

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Krasznai Zoárd Tibor

**Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika**

Témavezető: Prof. Dr. Hernádi Zoltán

Debrecen, 2007

Tartalomjegyzék.	1
Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	4
1.1 Célkitűzések.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1 A multidrog rezisztencia és kimutatása.....	9
2.2 A Pgp klinikai jelentősége.....	14
2.3 A nőgyógyászati daganatok és a multidrog rezisztencia.....	17
2.4 Az in vivo tumordiagnosztikai tracerek akkumulációja és a multidrog rezisztencia	20
2.5 FDG-PET vizsgálatok kvantitatív analízise.....	22
3. Anyagok és módszerek.....	24
3.1 Anyagok.....	24
3.2. Sejtkultúra.....	24
3.3 Áramlási citometriás mérések.....	25
3.4 A fluoreszcens antitest jelölések vizsgálata konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal.....	27
3.5 Radiofarmakon akkumulációs mérések.....	27
3.6 Kvantitatív FDG PET vizsgálatokat kiértékelő módszerek összehasonlítása.....	28
3.7 Az adatok feldolgozása.....	33
4. Eredmények.....	34
4.1 A Pgp pumpa expressziójának és működésének kimutatása petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejteken áramlási sejtanalizátoros méréssel.....	34
4.2 Paclitaxel kezelés hatása a tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációjára P-glikoprotein pozitív és negatív sejtekben.....	46
4.3 FDG-PET vizsgálatok kvantitatív értékelő módszereinek összehasonlítása.....	53

5. Megbeszélés.....	60
5.1 A Pgp pumpa expressziójának és működésének kimutatása petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejteken.....	60
5.2 Paclitaxel kezelés különböző módon befolyásolja a tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációját a P-glikoprotein pozitív és negatív sejtekben.....	62
5.3 FDG-PET vizsgálatok kvantitatív értékelő módszereinek összehasonlító analízise.....	65
6. Összefoglalás.....	68
6.1 Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága.....	70
7. Irodalomjegyzék.....	71
7.1 Közlemények.....	86
8. Tárgyszavak.....	89
9. Köszönetnyilvánítás.....	90
10. Az értekezés alapjául szolgáló közlenyények különlenyomatai.....	91

Az értekezésben használt rövidítések

ABC: ATP kötő domén (ATP binding cassette)

ATP: adenzin trifoszfát

CSA: cyclosporin A

DNR: daunorubicin

FCS: fetális szarvasmarha szérum

FITC: fluoreszcein izotiocianát

^{18}F FDG: 2- ^{18}F fluoro-2-deoxy-D-glükóz

GMR: glükóz-metabolikus sebesség (glucose metabolic rate)

mAb: monoklonális antitest

MDR: multidrog rezisztencia

MDR1: az emberi P-glikoproteint kódoló gén

MM6.15: humán MDR1-specifikus monoklonális antitest

MRP1: multidrog rezisztenciához kapcsolódó fehérje (P190)

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI: [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-hexakis-2-methoxybutyl isonitrile

PET: pozitron emissziós tomográfia

Pgp: P-glikoprotein (P170)

Pgp⁺: Pgp pozitív

Pgp⁻: Pgp negatív

R123: rodamin 123

SCID: severe combined immunodeficiency mice

PI: propidium-jodid

ROI: kitüntetett régió (region of interest)

SPECT: egyfoton emissziós tomográfia

SUV: átlagos drogfelvételi érték (standard uptake value)

UIC2: humán MDR1-specifikus monoklonális antitest

TACT: időfüggő szöveti aktivitás görbe (time-activity curve of the tissue)

VER: verapamil

1. Bevezetés

A petefészek hám eredetű rosszindulatú daganatai a női genitális malignómák közül az incidencia tekintetében a 4., míg a kedvezőtlen prognózis miatt a mortalitást tekintve az első helyen állnak. (Lehoczky és mtsai. 2005). A betegség sokáig nem okoz tüneteket, és mivel megfelelő specificitású és szenzitivitású szűrőprogrammal sem rendelkezünk, az esetek mintegy 60%-a az előrehaladott III.-as és IV-es stádiumban kerül felismerésre. A daganatos sejtek gyakran kitapadnak a peritoneumra és a tumorok *en block* sebészi eltávolítása előrehaladott betegség esetén általában nem alkalmazható eredményesen (van der Burg 2001). Ilyen esetekben a sebészi és kemoterápiás eljárások kombinálása hozhat eredményt. Az első műtét során végzett sebészi tumorredukció ugyanakkor a későbbi prognózist jelentősen befolyásolja, ezért törekedni kell a lehető legnagyobb mértékű citoredukcióra, mivel a reziduális daganatok mérete fordítottan arányos azok kemoterápia-érzékenységeivel. A kezelés ellenére, a betegek közel 50 %-ban a daganat még sikeresnek látszó első vonalú kemoterápiák után is két éven belül kiújul (Lehoczky és Pulay 2005). A kedvező grádusú, protokoll szerint kivitelezett sebészi-pathológiai 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 (Homesley és mtsai. 2002, Brooks és mtsai. 2004). A rezisztencia kifejlődésének megelőzésére, vagy a kifejlődő rezisztencia lassítására a gyógyszereket kevés kivételtől eltekintve általában kombináltan alkalmazzák.

A Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centruma Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikáján a petefészekrákkal kapcsolatos kutatásoknak nagy hagyománya van. A klinika Nőgyógyászati Onkológiai Osztályáról több mint két évtizede jelennek meg publikációk a petefészekrák kemoterápiás szerekekkel történő kezeléséről (Hernádi és mtsai. 1985a, 1985b). Az 1980-as években standard terápiaként alkalmazott cyclophosphamid - cisplatin kombinált kemoterápiás kezelésről Hernádi és

mtsai. (1987) közöltek adatokat, melyet később a doxorubicin és 4'epi-doxorubicin kezeléssel elért eredmények értékelése követett (Hernádi 1988, Hernádi és mtsai. 1988). Ugyancsak Hernádi és mtsai. (1998 és 1999) számoltak be a cyclophosphamid és ciszplatin kombinált kemoterápiával amifostin védelmében elért eredményekről, melyet a taxán származékokkal történő kezelések vizsgálata követett (Hernádi és mtsai. 2000, 2001, 2003a). A kutatási és gyógyító eredmények elismeréseként 2001.-ben a klinikán Nőgyógyászati Onkológiai Tanszék alakult amely kutatásait kiterjesztette a molekuláris biológia irányába is (Hernádi és mtsai. 2003a, b, 2005, 2006).

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

A citosztatikumok széles spektrumával szemben fellépő rezisztencia hátterében nagyon gyakran az ún. multidrog rezisztencia (MDR) áll. 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 is (Keogh és Kunta 2006). 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 (Sharom 1997, Krishna és Mayer 2000, Raub 2005, Xia és mtsai. 2005, Ambudkar és mtsai. 2006, Endres és mtsai. 2006).

A Pgp gyakran fokozott mennyiségben található meg a rákos sejtek felszínén, hiszen az ilyen sejtek szelekciós előnyt élveznek a kemoterápia során. Nemzetközi kutatási eredmények azt mutatják, hogy a nőgyógyászati daganatok jelentős hányadában megtalálható a kemorezisztenciát kiváltó MDR gén (Holzmayer és mtsai. 1992, Arao és mtsai. 1994, Bakelandt és mtsai. 2000, Costa és mtsai. 2001, Materna és mtsai. 2004, Yakirevich és mtsai. 2006). Baekelandt és mtsai. (2000) beszámoltak arról, hogy a vizsgált petefészekrákos betegek 47%-a volt Pgp pozitív a kemoterápiát megelőzően és a Pgp pozitivitást negatív prognosztikai jelnek találták. A petefészek tumoros mintákban lévő multidrog rezisztens sejtek felismerése és karakterizálása fontos klinikai paraméter.

A Pgp detektálására sokféle monoklonális és poliklonális antitestet fejlesztettek ki. Élő sejteken az áramlási citometria az egyik legmegfelelőbb eljárás a fluoreszcensen jelölt Pgp jelenlétének és funkciójának kimutatására. Ez idáig, számos fluoreszcens assay módszert dolgoztak ki a multidrog rezisztens és multidrog szenzitív sejtek felismerésére és elkülönítésére (Feller és mtsai. 1995, Homolya és mtsai.1996, Holló és mtsai. 1998, Karászi és mtsai. 2001), azonban egyikük sem foglalkozott a petefészek tumoros betegek asciteséből gyűjtött malignus sejtek vizsgálatával.

Jelen munkánkban először számolunk be egy olyan klinikai vizsgálat sorozat eredményéről, amely a petefészekrákos betegek asciteséből gyűjtött sejteken kifejezett multidrog transzporter kimutatásával és funkciójának vizsgálatával foglalkozik.

A pozitron emissziós tomográfia (PET) az élő szervezetben lejátszódó biokémiai folyamatok vizsgálatára alkalmas diagnosztikai eljárás, mely napjainkban a leggyakrabban használt „*in vivo* noninvazív” tumordiagnosztikai módszer (Rohren és mtsai. 2004, Weber 2005). A legfontosabb PET tumordiagnosztikai radiofarmakon a ^{18}F -al jelzett cukor analóg, az [^{18}F]fluoro-dezoxi-glükóz (^{18}FDG), amely a daganatos 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, napjainkban egyre nagyobb jelentőségre téve szert a PET tumor diagnosztikában (Rohren és mtsai. 2004, Tian és mtsai. 2004). 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 tracerek akkumulációját a tumoros sejtekben és a tumorszövetben egyaránt, amelyek a diagnózis helyes felállítását befolyásolhatják (Márián és mtsai. 2003, 2005 a,b).

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 szintén kimutatták, hogy szubsztrátja a Pgp pumpának. Bár jelenleg igen intenzív kutatások folynak a kemoterápiában használt drogok hatásmechanizmusának vizsgálatára, a paclitaxel közvetlen hatását a tumordiagnosztikai drogok akkumulációjára a tumorokban még nem vizsgálták (Shin és mtsai. 2003, Ferlini

és mtsai. 2003, Horowitz és mtsai. 2004, Choi és Li, 2005, Varma és Panchagnula, 2005). 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 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 kórlefolyás prognosztizálásában és a terápia hatékonyságának ellenőrzésében (Wahl 1996, Lucignani és mtsai. 2004, Rohren és mtsai. 2004, Fanti és mtsai. 2005, Weber 2005).

A numerikus adatokat eredményező kvantitálás több, egymástól lényegesen különböző tracer-kinetikai eljárással történhet, amelyek közül precizitásával kiemelkedik a Phelps-féle, legáltalánosabb modell (Phelps és mtsai. 1977, 1979). További, bizonyos restrikciókkal használható egyszerűsített modellek a Patlak és az ún. SUV (Standard Uptake Value) módszer (Patlak és mtsai. 1983, Woodard és mtsai. 1975).

Több közleményben találhatók adatok tumorszövetek különböző módszerrel mért jellemzőinek összehasonlításáról, de a fenti három, leggyakrabban használt modell szisztematikus összehasonlító analízisének eredményéről jelen munka számol be először. Laboratóriumunkban mindhárom módszerrel elvégeztük 5 egészséges személy agyi FDG-PET vizsgálatának kvantitatív elemzését és az eredményeket összehasonlító analízisnek vetettük alá. A közölt adatok támpontot adhatnak az ilyen vizsgálatokat értékelő, valamint az eredményeket felhasználó szakemberek számára annak megítélésére, hogy az egyes módszerekkel nyert értékek milyen agyi régiókban tekinthetők azonosnak, ill. mely régiókban hordoznak egymástól eltérő információt.

1.1 Célkitűzések

1. Áramlási citometriás módszer kidolgozása a multidrog rezisztenciáért (MDR) felelős Pgp expressziójának kimutatására, valamint pumpa funkciójának vizsgálatára hám eredetű petefészek tumorban szenvedő betegek asciteséből származó sejteken.
2. Paclitaxel kezelés hatásának vizsgálata a tumordiagnosztikai radiofarmakonok (^{18}F FDG, ^{11}C -kolin, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI) felvételére MDR pozitív és MDR negatív tumorsejteken. 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.
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.

