló hatást tapasztaltunk. Összehasonlításképpen a fulvestrant nagyságrendekkel nagyobb hatékonyságot mutatott, IC₅₀ értéke 10^{-9} M volt. Ezek az eredmények az EDPO-t, a 3-BEDPO-val ellentétben, hatékony ER α -antagonistaként azonosítják, amelynek gátlási profilja fulvestrantéhoz hasonló trendet mutat (3. ábra).



3. ábra: Koncentráció-hatás görbék az ERE-luciferáz gátlására fulvestrant, EDPO és 3-BEDPO alkalmazása esetén. A T47D-KBluc sejteket E2-vel és a vizsgált vegyületek valamelyikével együtt kezeltük és 24 órán át együtt inkubáltuk. Az adatpontok legalább három független kísérlet átlagát $\pm$ SEM értékeit mutatják.

4.3. *In vivo* uterotróf vizsgálat

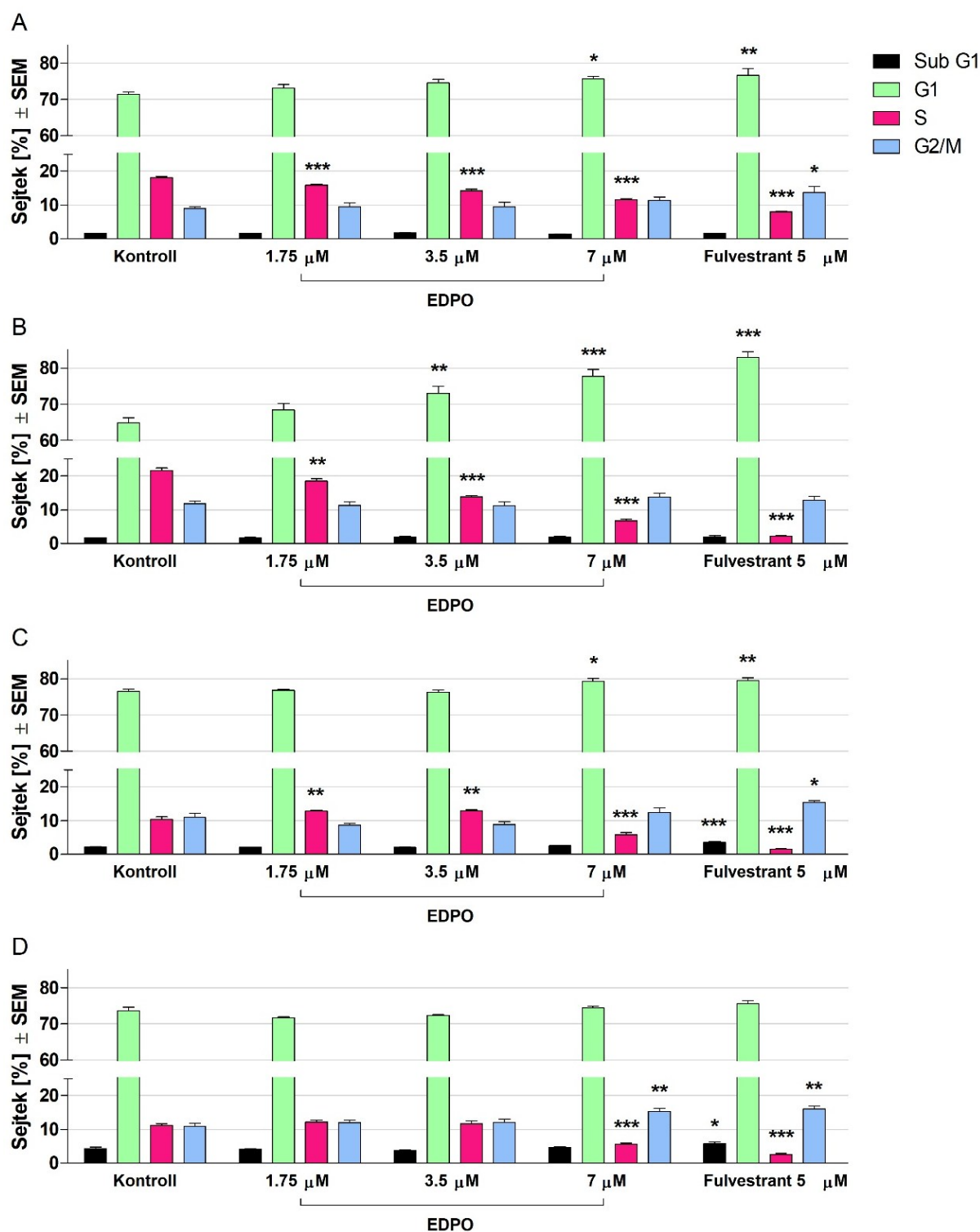
Az EDPO szignifikánsan, dózisfüggő módon gátolta az E2 által kiváltott méhnyövekedést *in vivo*, a referencia-antiösztrogén fulvestrant hatásához hasonló mértékben. Míg az E2-kezelés önmagában megközelítőleg hatszoros méhtömeg-növekedést idézett elő, az EDPO-val történő együttes kezelés jelentősen mérsékelte ezt a hatást, és a magasabb EDPO-dózis esetén nem mutatkozott szignifikáns különbség a fulvestranttal kezelt csoporthoz képest. Ezek az eredmények igazolják, hogy az EDPO hatékonyan gátolja az ER-mediált méhszövet-növekedést *in vivo* körülmények között (4. ábra).



