

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Gyógyszerhatástan, biofarmácia, klinikai gyógyszerészet Ph.D. program
Programvezető: Dr. habil. Zupkó István Ph.D.

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
Témavezető: Dr. habil. Zupkó István Ph.D.

Molnár Judit

TRIAZOL CSOPORTOT TARTALMAZÓ SZTEROID VEGYÜLETEK
ANTIPROLIFERATÍV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Falkay György

Tagok: Dr. Földesi Imre

Dr. Puskás László

Bíráló bizottság:

Elnök: Dr. Révész Piroska

Opponensek: Dr. Tekes Kornélia

Dr. Molnár József

Tagok: Dr. Szakonyi Gerda

Dr. Szakonyi Zsolt

BEVEZETÉS

Mivel a tumoros megbetegedések a vezető halálokok között a második helyet foglalják el világszerte a kardiovaszkuláris betegségeket követően, hatékony kezelésük fejlesztése jelenleg az egyik legnagyobb kihívások közé tartozik. 184 ország epidemiológiai adatainak áttekintése alapján globálisan az új rákos megbetegedések száma 2030-ra 23,6 millióra fog növekedni, mely 68%-os növekedést jelent a 2012-es adatokhoz viszonyítva.

A hormondependens tumorok esetében, mint emlő-, méh-, petefészek-, prosztata- és endometrium rákok, a szteroid receptorok fokozott expressziója nagymértékben vesz részt a sejtproliferációban. A szteroidok tumorelles szerekként több módon fejthetik ki hatásukat. Lehetnek enzim inhibitorok, mint szteroid szulfatáz inhibitorok, aromataz inhibitorok (AIs) és 17β -hidroxiszteroid dehidrogenáz inhibitorok és ligandok, melyek az endogén hormonokkal versengenek az ösztrogén receptorokért (ER), például antiösztrogének (szelektív ösztrogén receptor modulátorok (SERMs) és szelektív ösztrogén receptor down-regulátorok (SERDs)).

Az ösztrogének a tumor növekedésének fő faktorai, elsősorban emlő tumor esetében. A természetes eredetű 2-metoxi-ösztadiol az ösztadiol fő metabolitja nőkben és férfiakban egyaránt, a konverziót a katekol-O-metiltranszferáz katalizálja. A 2ME-nak nincs ösztrogén aktivitása és számos tanulmány kimutatta tumorelles tulajdonságait (antiproliferatív, proapoptotikus és citotoxikus aktivitás) és lehetséges kardiovaszkuláris előnyeit.

A szteroidokat tartalmazó növények az új tumorelles szerek legváltozatosabb és ígéretesebb forrásai közé tartoznak. A növényi tartalomanyagok kiemelkedő szerepet játszanak az új vezérmolekulák megtalálásában. A biológiai aktivitással és széleskörű szerkezeti diverzitással rendelkező hatóanyagok értékes forrását kínálják, ezáltal az új gyógyszerek fejlesztéséhez biztosítanak fontos kiindulási vegyületeket. A természetes eredetű szívglikozidok digitális fajokból származó szteroidok. A digitoxin és digoxin kardiológiai hatásaik mellett tumorelles hatásokkal is rendelkeznek.

A triazol gyűrűt tartalmazó vegyületek széleskörű farmakológiai aktivitásokkal rendelkeznek. A triazol gyűrű számos, a terápiában is használatos hatóanyagban is megtalálható, mint például a trazodonban, a rizatriptánban, a hexakonazolban és az alprazolámban.

Az apoptózis vagy programozott sejthalál a soksejtű szervezetek fejlődésének normális alkotóeleme. Az apoptózis során a sejtek ellenőrzött körülmények között pusztulnak el és az apoptotikus sejtek morfológiai és biokémiai markerek révén detektálhatók. Az apoptózist számos sejten kívüli és sejten belüli jel is aktiválhatja, ebben a folyamatban a kaszpázok kiemelkedő fontosságúak. A proapoptotikus kaszpázoknak két csoportja létezik, az iniciátor kaszpázok csoportja: 2, 8, 9 és 10 és a végrehajtó vagy effektor kaszpázok csoportja: 3, 6 és 7.

A kaszpáz-8 kiemelkedő fontosságú az apoptózis extrinszik útvonalában, melynek során az apoptózist kiváltó jel az ún. halálreceptorok felől érkezik. Az apoptózis intrinszik útvonalának része a kaszpáz-9, melyet a mitokondrium felől jövő jelek aktiválnak. Az iniciátor kaszpázoknak az aktiválódásukhoz specifikus aktiváló fehérjékhez kell kapcsolódniuk. Ezt követően az aktív iniciátor kaszpázok proteolitikus hasítás révén aktiválják az effektor kaszpázokat, melyek ezáltal kiváltják az apoptózist. A G2/M jelútvonal fontos szerepet játszik a sejtciklusban, mivel ez az ellenőrzőpont szabályozza a sejtek mitózisba (M-fázis) való belépését. Ha nem funkcionál a G2/M ellenőrzőpont, a sejtek még azelőtt belépnek a mitózisba mielőtt kijavítanák a DNS károsodásokat és ez kontrollálatlan sejtosztódáshoz és genetikai hibák kialakulásához vezet. A sejtciklust ciklinek és ciklindependes kinázok (CDK) szabályozzák, a G2/M ellenőrzőpont esetén a ciklinB-cdc2 (CDK1) komplex. A DNS károsodása az ATM/ATR kinázok aktivációját váltja ki, mely a Chk kinázon keresztül a ciklinB/CDK1 komplexet inaktiválja. A Chk kináz a cdc25-öt annak foszforilációján keresztül inaktiválja, melynek fontos szerepe van a CDK1 aktiválásában annak defoszforilációján keresztül.

CÉLKITŰZÉSEK

A jelen vizsgálataink célja triazol csoportot tartalmazó, D gyűrűben módosított szteroid vegyületek antiproliferatív tulajdonságainak meghatározása:

Az újonnan szintetizált 15, 16, 17-es helyzetben triazol gyűrűvel szubsztituált ösztán és androsztán származékok antiproliferatív hatásának vizsgálata *in vitro*, humán tumoros sejtvonalakat használva és a vegyületek szerkezet – hatás összefüggéseinek feltárása.

