

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**MULTIDROG REZISZTENCIÁT OKOZÓ P-GLIKOPROTEIN
KIMUTATÁSA ÉS FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA HUMÁN
TUMORBÓL SZÁRMAZÓ MINTÁKBAN**

Dr. Krasznai Zoárd Tibor

Témavezető: Prof. Dr. Hernádi Zoltán



Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum

Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

2007

1. BEVEZETÉS

A petefészek hám eredetű rosszindulatú daganatai a női genitális malignómák közül az incidencia tekintetében a negyedik, míg a kedvezőtlen prognózis miatt a mortalitást tekintve az első helyen állnak. A daganatos sejtek gyakran kitapadnak a peritoneumra és a tumorok *en block* sebészi eltávolítása előrehaladott petefészek tumoros betegek esetében általában nem alkalmazható eredményesen, azonban ilyenkor is törekedni kell az első műtét során a maximális citoredukcióra. Ilyen esetekben a sebészi és kemoterápiás eljárások kombinálása hozhat eredményt. A kemoterápiás kezelés eredményességének azonban jelentős akadályja lehet a betegek öröklött vagy szerzett multidrog rezisztenciája (MDR), ami az alkalmazott gyógyszerek csökkent szöveti felhalmozódását eredményezi.

A daganatos betegeknél kifejlődő ascitesnek számos oka lehet, ezek közül kiemelendő a citokinek hatása mellett a direkt limfatikus blokád és a tumorok neovaszularizációja által okozott fokozott szöveti permeabilitás. Az ascites megjelenése petefészek tumoros betegeknél a tumorok hasüregi implantációjára és rossz prognózisra utal.

A kedvező grádusú, protokoll szerint kivitelezett sebészi-patológiai staginggel alátámasztottan I/a és I/b stádiumú daganatok kivételével, a sebészi kezelést minden esetben adjuváns platina-bázisú kemoterápia kell, hogy kiegészítse. A hám eredetű malignus petefészek daganatok kemoterápiás kezelésére első vonalban jelenleg a taxol-carboplatin kombináció az elfogadott terápia, második és további vonalakban a platina származékok mellett a topoizomeráz inhibitorok, egyéb taxán származékok, alkiláló ágensek és a különböző anthracyclinek használatosak. A rezisztencia kifejlődésének megelőzésére, vagy a kifejlődő rezisztencia

lassítására a gyógyszereket kevés kivételtől eltekintve általában kombináltan alkalmazzák. A fent említett gyógyszerek a platina alapúaktól eltekintve hidrofób vegyületek.

A Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centruma Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikáján a petefészekrákkal kapcsolatos kutatásoknak nagy hagyománya van. Már az 1980-as években publikációk jelentek meg a petefészekrákos betegek kemoterapeutikumokkal szembeni érzékenységének előrejelzésére, valamint széleskörű vizsgálatokat végeztek a petefészekrák első és második vonalbeli kezeléseinek hatékonyságát illetően. A klinika kutatási eredményei elismeréseként önálló Nőgyógyászati Onkológiai Tanszék alakult, amely kutatásait kiterjesztette a molekuláris biológia irányába is.

A citosztatikumok széles spektrumával szemben fellépő rezisztencia az ún. multidrog rezisztencia. A multidrog rezisztencia kialakulásában egyéb mechanizmusok mellett fontos szerepet játszik a P-glikoprotein (Pgp) expressziója. A legújabb vizsgálatok szerint a jelenleg forgalomban levő gyógyszerek közel 50 %-a Pgp szubsztrát vagy Pgp modulátor. A Pgp egy széles szubsztrát spektrumú transzport ATPáz, mely amfifil, lipofil molekulák sokaságát, köztük a daganatos betegségek kemoterápiájában alkalmazott citosztatikumok többségét szubsztrátként ismeri fel és képes a sejtekből ATP hidrolízis energiájának felhasználásával eltávolítani.

A P-glikoprotein gyakran fokozott mennyiségben található meg a rákos sejtek felszínén, hiszen az ilyen sejtek szelekciós előnyt élveznek a kemoterápia során. A nemzetközi kutatási eredmények azt mutatják, hogy a nőgyógyászati daganatok jelentős hányadában megtalálható a kemorezisztenciát kiváltó MDR gén. Kimutatták azt is, hogy a betegek egy része a kemoterápia hatására vált Pgp pozitívvá. Az ascites jelenléte és a Pgp pozitivitás között szignifikáns pozitív korrelációt találtak.

A petefészek tumoros mintákban lévő multidrog-rezisztens sejtek felismerése és karakterizálása fontos klinikai paraméter. Sokféle monoklonális és poliklonális antitestet fejlesztettek ki a Pgp detektálására. Az áramlási citometria a legmegfelelőbb eljárás a fluoreszcensen jelölt Pgp jelenlétének és funkciójának kimutatására élő sejteken. Ez idáig számos fluoreszcens assay módszert dolgoztak ki a multidrog rezisztens és multidrog szenzitív sejtek felismerésére és elkülönítésére, azonban egyikük sem foglalkozott petefészek tumoros betegek asciteséből gyűjtött malignus sejtek vizsgálatával.