4. ábra: A fulvestrant, illetve az EDPO ivaréretlen, nőtény Sprague-Dawley patkányok méhtömegére kifejtett hatása. A nedves méhtömegek mg-ban, 100 g testtömegre normalizálva, átlag ± SD formájában vannak feltüntetve. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val történt. A szignifikáns különbségeket ### jelöli, ahol $p < 0,001$ a vivőanyag csoporthoz képest; ***, ahol $p < 0,001$ az E2-csoporthoz képest; ×, ahol $p < 0,05$ az E2 + FULV és az E2 + EDPO (60) csoportok, valamint az E2 + EDPO (60) és E2 + EDPO (600) csoportok összehasonlításában; ns: nem szignifikáns ($n = 6$).

4.4. Sejtciklus-analízis

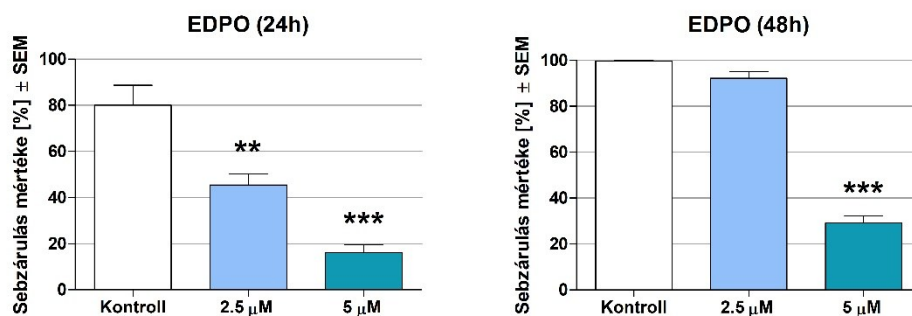
Az EDPO jelentős idő- és koncentrációfüggő G1-fázisú sejtciklus-leállást indukált T47D sejtekben, amelyet a G1-populáció növekedése és az S-fázisú sejtek arányának egyidejű csökkenése jellemzett. Ez a hatás leginkább a 24 órás kezelést követően volt megfigyelhető, amikor valamennyi vizsgált koncentrációnál egyértelmű G1-felhalmozódás jelentkezett. Pozitív kontrollként fulvestrantot alkalmaztunk (5. ábra).



5. ábra: Az EDPO által kiváltott G1-fázisú sejtciklus-megállás a fulvestrantéval összehasonlítva, 12 (A), 24 (B), 48 (C) és 72 óra (D) inkubációt követően T47D sejteken. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val történt; *, ** és *** a $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$ szignifikanciaszinteket jelölik a kezeletlen kontrollmintákhoz viszonyítva.

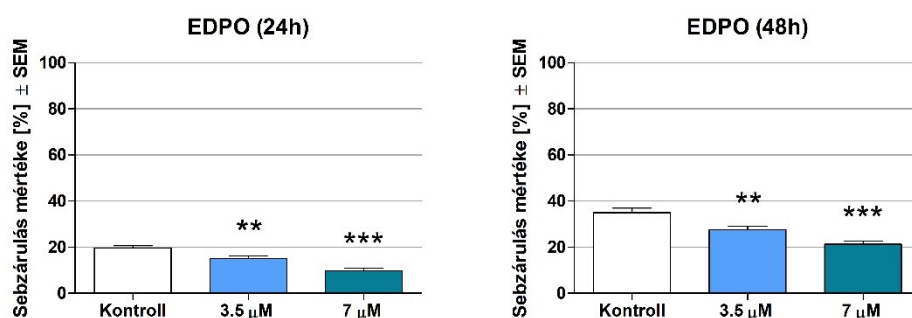
4.5. Sejtmigrációs (sebgyógyulási) vizsgálat