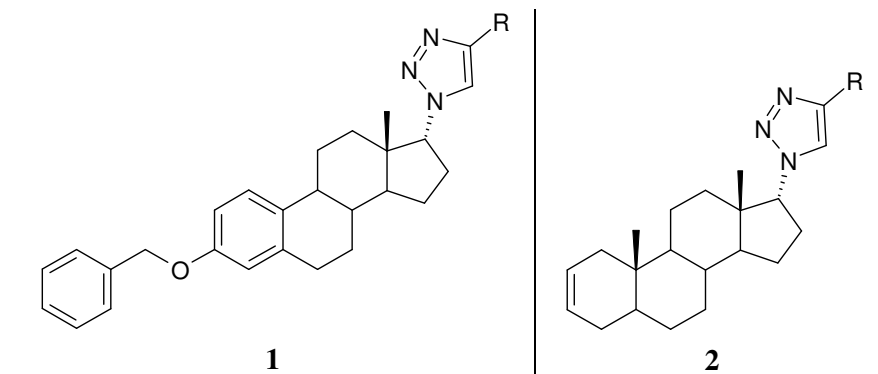
A leghatásosabb vegyületeket kiválasztottuk további *in vitro* kísérletsorozatra a lehetséges hatásmechanizmus leírása érdekében. Az alkalmazott módszerek a következők voltak: sejtciklus analízis, fluoreszcens mikroszkóppal végzett morfológiai vizsgálat HOPI kettős festést követően, kaszpáz-3, -8 és -9 enzim aktivitás mérés, a sejtciklust szabályozó faktorok expressziójának vizsgálata RT-PCR és Western blot technika segítségével.

A leghatásosabb vegyületek tumorszelektivitását humán fibroblaszt sejtek életképességére kifejtett hatása révén jellemeztük.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

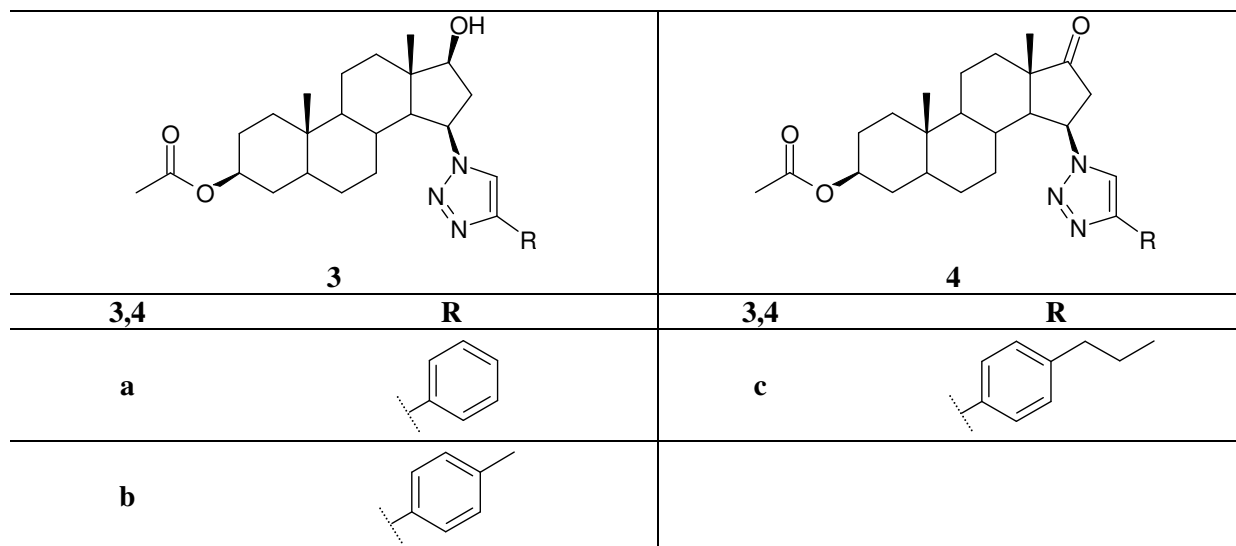
Újonnan szintetizált, a D-gyűrűn triazol gyűrűvel szubsztituált szteroid származékok kémiai szerkezete

A vizsgált vegyületek első csoportját (1-2) a 17 α -triazol szteroid analógok képezték. A vizsgált vegyületek ösztron és androsztán vázzal rendelkeznek és mindkét vegyületsor esetében a D-gyűrű 17-es szénatomjához kapcsolódik a triazol gyűrű.



1. ábra 17 α -triazol szteroid analógok szerkezete

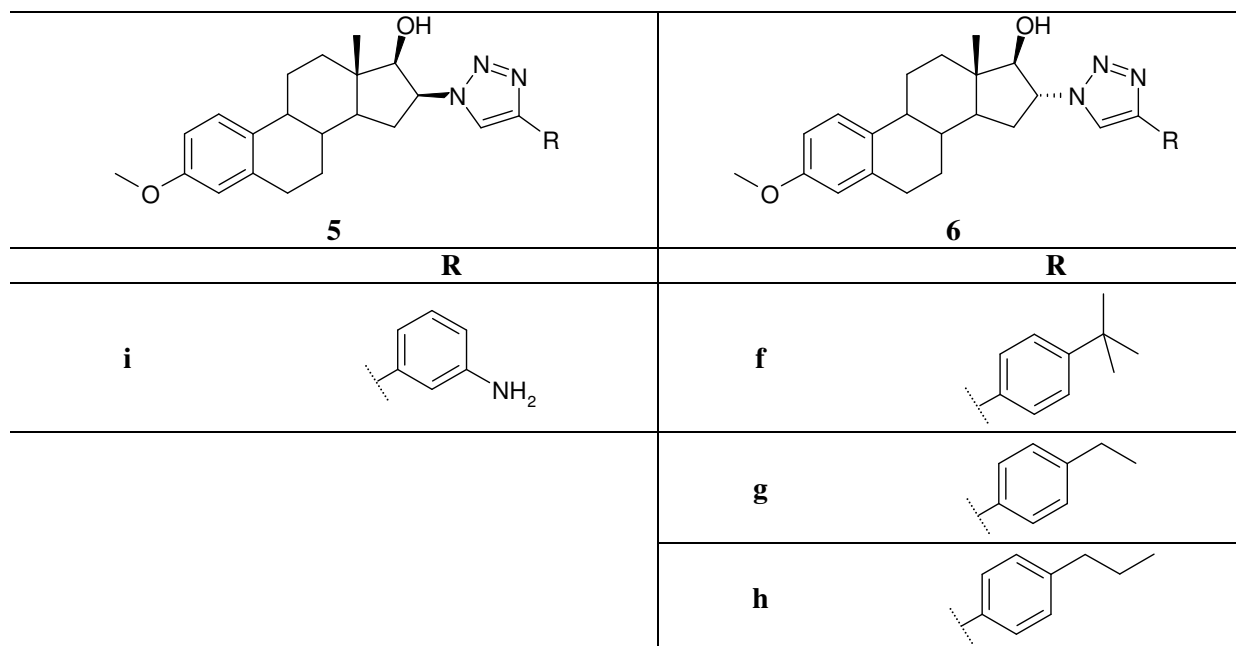
A vizsgált vegyületek második csoportjába (3-4) a 15 β -triazol-5 α -androsztán analógok tartoznak. A vizsgált vegyületek androsztán vázzal rendelkeznek, melyek A-gyűrűje a 3-as helyzetben acetoxi funkciós csoportot tartalmaz. Az analógok a 17-es helyzetű -OH és =O csoportokban térnek el egymástól. A triazol gyűrű a D-gyűrű 15-ös szénatomjához kapcsolódik.