Jelen munkánkban először számolunk be egy olyan klinikai vizsgálatsorozat eredményéről, amely petefészekrákos betegek asciteséből gyűjtött sejtekben kifejezett multidrog transzporterek kimutatásával és funkciójának vizsgálatával foglalkozik.

Jelenleg a pozitron emissziós tomográfia (PET) a legkorszerűbb *in vivo* non-invazív tumordiagnosztikai módszer. A legfontosabb PET tumordiagnosztikai radiofarmakon a ^{18}F -al jelzett cukoranalóg, az [^{18}F]fluoro-dezoxi-glükóz (^{18}FDG) amely a tumoros sejtekben, azok megnövekedett energiaigénye miatt fokozottan halmozódik fel. Az ^{18}FDG -hez hasonlóan a ^{11}C -kolin is alkalmas a fenti vizsgálatokra, mivel szintén fokozott akkumulációt mutat a daganatos sejtekben, ezért napjainkban egyre nagyobb jelentőségű a PET tumordiagnosztikában. A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexakis-2-methoxybutyl isonitrile ($^{99\text{m}}\text{TC-MIBI}$) ismert SPECT tumordiagnosztikai radiofarmakon, mely a Pgp pumpának is szubsztrátja. A közelmúltban megjelent publikációk rámutatnak arra, hogy a kezeléseknél használt gyógyszerek, ligandok megváltoztathatják a PET és SPECT tumordiagnosztikai traccerek akkumulációját a tumoros sejtekben és a tumorokban egyaránt, amelyek a diagnózis helyes felállítását befolyásolhatják.

A különböző taxán származékok a malignus daganatok kezelésében széleskörűen használt kemoterápiás szerek, így például a paclitaxelt kiterjedten alkalmazzák a petefészekrák, emlődaganatok illetve a nem kissejtes tüdőrák kezelésére is. A paclitaxelről kimutatták azt is, hogy a Pgp pumpa szubsztrátja. Bár jelenleg igen intenzív kutatások folynak a kemoterápiában használt drogok hatásmechanizmusának vizsgálatára, a paclitaxel közvetlen hatását a tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációjára a tumorokban még nem vizsgálták. Munkánkban arra kerestünk választ, hogy a paclitaxel kezelések hogyan befolyásolják a tumordiagnosztikai tracerek (PET és SPECT) akkumulációját a tumorsejtekben a Pgp pumpa jelenlétében és hiányában. Modellként egy hám eredetű petefészek tumoros sejtvonalat használtunk.

Az ^{18}F FDG-PET vizsgálatok értékelésében fontos szempont a glükóz-metabolizmus kinetikai paramétereinek egzakt ismerete, mely a különböző helyen és/vagy időben végzett vizsgálatokat egymással összehasonlíthatóvá teszi, és hatékony segítséget jelent a diagnózis felállításában, a kórlefordítás prognosztizálásában és a terápia hatékonyságának ellenőrzésében. A numerikus adatokat eredményező kvantitálás több, egymástól lényegesen különböző tracer-kinetikai eljárással történhet, amelyek közül precizitásával kiemelkedik a Phelps-féle, általános modell (Phelps és mtsai 1979). Egyszerűsített modellek a Patlak és az ún. SUV-módszer (Patlak és mtsai 1983, Woodard és mtsai 1975).

Több közleményben található adatok tumorszövetek különböző módszerrel mért jellemzőinek összehasonlításáról, de a fenti három, leggyakrabban használt modell szisztematikus összehasonlító analízise még nem történt meg. Laboratóriumunkban mindhárom módszerrel elvégeztük 5 egészséges személy agyi FDG-PET vizsgálatának összehasonlító kvantitatív elemzését.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1 Áramlási citometriás módszer kidolgozása a multidrog rezisztenciáért felelős Pgp expressziójának valamint funkciójának tumoros betegek ascitesében található sejteken történő vizsgálatára.

2.2 Paclitaxel kezelés hatásának vizsgálata a rákos sejtek tumordiagnosztikai radiofarmakon felvételére a Pgp pumpa jelenlétében és hiányában. Az ^{18}F FDG, ^{11}C -kolin, és a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI radiofarmakonok akkumulációját befolyásoló paclitaxel kezelés Pgp függő és Pgp független hatásainak kimutatása.

2.3 FDG-PET-vizsgálatok kvantitatív kiértékelési módszereinek összehasonlító analízise. A glükóz metabolizmus meghatározására használt három legismertebb FDG-PET kinetikai modell (Phelps, Patlak és SUV) kritikai elemzése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtkultúra

A kísérletekben A2780 humán ovárium karcinóma sejtvonalat és doxorubicin szelektált, Pgp-t expresszáló változatát, az A2780AD sejtvonalat, az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat, annak a humán MDR1 génnel transzfectált változatát, a NIH 3T3 MDR1 G185 sejtvonalat és az Epstein-Barr vírussal transzformált JY humán B limfoblaszt sejtvonalat használtuk.

Sejtszeparálás

Az ascitest centrifugáltuk, majd a vörösvértestek ammóniumkloridos lizálását követően a sejteket PBS-ben mostuk, számoltuk és felhasználásig PBS + 5mM glükóz oldatban tároltuk. A módszer validálásához humán perifériás limfocitákat illetve a NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak humán MDR1 génnel transzfectált változatát, a NIH 3T3 MDR1 G185 sejtvonalat használtuk.