A célkitűzés várható tudományos eredményei

1. Noninvazív áramlási citometriás módszer a hám eredetű petefészek tumorok multidrog rezisztenciájának vizsgálatára.
2. Az alkalmazott kemoterápiának a tumordiagnosztikai tracerek szöveti akkumulációját módosító hatásának ismerete pontosíthatja a felállított PET, SPECT diagnózist.
3. Annak ismerete, hogy az egyszerűsítő eljárásokat alkalmazó kinetikai modellekkel végzett kvantitatív FDG vizsgálatok eredményei mely agyi régiókban biztosítanak az idő és munkaigényes Phelps módszerrel azonos eredményeket a különböző eljárásokkal készített FDG-PET diagnózisok összehasonlíthatóságát ill. gyors diagnózis felállítást tesz lehetővé.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A multidrog rezisztencia és kimutatása

2.1.1 ABC transzporterek

Az egyik legnagyobb és legjelentősebb fehérje transzporter család az ABC család (ATP binding cassette), melynek a prokariótákban és az eukariótákban egyaránt számos tagja található meg. Az ABC transzporter fehérjék a sejtek plazmamembránjában, vagy a sejtorganellek membránjában találhatók és különböző fiziológiai funkciókat szabályoznak, mint például a jelátvitelt, a mérgező anyagok kiválasztását és a sejtek anyagfelvételét.

Jelenlegi ismereteink szerint a humán genom 48 különböző ABC-transzporter molekula génjét tartalmazza, ebből 24-ről mutatták ki, hogy olyan fiziológiai funkcióval rendelkezik, amely kapcsolatba hozható veleszületett humán megbetegedésekkel (Dean és mtsai. 2001, Dean és Annilo 2005). A fehérjéket hét osztályba sorolják az ABCA-tól az ABCG-ig, az aminosav szekvenciák hasonlóságai szerint és a különböző szerkezeti egységek sorrendje, valamint nukleotid-kötő és transzmembrán doménjeik homológiája alapján.

2.1.2 Az ABCB osztály

Az ABCB osztály négy teljes-transzporterből és hét féltranszporterből áll. Ez az egyetlen osztály, melyben mindkét transzporter típus megtalálható. Az ABCB1/Pgp az elsőként és egyben a legrészletesebben jellemzett humán ABC-transzporter. A multidrog rezisztenciáért is felelőssé tehető fehérje elsődleges élettani funkciója a szervezet védelme a toxikus ágensekkel szemben.

A májban található ABCB4 és ABCB11 fehérjék szerepe a foszfatidil-kolin és az epesók szállítása. Mutációjuk következtében progresszív familiáris intrahepatikus kolesztázis alakul ki. Az ABCB2 és ABCB3 fehérjék az immunsejtek antigén-prezentációs működésében játszanak szerepet.

Az osztályba tartozó többi féltranszporter a mitokondriumban (ABCB6, B7, B8 és B10) vagy a lizoszómában (ABCB9) fejeződik ki (Dean és mtsai.2001, Dean és Annilo 2005).

2.1.3 Az ABCB1 vagy P-glikoprotein

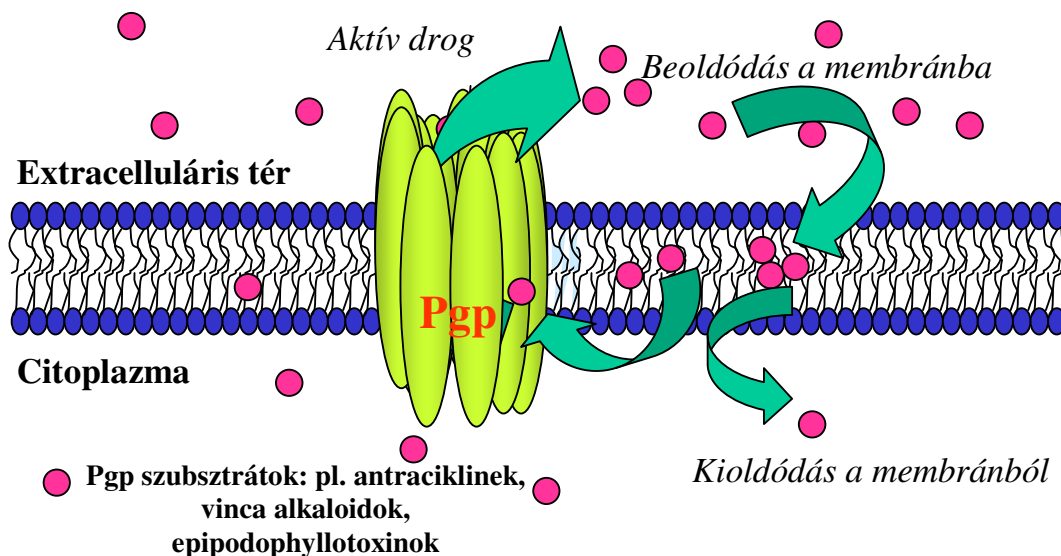
A daganatos betegségek kemoterápiás kezelésének egyik súlyos problémája a különböző kemoterápiás szerek széles spektrumával szemben fellépő szerzett, vagy meglévő rezisztencia a „multidrog rezisztencia” (MDR). Különbőféle, a multidrog rezisztenciára jellemző efflux pumpák felelősek a kemoterápiás szerek hatékonyságának csökkenéséért (Borst és Elferink 2002, Glavinas és mtsai. 2004, Zhang és mtsai. 2005, Kim 2005). Ezek a multidrog transzporter molekulák különbőféle támadáspontú és szerkezetileg is eltérő citosztatikumok sorát képesek megkötni, és ATP hidrolízis energiáját felhasználva a sejtekből eltávolítani (Litman és mtsai. 2001, Dean és mtsai. 2001). Ily módon a kemoterápiás szerek intracelluláris koncentrációja a letális szint alá csökken és a kezelés hatástalanná válik, vagy olyan magas dózisú citosztatikus kezelést tesz szükségessé, amely a mellékhatások súlyosbodását és a kezelés tolerálhatóságának csökkenését okozhatja.

P-glikoprotein (Pgp)

Az ABC transzporterek számos tagja, közöttük az MDR1 gén kódolta Pgp - fiziológiás szerepe mellett - számos, citosztatikumként alkalmazott drog transzportjában vehet részt (Raub 2005, Xia és mtsai. 2005 Ambudkar és mtsai. 2006, Endres és mtsai. 2006).

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 (Sharom 1997, Krishna és Mayer 2000) (1. ábra). A kereskedelembe használt gyógyszerek közel feléről mára kimutatták, hogy Pgp szubsztrát vagy Pgp modulátor is egyben. Ezért a gyógyszergyárak között napjainkra konszenzus alakult ki azzal kapcsolatban, hogy a drog-Pgp kölcsönhatás tesztelése egy új gyógyszer kifejlesztésénél az egyik legfontosabb feladat (Keogh és Kunta 2006). A P-glikoprotein valószínűleg saját membrán lipid környezetéből köti meg és pumpálja ki a hidrofób vegyületek igen széles spektrumát (1. ábra). A szubsztrátok gyakran kompetitíven vagy allostérikusan befolyásolják egymás kötődését, vagy Pgp általi transzportját. Utóbbi jelenség lehetőséget nyújt egy adott

szubsztrát pumpálásának megakadályozására (moduláció jelensége). A Pgp transzport mechanizmusa még nem teljesen tisztázott.



1. ábra. A P-glikoprotein működésének „hidrofób porszívó” modellje: szubsztrátjait főleg a sejtmembránból, még a citoplazma elérése előtt köti meg.

A P-glikoprotein gyakran fokozott mennyiségben található meg a tumoros sejtek felszínén, hiszen az ilyen sejtek szelekciós előnyt élveznek a kemoterápia során. A tumorsejteken más drog transzporter molekulák is kifejeződhetnek, melyek csökkentik a terápia hatékonyságát. Ilyenek pl. az MRP1 (multidrug resistance protein) és a BCRP (breast cancer resistance protein), melyek szintén a kemoterápiás szerek széles spektrumát képesek a sejtekből eltávolítani. A Pgp detektálására sokféle monoklonális és poliklonális antitestet fejlesztettek ki. Ezek közül néhány ún. konformációs epitóphoz kötődik, melyet a lineáris szekvenciában egymástól távoli aminosavak alkotnak. Ilyenek például az MRK16, MM12.10 és UIC2 monoklonális antitestek (Nagy és mtsai.2001, Goda és mtsai. 2002, 2007).

A 170 kDa molekula tömegű Pgp különböző kemoterápiás szereket képes a koncentráció gradiens ellenében a sejtekből eltávolítani, így pl. az antraciklin származékokat, taxán származékokat, topoizomeráz inhibitorokat, vinca alkaloidokat stb. A Pgp funkciója különböző lipofil-amfifil anyagokkal gátolható vagy modulálható, mint pl. kalcium csatorna blokkolókkal, calmodulin inhibitorokkal, szteroidokkal. A leghatásosabb Pgp gátlók a klinikai kipróbálás alatt is álló cyclosporin A (CSA), az SDZ PSC 833 (ciklosporin D származék) és az SDZ 280-466 jelű peptid származék (Hendrikse és mtsai. 1999). Ezen anyagok többségéről kimutatták, hogy a Pgp-t expresszáló sejtekben megnövelik a citosztatikumok intracelluláris koncentrációját. Ennek legvalószínűbb mechanizmusa a Pgp-vel való direkt kölcsönhatás, például kompetíció a szubsztrátokkal a kötődésért, mivel a modulátorok gyakran szubsztrátokként is viselkednek.

Az 1. táblázatban olyan Pgp pumpa szubsztrátokat és blokkolókat mutatunk be, amelyeknek klinikai relevanciája ismert (Endres és mtsai. 2006). Mivel a Pgp molekulák a normál szövetekben, többek közt a vékonybélben, az epeutakban, a vese tubulusokban és az agy kapillárisaiban is kifejeződnek (Litman és mtsai. 2001, Dean és mtsai. 2001, Vaalburg és mtsai. 2005, Endres és mtsai. 2006), a modulátorok alkalmazásakor a gyakran Pgp pozitív daganatos szövet mellett a Pgp-t fiziológiásan expresszáló szövetekben, ill. környezetükben is változhatnak a Pgp szubsztrátok koncentrációi, nemkívánatos mellékhatásokat okozva (Mechetner és Roninson 1992, Mechetner és mtsai. 1997, Levchenko és mtsai. 2000).

Szubsztrátok

Analgetikumok	H2-receptor antagonisták	Kardioaktív szerek
Asimadoline	Cimetidine	Verapamil
[D-Penicillamine2,5]-enkephalin (DPDPE)	Ranitidine	Diltiazem
Tumor ellenes szerek	Antigout szerek	Digoxin
Vinblastine	Colchicine	Quinidine
Vincristine	Bélmozgás csökkentő szerek	Antihypertenzívumok
Paclitaxel	Loperamide	Losartan
Doxorubicin	Antiemetikumok	Atorvastatin
Daunorubicin	Domperidone	Immunszuppresszorok
Epirubicin	Ondansetron	Cyclosporine A
Bisantrene	Gombaellenes szerek	FK506
Mitoxantrone	Ketoconazole	Tacrolimus
Etoposide	Itraconazole	Cortikoszteroidok
Teniposide	Antihisztaminok	Dexamethasone
Actinomycin D	Fexofenadine	Hydrocortisone
HIV proteáz inhibitorok	Cetirizine	Corticosterone
Saquinavir	Diagnosztikai festékek	Triamcinolone
Ritonavir	Rhodamine 123	Antibiotikumok
Nelfinavir	Hoechst 33342	Erythromycin
Indinavir		Gramicidin D
Lopinavir		Valinomycin
Amprenavir		

Gátlószerek

1. generációs	2. generációs	3. generációs
Verapamil	Dexverapamil	LY335979
Nicardipine	Emopamil	GF120918
Quinacrine	Gallopamil	XR9051
Cyclosporin A	Ro11-2933	OC144-093
	PSC833	VX-710
		VX-853

1. táblázat. A különböző klinikai relevanciával rendelkező Pgp szubsztrátok és gátlószerek

2.2 A Pgp klinikai jelentősége

A daganatok kemorezisztenciájának megismerése az onkológia kutatások egyik legfontosabb feladata. A tumorok kemorezisztenciája fordított arányban áll a betegek túlélési esélyével, és ez a rezisztencia a különböző szerkezetű és hatásmechanizmusú kemoterápiás szerek egész sorával szemben kialakulhat (Bush és Li 2002).