2. ábra A leghatásosabb 15 β -triazol-5 α -androsztán analógok szerkezete

A vizsgált vegyületek harmadik csoportjába (5-6) a 16-triazol ösztron epimerek tartoznak. A vizsgált vegyületek ösztron vázzal rendelkeznek, melyek A-gyűrűje a 3-as helyzetben metoxi

funkciós csoportot tartalmaz. A triazol gyűrű a D-gyűrű 16-os szénatomjához kapcsolódik, melyen keresztül különböző funkciós csoportok kapcsolódnak a vegyületekhez.



3. ábra A leghatékonyabb 16-triazol szteroid analógok szerkezete

Sejtvonalak és sejtenyésztés

A vizsgált vegyületeket HeLa (cervix adenokarcinóma), A431 (bőr adenokarcinóma), MCF7 (emlő adenokarcinóma) és nem tumoros MRC-5 főtájsl tüdő fibroblaszt sejteken teszteltük. Az sejteket minimális esszenciális médiumban (MEM) tenyésztjük 10% főtájs borjúszerummal, 1-1% nem esszenciális aminosav és antibiotikum-antimikotikum keverékkel kiegészítve 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében.

MTT vizsgálat

A tesztanyagok sejtekre kifejtett antiproliferatív hatását kolorimetriásan MTT módszer segítségével határoztuk meg. A sejteket 96-os lemezre telepítettük ki 5000 sejt/üreg denzitással, egy éjszakán át állni hagytuk, majd hozzáadtuk a vizsgálandó vegyületeket tartalmazó médiumot. A sejtek életképességét 72 órás inkubációt követően 20 µL MTT-oldat (5 mg/mL) hozzáadásával határoztuk meg. A 4 órás inkubáció során kicsapódott formazán kristályokat 100 µl DMSO-ban oldottuk fel, majd az abszorbancia értékeket 545 nm-en határoztuk meg ELISA olvasó segítségével. Valamennyi kísérlet esetében két egymástól független vizsgálatot végeztünk öt párhuzamos üreggel, referencia vegyületként ciszplatint használtunk. A mért értékekre szigmoid dózis-hatás görbét illesztettünk, majd kiszámítottuk az IC₅₀ értékeket GraphPad Prism 4.0 program segítségével.

Áramlási citometria analízis

A sejtek DNS tartalmát a DNS-hez kötődő propídium-jodid (PI) segítségével, áramlási citometriás analízis során vizsgáltuk. A sejteket a tesztanyagok különböző koncentrációival kezeltük be és inkubáltuk 24 és 48 órán át, majd a mintákat FACStar segítségével vizsgáltuk. Minden egyes mérésnél 20.000 sejtet vizsgáltunk, a sejtek százalékos megoszlását a sejtciklus különböző fázisaiban (subG1, G1, S and G2/M) winMDI 2.8 programmal határoztuk meg.

Hoechst 33258-propídium jodid kettős festés

A sejteket 96-os üregű lemezre telepítettük ki, majd a tesztanyagok különböző koncentrációival kezeltük be 24 órán át. Az inkubációt követően hozzáadtuk a sejtekhez a festékoldatot. A Hoechst 33258 és PI végkoncentrációi 5 és 3 $\mu\text{g/mL}$ voltak. A festés lehetővé teszi az élő, a korai és késői apoptotikus, valamint a nekrotikus sejtek azonosítását. A HO bejut az élő sejtbe és kékre festi a sejtmagot. A membrán integritásának elvesztésekor a sejtek felveszik a propídium jodidot, a sejtmagot pirosra festve.

Kaspáz-3, -8 és -9 enzim aktivitás meghatározása

A kaspáz-3, -8 és -9 enzimek aktivitását beszerezhető kolorimetriás kit segítségével határoztuk meg Ac-DEVD-*pNA*-t, Ac-IETD-*pNA*-t és Ac-LEHD-*pNA*-t használva szubsztrátként. A vizsgálat során a peptid szubsztrátokat a kaspáz-3, -8 és -9 enzimek hasították *pNA* (*p*-nitroanilin) felszabadulást eredményezve, melyet 405 nm-es hullámhosszúságon mértünk. A HeLa sejteket a tesztanyagok 3, 10 és 30 μM -os koncentrációival kezeltük be 24 órán át; a kezeletlen sejtek kontroll sejteknek feleltek meg.

Reverz transzkriptáz (RT-PCR) vizsgálatok

Az apoptózis kiváltásában szerepet játszó markerek, mint Bax, Bcl-2, valamint a sejtciklus G2/M átmenet szabályozásában szerepet játszó faktorok, mint ciklin dependens kináz 1 (CDK1), cdc25B, ciklinB1 és ciklinB2 mRNS szintű expresszióját RT-PCR technika segítségével határoztuk meg a tesztanyagokkal kezelt HeLa sejtekből. A sejtekből 24 órás inkubáció után totál RNS-t izoláltunk, majd cDNS-t preparáltunk reverz transzkriptáz (RT) jelenlétében. Kontrollként humán gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (hGAPDH) primert használtunk valamennyi minta esetében.

Western blot vizsgálatok

A leghatékonyabb tesztanyagoknak a foszforilált és total stathmin funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálatához azok fehérje szintű expresszióját Western blot vizsgálattal végeztük. A HeLa sejteket 48 órás kezelésnek vetettük alá. Teljes sejt extraktumot készítettünk, a proteint 4–12% NuPAGE Bis–Tris Gelen elektroforizáltuk, majd nitrocellulóz membránra vittük iBlot Gel Transfer System segítségével. Az antitest kötődés detektálása WesternBreeze Chemiluminescent Western blot immunodetection kit segítségével történt.

EREDMÉNYEK

17 α -triazol származékok antiproliferatív hatása

Az ösztron származékok (**1a–j**) szerény hatással rendelkeznek, ezek a vegyületek még nagyobb koncentrációban is kevesebb, mint 60%-os proliferáció gátló hatást fejtenek ki a sejtekre. Az androsztán sorozat (**2a–j**) hatékonyabban gátolta a sejtosztódást. Mivel az analóg vegyületek szerény antiproliferatív hatással rendelkeznek, nem végeztünk velük további vizsgálatokat.

