

Organoszilikon, terpenoid és flavonoid vegyületek hatása tumor sejtek multidrog rezisztenciájának gátlására *in vitro*

(Összefoglaló)



A multidrog rezisztencia kialakulása korlátozza a tumoros megbetegedések kezelésének hatékonyságát. A tumor sejtekben kemoterápia indukálta multidrog rezisztencia mechanizmusok teszik hatástalanná a kezelést és okoznak gondot a klinikai onkológiában. A helyes terápia kijelölésénél egyre nagyobb erőfeszítések mutatkoznak a multidrog rezisztencia esetleges meglétének igazolására, illetve kiküszöbölésére. Számos olyan mechanizmust azonosítottak, mely meghatározó szerepet játszik a multidrog rezisztencia folyamatában.

1. DNS topoizomerázok expressziójának és funkciójának megváltozása.
2. A DNS repair mechanizmusok fokozódása.
3. Fiziológias apoptotikus utak defektusa.
4. Efflux proteinek overexpressziója.

Egyik lehetséges út a multidrog rezisztencia gátlására tehát olyan vegyületek alkalmazása a kezelés során, melyek képesek blokkolni a sejtekben a rezisztenciáért felelőssé tehető fehérjék működését.

A fent említett mechanizmusok közül az egyik fő tényező az ABC (ATP-binding cassette) proteinek, köztük az MDR1 (multidrug resistance protein 1) vagy más néven P-glycoprotein (P-gp) és MRP (multidrug resistance related protein 1) proteinek overexpressziója, mely megakadályozza a kemoterápiás szerek daganatsejtben történő felhalmozódását. A közelmúltban néhány igen ígéretes rezisztenciamódosító vegyületet azonosítottak. Az MDR1 gátlásában a legjelentősebbek a dexverapamil, valspodar (PSC 833), zosuquidar (LY335979) és laniquidar (R101933) de a klinikai kipróbálás során gyakran toxikusnak bizonyultak illetve még klinikai tesztek alatt állnak. Az *in vitro* MRP modulátorok közül az irodalmi adatok a flavonoidok egyes képviselőit, az indometacin, a N,N - diszubsztituált piperazinok valamint a quinazolinonok jelentőségét emelik ki.

Célul tűztük ki a természetes növényi alkotókból kivont terpenoid, flavonoid származékok valamint szintetikus organoszilikon származékok vizsgálatát, remélve, hogy kevésbé toxikus és hatásosabb rezisztenciamódosító vegyületet találunk.

1. Immuncitokémiai vizsgálattal igazoltuk a működő ABC transzporterek (MDR1, MRP) jelenlétét L5178Y humán *mdr1* gén transzfektált egér lymphoma vonal, MDA-MB-231, MCF7, valamint drogrezisztens KCR humán emlőtumor vonalakon, továbbá Hep2 gége karcinoma sejtvonalon.
2. A rákkutatásban is széles körben alkalmazott MTT módszerrel teszteltük a vegyületek antiproliferatív és citotoxikus hatását *in vitro*.
3. MDR1 rezisztencia módosítás tesztelésére megvizsgáltuk a Rhodamin 123 intracelluláris akkumulációját a organoszilikon, terpenoid (jatrophone diterpen and karotenoid) és flavonoid vegyületek jelenlétében, az L5178Y humán *mdr1* gén transzfektált egér lymphoma vonalon áramlási citometria módszerével.
4. Az MDR1 reverziót megvizsgáltuk karotenoidok jelenlétében a doxorubicin adaptált, drogrezisztens KCR humán emlőtumor sejtvonalon.
5. Az MRP rezisztencia tanulmányozására a 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxy-fluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) intracelluláris akkumulációját vizsgáltuk a tsztelt vegyületek jelenlétében MDA-MB-231 emlő tumor sejteken.
6. Hep2 gégekarcinóma vonalon, pedig az organoszilikon vegyületek multidrog rezisztencia gátló hatását vizsgáltuk *in vitro*.
7. Az optimális gyógyszer felhalmozódást elősegítő rezisztencia módosítók jelenlétében tanulmányoztuk a mindennapi gyakorlatban alkalmazott rák ellenes kemoterápiás szerek hatását, a különböző daganat sejtek proliferációjára és pusztulására, kombinációs kísérletben (checkerboard microplate method).
8. Néhány vegyület esetében alkalmunk nyílt a szerkezet-aktivitás összefüggéseinek megvizsgálására, az ADME (Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion) szoftver program segítségével, mely a molekula a szerkezeti és kémiai tulajdonságai alapján lehetőséget nyújt az MDR1 gátló hatás predikciójára (Pharma Algorithms Inc., 2004 Canada; www-ap-algorithms.com).
9. Megvizsgáltuk karotenoidok apoptózis indukáló hatását, mint a tumor sejtek eliminálásához hozzájáruló lehetséges faktor szerepét.