Áramlási citometriás mérések

Becton Dickinson FACS Calibur két lézerrel működő áramlási citométert, (Ar ion és He-Ne) és egy Becton Dickinson FACScan áramlási citométert (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) használtunk a fluoreszcencia intenzitások mérésére.

Az áramlási citométeren 488 nm-en történő gerjesztést követően a rodamin 123-at (R123) 540 nm-en (F11), míg a daunorubicint (DNR) 580nm (F12) feletti emisszióval mértük. A sejtek életképességét, és a DNS tartalmat $30 \mu\text{gml}^{-1}$ propidium iodid (PI) hozzáadásával mértük, a 620 nm (F13) feletti fluoreszcencia intenzitás detektálásával. A Pgp fehérje

jelenlétének kimutatása immunfluoreszcenciás technikával történt. Az MDR1 gén expresszióját natív ill. 1% formaldehid fixált mintákon is vizsgáltuk. A PBS-ben mosott sejteket (10^7 sejt ml^{-1}) UIC2 hibridóma sejtek felülúszójából preparált Pgp ellenes monoklonális antitesttel ($10\mu\text{gml}^{-1}$), vagy MM6.15 (M. Cianfriglia, Istituto Superiore di Sanita, Róma) monoklonális antitesttel ($8\mu\text{gml}^{-1}$) inkubáltuk 40 percig jégen PBS és 1 %-os marha szérumot (FCS) tartalmazó oldatban. Másodlagos antitestként FITC-RAMIG, Alexa 488 RAMIG vagy Alexa 647 RAMIG jelöléseket használtunk ($10\mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációban, 40 percig, jégen). Izotipikus kontrollként nonspecifikus egér IgG2a antitestet (UPC10, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) használtunk.

A petefészek tumoros sejteket CA125 monoklonális antitesttel azonosítottuk (mouse anti human CA125 IgG1, MCA1914H, Serotec Ltd, Kidlington, Oxford).

Radiofarmakonok előállítása

Az ^{18}F FDG és a ^{11}C -kolin PET radiofarmakonokat a Debreceni Egyetem OEC PET Centrumának radiokémiai laboratóriumában szintetizálták. A MIBI jelölése $^{99\text{m}}\text{Tc}$ izotóppal standard kit technikával történt a Debreceni Egyetem Nukleáris Medicina Tanszék laboratóriumában.

A radiofarmakonok akkumulációjának mérése

A PBS-ben mosott sejteket 1×10^6 ml^{-1} koncentrációban előinkubáltuk a ligandokkal (CSA, verapamil (VER), paclitaxel, stb.), PBS és 5 mM D-glükózt tartalmazó oldatban 10 percig, $36\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Ezt követően a mintákhoz $5\ \mu\text{Ci ml}^{-1}$ ^{18}F FDG-et, vagy $50\ \mu\text{Ci ml}^{-1}$ ^{11}C -kolint, vagy $5\text{-}10\ \mu\text{Ci ml}^{-1}$ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -

MIBI-t adtunk. A sejteket a radioligandokkal tovább inkubáltuk a kísérletekben meghatározott ideig, majd hideg PBS-el blokkoltuk a további radiofarmakon felvételt. A sejteket háromszor mostuk hideg PBS-ben és a radioaktivitást kalibrált gammaszámlálóval mértük (Canberra Packard).

Az adatok feldolgozása

A kísérleti adatok minimum három független mérés átlag és szórás értékeit tartalmazzák. Az adatokat Student t próbával értékeltük. A szignifikancia szintet, ha nem jeleztük külön, $p=0.01$ értéknek vettük.

Kvantitatív FDG PET vizsgálatokat kiértékelő módszerek összehasonlítása

A kvantitatív PET-méréseket GE 4096 Plus egész test PET-kamerával végeztük. A vizsgálatokat a Debreceni Orvostudományi Egyetem Kutatásetikai Bizottságának az engedélyével 5 egészséges személyen végeztük el, akiknél a PET-módszer, illetve az egyéb vizsgálatok funkcionális vagy strukturális károsodást nem mutattak.

Radiofarmakonként ^{18}F FDG-t használtunk. A bolus injekció formájában (10 sec alatt, a jobb vagy bal vena cubitalisba) beadott aktivitás 0.15 mCi/tskg volt, 5 ml fiziológiás sóoldatban. A PET-kamerával történő adatgyűjtést és a vérminták vételét az injektálással egyidőben kezdtük. A dinamikus PET-vizsgálatokban az egyes képeket a következő időrend szerint gyűjtöttük: tizenkét 0.5 perces, négy 1 perces, öt 3 perces és hét 5 perces expozíció. Meghatározott időközönként (az első 5 percben 10, majd a további 55 percben még 15-20) vérmintát vettünk a PET-vizsgálatokkal

párhuzamosan, és a plazmában meghatároztuk a PET-kamerával összekalibrált gamma-számláló segítségével a ^{18}F FDG radioaktivitását.