Egyes vizsgálatok szerint a kemoterápiával kezelt daganatok több mint a fele expresszálja a Pgp-t, mely a betegség lefolyása szempontjából mindenképpen rossz prognózist jelent (Mechetner és mtsai. 1997, Trock és mtsai. 1997, Litman és mtsai. 2001).

Az MDR biokémiai és klinikai jellemzése nagy jelentőséggel bír, hiszen a rosszindulatú daganatok kezelésénél a kemoterápia az egyik legfontosabb terápiás eljárás. A tumoros megbetegedések egy részében, mint például a gyermekkori akut leukémiák esetén, a kombinált citosztatikus kemoterápiával kitűnő gyógyulási eredményeket lehet elérni. Sajnos a gyakrabban előforduló felnőttkori daganatos megbetegedések, pl. a tüdő, az emlő a vastagbél vagy a gyomor rosszindulatú tumorai esetén az intrinsic rezisztencia, vagy a gyógyszeres kezelést követően kialakuló, szerzett rezisztencia következtében a daganatos szövet érzékenysége számottevően csökken és így a kezelés sokszor hatástalannak bizonyul (Holzmayer és mtsai. 1992, Gottesman és Pastan, 1993).

A diagnózis felállításakor kimutatható MDR fenotípus rossz prognózist jelent, míg ha a fehérje expressziója nem mérhető, az jó esélyt adhat a hosszú távú túlélésre. Erős Pgp expressziót mutatnak azok a még kezeletlen tumoros megbetegedések, melyek proliferáló szövetei fiziológiás körülmények között is kifejezik a fehérjét, így pl. a vese, a máj, a bél daganatai, vagy a primer agytumor (Hamada és Tsuruo, 1986, Osmak 1993, Jachez és mtsai. 1994, Itsubo és mtsai. 1994, Kawamoto és mtsai. 1997, Zhou és mtsai. 1999). Malignus hematológiai betegségekben már felfedezésükkor magas Pgp expressziós szintet találtak, ami a kemoterápiás kezeléssel, illetve a betegség progressziójával tovább fokozódott (Rochlitz és mtsai. 1992, Licht és mtsai. 1994, Marie és mtsai. 1996, Friedenberg és mtsai. 1999).

Eid és mtsai. (1996, 2000) a Pgp és MRP expresszióját mutatták ki heretumorkban, utalva arra, hogy a Pgp expressziót mutató betegcsoportok előrejelzése

meghatározó lehet a követendő kemoterápiára vonatkozóan. Mandoky és mtsai. (2004) LRP (lung resistance protein) jelenlétét mutatták ki csirasejtes here daganatokban amelyet kedvezőtlen klinikai prognózisnak találtak.

A nőgyógyászati daganatok esetében is a tumorok jelentős hányadában kimutatták az MDR jelenlétét (Holzmayer és mtsai. 1992, Arao és mtsai. 1994, Bakelandt és mtsai. 2000, Costa és mtsai. 2001, Materna és mtsai. 2004, Yakirevich és mtsai. 2006).

Számos molekuláris biológiai (gén expresszió az mRNS szintjén), immunológiai (a Pgp mennyiségének meghatározása) és funkcionális megközelítésű (festék akkumuláció mérése) eljárást dolgoztak ki a Pgp kimutatására és/vagy az expresszió mértékének megbecsülésére. A legelterjedtebben használt módszer valamely fluoreszcens szubsztrát (pl. antraciklinek, rhodamin 123, verapamil-analógok, Hoechst, fluo-3, calcein-AM) és egy inhibitor együttes alkalmazása. Így különböző megközelítésben határozható meg a Pgp transzport-funkciója, pl. a fluoreszcens szubsztrát sejtekbe történő akkumulációjának, vagy kiáramlásának mérésével (Holló és mtsai. 1994; Broxterman és mtsai. 1996; Homolya és mtsai. 1996, Sarkadi és Müller, 1997; Karászi és mtsai. 2001). Gyakran használt fluoreszcenciás eljárás a rodamin 123 kiáramlásának mérésén alapuló teszt a Pgp pumpa működésének vizsgálatára, bár ez nem, illetve kevésbé alkalmazható MRP1 és BCRP típusú pumpa fehérjék esetén (Litman és mtsai. 2001, Honjo és mtsai. 2001). A legtöbb előnyös tulajdonsággal a calcein-teszt rendelkezik, mely rövid és egyszerűen kivitelezhető eljárás, az intenzív zöld fluoreszcencia könnyen mérhető az áramlási citometria segítségével, és az intracelluláris környezet nem befolyásolja a festék akkumulációját vagy spektrális tulajdonságait (Homolya és mtsai. 1993, Homolya és mtsai. 1996, Karászi és mtsai. 2001). Megfelelő revertáló ágensek választásával az MRP1 kimutatására is alkalmazható, mivel a calcein AM szubsztrátja mind a Pgp-nek mind az MRP1-nek is (Holló és mtsai. 1996).

A tríciummal jelölt digoxin (Pgp szubsztrát) szintén biztató in vitro és bizonyos megszorításokkal *in vivo* módszernek tűnik a gyógyszerek terápiás koncentrációjának megállapításánál, és a drog-drog kölcsönhatások vizsgálatánál a Pgp jelenlétében (Keogh és Kunta 2006, Ambudkar és mtsai. 2006).

A különböző laboratóriumok által kidolgozott, Pgp-t kimutató tesztek érzékenysége más és más, illetve az adatok és a betegség klinikai lefolyása közötti összefüggések általános és egységes interpretációja is rendkívül nehéz (Beck és mtsai. 1996, Broxterman és mtsai. 1996). Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan nemzetközileg is elfogadott és standardizált módszer, amely egy egységes, ellentmondásmentes diagnózist adó, akár összetett klinikai próba lenne (Noonan és mtsai. 1990, Marie és mtsai. 1997, Okochi és mtsai. 1997, Beck and Grogan 1997, Huet és mtsai. 1998).

A Pgp *in vivo* kimutatása jelenleg az érdeklődés középpontjában áll. Az egyik eredményekkel kecsegtető terület a Pgp *in vivo* detektálására, az izotóppal jelzett ligandok, gyógyszerek és Pgp szubsztrátok felhasználása a képalkotó diagnosztikában (Hendrikse és mtsai. 1999, Levchenko és mtsai. 2000, Márián és mtsai. 2003, Kurdziel és mtsai. 2003, Vaalburg és mtsai. 2005). Erre a célra több PET és SPECT izotóppal jelölt ligandot, gyógyszert állítottak elő, melyek kipróbálása a különböző típusú tumorokban expresszált Pgp detektálására jelenleg nagy erőfeszítésekkel folyik (Barbics és mtsai. 1998, Pauwels és mtsai. 1998, Del Vecchio és mtsai. 1999, Luurtsema és mtsai. 2003, Kurdziel és mtsai. 2003, Higashi és mtsai. 2004, Vaalburg és mtsai. 2005, Ambudkar és mtsai. 2006).

A citosztatikumok nagy része szubsztrátja a Pgp pumpának, ezért a terápia során célszerűen olyan új gyógyszerek használatára lenne szükség, amelyeket a Pgp nem ismer fel. Az ez irányú törekvések sikere azonban kétségesnek tűnik a fehérje szubsztrát-felismerő promiskuitása ismeretében. Egy potenciális módszer lehet a kemoterápiás ágens hordozó molekulához való kötése, melynek eredményeként az a fehérje számára nem lesz felismerhető, de megtartja citotoxikus tulajdonságát és így hatásos citosztatikumként használható (Cheriff és Farquhar 1992, Thierry és mtsai. 1993, Pawlak és mtsai. 2000, Gottesmann és mtsai. 2002). Figyelemreméltó kutatási eredményekről számoltak be Burchholz és mtsai. (2006), akik olyan citosztatikus hormonanalógokat (somatostatin, bombasin stb) szintetizáltak, amelyek eredményesen használhatók a petefészek tumoros betegek kezelésére, a kemorezisztencia kialakulása után is.

Bár a Pgp-szubsztrát kölcsönhatások *in vitro* tanulmányozása segítséget nyújt az új drogok kifejlesztéséhez, az így jellemzett inhibitorokra és szubsztrátokra vonatkozó adatok extrapolálása a humán terápia színterére számos megoldandó problémát vet fel.

Mivel a Pgp az élő szervezetben számos fiziológiás szereppel rendelkezik (bár Pgp deficiens knock-out egereken végzett kísérletek szerint a funkcionális Pgp fontos, de nem feltétlenül létfontosságú védelmi szerepet lát el (Schinkel és mtsai. 1993)), a revertáló ágensek hatása nemcsak a daganatos szövetekben lép fel, hanem az ép Pgp-t expresszáló szövetek működését is befolyásolja, így nem várt mellékhatásokat okozhat. További kérdést vet fel, hogy a modulátorok klinikailag hatékony dózisa a szervezet számára még tolerálható koncentráció-e. Szélesebb körű klinikai tapasztalat egyelőre csak a modulátorok ún. első generációjával kapcsolatban van, mint például a verapamil (VER), a diltiazem, ciklosporin A (CSA), vagy a kalmodulin gátlók. A fejlesztések alatt álló második generációs szerek már kisebb koncentrációban is jó Pgp modulátorok. Ilyen ígéretes revertáló ágens a cyclosporin analóg SDZ PSC 833, vagy a verapamil analóg R-verapamil, melyek alkalmazása esetén a tipikus mellékhatások (immunszuppresszió, kardiotoxicitás) kevésbé jelentkeznek. A legújabb modulátorok már kifejezetten egy-egy meghatározott gyógyszer-rezisztenciáért felelős transzporter gátlására irányulnak, mint például a Pgp-re szelektív és nagy affinitású reverzin (Sharom és mtsai. 1999).

A multidrog rezisztencia legyőzésére elméletileg a Pgp monoklonális antitestjei is bevethetőek lennének. Elsősorban azok az ellenanyagok lehetnének hatásosak, melyek a Pgp extracelluláris epitópjaihoz kötődve gátolják a fehérje funkcióját (Tsuruo és mtsai. 1989, Pearson és mtsai. 1991, Mechetner és Roninson 1992, Nagy és mtsai. 2001, Goda és mtsai. 2002, 2007).

Bár a Pgp által megvalósított transzport-folyamatról egyre több információval rendelkezünk, működésének részletes mechanizmusa még nem ismert. A fehérje működése még feltáratlan mozzanatainak vizsgálata hozzájárulhat a gyógyszer-rezisztencia kivédéséhez a klinikai gyakorlatban, pl. újabb, hatékonyabb és szelektívebb revertáló szerek kifejlesztésével.

2.3 A nőgyógyászati daganatok, kezelésük és a multidrog rezisztencia

A nőgyógyászati malignómák közül a petefészekrák a negyedik leggyakoribb daganatfélése, mely azonban rossz prognózisa miatt a mortalitás tekintetében az első

helyen áll (Lehoczky és mtsai. 2005, Yakirevich és mtsai. 2006) A tumor hamar szóródhat a hasüregben, ilyenkor az *en block* sebészi eltávolítás általában nem lehetséges (van der Burg 2001), azonban ekkor is a lehető legteljesebb tumor redukcióra kell törekedni a primer műtét során, mivel ez a túlélést alapvetően befolyásolja. A daganat természetéből adódóan a sebészi és kemoterápiás eljárások kombinálása hozhat eredményt. Az epitheliális tumorok esetén ma az első vonalban platina bázisú kemoterápiás kezelést végzünk (Carboplatin), Magyarországon taxán származékkal (Taxol) kombinációban. Az erre adott terápiás válasz szerint megkülönböztetünk platina szenzitív, rezisztens ill. refrakter tumorokat. Amennyiben a daganat recidívál másod- ill. harmad-vonalbeli kezelésekre is van lehetőség, különböző támadáspontú gyógyszerekkel. (Hernádi és mtsai. 2000, 2001, 2003a). A kemoterápiás kezelés eredményességének azonban jelentős akadálya a betegek öröklött vagy szerzett multidrog rezisztenciája, ami az alkalmazott gyógyszerek csökkent szöveti felhalmozódását eredményezi (Schöndorf és mtsai. 2002).