Az EDPO szignifikánsan gátolta a sejtmigrációt mind az UPCI-SCC-131, mind a T47D sejtvonalakon idő- és koncentrációfüggő módon, annak ellenére, hogy ezek a sejtvonalak eltérő intrinszik migrációs képességekkel rendelkeznek. Az UPCI-SCC-131 sejtekben 24 óra elteltével mindkét koncentrációnál szignifikáns gátlást figyeltünk meg, míg 48 óra elteltével ez a hatás csak a magasabb koncentrációnál maradt fenn (6. ábra).



6. ábra: Az EDPO hatása az UPCI-SCC-131 sejtek migrációjára 24 és 48 órás inkubációt követően. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val történt, ahol ** és *** a $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$ szignifikanciaszinteket jelölik a kezeletlen kontrollmintákhoz képest.

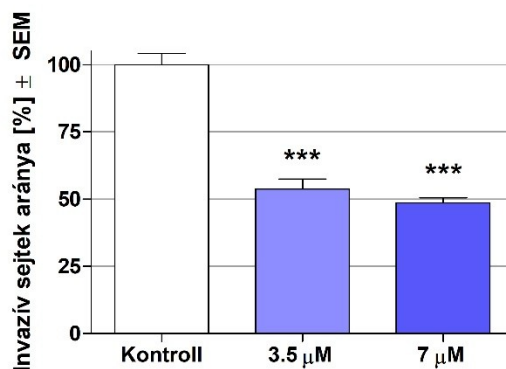
A T47D sejtek esetében, bár a sejtmigráció gátlására irányuló hatás kevésbé volt szembetűnő, a sejtvasorlás mértéke mindkét koncentrációnál és vizsgált időpontban szignifikánsan csökkent a kontrollcsoportéhoz képest (7. ábra). Összegezve, eredményeink az EDPO erőteljes migrációgátló hatását igazolják a különböző tumorsejt-modellekben.



6. ábra: Az EDPO hatása a T47D sejtek migrációjára 24 és 48 órás inkubációt követően. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val történt, ahol ** és *** a $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$ szignifikanciaszinteket jelölik a kezeletlen kontrollmintákhoz képest.

4.6. Sejtinváziós (Boyden-kamrás) vizsgálat

Az EDPO szignifikánsan csökkentette a T47D sejtek invazív képességét, a sejtek inváziójának mértékét mindkét vizsgált koncentrációnál megközelítőleg a kontrollérték 50%-ára csökkentve. Ez a gátló hatás szignifikáns volt, azonban statisztikailag igazolható koncentrációfüggő összefüggést nem mutatott (8. ábra).



8. ábra: Az EDPO hatása a T47D sejtek inváziójára 48 órás inkubációt követően. A statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val történt; *** $p < 0,001$ szignifikanciát jelez a kezeletlen kontrollmintákhoz viszonyítva.

5. Diszkusszió

Az emlődaganatok túlnyomó többségét az ER-pozitív (ER+) altípus alkotja, amelynek kialakulását alapvetően az ER α -mediált ösztrogénjelátvitel határozza meg. Ez a jelátviteli útvonal a sejtszaporodásban, túlélésben és a metasztatikus progresszióban szerepet játszó gének expresszióját szabályozza. Bár az endokrin terápiák – így a SERM-ek, az aromatázgátlók és a SERD-ek – jelentősen csökkentették a mortalitást és a kiújulás kockázatát, az intrinszik és szerzett rezisztencia gyakori megjelenése korlátozza hosszú távú hatékonyságukat.

A klinikai tapasztalatok azt mutatják, hogy még az új generációs, célzott endokrin szerek, beleértve az orálisan alkalmazható SERD-eket és a kombinációs kezeléseket (például CDK4/6- vagy PI3K-gátlókkal) is, bár javítják a progressziómentes túlélést, nem szüntetik meg teljes mértékben a rezisztenciát vagy a kiújulás kockázatát, valamint gyakran jelentős toxicitással bírnak. Ez a kihívás olyan új terápiás szerek kifejlesztését ösztönzi, amelyek esetében továbbra is fennmarad vagy erősödik az ösztrogén jelátvitelt gátló hatás, miközben mérséklődik a mellékhatások, illetve a rezisztencia kialakulásának kockázata. Az új, ésszerűen megtervezett szteroidalapú vegyületek ígéretes stratégiát jelenthetnek ezen hiányosságok kiküszöbölésére.