Az agy glükóz-metabolizmusának a kvantifikálása három-kompartmentes modell alapján történt. A ROI-k (kitüntetett régió, region of interest) rajzolását és az TACT (időfüggő aktivitás görbe, time-activity curve of the tissue) görbék előállítását egy VAX 4000 VLC munkaállomáson az Image Display and Analysis 6.1 programmal végeztük. A tracer-kinetikai állandók meghatározása a TACT és a vérgörbéknek a MATLAB programcsomag segítségével történő analízisével Silicon Graphics INDIGO² munkaállomáson történt.

Vizsgálati személyenként 115-130 ROI-t vizsgáltunk, amely mindössze 22-25 jól definiálható anatómiai területnek felel meg, hiszen a legtöbb anatómiai képlet több metszetben is szerepel. A vizsgált anatómiai struktúrák a következők voltak: cerebellum*; pons; thalamus; gyrus rectus*; corpus callosum; gyrus cinguli*; szeletek a lobus frontalis*, lob. temporalis*, lob.parietalis*, lob. occipitalis* kérgi területeiről; capsula interna*; nucleus lentiformis*; nucl. caudatus*; cuneus*. A csillaggal jelölt területekből szimmetrikus elhelyezkedés miatt jobb és bal oldalt különböztettünk meg.

A három kiválasztott kvantitáló módszer statisztikai összehasonlítását a lineáris korrelációs analízis segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1 A Pgp pumpa expressziójának és működésének kimutatása petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejteken áramlási citometriás méréssel

Az ascites sejtek Pgp expressziójának vizsgálata immunfluoreszcenciás módszerrel

Munkánkban először számolunk be egy olyan klinikai vizsgálatsorozat eredményéről, amely petefészekrákos betegek asciteséből gyűjtött sejtekben kifejezett multidrog transzporterek kimutatásával és funkciójának vizsgálatával foglalkozik.

A petefészek tumoros betegek ascites mintáiból gyűjtött sejtekben a Pgp fehérje expressziójának mértékét UIC2 és MM6.15 Pgp specifikus antitestekkel, immunfluoreszcenciás technikával mértük áramlási citométeren. Negatív kontrollként HPBL és JY humán B limfoid sejteket használtunk. A Pgp expresszió mértékét úgy határoztuk meg, hogy az antitesttel jelölt sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitásának mértékét normáltuk az izotipikus kontroll átlagos fluoreszcencia intenzitásának mértékéhez. Az így kiszámított hányadost R értéknek neveztük. A Pgp pozitív sejtpopulációhoz azok a sejtek tartoztak, amelyek fluoreszcencia intenzitás nagyobb volt, mint az izotipikus kontroll csoporthoz tartozó sejteké. A Pgp expresszió mértékét jelző $R_{MM6.15}$ érték 2.0 és 18 között változott az MM6.15 antitesttel jelölt mintákban (átlag és szórás: 8.6 ± 4.3 , $n=35$), míg az R_{UIC2} értéke 1.5 és 15 között változott (átlag és szórás: 6.6 ± 2.7 , $n=11$). A Pgp pozitívást mutató sejtek %-os aránya az MM6.15 antitesttel történő jelöléseknél 10 és 79 között változott (átlag és szórás:

38.9±20.7, n=35), az UIC2 antitesttel történő jelölésnél pedig a Pgp pozitív sejtek aránya 14 és 70 között változott (átlag és szórás: 42±16.7, n=11). Szoros korrelációt találtunk az azonos mintákhoz tartozó $R_{MM6.15}$ és R_{UIC2} értékek között ($r=0.924$, $p=4.8 \times 10^{-5}$). Hasonlóan szoros korrelációt találtunk az egyes minták $MM6.15$ ($\%_{MM6.15}$) és $UIC2$ ($\%_{UIC2}$) pozitivitást mutató sejtek százalékos értékei között ($r=0.992$, $p=2.13 \times 10^{-9}$).

A Pgp pumpa funkciójának vizsgálata

A petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejtek Pgp pumpájának működését rodamin 123 (R_{123}) fluoreszcens szubsztrát felvételével vizsgáltuk, cyclosporin A (CSA) Pgp blokkoló jelenlétében és hiányában. A Pgp expressziójának és funkciójának vizsgálatokor pozitív kontrollként NIH 3T3 MDR1 G185 sejteket, míg negatív kontrollként NIH 3T3, JY és HPBL sejteket használtunk. A Pgp pumpa működését egy arányszámmal jellemeztük, amit R_{R123} -nak neveztünk. Ezt az R_{R123} értéket úgy számoltuk ki, hogy a CSA kezelt sejteken mért R_{123} fluoreszcencia intenzitások középértékét elosztottuk a kezeletlen sejtek esetében mért R_{123} fluoreszcencia intenzitások középértékével. CSA kezelés megnövelte a R_{123} felvételét a MDR pozitív sejtekben, és nem változtatta lényegesen azt, az MDR negatív sejtekben. Ha ez az arány (az R_{R123} érték) közel egyenlő volt 1-el, az azt jelentette, hogy a vizsgált sejtpopulációban a Pgp pumpa működése elhanyagolható volt. Amennyiben ez az arány jóval nagyobb volt, mint 1, az kifejezett Pgp pumpa expressziót és működést jelentett a sejtpoplációban. Az ascitesből származó sejt mintákban R_{123} felvételük alapján szubpopulációkat különíthetünk el. A CSA kezelt és kezeletlen sejtek R_{123} akkumuláció mértékének aránya, az R_{R123} érték 1.3 és 2.8 között változott a vizsgált ascites mintákban (n=8), de az egyes mintákon belül, a szubpopulációkban az R_{R123} 1 és 5 közötti értékeket

mutatott. A funkcionális vizsgálat eredménye szoros korrelációt mutatott a Pgp expresszió mértékének vizsgálatával. Szintén erős korrelációt találtunk az R123 felvételt és a MM6.15 pozitivitást mutató sejtek között ($r=0.976$, $p=3.2 \times 10^{-5}$, $n=8$).