A tumor sejtekben kialakuló rezisztenciáért elsődlegesen a P-gp overexpressziója tehető felelőssé, más esetekben egyéb plazmamembrán ABC transzporterek szerepelnek, melyek szintén ATP hidrolízis révén képesek a citosztatikumokat a sejtből kijuttatni. Irodami adatok alapján a P-gp gátolható közvetlen vagy közvetett módon is. Közvetlenül: a kötőhely kompetitív, nem

kompetitív vagy allosztérikus gátlásával, közvetett módon az ATP hidrolízis befolyásolásával, valamint a sejtmembrán környezet megváltoztatásával.

Vizsgálataink megkezdése előtt immuncytokémiai mérésekkel igazoltuk a különböző efflux proteinek (MDR1, MRP) jelenlétét az alkalmazott sejtvonalakon. Az MDA-MB-231 emlőtumor vonal esetében, mind a P-gp, mind pedig az MRP fokozott expressziót mutatott. Azonban az in vitro drog akkumulációs vizsgálatok nem igazolták a P-gp aktivitást, feltehetően a proteinen bekövetkező konformációs változások miatt.

Az organosilicon vegyületek hatásosan gátolják az MDR1 pumpa működését nem csak az mdrl gén transzfektált egér lymphoma sejteken, hanem a Hep2 sejtvonal esetében is melyről korábban igazolták, hogy radio- és kemorezisztens tulajdonságok egyaránt jellemzik.

A terpenoid vegyületek közül a jatrophone diterpen pubescen A és D mutat jelentős hatást az MDR1 gátlásban, amit az in vitro kombinációs kísérletek is alátámasztanak. Az utóbbi vegyület az MRP pumpák működését is gátolja. Azonban nem kaptunk elég vegyületet és adatot arra, hogy feltárjuk a legjobb P-gp gátló hatással bíró jatrophone diterpen vegyületek szerkezet és hatás közti összefüggését.

Számos tanulmány alátámasztja, hogy a megváltozott membránszerkezet jelentős hatással bír az efflux pumpák aktivitására, valamint a rezisztencia módosítók és a membrán lipidek kölcsönhatása szintén meghatározó a rezisztencia módosítás szempontjából. A karotenoidok, úgy tűnik képesek befolyásolni a membrán szerkezetet, és a megváltozott membrán fluiditás akadályozza a pumpaműködést. A karotenoidok hatása továbbá összefügg a molekulák polaritási jellemzőivel, mivel a poláris tulajdonsággal bíró képviselőik esetén az MDR1 gátló hatás sokkal kifejezettebb. Kiemelném a szerkezet-aktivitás összefüggéseinek vizsgáló ADME komputer program fontosságát, melynek eredményei elég jól korrelálnak a drogakkumulációs kísérletekben kapottakkal, így használatával a további MDR1 reverziós vizsgálatokban jelentős idő és pénz spórolható.

A karotenoidok apoptotikus aktivitása nem jelentős valamint erősen függ a vizsgálathoz használt sejt típusától, ugyanis az átlalunk vizsgált egérlymphoma sejtek érzékenyebbek bizonyultak a humán MDA-MB-231 emlőtumor sejteknél.

Megvizsgáltuk a flavonoidok és isoflavonoidok mind a P-gp és MRP mediálta efflux mechanizmusokra gyakorolt hatását egér lymphoma és emlőtumor sejtvonalakon. A flavonoidok közül a rotenon és az amorphigenin gátló hatása volt jelentősebb, azonban a rotenon igen toxikusnak bizonyult. A rotenon és

amorphigenin közti szerkezeti differencia (egy -OH csoport) csökkent toxicitást eredményezett, míg P-gp gátló aktivitása még jelentős maradt. Hatásukat valószínűleg a transzporterek ATP kötő domain-jén keresztül váltják ki.

Mivel a P-gp hozzájárul a tumor sejtek szerzett multidrog rezisztenciájához ezért ráksejtek szelektív eliminálása tökéletesíthető citosztatikumok és rezisztencia módosítók szimultán alkalmazásával kombinált kemoterápia során. Kísérleteink során a jatrophone diterpene Pubescen D jelentősen fokozta a doxorubicin retencióját, az MDA-MB-231 humán emlő tumor sejtvonalon és a humán *mdr1* gén transzfektált egérlymphoma sejtekben egyaránt, ezáltal felerősítve a sejtek pusztulását. Ezzel elérhető a kemoterápiás szerek koncentrációjának növekedése rezisztens sejtekben is. Elvileg tumor vagy szerv specifikus efflux pumpa inhibitorok azáltal, hogy szelektíven befolyásolják a citosztatikumok akkumulációját a sejtekben, csökkenthetik azok általános toxikus hatásait. Az organoszilikon valamint a karotenoidok közül néhány vegyület igen ígéretesnek bizonyult a multidrog rezisztencia gátlásában, vizsgálatuk folytatódik *in vivo*.