15 β -triazol-5 α -androsztán származékok antiproliferatív hatása

Az MTT vizsgálat eredményei alapján a **3a–c**, **4a** és **4b** vegyületeket választottuk ki további vizsgálatokra hatásmechanizmusuk feltárása érdekében.

16 α -triazol-ösztron származékok antiproliferatív hatása

Az antiproliferatív hatásaik alapján, az **5i** és **6f–h** vegyületeket választottuk ki további vizsgálatok elvégzésére, valamint tumorszelektivitásukat is jellemeztük. Mind a 4 szteroid szerény hatást fejtett ki a nem tumoros fibroblaszt MRC5 sejtek proliferációjára. Az **5i** és **6h** vegyületek nem tudtak 50%-os gátlást elérni 30 μ M-ig.

Táblázat 1. A leghatékonyabb vegyületek antiproliferatív hatása

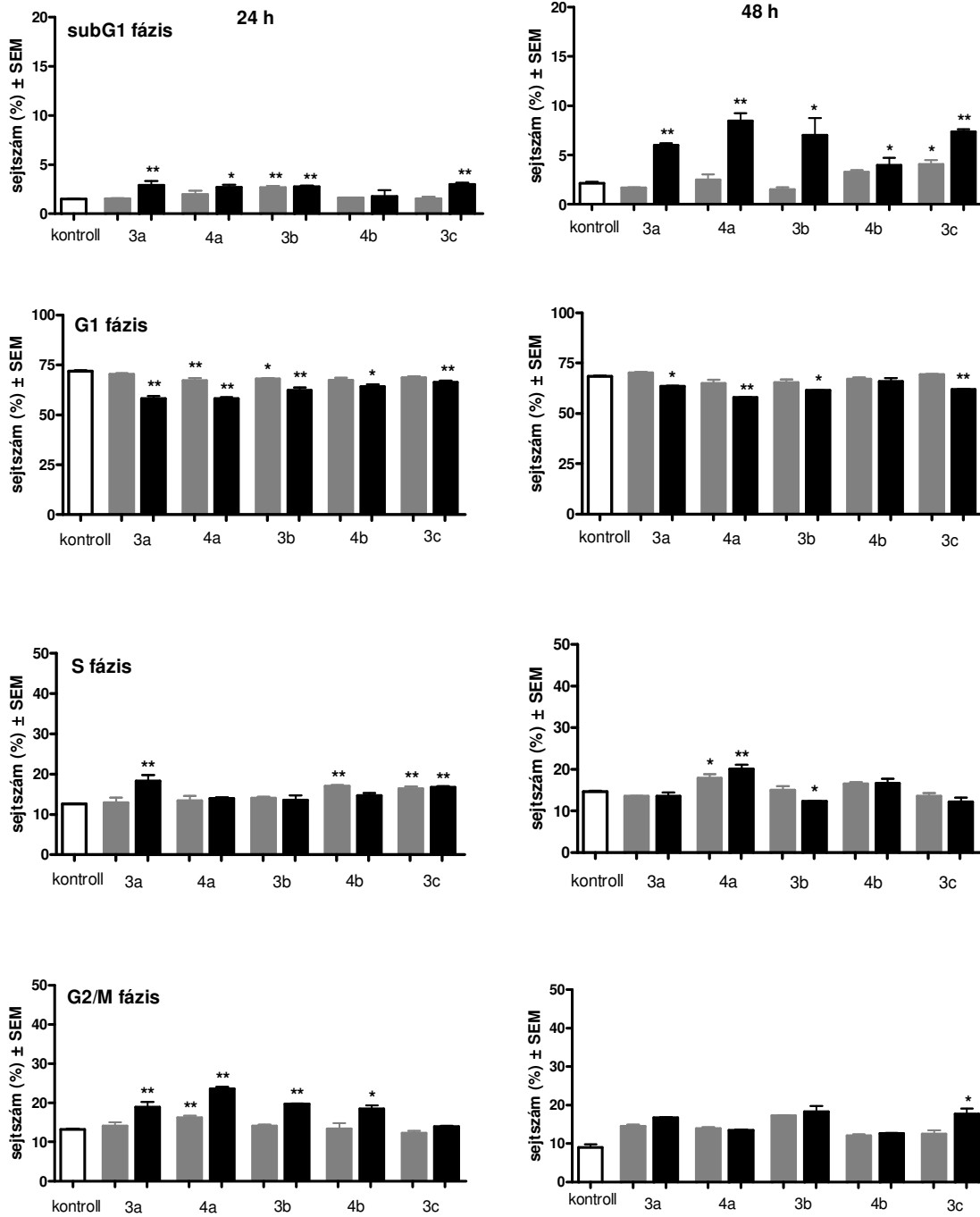
Vegyületek	IC ₅₀ értékek (μM)			
	HeLa sejtek	MCF-7 sejtek	A431 sejtek	MRC5 sejtek
3a	7.70	19.24	20.69	n.d.
3b	9.40	10.28	22.43	n.d.
3c	6.52	>30	>30	n.d.
4a	9.16	1.69	9.69	n.d.
4b	10.27	2.68	10.66	n.d.
5i	13.85	14.88	11.75	>30
6f	5.08	7.88	6.77	17.64
6g	8.69	10.78	10.68	17.07
6h	12.11	>30	>30	>30