Az R_{R123} érték az MDR pozitív (NIH 3T3 MDR1 G185) kontroll sejtpopulációnál 8.1 ± 3 volt ($n=3$). Az eredeti, Pgp-t nem expresszáló MDR negatív sejtvonalnál ez az arány szignifikánsan alacsonyabb volt (1.1 ± 0.05 , $n=3$). A funkciós mérésekkel összhangban, az R_{UIC2} érték (a Pgp expresszió mértéke) 75 ± 22 volt az MDR pozitív sejtvonalnál, 1.08 ± 0.1 az MDR negatív sejtvonalnál, 1.1 ± 0.05 a JY sejtneél, és 1.02 ± 0.1 a HPBL sejtek esetében ($n=3$, minden esetben). Látható, hogy a NIH 3T3, JY és HPBL sejtek membránjában nem expresszálódott kimutatható mértékben a Pgp fehérje, és ezekben a sejtekben nem növekedett meg szignifikánsan a R123 Pgp szubsztrát felvételének mértéke a CSA Pgp pumpa blokkolóval történő kezelést követően.

Egyedi sejteken fluoreszcens digitális képalkotási technikát használva is kimutattuk a Pgp jelenlétét. Azonban, amíg az egyedi sejteken történő mikroszkópos mérések nagyon időigényesek, a szintén egyedi sejtek mérésére alapozott extracellulárisan kötődő fluoreszcens antitesteket használó áramlási citometriás technika kiváló lehetőséget biztosít a Pgp jelenlétének és funkciójának igen rövid idő alatt történő vizsgálatára. A nagyszámú sejten végzett vizsgálat további előnye a megbízható statisztikai feldolgozhatóság.

Valamennyi vizsgált betegünk kemoterápiás kezelésben részesült az ascites minták gyűjtését megelőzően. Baekeland és mtsai. (2000) arról számoltak be, hogy petefészek rákos betegeinek 47%-a volt Pgp pozitív a kemoterápiát megelőzően és a Pgp pozitivitást negatív prognosztikai jelnek találták. Szintén beszámoltak arról, hogy néhány beteg a kemoterápia

hatására vált Pgp pozitívvá. Az ascites jelenléte és a Pgp pozitivitás között szignifikáns pozitív korrelációt találtak.

Eredményeink alapján úgy véljük, hogy az itt ismertetett módszer az MDR1/P170 mediált multidrog rezisztencia kimutatására petefészekrákos betegek asciteséből, hasznos információkkal szolgálhat a betegség kezelésére használt kemoterápiás protokoll kiválasztásához.

4.2 Paclitaxel kezelés különböző módon befolyásolja a tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációját a P-glikoprotein pozitív és negatív sejteknél

A Pgp expresszió szintjének és működésének meghatározása rákos sejteken

A Pgp-t a fehérje extracelluláris epitópjához kötődő UIC2 monoklonális antitesttel mutattuk ki indirekt immunfluoreszcenciás technikával. Az R_{UIC2} értékek rendre 28 ± 8 , 1.1 ± 0.1 , és 1.1 ± 0.2 voltak az A2780AD, A2780 és JY sejtekre (átlag \pm szórás, n=3). Az A2780AD és A2780 sejtek R123 felvételét a Pgp modulátor VER és CSA jelenlétében ill. hiányában vizsgáltuk. Az R123 felhalmozódás a Pgp⁺ sejtekben alacsonyabb volt, mint a Pgp⁻ sejtekben, mert a pumpa a szubsztrát R123 jelenlétében aktiválódik és ez kisebb nettó influxot eredményez. Amikor a Pgp pumpa működését VER vagy CSA modulátorral blokkoltuk a Pgp⁺ sejtekben az R123 felhalmozódás megnövekedett, míg a Pgp⁻ sejtekben nem változott szignifikánsan. Hasonló eredményeket kaptunk egy másik Pgp szubsztrát, a daunorubicin használatakor is.

Paclitaxel hatása a tumordiagnosztikai radiofarmakonok felhalmozódására rákos sejtekben

Az A2780AD és A2780 sejtek ^{18}F FDG felvételének kinetikáját paclitaxel jelenlétében és hiányában vizsgáltuk. Egy órás inkubáció után az A2780AD sejtek ^{18}F FDG felvétele 73%-al magasabb volt, mint az A2780 sejteké. Azt, hogy a Pgp-t kifejező sejtek alap ATP aktivitása magasabb a külsőleg hozzáadott szubsztrátok hiányában is, mint a Pgp-t nem kifejező sejteké, azzal magyarázható, hogy valószínűleg endogén szubsztrátok tartják működésben a pumpát. Paclitaxel kezelés az ^{18}F FDG felhalmozódást tovább növelte, mind az A2780AD, mind az A2780 sejtek esetében, de a Pgp⁺ sejtek ^{18}F FDG felvétele nagyobb volt. A paclitaxel a humán limfoid JY sejtvonalban is megemelte az ^{18}F FDG felvételt, amiből arra következtetünk, hogy ez a növekedés nem Pgp függő hatás eredménye.