A nemzetközi kutatási eredmények azt mutatják, hogy a nőgyógyászati daganatok jelentős hányadában megtalálható a kemorezisztenciát kiváltó MDR gén (Holzmayer és mtsai. 1992, Arao és mtsai. 1994, Bakelandt és mtsai. 2000, Costa és mtsai. 2001, Materna és mtsai. 2004, Yakirevich és mtsai. 2006). Costa és mtsai. (2001) méhnyakrákban szenvedő betegeken vizsgálták több sejtszintű marker jelenlétét, köztük az MDR1 gén expresszióját is a neoadjuváns kemoterápia előtti és utáni biopsziás és műtéti mintákból. Már a kezelés előtti minták is több mint 50%-ban mutatták ki az MDR1 gént, és a kezelések hatására ez az arány tovább nőtt. Több közlemény is beszámolt arról, hogy a petefészek tumoros betegek szövettani vizsgálatai alapján kimutatható, hogy a multidrog rezisztenciát okozó gén a tumorok egy jelentős hányadában jelen van, ami a kemoterápia hatékonyságát nagymértékben befolyásolja. A vizsgálatok alapján a petefészek tumorokban a Pgp, MRP1 és az LRP multidrog rezisztenciáért felelős pumpák is expresszáldhatnak (Kavallaris és mtsai. 1996, Materna és mtsai. 2004, Yakirevich és mtsai. 2006). Kavallaris és mtsai. (1996) arról számoltak be, hogy a vizsgált 53 kezeletlen petefészek tumoros beteg mintáinak harmadában expresszáldott az MDR1 gén. Ugyanezen mintákban az MRP1 gént pedig szinte mindegyik betegnél kimutatták, bár a génexpresszió mértéke nagyon változott. Baekelandt és mtsai. (2000) azt állapították meg, hogy a vizsgált petefészek rákos

betegek 47%-a volt Pgp pozitív a kemoterápiát megelőzően, és a Pgp pozitivitást negatív prognosztikai jelnek találták. Szintén beszámoltak arról, hogy több beteg a kemoterápia hatására vált Pgp pozitívvá. Az ascites jelenléte és a Pgp pozitivitas között szignifikáns pozitív korrelációt találtak.

Az ascites megjelenése a petefészek tumoros betegeknél a tumorok hasüregi implantációjára és rossz prognózisra utal (Shen-Gunther és Mannels 2002). A daganatos betegségek esetén megjelenő ascitesnek számos oka lehet (Aslam és Marino 2001). A tumorsejtek peritoneumon történő implantációján, a szabályos sejt-sejt közötti kapcsolatok felbomlásán túl egyes citokineknek is jelentős oki szerepe van, de a direkt limfatikus blokád vagy a tumorok neovascularizációja következtében létrejövő fokozott érpermeabilitás is szerepet játszhat.

A hám eredetű petefészek tumorok kemoterápiás kezelésére jelenleg leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek platina bázisú citosztatikumok és a taxán származékok mellett a topoizomeráz inhibitorok és a különböző anthracyclin származékok (Homesley és mtsai. 2002, Brooks és mtsai. 2004). A rezisztencia kifejlődésének megelőzésére, vagy a kifejlődő rezisztencia lassítására a gyógyszereket általában kombináltan, egyidejűleg alkalmazzák. Fent említett gyógyszerek a platina alapúaktól eltekintve hidrofób vegyületek.

A paclitaxel egy növényi eredetű, a *Taxus Brevifolia* kérgéből izolált diterpén vegyület, mely a Pgp pumpa szubsztrátja (Horwitz, 1992). Ez a petefészekrák első vonalbeli terápiájában alkalmazott természetes eredetű kemoterapeutikum, a sejtekben a tubulin monomerek szabálytalan polimerizációját okozva mikrotubulus stabilizáción keresztül fejti ki a hatását (Yusuf et al., 2003). A petefészekrák kemoterápiás kezelése mellett számos más daganatban is hatékonyak bizonyult, így nem kissejtes tüdő-, emlő-, húgyhólyag-, fej-nyaki- rákok és melanoma malignum esetén. (Holmes et al., 1991; Gregory and DiLisa, 1993; Yusuf et al., 2003). Bár a paclitaxel az egyik leghatékonyabb kemoterapeutikum ezekben a tumorokban, sok beteg rezisztenssé válik iránta, és a paclitaxel- platina kezeléssel elért remisszió után gyakori a relapszus.

Az MRP1 klinikai jelentőségéről még kevesebb adat áll rendelkezésre, de bizonyos tumorok esetén (pl. akut mieloid leukémia, endometrium karcinóma, petefészek karcinóma, stb.) valószínűsíthető a szerepe a citosztatikum rezisztencia kialakulásában (Kavallaris és mtsai. 1996, Krishna és Mayer 2000, Litman és mtsai.

2001, Borst és Elferink 2002, Ohishi és mtsai. 2002, Yakirevich és mtsai. 2006). A Pgp-nek és az MRP1-nek egyaránt van fiziológias funkciója is az emberi szervezetben. A multidrug rezisztenciáért felelős Pgp és MRP1 pumpák jelenlétének és működésének kimutatása lényeges szempont a tumoros betegek kezelésének tervezésénél (Barbics és mtsai. 1998, Pauwels és mtsai. 1998, Del Vecchio és mtsai. 1999). Számos *in vitro* módszer ismert a Pgp és MRP1 fehérjék kimutatására mRNS és protein szinteken. Ezek a hagyományos módszerek nem adnak információt a pumpa működéséről, csupán az expresszióról. A daganatos betegek terápiájának helyes megválasztása szempontjából nagy jelentősége lenne a Pgp és MRP1 pumpák transzport kapacitásának *in vivo* mérésére. Erre pl. a PET technika kiváló elvi lehetőséget biztosít (Hendrikse és mtsai. 1999, Márián és mtsai. 2003, 2005b. Vaalburg és mtsai. 2005)

2.4 Az *in vivo* tumordiagnosztikai radiotracerek akkumulációja és a multidrog rezisztencia

Az *in vivo* tumordiagnosztikában jelenleg a PET a legfontosabb diagnosztikai módszer (Rohren és mtsai. 2004, Fanti és mtsai. 2005, Weber 2005). Amennyiben a PET által nyújtott tumordiagnosztikai lehetőséget felhasználhatnánk az MDR kimutatására is, ez sokat segítené a terápia helyes megválasztásában. Erre a célra az egyik lehetséges út pozitron emittáló izotóppal jelölt Pgp szubsztrátok (verapamil, colchicin, daunorubicin (DNR), stb.) előállítására (Hendrikse és mtsai. 1999, Levchenko és mtsai. 2000, Kurdziel és mtsai. 2003).

A Pgp működésének kimutatására felhasználhatók azok a kemoterápiában használt gyógyszerek is, amelyek szubsztrátjai a Pgp pumpának és megjelölhetők PET vagy SPECT izotóppal (Hendrikse és mtsai. 1999, Kurdziel és mtsai. 2003). Ebben az esetben a gyógyszer *in vivo* farmakodinamikai és farmakokinetikai tesztje mellett a Pgp vagy MRP1 pumpa működése is vizsgálható. Egyszerűsítene a vizsgálati protokollt, ha a már validált PET és SPECT tumordiagnosztikai farmakonok (^{18}F FDG, ^{11}C -metionin, ^{11}C -kolin, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI stb) között találnánk olyat, amely a tumor diagnózis mellett információval szolgálna a Pgp működéséről. Előzetes kísérletek azt igazolták, hogy az Pgp^+ és Pgp^- sejtek eltérő mértékben halmozták fel az egyes PET és SPECT izotópokat (pl. ^{18}F FDG, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin), ami nagy valószínűséggel Pgp függő

hatásnak bizonyult. Azt is kimutatták, hogy ha a multidrog rezisztens és szenzitív sejteket előzetesen a daganatos betegek kemoterápiájában is használatos Pgp modulátorokkal, gyógyszerekkel kezelték, akkor szintén megváltoztak az egyes tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációs kinetikái (Márián és mtsai. 2003, Márián és mtsai. 2005a,b.).

A tumordiagnosztikai tracerek akkumulációjában bekövetkezett változásokért felelős élettani mechanizmusok jelenleg teljességében még nem ismertek egyetlen esetben sem. A kemoterápiás szerek nagy valószínűséggel MDR függő és független módon is változtatják az *in vivo* tumordiagnosztikai tracerek akkumulációját a különböző típusú tumorokban. Mindezen hatások befolyásolhatják a helyes diagnózis felállítását is.

A Pgp pumpa működése energiaigényes folyamat, az energiát a sejt az ATP hidrolíziséből nyeri. A pumpa működéséhez kapcsolt fokozott energiafelhasználás megnövekedett ^{18}F FDG felvétellel párosul (Márián és mtsai. 2003). Ezért pl. az ^{18}F FDG felvétel változását megfelelő protokoll kidolgozásával fel lehetne használni a multidrog rezisztenciáért felelős pumpák transzport kapacitásának mérésére is. Az ^{18}F FDG a leggyakrabban alkalmazott glükózanalóg az *in vivo* PET tumordiagnosztikában (Rohren és mtsai. 2004, Weber 2005). Az ^{18}F FDG-hez hasonlóan a ^{11}C -kolin szintén felhalmozódik a daganatos sejtekben. A diagnózis alapja a rákos sejtek megnövekedett kolin metabolizmusával függ össze (Torizuka és mtsai. 2003, Rohren és mtsai. 2004, Tian és mtsai. 2004). A ^{11}C -metionin-PET vizsgálat alapja a tumorok megnövekedett aminosav felvétele és fehérje metabolizmusa (Jager és mtsai. 2001). A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexakis-2-methoxybutyl isonitrile ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI) ismert SPECT tumordiagnosztikai tracer. Ez az egyszer pozitív töltésű komplex molekula a citoplazma membránon átjutva a tumoros sejtek negatív membránpotenciálú mitokondriumában halmozódik fel (Piwnica-Worms és mtsai. 1995, Pauwels 1998). Azonban a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI szubsztrátja is a multidrog rezisztenciáért felelős pumpáknak, ezért a felvétele- amennyiben a sejtek kifejezik a Pgp-t- szignifikáns csökkenést mutat. (Hendrikse és mtsai. 1999, Márián és mtsai. 2003, Jekerle és mtsai. 2006).

Az egyes tumorokban található sejtekben a multidrog rezisztencia nem minden, vagy semmi alapon fejeződik ki, hanem a különböző sejtípusokban, és egy sejtípuson belül is nagyfokú heterogenitás tapasztalható (Kostakoglu és mtsai. 1998). Az *in vivo*

humán SPECT vizsgálatokban a ^{99m}Tc -MIBI felvételek egy átlagolt akkumulációt jelenítenek meg, amelyben sokszor elkenődnek (kiátlagolódnak) a különböző irányú hatások. Sok esetben az egyes tumorokban nem diagnosztizálható egyértelmű összefüggés a Pgp expresszió mértéke és a ^{99m}Tc -MIBI akkumuláció szint között (Kostakoglu és mtsai. 1998, Kinuya és mtsai. 2003), ami elsősorban annak tulajdonítható, hogy a különböző kezelések hatására bekövetkezett ^{99m}Tc -MIBI akkumulációs változások Pgp függő és Pgp független hatások eredőjeként jelennek meg. Lényeges tehát a különböző ligandok hatását megvizsgálni a tumordiagnosztikai radiofarmakonok (^{99m}Tc –MIBI, ^{18}F FDG, ^{11}C -kolin, stb) felvételére az MDR pozitív és MDR negatív tumoros sejteknél egyaránt.

2.5 FDG-PET vizsgálatok kvantitatív analízise

A PET az élő szervezetben lejátszódó biokémiai folyamatok vizsgálatára alkalmas képalkotó eljárás (Wahl 1996, Pauwells 1998 Emri és mtsai. 2003, Dimitrakopoulou-Strauss és Strauss 2006). A pozitron emissziós tomográfias vizsgálatokban az *in vivo* szöveti glükóz metabolizmus meghatározására általában ^{18}F FDG-t használnak úgy, hogy meghatározzák ennek a glükózanalógnak az intravénás injektálást követően kialakuló háromdimenziós szöveti eloszlását. A vizsgálmódszer egyik nagy előnye, hogy eredményei kvantifikálhatók, azaz valamilyen abszolút skálán is kifejezhetők. A hasonló vizsgálatok eredményeivel való összehasonlítást megengedő, igényes, kvantitatív PET-vizsgálatok során a radiofarmakon háromdimenziós eloszlásának meghatározása kizárólag primér információnak tekinthető, és semmiképpen sem végcél, hiszen az adatgyűjtés protokollja, és a radiofarmakon eloszlását meghatározó egyéb feltételek laboratóriumonként változhatnak, sőt, ezek a feltételek még ugyanazon laboratóriumban különböző időkben végzett mérések során sem azonosak tökéletesen.