15β-triazol-5α-androsztán származékok sejtciklusra kifejtett hatása

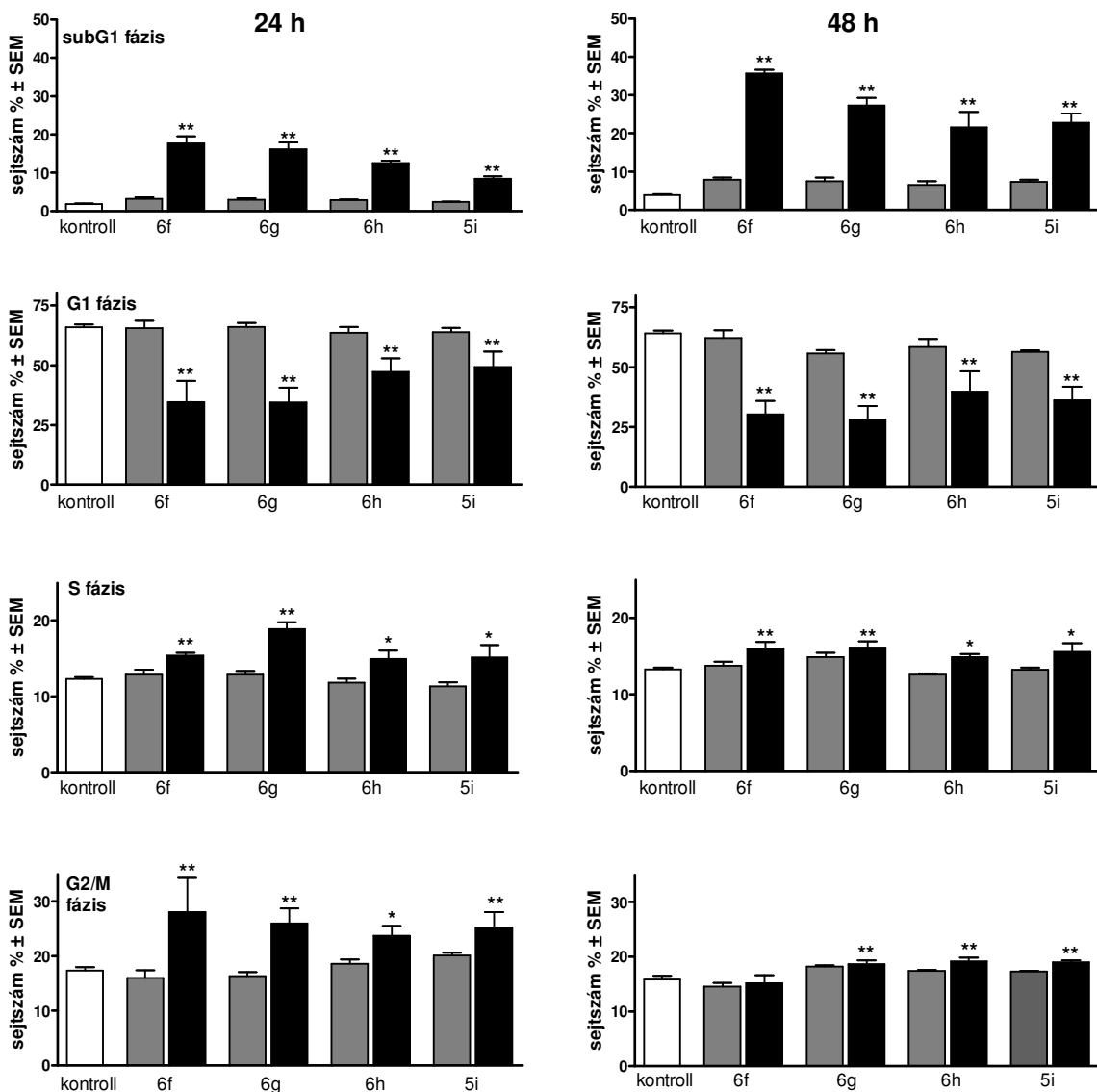
24 órás kezelést követően koncentráció függő csökkenés volt tapasztalható a G1 fázisú sejtpopulációban, a G2/M fázisú sejtek viszont növekedést mutattak (4. ábra). A **3c** vegyület nem volt hatással a G2/M fázisra, viszont növelte a sejtek arányát a sejtciklus szintetikus (S) fázisában. A **3a–c** és **4a** vegyületek mérsékelten, de szignifikáns mértékben növelték a hipodiploid (subG1) fázisú sejtek mennyiségét, ami rendszerint az apoptotikus populációnak felel meg. Ez az apoptotikus populáció még kifejezettebb lett 48 órás kezelést követően.

16α-triazol-öszttron származékok sejtciklusra kifejtett hatása

A kiválasztott öszttron analógokkal történő kezelést követően koncentráció függő növekedés következett be a subG1 fázisú sejtek mennyiségében, ami kifejezettebbé vált 48 órás inkubáció után. Ugyanakkor a G1 fázis nagymértékben lecsökkent, miközben a szintetikus S és a G2/M fázis szerény, de szignifikáns növekedést mutatott (5. ábra).



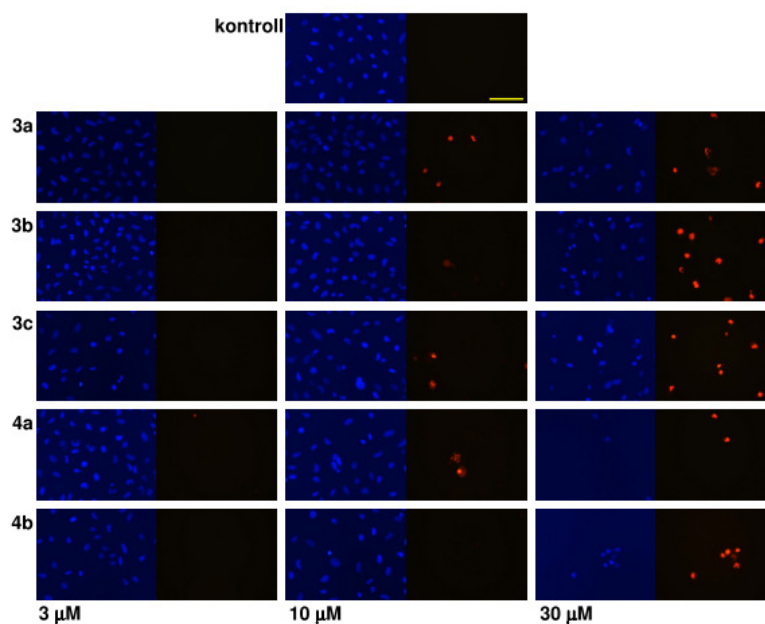
4. ábra A **3a-c** és **4a-b** vegyületek hatása a HeLa sejtek sejtciklus eloszlására 24 (bal oldal) és 48 órás (jobb oldal) kezelés után. A szürke és a fekete oszlopok a 3 és 10 μM-os koncentrációkat jelölik. *és ** $p < 0.05$ és $p < 0.01$ a kontroll sejtekhez viszonyítva.



5. ábra A **6f**, **6g**, **6h** és **5i** vegyületek hatása a HeLa sejtek sejtciklus eloszlására 24 (bal oldal) és 48 órás (jobb oldal) kezelés után. A szürke és a fekete oszlopok a 3 és 10 μM-os koncentrációkat jelölik. *és ** $p < 0.05$ és $p < 0.01$ a kontroll sejtekhez viszonyítva.