Jelen vizsgálatban két, D-gyűrűben módosított ösztroon-származék vegyületcsoport antiproliferatív hatását vizsgáltuk különböző női emlő-, nőgyógyászati és fej-nyaki eredetű daganatos sejtvonalakon. A vizsgált vegyületek közül a II/9 (EDPO) mutatta a legkedvezőbb aktivitás-szelektivitás kombinációt, IC₅₀ értékei az UPCI-SCC-131 és a T47D sejtvonalakon összevethetők voltak a ciszplatinéval. Az EDPO további *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok tárgyát képezte annak érdekében, hogy feltárjuk lehetséges hatásmechanizmusát.

Az egyes vegyületek ER α -mediált transzkripciós aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatára a T47D-KBluc riportersejtvonalat alkalmaztuk. Ebben a rendszerben az EDPO egyértelmű gátló hatást mutatott az E2 által indukált transzkripciós aktivációval szemben, amely összehasonlítható volt a klinikumban is alkalmazott antiösztrogén, a fulvestrant hatásával. Ezen eredmények értelmében kijelenthetjük, hogy az EDPO hatékonyan gátolja az ER α -függő génexpressziót.

További vizsgálatunkban kimutattuk, hogy az EDPO dózisfüggő módon csökkenti az E2 által kiváltott méhtömeg-növekedést. A méh tömegének csökkenése azt jelzi, hogy az EDPO fiziológiás körülmények között is hatékonyan mérsékli az ER α aktivitását, és hatékonysága egy jól bevált kemoterápiás szerével összemérhető.

Mindemellett, *in silico* molekuláris dokkolási vizsgálatok alapján azt is kimutattuk, hogy az EDPO ER α -hoz való kötődési profilja is hasonló a fulvestrantéhoz. Az E2-vel ellentétben, amely a 12-es hélix (H12) agonista konformációban történő stabilizálásával aktiválja az ER α -t, az EDPO és a fulvestrant olyan kulcsfontosságú hidrogénkötéseket alakítanak ki, amelyek a H12 konformációváltozását indukálják, ezzel gátolva a koaktivátorok kötődését. Az EDPO, a fulvestranthoz hasonlóan, a hatás szempontjából fontos aminosav-oldallánccal (E353 és R394) stabilizáló hidrogénkötéseket alakít ki, valamint a T347 oldallánccal egy további kötést létesít, amelyek feltehetően fokozzák ezen vegyületek antiösztrogén hatását.

Ezek az eredmények együttesen erős bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az EDPO antiösztrogén aktivitását az ER α -n és annak downstream jelátviteli útvonalainak gátlásán keresztül fejti ki.

Az ösztrogén-mediált sejtosztódás a G1/S sejtciklus-átmenet nélkülözhetetlen szabályozóinak, többek között a ciklin D1, az MDM2 és a c-Myc gyors indukcióján keresztül valósul meg, amelyek együttesen fokozzák a retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációját, az E2F1 aktivációját és ezzel a sejt S-fázisba lépését. Ezzel szemben a p53-p21 tengely központi ellenőrzőpontként működik azáltal, hogy gátolja a ciklin-CDK komplexek aktivitását és a pRb-t sejtosztódás-gátló állapotban tartja. Ennek az egyensúlynak a felborulása, gyakran a c-Myc által közvetített p21-represszió és az MDM2 által kiváltott p53-gátlás révén, kontrollálatlan proliferációhoz vezet a daganatsejtekben. Összhangban a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint a fulvestrant az MDM2 downregulációján keresztül G1-fázisú sejtciklus-megállást indukál, jelen vizsgálatban mind a fulvestrant, mind az EDPO jelentős G1-fázisú sejtciklus-megállást váltott ki T47D sejtekben. Ezek az eredmények alátámasztják az EDPO

antiösztrogén profilját, és arra utalnak, hogy antiproliferatív hatása az ösztrogének által szabályozott G1/S ellenőrzőpont gátlásán keresztül valósul meg.