Az ^{18}F FDG-vel végzett kvantitatív PET-vizsgálatokban az elsődlegesen rekonstruált radioaktivitás eloszlási mintázatokból speciális, úgynevezett tracer-kinetikai analízis segítségével meghatározzák a szövetek mg foszforilált glükóz/100 g szövet/min

egységekben kifejezett metabolikus aktivitását (GMR), valamint az FDG transzportját meghatározó, l/min egységekben kifejezett kinetikai állandók értékeit.

A glükóz-metabolizmus kinetikai paramétereinek numerikus ismerete lehetővé teszi a különböző helyen és időben végzett vizsgálatok összehasonlítását és nagy segítséget jelent a tumoros folyamat malignus vagy benignus voltának meghatározásában, a pontos diagnózis felállításában és a terápia meghatározásában. (Wahl 1996, Fukunaga és mtsai. 1998, Rohren és mtsai. 2004, Fanti és mtsai. 2005, Weber 2005). A tracer-kinetikai modelleknek nagy szerep jut a különböző tumorok esetében alkalmazott terápiás eljárások eredményességének megítélésében és a kezelés után gyakran kialakuló hegszövetnek a reziduális tumortól való elkülönítésében is (Daemen és mtsai. 1992, Fishman és Alpert 1993, Wu és mtsai. 1996, Römer és mtsai. 1998, Lucignani és mtsai. 2004, Dimitrakopoulou-Strauss és Strauss 2006).

Az FDG-PET-vizsgálatok eredményeként nyert radioaktivitás-eloszlás képeken az egyes anatómiai strukturáknak megfelelő, vagy egymástól funkcionális sajátosságokban eltérő régiók jelölhetők ki, és meghatározhatók a GMR, valamint a glükóz transzportnak a régió belüli paraméter értékei. Ez az analízis több, egymástól lényegesen különböző tracer-kinetikai eljárás és matematikai modell alkalmazásával is elvégezhető (Evans és mtsai. 1986, Hawkins és mtsai. 1986, Gambhir és mtsai. 1989, Choi és mtsai. 1991, Schmidt és mtsai. 1991, Kim és mtsai. 1994, Hoh és mtsai. 1994, Schmidt és mtsai. 1996, Wu és mtsai. 1996). Az eljárások közül precizitásával kiemelkedik a Phelps-féle legáltalánosabb modell (Phelps és mtsai. 1977, 1979). Ennek az összetett modellnek a használata rendkívül időigényes és speciális mérési protokoll alkalmazását teszi szükségessé, ezért kiterjedten alkalmaznak különböző megszorító feltételeken alapuló egyszerűbb modelleket is. A két leggyakrabban használt ilyen eljárás az u.n. Patlak- (Patlak és mtsai. 1983, Patlak és Blasberg 1985) és SUV módszer (Woodard és mtsai. 1975).

Több közleményben találhatók adatok tumorszövetek különböző módszerrel mért jellemzőinek összehasonlításáról (Hamberg és mtsai. 1994, Hoh és mtsai. 1994, Keyes 1995, Haberkorn és mtsai. 1997, Fukunaga és mtsai. 1998, Römer és mtsai. 1998), de a fenti három, leggyakrabban használt modell szisztematikus összehasonlító analízise ez idáig még nem történt meg.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Anyagok

A sejtenyésztés során és a kísérletekben alkalmazott vegyszerek többségét a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO) szereztük be. A propidium jodid (PI), rodamin 123 (R123), daunorubicin, Alexa 488 GAMIG, Alexa 647 GAMIG a Molecular Probes-től (Eugene, OR) származott.

A Pgp szubsztrátokból, festékekből és sejtek kezelésére alkalmazott egyéb anyagokból desztillált vízben (pl. VER, DNR, R123), etanolban (PI) vagy dimetil-szulfoxidban (pl. cyclosporin A, paclitaxel) készítettünk törzsoldatokat. A kezelés során az oldószerként adott etanol vagy dimetil-szulfoxid koncentrációja 1% alatt maradt és minden esetben ellenőriztük, hogy az oldószer nem befolyásolja-e a vizsgált paramétert. A foszfát puffer sóoldat (PBS) összetétele: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, és 3mM NaH₂PO₄, pH=7.4 volt.

3.2 Sejtkultúra

A kísérletekben A2780 humán ovárium karcinóma sejtvonalat és doxorubicin szelektált Pgp-t expresszáló változatát az A2780AD sejtvonalat, az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak a humán MDR1 génnel transzfektált változatát, az NIH 3T3 MDR1 G185 sejtvonalat valamint az Epstein-Barr vírussal transzformált JY humán B limfoblaszt sejtvonalat használtuk. A sejteket (a JY kivételével) DMEM (Dulbecco) tenyésztő folyadékban növesztettük, 37 °C-on, 5 %-os CO₂ atmoszférában, 95 %-os páratartalom mellett. A tenyésztő folyadékot 10 % inaktivált fetális szarvasmarha szérumot (FCS, Gibco), 2 mM glutaminsavat és 100 unitsml⁻¹ penicillin és 100 µgml⁻¹ streptomocint tartalmazott. A Pgp-et expresszáló sejtvonalakat 2 µM doxorubicint (A2780AD) vagy 0.9 µM doxorubicint (NIH 3T3 MDR1) tartalmazó tápoldatban tartottuk fenn, és csak a felhasználásuk előtt 2-3 nappal helyeztük át drog mentes tenyésztő oldatba.

A JY sejteket RPMI-1640 tenyésztőfolyadékban növesztettük, 37 °C-on, 5 %-os CO₂ atmoszférában, 95 %-os páratartalom mellett. A tenyésztő folyadék 10 % inaktivált

fetális szarvasmarha szérumot (FCS, Gibco), 2 mM glutaminsavat és 100 units ml^{-1} penicillint és 100 μgml^{-1} streptomicint tartalmazott.

Sejtszeparálás

Az ascites folyadékot 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 az NIH 3T3 egér fibroblaszt sejtvonalat és annak humán MDR1 génnel transzfektált változatát, a NIH 3T3 MDR1 G185 sejtvonalat használtuk. A vizsgálatokhoz a DEOEC Kutatásügyi Bizottságának az engedélyével rendelkezünk.

3.3 Áramlási citometriás mérések

Becton Dickinson FACS Calibur két lézerrel működő áramlási citometert, (Ar ion és He-Ne) és Becton Dickinson FACScan áramlási citométert (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) használtunk a fluoreszcencia intenzitások mérésére. Az áramlási citométeres adatokat BDIS CELLQUEST (Becton-Dickinson), vagy FloWin (szerzők: Dr. Emri M. és Dr. Balkay L.) programokkal értékeltük ki.

A Pgp pumpa funkciójának vizsgálata fluoreszcens szubsztrátokkal

A Pgp pumpa működését 1 vagy 2 μM R123, vagy 1 μM DNR szubsztrát akkumulációjával mértük áramlási citométeren, Pgp blokkolók vagy modulátorok jelenlétében, illetve hiányában. A sejteket 10^6ml^{-1} koncentrációban, PBS+5mM D-glükóz oldatban előinkubáltuk a ligandokkal (CSA, paclitaxel stb.) 36 $^{\circ}\text{C}$ -on, majd a Pgp szubsztrátok hozzáadását követően további 30 percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket hideg PBS-el mostuk, centrifugáltuk, és a mérésig jégen tartottuk. Az áramlási citométeren 488 nm-en történő gerjesztést követően a R123-at 540 nm-en (F11), míg a DNR-t 580 nm (F12) feletti emisszióval mértük. A sejtek életképességét 30 μgml^{-1} PI hozzáadásával mértük a 620 nm (F13) feletti fluoreszcencia intenzitás detektálásával.

A Pgp fehérje jelenlétének kimutatása immunfluoreszcenciás technikával

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 felülszójából preparált Pgp ellenes monoklonális antitesttel ($10 \mu\text{gml}^{-1}$), vagy MM6.15 (M. Cianfriglia, Instituto 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.

Petefészek tumoros sejtek detektálása

A petefészek tumoros sejteket CA 125 monoklonális antitesttel azonosítottuk, amely a sejtekben nagymértékben expresszált tumorspecifikus antigént mutatja ki. A sejteket (10^6 sejt) 40 percig inkubáltuk $100 \mu\text{l}$, a kereskedelembe forgalmazott, előhígított mAb CA 125 monoklonális antitestet tartalmazó oldattal (mouse anti human CA 125 IgG1, MCA1914H, Serotec Ltd., Kidlington, Oxford). Másodlagos antitestként Alexa 488 GAMIG-al inkubáltuk a sejteket $10 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációban PBS-ben, 40 percig.

A sejtek életképességének mérése PI fluoreszcens festékkel

A sejtek életképességének meghatározása PI fluoreszcens festékkel történt áramlási citométeren, a 620 nm feletti emisszió mérésével. Az élő sejtek nem veszik fel a PI-ot, míg a sérült membránú sejtek sejtmagja intenzíven jelölődik a festékkel.

DNS tartam mérése PI fluoreszcens festékkel

A sejteket 70 %-os etanollal fixáltuk, és felhasználásig -20°C -on tároltuk. A fixált sejteket mostuk, PBS-ben felfuszpendáltuk és $100 \mu\text{gml}^{-1}$ RNA-ase hozzáadásával 30 percig 37°C -on inkubáltuk, majd $50 \mu\text{gml}^{-1}$ PI festékkel festettük.

3.4 A fluoreszcens antitest jelölések vizsgálata konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal

A membránban expresszált Pgp fehérje jelenlétét fluoreszcens antitest jelölés után konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Zeiss LSM 510) egyedi sejteken is kimutattuk. A sejteket UIC2 és MM6.15 elsődleges Pgp ellenes antitestekkel jelöltük. Másodlagos antitestként FITC-RAMIG, Alexa 488 GAMIG vagy Alexa 647 GAMIG specifikus antitestekkel, míg a sejtek sejtmagját PI DNS interkalálódó festékkel jelöltük. A FITC és az Alexa 488 festékeket 520 nm-en, míg a PI-ot 620 nm felett detektáltuk. Az Alexa 647 detektálására 640 nm feletti vágószűrőt használtunk.

Petefészek tumoros szövetek vizsgálata Pgp és petefészek tumor ellenes (CA 125) antitestekkel

Immunfluoreszcenciás és immunhisztokémiai jelölések

A formaldehid fixált, paraffinba ágyazott petefészek karcinóma mintákból 3 μM vastag metszeteket vágunk. A metszeteket deparaffináltuk és rehidratáltuk. Az antigének feltárása pepszines kezeléssel (0.1% pepszin 0.01 N sósavban, 10 percig inkubálva szobahőmérsékleten), vagy hőkezeléssel (nyomás alatt forralva) történt, a Pgp és a CA 125 antigének esetében is. A Pgp molekulákat UIC2 mAb ($10 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációban, 40 percig, PBS-ben), vagy MM6.15 mAb ($8 \mu\text{gml}^{-1}$ koncentrációban, 40 percig, PBS-ben) antitestekkel jelöltük, és másodlagos antitestként Alexa-GAMIG-ot (Alexa-488-konjugált kecske anti egér Ig(IgG2a), F/P=6.2; Sigma-Aldrich, Budapest) használtunk.

A szerózus és endometrioid adenokarcinómákból származó mintákat CA 125 antigén kimutatásával jellemeztük, egér anti-humán CA 125 antitest (IgG1; Serotec) és Alexa 488 GAMIG jelöléssel. A mintákat a fluoreszcens antitesttel történő jelölés után konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Zeiss LSM 510) vizsgáltuk.

3.5 Radiofarmakon akkumulációs mérések

Radiofarmakonok előállítása

Az ^{18}F FDG és a ^{11}C -kolin PET radiofarmakonokat a Debreceni Egyetem OEC PET Centrumának radiokémiai laboratóriumában szintetizálták, az ^{18}F FDG-t a Hamacher

és mtsai. (1986) által megadott módszerrel, a ^{11}C -kolint pedig Pascali és mtsai. (2000) által közölt módszer alapján. A MIBI jelölése $^{99\text{m}}\text{Tc}$ izotóppal standard kit technikával történt a Debreceni Egyetem Nukleáris Medicina Tanszék laboratóriumában.