15β-triazol-5α-androsztán származékok sejt morfológiára kifejtett hatása

Morfológiai változások, mint a sejtmag kondenzációja, az apoptotikus testek megjelenése és a sejtmembrán permeabilitásának növekedése volt észlelhető koncentráció függő módon az apoptózis és nekrozis bizonyítékaként. A 15β-triazol-5α-androsztán származékokkal történő 24 órás kezelés után a sejtmag kondenzációja és a sejtmembrán permeabilitás növekedésének koncentráció függő változása volt észlelhető, melyet a kék és piros fluoreszcencia jelöl (6. ábra).



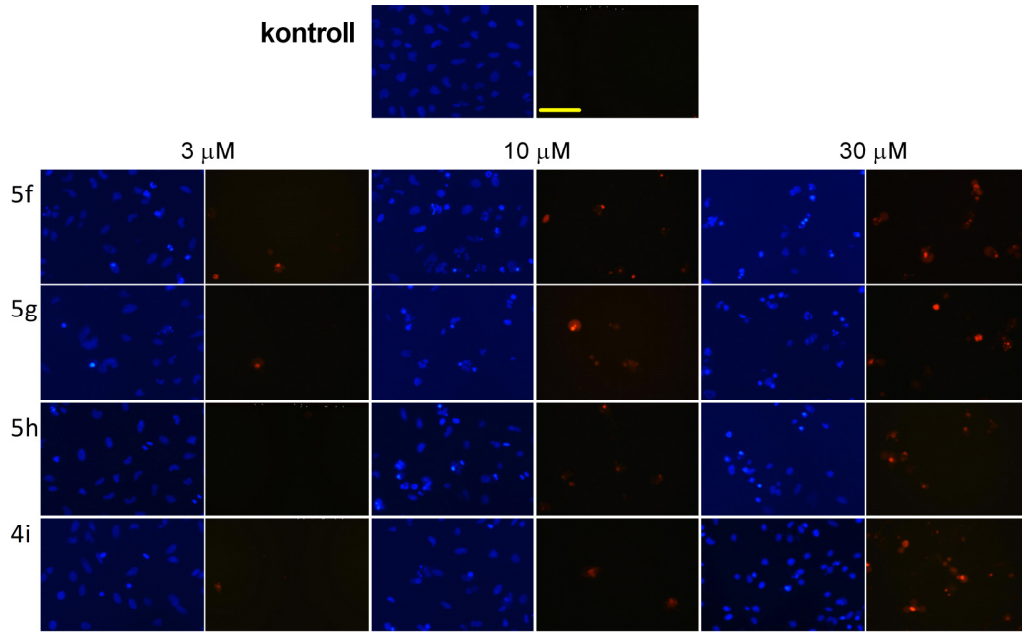
6. ábra Fluoreszcens mikroszkóppal készített fotók Hoechst 33258 – propídium jodid kettős festést követően. Ugyanarról a látótérrel két fotó készült a két markert külön szemléltetve. A HeLa sejteket médiummal (kontroll) és a **3a–c** és **4a–b** vegyületekkel kezeltük 3, 10 és 30 μM -os koncentrációkban. A kék fluoreszcencia (bal panel) a HO, a piros színeződés (jobb panel) pedig a sejt PI felvételének az eredménye. A vonal a kontroll képen 100 μm -t jelöl.

16 α -triazol- α -sztron származékok sejt morfológiára kifejtett hatása

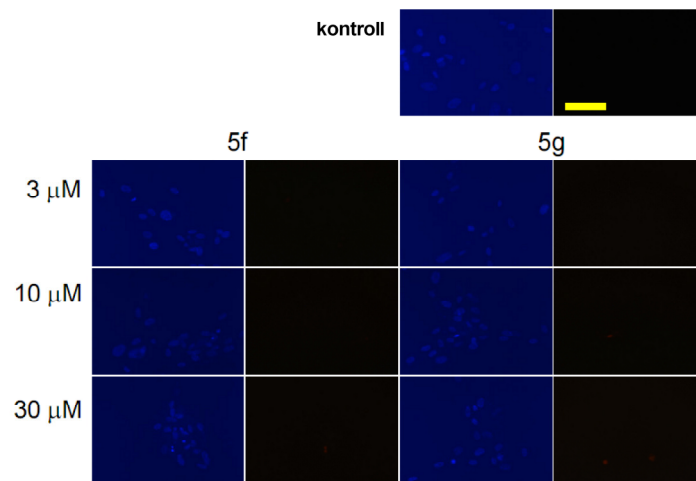
A 16 α -triazol- α -sztron származékok közül négy vegyület (**5i**, **6f**, **6g** és **6h**) váltott ki korai apoptózist, amit a megnövekedett membrán permeabilitás nélkül lezajló sejt mag kondenzáció is bizonyít. A membrán permeabilitásának zavara csak magasabb koncentrációkban volt észlelhető sejt mag kondenzáció nélkül, ami a vegyületek nekrozist kiváltó képességét mutatja (7. ábra). Két kiválasztott szteroidot (**6f** and **6g**) a nem tumoros MRC5 sejt vonalon is leteszteltük (8. ábra). Sejt mag kondenzáció csak elszórtan jelentkezett magasabb koncentrációknál (10 vagy 30 μM) PI-os festődés nélkül.

Kaspáz-3, kaspáz-8 és kaspáz-9 enzim aktivitás vizsgálat

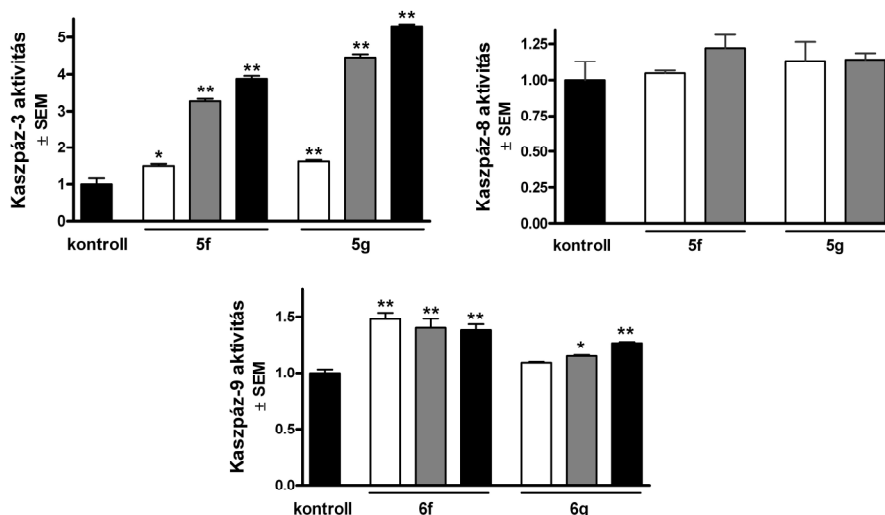
A sejt ciklus analízis és HO-PI kettős festés eredményeit alapul véve, meghatároztuk két kiválasztott vegyületnek (**6f** és **6g**) az apoptózis kulcsenzimeinek aktivitására (kaspáz-3, kaspáz-8 és kaspáz-9) kifejtett hatását. Mindkét szteroid analóg aktiválta a végrehajtó kaspáz-3 enzimet koncentráció függő módon 24 órás kezelést követően (9. ábra). Az iniciátor kaspáz-9 enzim aktivitása szintén szignifikánsan növekedett mindkét vegyület hatására. Másrészt, egyik tesztanyag sem váltott ki szignifikáns kaspáz-8 enzim aktivitást.