Az A2780AD Pgp⁺ sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvétele szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az A2780 Pgp⁻ sejteké. CSA Pgp blokkoló teljesen visszaállította, amíg VER nem befolyásolta a Pgp⁺ sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvételét. A paclitaxel koncentráció és inkubációs idő függő mértékben megnövelte mind a Pgp⁺ mind a Pgp⁻ sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvételét, de a növekedés a Pgp⁺ sejtek esetében sokkal kifejezettebb volt.

A paclitaxel 30 perces inkubációs idő alatt nem változtatta meg szignifikánsan egyik vizsgált sejtvonal (A2780AD, A2780 és JY sejtek) ^{11}C -kolin felvételét sem. Ezen eredmények alapján a ^{11}C -kolin akkumulációs vizsgálatokat javasolhatjuk paclitaxel kezelt betegek tumordiagnosztikájában.

Áramlási citometriás méréseinkben a paclitaxel (25-75 μM) megemelte a Pgp⁺ sejtek R123 és DNR felvételét a kontrol 200 ill. 150%-ára. Ugyanakkor a paclitaxel lecsökkentette a Pgp⁻ sejtek R123 és DNR

felvételét a kontrol 80%-ára. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a Pgp⁺ sejtek megnövekedett R 123 és DNR felvétele Pgp függő.

Kísérleteinkben a paclitaxel koncentráció függő mértékben visszaállította a ^{99m}Tc-MIBI akkumulációját a Pgp⁺ humán petefészek karcinóma sejtekben, ugyanakkor- bár sokkal kisebb mértékben- növelte a Pgp⁻ sejtek ^{99m}Tc-MIBI akkumulációját is. A ^{99m}Tc-MIBI akkumuláció kismértékű változása a Pgp⁻ sejtekben a paclitaxelnek a sejtmembrán struktúrájára és annak permeabilitására gyakorolt aspecifikus hatásával magyarázható. A Pgp egy transzport molekula, amely a paclitaxelt eltávolítja a tumor sejtekből, azonban számos más mechanizmus is részt vehet a klinikailag kialakult paclitaxel rezisztenciában, pl. változások a β-tubulin molekuláris szerkezetében, vagy az apoptotikus szabályozásban, stb. A mi kísérleteink azt mutatták, hogy a paclitaxel a Pgp nagy affinitású szubsztrátja, mivel kiválóan kompetál a szintén Pgp szubsztrát ^{99m}Tc-MIBI-vel a Pgp⁺ sejtekben. Paclitaxel, bár szintén megemelte a sejtek R123 és DNR felvételét –a Pgp expresszió függvényében- de ez a hatás, a ^{99m}Tc-MIBI-hez viszonyítva kisebb mértékű volt. Az a tény, hogy a paclitaxel a különböző Pgp szubsztrátok felvételét, ill. akkumulációját különböző mértékben befolyásolta azt sugallja, hogy a Pgp feltehetően nem egy, hanem több szubsztrát kötőhellyel rendelkezik és feltehetően egy nagy drog-szubsztrát zsebet formál.

Következtetésül levonhatjuk, hogy a paclitaxel Pgp függő és független módon is befolyásolja a tumor-diagnosztikai tracers (¹⁸FDG és ^{99m}Tc-MIBI) felvételét, ugyanakkor nem befolyásolja a ¹¹C-kolin akkumulációját. A paclitaxel fenti hatásának ismerete segíthet a Pgp⁺ és Pgp⁻ tumorok korrekt *in vivo* diagnosztizálásában és a megfelelő terápia kialakításában.

4.3 Agyi FDG-PET vizsgálatok kvantitatív értékelő módszereinek összehasonlítása

Az FDG-PET-vizsgálatok kvantitálására leggyakrabban alkalmazott három tracer-kinetikai módszer összehasonlító analízisét végeztük el humán agy modellen. Öt egészséges személy PET-vizsgálatával nyert adatokat a glükóz metabolikus aktivitás meghatározására szolgáló legáltalánosabb Phelps-féle módszerrel analizáltuk, valamint az egyszerűsítő feltételekből levezethető Patlak-eljárással és a SUV módszerrel. Korrelációs analízis segítségével kimutattuk, hogy az egyszerűbb modellek eredményei a Phelps-modell alapján nyert adatok becslésére a kiválasztott agyi régiók jellegétől függő mértékben használhatók. Megállapítottuk, hogy mindkét egyszerűsített modell ugyanazon agyi régióknál vezet a legnagyobb torzításokhoz. Az ilyen agyi területek vagy a fehérállományban elhelyezkedő, alacsony metabolikus aktivitású területek, vagy egy nagyobb keresztmetszetű ér közelében fekvő, ill. koponyaalapi képletek voltak [gyrus rectus (l.u.), pons, capsula interna (l.u.), cerebellum (l.u.), corpus callosum]. A torzított becslés valószínű magyarázata az, hogy az egyszerűsítő modellek elhanyagolják az FDG-6P defoszforilációjának mértékét, és nem számolnak azzal a virtuális szöveti radiofarmakon mennyiséggel, ami a közeli vaszkuláris képletek radioaktivitása miatt járulékként megjelenik a viszonylag rossz felbontóképességgel nyert PET-képek szöveti radioaktivitás eloszlási mintázataiban. A Phelps-módszerrel nyert glükózfelhasználási adatok és a vizsgált egyszerűbb modellek eredményei közötti összefüggést jellemző korrelációs együttható igen alacsony értékeket vesz fel a fehérállományban, valamint a nagyobb erek közelében elhelyezkedő, ill. koponyaalapi képletek esetén. A közölt adatok támpontot adhatnak az ilyen vizsgálatokat értékelő, valamint az eredményeket felhasználó szakemberek számára