A radifarmakonok akkumulációjának mérése

A PBS-ben mosott sejteket $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ koncentrációban 10 percig előinkubáltuk a ligandokkal (CSA, VER, paclitaxel, stb.) PBS és 5 mM D-glükózt tartalmazó oldatban 36°C -on. Ezt követően a mintákhoz $5 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ ^{18}F FDG-t, 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. Az úgynevezett multitraceres vizsgálatoknál a radiofarmakonokat és a fluorszcens szubsztrátokat együttesen is alkalmaztuk. 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 gamma számlálóval mértük (Canberra Packard), 1 perces beütésszám gyűjtéssel, az ^{18}F - és ^{11}C -érzékeny energia szinteken, valamint a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -érzékeny energia szinten. A bomlásra korrigált radiofarmakon felvételt beütésszám perc^{-1} (10^6 sejt) $^{-1}$ (cpm) egységekben számoltuk ki. Az eredményeket három független mérés -mérésenként három ismétléssel- átlag $\pm$ szórás értékével jellemeztük.

3.7 Kvantitatív ^{18}F FDG-PET vizsgálatokat kiértékelő módszerek összehasonlítása

Dinamikus PET vizsgálatok

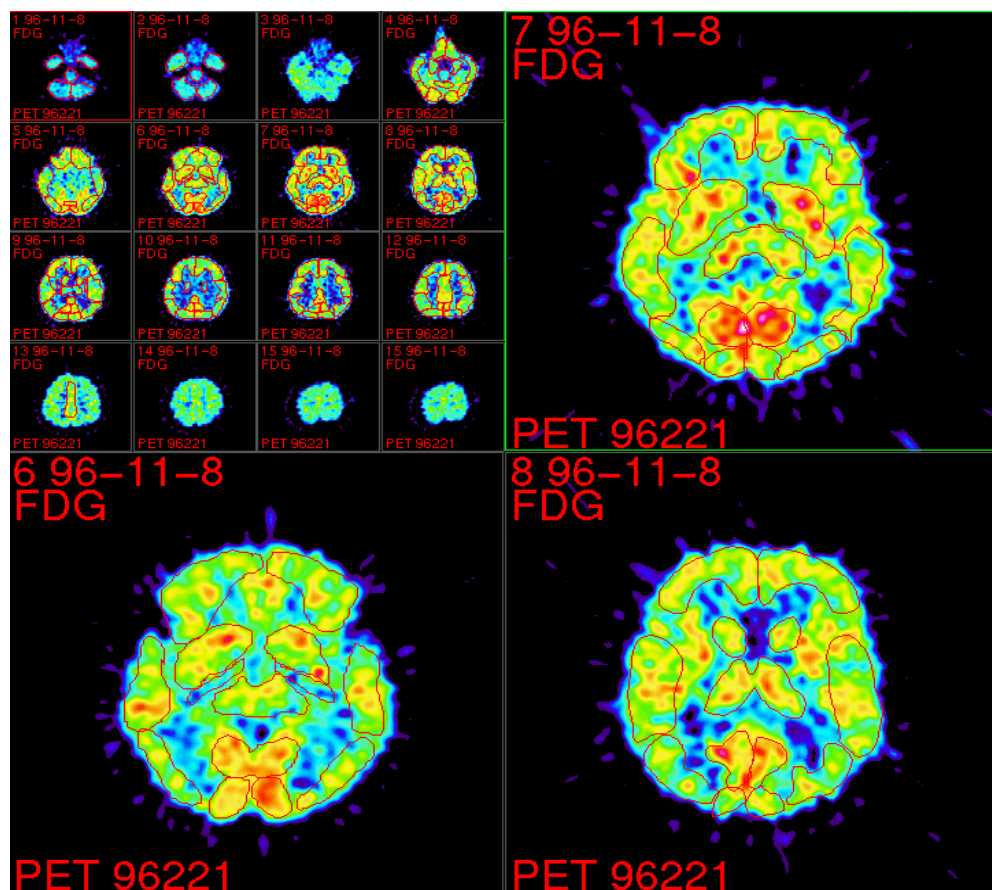
A kvantitatív PET-méréseket GE 4096 Plus egész test PET-kamerával végeztük 5 mm-es sugárirányú felbontás és 6.5 mm-es rétegvastagság mellett. A kamera axiális látótere 103 mm, amelyen belül 15 transzaxiális metszet készül el közvetlenül. A vizsgálatokat a Debreceni Orvostudományi Egyetem Kutatásetikai Bizottságának az engedélyével 5 egészséges személyen végeztük el, akiknél a PET-módszer, illetve az egyéb vizsgálatok funkcionális vagy struktúrális károsodást nem mutattak.

Radiofarmakónként ^{18}F FDG-t használtunk. A farmakon radiokémiai tisztasága 97 % fölött volt, minimálisan $2 \text{ Ci } \mu\text{mol}^{-1}$ specifikus aktivitással. A bolus injekció formájában (10 sec alatt, a jobb vagy bal vena cubitalisba) beadott aktivitás $0,15 \text{ mCi/testtömegkg}$ 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 (Szakáll és mtsai. 1998) az ^{18}F FDG radioaktivitását.

A képi rekonstrukció során Hanning filtert alkalmaztunk, 4,5 mm félértékszélességgel. A gyengítési korrekció elvégzéséhez az ^{18}F FDG injektálása előtt egy független transzmissziós vizsgálatot végeztünk ^{68}Ge vonalforrással. Az agy glükóz-metabolizmusának a kvantifikálása három-kompartmentes modell (Sokoloff és mtsai. 1977) alapján történt. A ROI-k (kitüntetett régió, region of interest) rajzolását és az TACT (időfüggő szöveti 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.

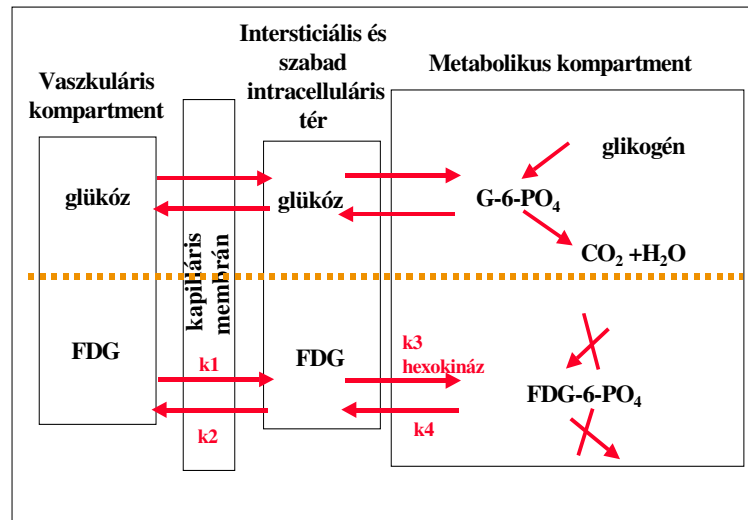
Vizsgálati személyenként 115-130 ROI-t vizsgáltunk (2. ábra), amely mindössze 22-25 jól definiálható anatómiai területnek felel meg, hiszen a legtöbb anatómiai képlet több metszetben is szerepel. A vizsgált anatómiai struktúrák a következők voltak: cerebellum*; pons; thalamus; gyrus rectus*; corpus callosum; 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 humán agy ^{18}F FDG-PET-képén ezek a területek könnyen elkülöníthetők és egyértelműen definiálhatók. Az egyes struktúrák elkülönítését az MR-vizsgálati képek és a PET-képek együttes megjelenítése segítette (Emri és mtsai. 1998). A három kiválasztott kvantitáló módszer statisztikai összehasonlítását lineáris korrelációs analízis segítségével végeztük. A korreláció jóságának leírására a korrelációs együttható négyzetét (R^2) az un. korrelációs determinánst használtuk.



2. ábra. Egészséges emberi agyról készített ^{18}F FDG-PET-kép, az általunk használt régiókat piros kontúrok határolják. A nagyobb mértékű szöveti ^{18}F FDG-felhalmozódást a színskála melegebb színei (vörös, sárga) jelölik, a hideg színek kisebb mértékű akkumulációra utalnak. Az ábra bal felső sarkában található 16 kisméretű panel a kamera 103 mm-es axiális látóterén belül elkészített transzaxiális metszetek mentén mutatja a radiofarmakon eloszlást. Ezek közül hármat nagyobb lépték mellett mutatnak be a nagyobb méretű panelek.

A vizsgált matematikai modellek leírása

A szöveti glükóz-felhasználás legáltalánosabb, Phelps-féle modellje a Sokoloff által leírt (Sokoloff és mtsai. 1977, Phelps és mtsai. 1979, Huang és mtsai. 1980) három-kompartmentes modellre épül (3.ábra).



3. ábra. A szövetek glükóz- és FDG-felhasználásának három-kompartmentes modellje

Ez utóbbi modell szerint az injektált FDG (ill. annak foszforilált formája) három kompartment között oszlik meg. A radiofarmakont a vaszkuláris kompartmentbe injektálják. A második kompartment térben nem lokalizálható egyértelműen, ez magába foglalja az intersticiális teret, valamint az intracelluláris tér azon részét, amelyben a glükózanalóg foszforilálatlan formában van jelen. A harmadik, ún. metabolikus kompartmentet sem lehet körülhatárolni a háromdimenziós reális térben, ez a “virtuális” tér az intracelluláris tér azon része, amelyben a glükózanalóg az intracelluláris enzimek által foszforilált formában van jelen. Az FDG foszforilációját a hexokináz enzim végzi, de az FDG-6-foszfát a glükóz-6-foszfáttal ellentétben a további glikolitikus enzimeknek már nem szubsztrátja, általában igen lassan defoszforilálódik, poláros jellege miatt a lipid barrieren sem jut át, így a sejtekben akkumulálódik (Phelps és mtsai. 1977, Phelps és mtsai. 1979, Reivich és mtsai. 1979, Hoh és mtsai. 1994). Az akkumuláció mértéke arányos a szöveti glükóz-metabolizmus intenzitásával.

Az 3. ábrán látható állandók közül k_1 az FDG-nek a vérből a szabad intracelluláris térbe, azaz a szöveti kompartmentbe irányuló facilitált transzportjának a sebességi állandója, k_2 az ellenirányú folyamaté, k_3 az FDG-foszforiláció, k_4 pedig a

defoszforiláció sebességi állandója. A Phelps-modell ezenkívül egy vaszkuláris faktor paramétert is tartalmaz (V_0), amely leírja, hogy a vaszkuláris térben levő FDG-aktivitásnak milyen hányada jelenik meg szöveti aktivitásként a viszonylag gyenge felbontóképesség miatt. Az FDG-metabolizmus sebessége (K) a kinetikai állandókból az (1) összefüggés alapján határozható meg.

$$K = \frac{k_1 k_3}{k_3 + k_2} \quad (1)$$

A szövetek glükóz-hasznosítása ($GMR_{ált}$) a glükóznak a plazmában mért C_{pgl} koncentrációja, az FDG sebességi állandói és egy korrekciós faktor (LC:Lumped Constant) segítségével határozható meg (Phelps és mtsai. 1979, Reivich és mtsai. 1985, Hoh és mtsai. 1994,) a (2) összefüggés szerint:

$$GMR_{ált} = \frac{C_{pgl}}{LC} \frac{k_1 k_3}{k_3 + k_2} \quad (2)$$

Az LC korrekciós faktorra az FDG és a glükóz felhasználásának eltérő kinetikai állandói miatt van szükség. A fenti kompartmentek közötti transzportfolyamatok kinetikai állandóit a modellt leíró differenciál egyenletrendszer megoldásával lehet meghatározni. A megoldáshoz, egyebek mellett, az szükséges, hogy a vizsgálat során többszörös vérvételre kerüljön sor (Schmidt és mtsai. 1991) és a szöveti radioaktivitás időfüggése is ismert legyen számos, egymást követő expozícióból.

A Patlak-módszer (Patlak és mtsai. 1983, Patlak és Blasberg 1985) alapfelvetése az, hogy a szövetekben történő defoszforiláció mértéke elhanyagolható, azaz a $k_4=0$. A tracer-kinetikai modell így egyszerűsödik és az azt leíró egyszerűbb egyenletrendszer megoldásához már elegendő a lineáris regressziós technika a három nagyságrenddel több számítógép-processzoridőt igénylő nem-lineáris regresszió helyett. Megoldásként az FDG-hasznosítás sebességének értéke (K) adódik, amiből a szöveti glükóz-metabolizmus mértéke GMR_{Pat} könnyen számítható, de a $k_1, \dots, k_4$ sebességi állandók értékeit ezzel a módszerrel nem lehet meghatározni.