7. ábra Fluoreszcens mikroszkóppal készített fotók Hoechst 33258 – propídium jodid kettős festést követően. Ugyanarról a látótérrel két fotó készült a két markert külön szemléltetve. A HeLa sejteket médiummal (kontroll) és a **5f**, **5g**, **5h** és **4i** vegyületekkel kezeltük 3, 10 és 30 μM-os koncentrációkban. A kék fluoreszcencia a HO (bal oldali panel), a piros színeződés pedig a sejt PI (jobb oldali panel) felvételének az eredménye. A vonal a kontroll képen 100 μm-t jelöl.



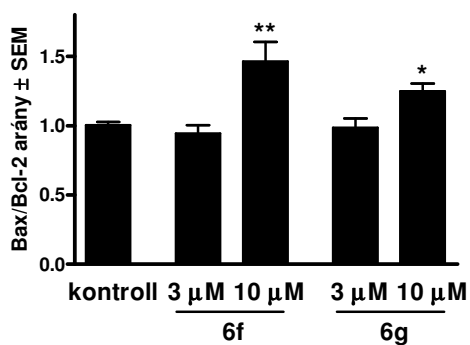
8. ábra Fluoreszcens mikroszkóppal készített fotók Hoechst 33258 – propídium jodid kettős festést követően. Ugyanarról a látótérrel két fotó készült a két markert külön szemléltetve. Az MRC5 sejteket médiummal (kontroll) és a **5f** és **5g** vegyületekkel kezeltük 3, 10 és 30 μM-os koncentrációkban.



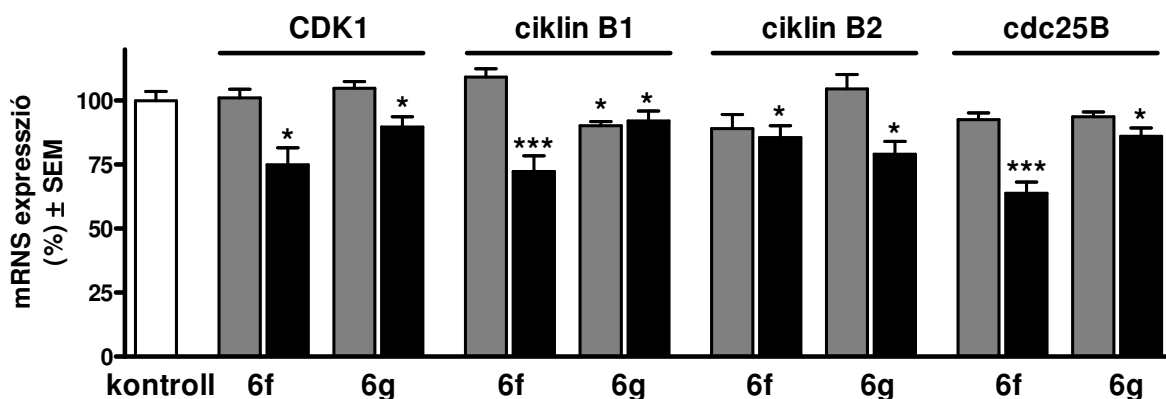
9. ábra A kaspáz-3, kaspáz-8 és kaspáz-9 enzimek aktivitásának kiváltása a **6f** és **6g** vegyületekkel 24 órás kezelést követően. A fehér, a szürke és a fekete oszlopok a 3, 10 és 30 μ M-os koncentrációkat jelölik. *és ** $p < 0.05$ és $p < 0.01$ a kontroll sejtekhez viszonyítva.

RT-PCR vizsgálatok

A sejtciklus G2/M átmenet szabályozó faktorainak (CDK1, ciklinB1, ciklinB2 és cdc25B) és az apoptózis mitokondriális útvonal kiváltásában szerepet játszó kulcsfontosságú faktorainak (Bax és Bcl-2) mRNS-szintű expresszióját RT-PCR technika segítségével határoztuk meg. A Bax/Bcl-2 arány szignifikánsan magasabb volt nagyobb koncentrációnál a két leghatékonyabb vegyület esetében (10. ábra). Ez az apoptózis mitokondriális útvonalának kiváltásában játszik szerepet. A G2/M átmenetben résztvevő négy kiválasztott faktor a magasabb koncentrációval (10 μ M) történő kezelést követően csökkenést mutatott. Továbbá, a ciklinB1 mRNS-szintű expressziója a **6g** vegyület esetében már 3 μ M-os kezelést követően szignifikánsan alacsonyabb volt (11. ábra).



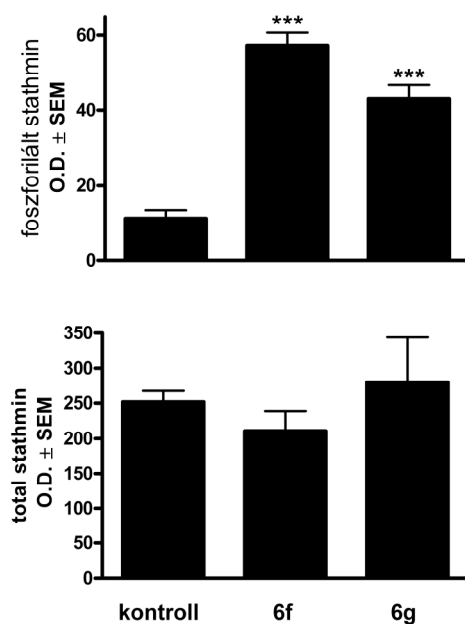
10. ábra A **6f** és **6g** vegyületek hatása a Bax/Bcl-2 arányra HeLa sejtek esetében 24 órás kezelést követően. *és ** $p < 0.05$ és $p < 0.01$ a kontroll sejtekhez viszonyítva.