annak megítélésében, hogy az egyes módszerekkel nyert értékek mennyiben tekinthetők azonosnak, ill. mennyire hordoznak egymástól eltérő információt. Az eredmények hozzájárulhatnak továbbá egy olyan módszer kidolgozásához is, amely a Pgp pumpa kapacitását méri a tumorokban, a megnövekedett FDG felvétel segítségével.

6. Összefoglalás

Munkánkban a multidrog rezisztenciáért felelős P-glikoprotein (Pgp) jelenlétét és működését vizsgáltuk fluoreszcenciás és izotópos technikákkal petefészekrákos sejteken. Klinikai vizsgálatokban először mutattuk ki, hogy a petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejtekben, különböző mértékben, de jelen van a multidrog rezisztenciáért felelős egyik leggyakoribb fehérje, a Pgp. A különböző citosztatikummal kezelt betegekből származó ascites mintákban változó mennyiségben (10-79 %) találtunk Pgp pozitív sejteket. A Pgp expressziót specifikus antitest jelöléssel, a Pgp működését pedig rodamin 123 szubsztráttal mutattuk ki fluoreszcenciás technikával. A Pgp funkciójának és expressziójának mértéke között szoros korrelációt találtunk.

Kimutattuk, hogy az ^{18}F FDG glükóz metabolikus PET tracer akkumulációja nagyobb a Pgp pozitív petefészek tumoros sejtekben, mint a Pgp negatív párjában. A paclitaxel kezelés megnövelte az ^{18}F FDG felvételt a Pgp pozitív és negatív sejtekben egyaránt, a ^{11}C -kolin PET tumordiagnosztikai tracer felvételét viszont a kezelés nem befolyásolta. A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI Pgp szubsztrát akkumulációjának mértéke a vizsgált A2780AD Pgp pozitív sejtekben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a Pgp negatív párjában. A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI akkumulációját a paclitaxel kezelés Pgp függő és Pgp független módon is befolyásolta. Következtetesként levonhatjuk, hogy a paclitaxel kezelés különböző mechanizmusok szerint befolyásolhatja a tumordiagnosztikai tracerek akkumulációját, amit a helyes diagnózis felállításánál figyelembe kell venni.

Az agyi FDG-PET-vizsgálatok kvantitálására leggyakrabban alkalmazott három tracer-kinetikai módszer összehasonlító analízisét végeztük el. Korrelációs analízis segítségével kimutattuk, hogy az

egyszerűbb modellek eredményei a Phelps-modell alapján nyert adatok becslésére a kiválasztott agyi régiók jellegétől függő mértékben használhatók. Megállapítottuk, hogy mindkét egyszerűsített modell ugyanazon agyi régióknál vezet a legnagyobb torzításokhoz. A torzított becslés valószínű magyarázata az, hogy az egyszerűsítő modellek elhanyagolják az FDG-6P defoszforilációjának mértékét és nem számolnak azzal a virtuális szöveti radiofarmakon mennyiséggel, ami a közeli vaszkuláris képletek radioaktivitása miatt járulékként megjelenik a viszonylag rossz felbontóképességgel nyert PET-képek szöveti radioaktivitás eloszlási mintázataiban.

6. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények

Krasznai ZT, Péli-Szabó J, Németh E, Balkay L, Szabó G, Goda K, Galuska L, Trón T, Major T, Hernádi Z. Paclitaxel modifies the accumulation of tumor-diagnostic tracers in different ways in P-glycoprotein-positive and negative cancer cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 28, 249-256, 2006.

IF: 2.341 (JCR 2005)

Krasznai ZT, Friedlander E, Nagy A, Szabó G, Vereb G, Goda K, Hernádi Z. Quantitative and functional assay of MDR1/P170-mediated MDR in ascites cells of patients with ovarian cancer. *Anticancer Res.* 25, 1187-1192, 2005.

IF: 1.604 (JCR 2005)

Balkay L, **Krasznai ZT**, Mikecz P. FDG-PET-vizsgálatok kvantitatív kiértékelési módszereinek összehasonlító analízise. *Orvosi Hetilap Suppl.* 2, 143/21, 1251-1254, 2002.