ER α -pozitív emlőrákban az ösztrogének nemcsak a sejtszaporodást serkentik, hanem az ER α -függő jelátviteli útvonalakon keresztül fokozzák a sejtek migrációs és invazív viselkedését is. Az ER α aktiválása egy Gai/G $\beta\gamma$ -mediált jelátviteli kaszkádot indít el, amelyben egy ER α -ból, c-Src-ből, PI3K-ből és FAK-ból álló multiprotein komplex alakul ki, ami FAK-foszforilációhoz és az N-WASP downstream aktivációjához vezet. Ezzel párhuzamosan a PI3K-jelátvitel elősegíti a cdc42 aktivációját, amely a foszfoinozítid-jelátvitellel együttesen serkenti az Arp2/3 komplexet és az aktinváz átrendeződését. Ezek az összehangolt citoskeletális folyamatok képezik az ER α -pozitív emlőráksejtekre jellemző fokozott motilitás és invazivitás alapját. Kísérleteink során az EDPO hatékonyan csökkentette a sejtmigrációt és inváziót ER α -pozitív sejtvonalakban. Mivel a daganatsejtek fokozott migrációja és inváziója elősegíti a metasztatikus progressziót, amely a daganatos halálozások fő oka, az e folyamatokat hatékonyan gátló vegyületek ígéretes daganatellenes terápiás jelöltek.

Legutóbbi publikációnkban írtuk le, hogy az EDPO hatékonyan gátolta a tumor növekedését egy 4T1 egér tripla-negatív emlőrák modellben is, annak ellenére, hogy ebben a daganattípusban nem expresszálódik az ER α . Bár az ER α -negatív daganatokat hagyományosan ösztrogénre nem reagálónak tekintik, egyre több bizonyíték utal arra, hogy az ösztrogének közvetett módon, az immunmikrokörnyezet modulálásán keresztül is elősegíthetik a tumorprogressziót. Az E2 serkenti a mieloid prekursorok immunszuppresszív mieloid eredetű szupresszor sejtekké történő differenciálódását, és közvetlenül gátolja a citotoxikus T-limfociták aktivitását, ezáltal immunszuppresszív tumormikrokörnyezetet alakít ki. Ezzel összhangban a fulvestranttal történő ösztrogénjelátvitel-gátlás a 4T1 modellben csökkenti a tumornövekedést és fokozza a tumorelles immunválaszt. Ezen megfigyelések magyarázatot adhatnak az EDPO ER-negatív *in vivo* tumormodellekben is kiváltott gátló hatására.

Összefoglalva, a jelen tanulmányban leírtak igazolják, hogy az ösztroon váz célzott kémiai módosítása előnyös, mert daganatellenes hatékonysággal és tumorszelektivitással rendelkező származékok létrejöttéhez vezethet. A vizsgált vegyületek közül az EDPO ígéretes hatóanyag-jelöltként emelkedik ki, amely kettős, antiproliferatív és antimetasztatikus hatással rendelkezik, melyet (legalább részben) az ER α antagonizmusán keresztül fejt ki. Ezek az eredmények jó kiindulási alapot teremtenek az ösztroon-alapú daganatellenes hatóanyagok további optimalizálásához, és új lehetőségeket kínálnak hatékony gyógyszerjelöltek kifejlesztésére mind a hormonfüggő, mind a hormonfüggetlen daganatok ellen.

A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPZŐ TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

- I. Kiss A, Jójárt R, Mernyák E, **Bartha S**, Minorics R, Zupkó I, Schneider G. Novel preparation of substituted oxazolines condensed to D-ring of estrane skeleton and characterization of their antiproliferative properties. *Steroids*. **176**, 108911 (2021).
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108911>
IF: 2.76 / Q2
- II. Mernyák E, **Bartha S**, Kóczán L, Jójárt R, Resch V, Paragi G, Vágvölgyi M, Hunyadi A, Bruszel B, Zupkó I, Minorics R. Microwave-assisted Phospha-Michael addition reactions in the 13 α -oestrone series and *in vitro* antiproliferative properties. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **36**, 1931-1937 (2021).
DOI: <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1963241>.
IF: 5.756 / Q2
- III. **Bartha S**, Germán P, Bózsity N, Puskás LG, Börzsei R, Hetényi C, Zupkó I, Mernyák E, Minorics R. Biological and computer-aided evaluation of 3-methoxy-13 α -estrone-16 α -diphenylphosphine oxide as a new antiestrogenic agent. *Sci Rep*. **15**, 44295 (2025).
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-27905-x>
IF: 3.9 / Q1

TOVÁBBI TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

- i. Ristovski (Trifunović) J, Minorics R, **Bartha S**, Janković N, Zupkó I. The evaluation of the anticancer activity of the Biginelli hybrids and pharmacokinetic profiling based on their retention parameters. *J Mol Struct*. **1254**, 132373 (2022).
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132373>.
IF: 3.8 / Q2

Összesített impakt faktor: 16.216