Az általunk vizsgált harmadik eljárásban (Woodard és mtsai. 1975) használt SUV-paraméter egy viszonyszám, amely megmutatja, hogy a kiválasztott régióban mérhető aktivitás hányszorosa annak, amit a radiofarmakon feltételezett egyenletes szöveti eloszlása esetén mérhetnénk. Ehhez a módszerhez nem szükséges a radiofarmakon vérben mérhető aktivitásának folyamatos mérése, elegendő, ha csupán a beadott összaktivitás, a

testsúly és az általunk vizsgált régióban felhalmozódott aktivitás t_1 és t_2 időpontok között mérhető mennyisége ismert. Egy régióhoz rendelt SUV(t_1, t_2)-érték meghatározása a (3)

$$SUV(t_1, t_2) = \frac{ROI \text{ aktivitás koncentráció}(t_1, t_2)}{beadott \text{ aktivitás} / \text{testsúly} \text{ kg}} \quad (3)$$

összefüggéssel történik, ahol a számláló a kiválasztott régióban felhalmozódott aktivitás koncentrációnak a (t_1, t_2) időintervallumra számított átlaga. Egy ROI-t jellemző SUV-paraméter különböző időintervallumokban gyűjtött adatokból is meghatározható. Vizsgálatainkban azt is analizáltuk, hogy a különböző módon definiált SUV-értékek között mennyire szoros a kapcsolat.

A számítógépes szimulációk során a vérplazmában mért FDG-aktivitás időbeli változását egy egészséges személyen végzett konkrét mérés eredményével (vérgörbe) írtuk le. A $k_1, \dots, k_4$ kinetikai állandókhoz szimulációs ciklusonként véletlenszerűen változó numerikus értékeket rendeltünk. Az aktuális, időfüggő, szöveti FDG-felhalmozódást (TACT) a standard vérgörbe és az aktuális $k_1, \dots, k_4$ értékek alapján a MATLAB® program segítségével számoltuk. A TACT görbéből egyszerű integrálással nyertük az FDG-injektálást követő 40.-60. percek közötti adatgyűjtéshez tartozó SUV-paramétert. Mivel a GMR-SUV, illetve a K-SUV korrelációk analízise teljesen egyenértékű, a sebességi állandók numerikus értékeiből csak az FDG-hasznosítás sebességét (K) határoztuk meg.

3.7 Az adatok feldolgozása

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

4. Eredmények

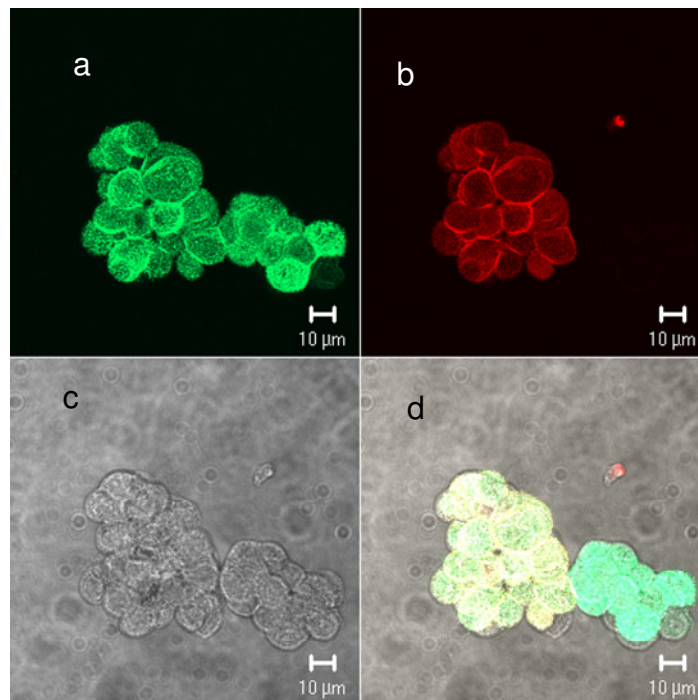
4.1 A Pgp pumpa expressziójának és működésének kimutatása petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejteken áramlási sejtanalizátoros méréssel

Sejtek

A betegek asciteséből származó mintákban a sejtkoncentráció $0.2-10 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ értékek között változott, az átlag $2.88 \pm 3.2 \times 10^5$ volt ($n=35$). Az anyagok és módszerek fejezetben ismertetett lizálós technikát követően az ascitesből származó sejtek életképessége 90 % fölött volt.

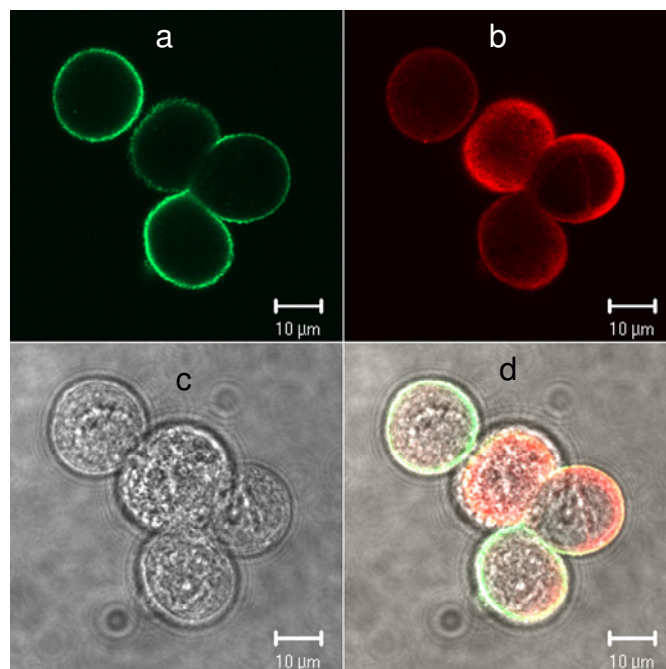
A Pgp fehérje expressziójának vizsgálata az ascites mintákból származó sejtekben

Az ascitesből származó sejtpopulációk közül 2 populáció mutatott különböző mértékű CA 125 pozitivitást. A populációk az előre kisszögű fényszórásuk alapján is elkülöníthetők voltak. A fényszórás alapján megállapítható, hogy az ascites sejtek közül a nagyobb méretűek mutattak a CA 125 pozitivitást. Az 4. és 5. ábrákon egy-egy reprezentatív mintát mutatunk be az ascitesből származó sejtekről készített konfokális mikroszkópos és fénymikroszkópos felvételtől. A sejteket (4.-5. ábra) CA 125 (a, zöld fluoreszcencia) és UIC2 (b, vörös fluoreszcencia) antitestekkel jelöltük. Az ábrákon az is látható, hogy az ascitesből származó sejtek nagy része pozitív CA 125 jelölést mutatott, és ezen sejtpopulációnak mintánként változó hányada volt Pgp pozitív. Például, az 4. ábrán látható, hogy amíg a 14. sorszámú minta ascites sejtjei pozitív CA 125 jelölést mutattak (petefészek tumor ellenes antitest próba), addig ugyanabban a mintában, a sejteknek csak egy része mutatott Pgp pozitivitást (UIC2 antitesttel jelölve). Az ábrán az is látható, hogy az ascites mintában levő sejtek nagyméretűek ($10 \mu\text{m}$ -nál nagyobbak). A 5. ábrán található összes sejt határozott CA 125 pozitivitást mutatott, és kisebb-nagyobb mértékben, de az UIC2 jelölés is pozitív volt ebben a mintában. A 6. ábrán egy betegből származó ascites mintának a CA 125 (F11) és UIC2 (F14) antitestekkel történő együttes jelölésének dot plot képe látható.



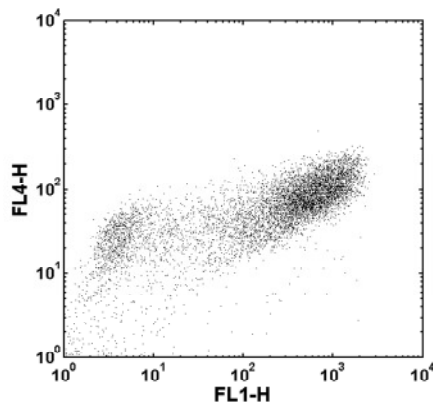
4. ábra. Reprezentatív felvételek a Pgp és a CA 125 expressziójának bemutatására ascitesből származó sejtekben , (14. számú minta).

Az ascites sejteket szimultán jelöltük CA 125 ellenes elsődleges antitesttel és Alexa 488 GAMIG másodlagos antitesttel (a. zöld fluoreszcencia), valamint UIC2 Pgp ellenes elsődleges antitesttel és Alexa 647 GAMIG másodlagos antitesttel (b. vörös fluoreszcencia). Az ábrán látható továbbá a sejtről készített fáziskontraszt mikroszkópos transzmissziós kép (c) és a CA 125, a Pgp specifikus jelölések és a fáziskontraszt mikroszkópos felvételek fuzionált képe is (d).



5. ábra. Reprezentatív minta a CA 125 és a Pgp expressziójának bemutatására ascitesből származó sejteken (22. számú minta).

Az ascites sejteket szimultán jelöltük CA 125 ellenes elsődleges antitesttel és Alexa 488 GAMIG másodlagos antitesttel (a. zöld fluoreszcencia), valamint UIC2 Pgp ellenes elsődleges antitesttel és Alexa 647 GAMIG másodlagos antitesttel (b. vörös fluoreszcencia). A felvételeket konfokális mikroszkóppal készítettük. Az ábrán látható továbbá a sejtről készített fáziskontraszt mikroszkópos transzmissziós kép (c), valamint a CA 125, a Pgp specifikus jelölések és a fáziskontraszt mikroszkópos felvételek fuzionált képe is (d).

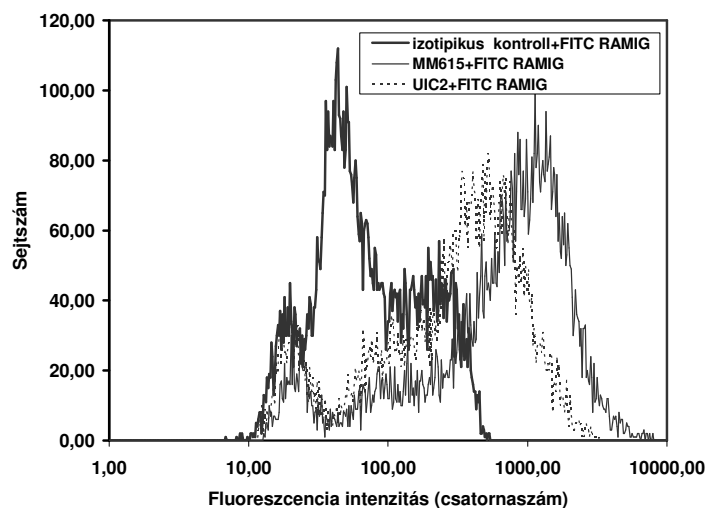


6. ábra. Ascites sejtek CA 125 ellenes antitest és Alexa 488 GARIG (FL1) és UIC2 Pgp ellenes antitest és Alexa 647 GARIG (FL4) párhuzamos jelölésének áramlási citométeres felvétele.

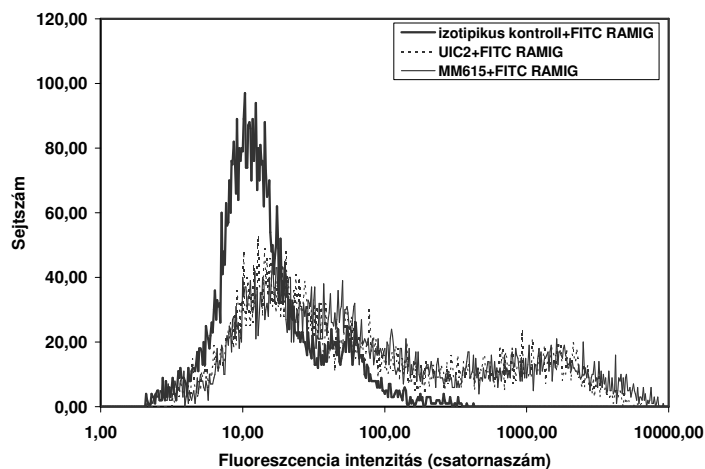
A petefészekes tumoros betegek ascites mintáiban található sejtekben a Pgp fehérje expresszió mértékét UIC2 és MM6.15 Pgp specifikus antitest kötődéssel mértük áramlási citométeren. Negatív kontrollként HPBL és JY humán B limfoid sejteket használtunk. A Pgp expresszió mértékét úgy határoztuk meg, hogy 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 intenzitása 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 7. ábrán két reprezentatív UIC2 és MM6.15 antitestekkel jelölt minta valamint az izotipikus kontroll fluoreszcencia hisztogramját mutatjuk be.