Krasznai ZT, Balkay L, Trón L. Agyi FDG-PET-vizsgálatok mennyiségi értékelő módszereinek összehasonlítása. *Orvosi Hetilap* 141/36., 1959-1967, 2000. A közlemény elnyerte az “Orvosi Hetilap Markusovszky Lajos Díj” – at.

A kutatási területhez kapcsolódó egyéb közlemények

Hernádi Z, Huga S, Lukácskó L, **Krasznai ZT**, Sály T, Borsos A. Second-line Taxol treatment of ovarian cancer patients refractory to first-line platinum-based chemotherapy. *Dzem. Gin.* 2, 29-32, 2000.

Hernádi Z, Huga S, Lukácskó L, **Krasznai ZT**, Sály T. Rezisztencia a petefészekrákos betegek platina-bázisú kemoterápiája során – a paclitaxel mint kezelési lehetőség. *Magyar Nőorvosok Lapja* 64, 249-254, 2001.

Hernádi Z, Szarka K, Sály T, **Krasznai ZT**, Veress G, Póka R. The prognostic significance of HPV-16 genome status of the lymph nodes, the integration status and p53 genotype in HPV-16 positive cervical cancer: a long term follow up. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 110, 205-209, 2003.

IF: 2.171 (JCR 2005)

Szöke K, Sály T, **Krasznai ZT**, Hernádi Z, Szladek G, Veress G, Dillner J, Gergely L, Kónya J. Moderate variation of the oncogenic potential among high-risk human papillomavirus types in gynecologic patients with cervical abnormalities. *J. Med. Virol.* 71, 585-592, 2003.

IF: 2.520 (JCR 2005)

Hernádi Z, Sály T, **Krasznai ZT**. The prevalence of the HPV 16 genome, integrated viral status and p53 genotype in cervical cancer population of north-eastern Hungary, the correlation with the established markers of tumour progression. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113, 83-86, 2004.

IF: 1.141 (JCR 2005)

Hernádi Z, Szőke K, Sápy T, **Krasznai ZT**, Soós G, Veress G, Gergely L, Kónya J. Role of human papillomavirus (HPV) in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesion. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 118, 229-234, 2005.

IF: 1.141 (JCR 2005)

Márián T, Balkay L, Trón L, **Krasznai ZT**, Szabó-Péli J., Krasznai Z. Effects of miltefosine on membrane permeability and accumulation of [^{99m}Tc]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile, [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, daunorubicin and rhodamine123 in multidrug-resistant and sensitive cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 495-501, 2005.

IF: 2.341 (JCR 2005)

Márián T, Balkay L, Szabó G, **Krasznai ZT**, Hernádi Z, Galuska L, Szabó-Péli J, Ésik O, Trón L, Krasznai Z. Biphasic accumulation kinetics of [^{99m}Tc]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile in tumour cells and its modulation by lipophilic P-glycoprotein ligands. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 201-209, 2005.

IF: 2.341 (JCR 2005)

Hernádi Z, Gazdag L, Szőke K, Sápy T, **Kasznai ZT**, Kónya J. Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 125, 114-119, 2006.

IF: 1.141 (JCR 2005)

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó előadások, poszterek

Krasznai ZT, Péli-Szabó J, Németh E, Major T, Juhász G, Hernádi Z. Effect of paclitaxel on the accumulation of tumor diagnostic tracers in P-glycoprotein positive and negative cancer cells. XVIIIth FIGO World Congress, Kuala Lumpur, Malaysia, November 05-10, 2006.

Krasznai ZT, Friedlander Elza, Szabó Gábor, Hernádi Zoltán. Pgp-hez kötött multidrog rezisztencia parallel immunológiai és funkcionális detektálása, Magyar Nőorvos Társaság XXVIII. Nagygyűlése. Szeged, május 25-27, 2006.

Krasznai ZT, Friedlander E, Nagy A, Szabó G, Vereb Gy, Hernádi Z. Parallel functional and immunofluorescence detection of MDR/P170 mediated multidrug resistance in tumour cells from ascites fluid of patient with ovarian cancer. The Fourth World Congress on Controversies in Obstetrics Gynecology and Infertility. Berlin, Germany, April 24-27, 2003.

Hernádi Z, **Krasznai ZT**, Huga S, Sály T. Second-line treatment of ovarian cancer with single-agent docetaxel following exposure to paclitaxel and platinum as initial therapy. Magyar Onkol. Suppl. 47(3), 264, 2003.

Krasznai ZT, Friedlander E, Szabó G, Nagy A, Hernádi Z. Multidrog rezisztencia kimutatása ovárium tumoros betegek asciteséből. Magyar Nőorvos Társaság XXVII. Nagygyűlése. Budapest augusztus 28-31, 2002.

Balkay L, Mikecz P, Németh F, **Krasznai ZT**, Trón L. PET-vizsgálatok kvantitálására használt mennyiségek összehasonlító analízise. Ötéves a Magyar PET Program, Tudományos Ülés. Debrecen, szeptember 22, 1999.

Krasznai ZT, Balkay L, Emri M, Trón L. Comparative analysis of kinetic models to study glucose metabolism of the brain. Fifth Symposium of International Society for Neuroimaging in Psychiatry, Groningen, November 27-29, 1997.

Az eredeti közlemények összegzett impakt faktora: 22. 617 (JCR 2005).

Független idézetek száma: 18