11. ábra A CDK1, cyclin B1, cyclin B2 és cdc25B mRNS-szintű expressziója 3 (szürke oszlop) és 10 (fekete oszlop) μM -os kezelést követően a **6f** és **6g** vegyületek esetében. *, ** és *** $p < 0.05$, $p < 0.01$ és $p < 0.001$, a kontroll sejtekhez viszonyítva

Western blot vizsgálat

A **6f** és **6g** vegyületekkel történő 10 μM -os 48 órás kezelést követően a foszforilált stathmin, egy mikrotubulus destabilizáló protein, fehérje expressziója szignifikánsan csökkent a kezeletlen kontroll sejtekhez képest (12. ábra). Másrésről a total stathmin esetében nem észleltünk semmilyen szignifikáns változást.



12. ábra A **6f** és **6g** (10 μM) vegyületek hatása a foszforilált stathmin (felső panel) és a total stathmin (alsó panel) fehérje expressziójára HeLa sejtek esetében 48 órás kezelést követően Western blot vizsgálattal meghatározva. Az eredmények átlagérték \pm SEM értékben vannak kifejezve, két párhuzamos mérés alapján, $n = 6$. *** $p < 0.001$, a kontroll sejtekhez viszonyítva.

DISZKUSSZIÓ

A triazol gyűrű egy öt szénatomos heterociklus, mely három nitrogén atomot tartalmaz. A triazolt tartalmazó vegyületek, mint az anasztrozol és letrozol kiemelkedő hormonellenes hatású gyógyszerek és nagy mennyiségű triazolt tartalmazó vegyület született az elmúlt években, mint tumorellenes hatású gyógyszerjelölt. Ismert tumorellenes szerek szerkezeti módosítása triazol funkció beépítésével a farmakológiai jellemzők (hatékonyság, szelektivitás) javulásához vezethet. Különböző innovatív szteroid szerkezetű vegyületek csoportjait teszteltük antiproliferatív tulajdonságaikat vizsgálva, melyek triazol gyűrűt tartalmaznak farmakofor csoportként a D gyűrű különböző pozícióiban.

Míg a 17 α -triazol származékok szerény aktivitást mutattak, addig a 15- és 16-triazol szteroidok jelentős hatásokkal rendelkeznek. A leghatékonyabb analógokat további vizsgálatoknak vetettük alá, hogy jellemezzük hatásmechanizmusukat. A kiválasztott négy vegyülettel (**5i**, **6f**, **6g** és **6h**) történő 24 órás kezelés, még a legalacsonyabb koncentrációban (3 μ M) is sejtmag kondenzációt eredményezett minimális vagy sejtmembrán permeabilitás változás nélkül, ami az apoptózis morfológiai markere. Az életképességi vizsgálat és fluoreszcens festés intakt humán fibroblaszt sejteken azt mutatta, hogy a négy kiválasztott molekulából kettő (**6f** és **6g**) mutat magasabb IC₅₀ értéket a nem tumoros sejteken, szemben a malignus sejtekkel és nem vált ki nagymértékű membrán károsodást 30 μ M-ig. A kiválasztott vegyületek közül a következő (**5i**) nem vált ki 50%-os gátlást fibroblaszt sejteken 30 μ M-ig és a negyedik vegyület (**6h**) HeLa sejtekre szelektívnek bizonyult. Az áramlási citometriát a kezelt sejtek sejtciklus eloszlásának kvantitatív jellemzésére használtuk. A leghatékonyabb vegyületek növelték a hipodiploid (subG1) populációt koncentráció- és időfüggő módon. A DNS csökkent megfesthetősége a progresszív DNS vesztés következményének tekinthető, ami az endonukleáz aktivitásnak és a fragmentumok eliminációjának, mint az apoptózis részeként bekövetkező ön-lebomlásnak a következtében jön létre. A két kiválasztott vegyület a kaszpázok aktivációs mintázata alapján az apoptózis az intrinszik útvonalát idézik elő. A kaszpáz-9 aktivációja kevésbé kifejezettnek látszik, ami nem szokatlan, mivel ez az enzim a kaszkád elején található, míg a kaszpáz-3 a végső eleme és ennek következtében egy amplifikációs termék is. A Bcl-2 és Bax arányát általában az apoptózis-túlélés arány markerének tekintik. A két kiválasztott vegyület (**6f** és **6g**) nagyobb koncentrációban a Bax/Bcl-2 arány szignifikáns növekedését eredményezte, megerősítve az észlelt apoptózis mitokondriális eredetét. A CDK1, ciklinB1, ciklinB2 és CDC25 expressziója szignifikánsan csökkent, jelezve, hogy a beavatkozás a sejtciklus szabályozásába valószínűleg magasabb regulációs szinten történik. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az ösztron-váz

alkalmas szerkezeti elemnek tekinthető a továbbiakban innovatív antiproliferatív gyógyszerek tervezésekor.

FÜGGELÉK

Értekezés alapját képező közlemények:

1. Frank É, Molnár J, Zupkó I, Kádár Z, Wölfling J: Synthesis of novel steroidal 17α -triazolyl derivatives via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, and an evaluation of their cytotoxic activity in vitro. *Steroids* **76**: 1141-8 (2011)
2. Kádár Z, Molnár J, Schneider G, Zupkó I, Frank É: A facile 'click' approach to novel 15β -triazolyl- 5α -androstane derivatives, and an evaluation of their antiproliferative activities in vitro. *Bioorg Med Chem* **20**: 1396-402 (2012)
3. Molnár J, Frank É, Minorics R, Kádár Z, Ocsovszki I, Schönecker B, Wölfling J, Zupkó I: A click approach to novel D-ring-substituted 16α -triazolyloestrone derivatives and characterization of their antiproliferative properties. *PLOS ONE* **10**: e0118104 (2015)

Egyéb közlemények:

1. Molnár J, Ocsovszki I, Puskás L, Ghane T, Hohmann J, Zupkó I: Investigation of the antiproliferative action of the quinoline alkaloids kokusagine and skimmianine on human cell lines. *Curr Signal Transduct Ther* **8**: 148-55 (2013)
2. Zupkó I, Molnár J, Réthy B, Minorics R, Frank É, Wölfling J, Molnár J, Ocsovszki I, Topcu Z, Bitó T, Puskás GL: Anticancer and multidrug resistance-reversal effects of solanidine analogs synthesized from pregnadienolone acetate. *Molecules* **19**: 2061-76 (2014)
3. Hajdú Z, Hohmann J, Forgo P, Máthé I, Molnár J, Zupkó I: Antiproliferative activity of *Artemisia asiatica* extract and its constituents on human tumor cell lines. *Planta Med* **80**: 1692-7 (2014)
4. Csupor-Löffler B, Zupkó I, Molnár J, Forgo P, Hohmann J: Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from the roots of *Onopordum acanthium*. *Nat Prod Commun* **9**: 337-40 (2014)