A.



B.



7. ábra. Két reprezentatív, UIC2 és MM6.15 antitestekkel jelölt ascites minta valamint izotipikus kontrolljaik fluoreszcencia hisztogramja. Az „A” minta a 8. sz. beteg, a „B” minta a 26. sz. beteg asciteséből származik.

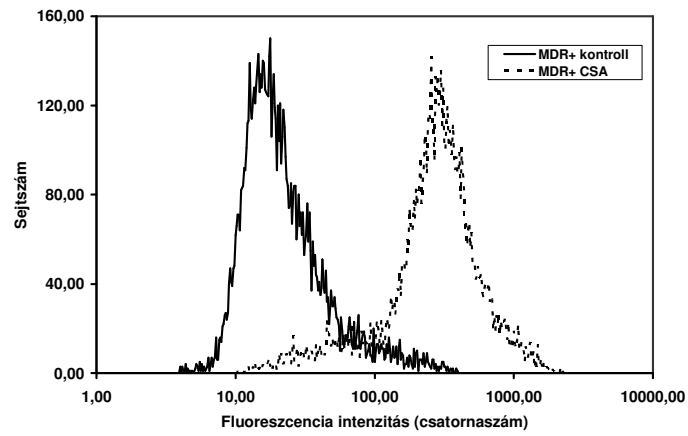
A Pgp pumpa funkciójának vizsgálata

A petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejtek Pgp pumpájának működését R123 fluoreszcens szubsztrát felvételével vizsgáltuk, cyclosporin A Pgp pumpablokkoló jelenlétében és hiányában.

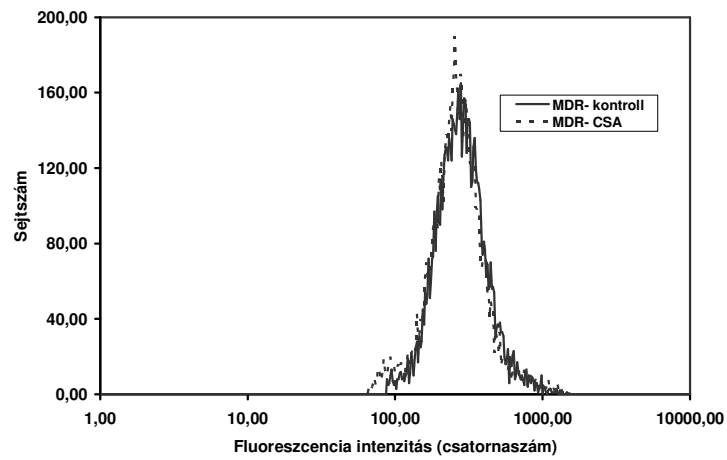
A Pgp funkciójának vizsgálatakor pozitív kontrollként NIH 3T3 MDR1 G185 sejteket, míg negatív kontrollként NIH 3T3, JY és HPBL sejteket használtunk. A Pgp pumpa működését egy arányszámmal jellemeztük, amit R_{R123} -nak neveztünk. Ezt az R_{R123} értéket úgy számoltuk ki, hogy a CSA kezelt sejteken mért R123 fluoreszcencia intenzitások középértékét elosztottuk a kezeletlen sejtek esetében mért R123 fluoreszcencia intenzitások középértékével. A CSA kezelés megnövelte a R123 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. Amennyiben ez az arány jóval nagyobb volt mint egy, az azt jelentette, hogy a sejtpopulációban a Pgp pumpa expressziója és pumpa működése nagymértékű. A Pgp pumpa működésére vonatkozó vizsgálataink eredményét az 2. táblázatban foglaltuk össze. 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 , $n=3$, $p < 0.0001$). A 8. ábrán az MDR pozitív és negatív sejtvonalak R123 akkumulációjának mértékét mutatjuk be kontroll sejtek esetén és CSA kezelés hatására.

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 sejtnél és 1.02 ± 0.1 a HPBL sejtek esetében ($n=3$, minden esetben). 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 kezelést követően.

A



B



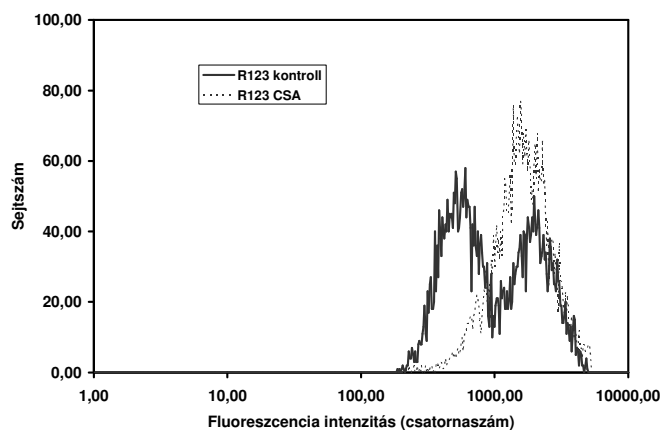
8. ábra. Az MDR pozitív (MDR⁺) (A) és MDR negatív (MDR⁻) (B) sejtek R123 felvételének fluoreszcencia hisztogramjai kontroll sejtek esetén és CSA kezelést követően.

Az ascitesből származó sejtes mintákban R123 felvételük alapján szubpopulációkat különíthetünk el. A CSA kezelt és kezeletlen sejtek R123 akkumuláció mértékének aránya, az R_{R123} érték 1.3 és 2.8 között változott a vizsgált ascites mintákban ($n=8$, 2. Táblázat), de az egyes mintákon belüli szubpopulációkban az R_{R123} 1 és 5 közötti értékeket mutatott. A 9. ábrán ugyanazon ascites minta Pgp fehérje expressziójának és a Pgp pumpa funkciójának párhuzamos áramlási citométeres mérésének eredményeit mutatjuk be. A 9.A ábra egy reprezentatív minta R123 felvételének fluoreszcencia hisztogramját mutatja kezeletlen sejtek (folytonos vonal) és CSA kezelést (szaggatott vonal) követően. A hisztogram alapján két populációt különíthetünk el. Az ascites mintából származó sejtek mintegy 60%-ában expresszáldott a Pgp pumpa és működése következtében ennek a populációnak a R123 felvétele kisebb volt, mint a Pgp-t nem expresszáló populációnak. Amennyiben CSA blokkolóval a pumpa működését meggátoltuk, akkor ennek a kisebb fluoreszcencia hisztogrammal jellemzett Pgp pozitív sejtpopulációnak a fluoreszcencia intenzitása (R123 felvétele) a Pgp negatív szubpopuláció szintjére nőtt meg. A 9.B ábrán ugyanezen minta Pgp expressziójának mértékét mutatjuk be, MM6.15 Pgp specifikus antitest jelöléssel. A funkcionális vizsgálat eredménye szoros korrelációt mutatott a Pgp expresszió mértékével (9.A és B ábrák).

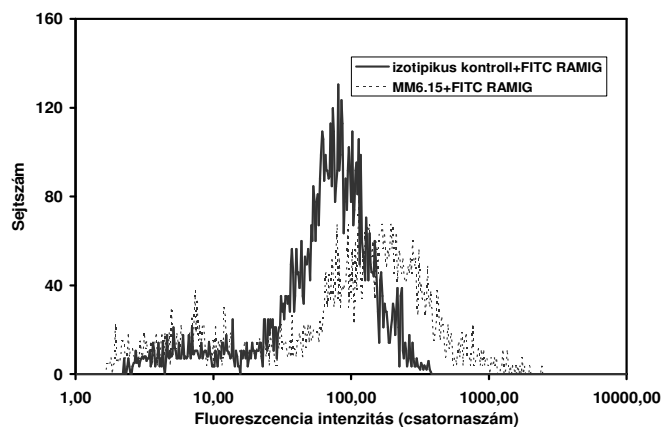
A 10. ábra egy másik beteg ascites mintájából származó sejteken a Pgp működésének (A) és expressziójának (B) mértékét mutatja be. Szintén erős korrelációt találtunk a R123 felvételt és az MM6.15 pozitivitást mutató sejtek között ($r=0.976$, $p=3.2 \times 10^{-5}$). A 11. ábrán ugyanannak a mintának az ascites sejtjeiről készült MM615 fluoreszcens jelölés és a PI fluoreszcens jelölés konfokális mikroszkóppal készült képei láthatók. Az ábrán bemutatjuk a sejtek transzmissziós fáziskontraszt mikroszkópos felvételeit is.

Meghatároztuk az egyes ascites minták proliferációs indexét és összehasonlítottuk azt a Pgp expressziós ill. funkcionális szintjével. Azt tapasztaltuk hogy a mintáról mintára változó Pgp expressziós és funkcionális különbségek nem az ascites sejtek különböző proliferációs szintjének a következményei.

A.



B.

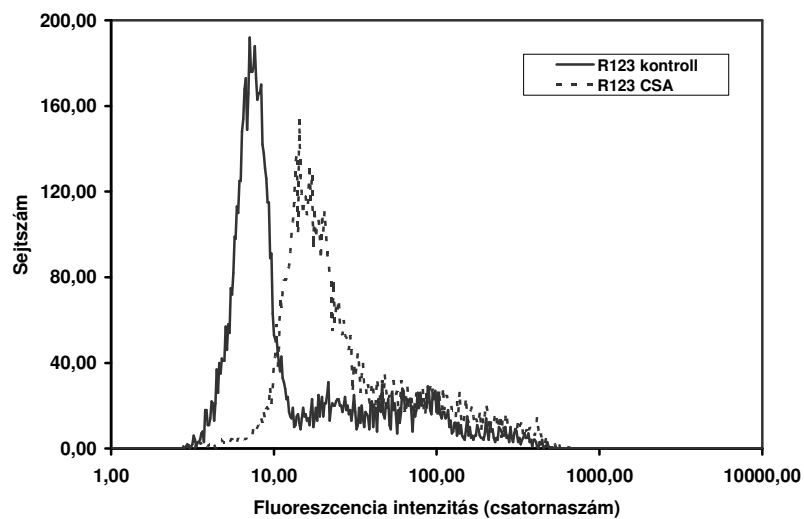


9. ábra. A 21. sz. minta asciteséből származó sejtek Pgp expressziójának és a Pgp pumpa működésének párhuzamos áramlási citométeres mérése.

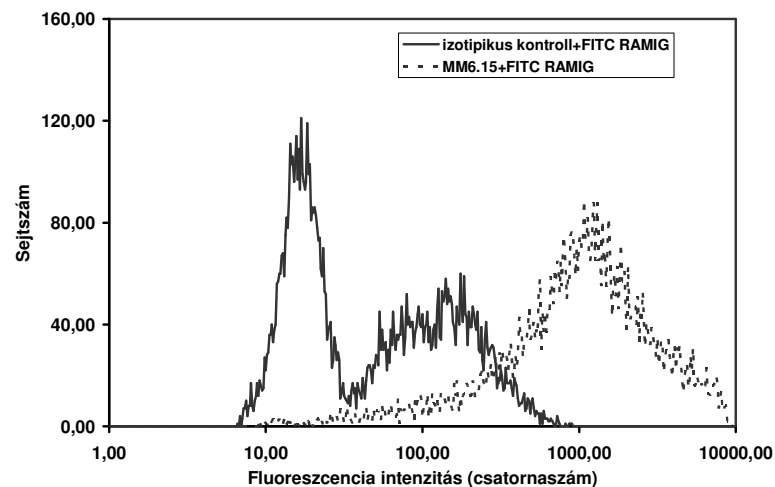
A: Kontroll és cyclosporin A (CSA) kezelt sejtek R123 felvételének hisztogramjai.

B: MM6.15 antitesttel és FITC-RAMIG másodlagos antitesttel jelölt sejtek valamint az izotipikus kontroll fluoreszcencia hisztogramjai.

A.



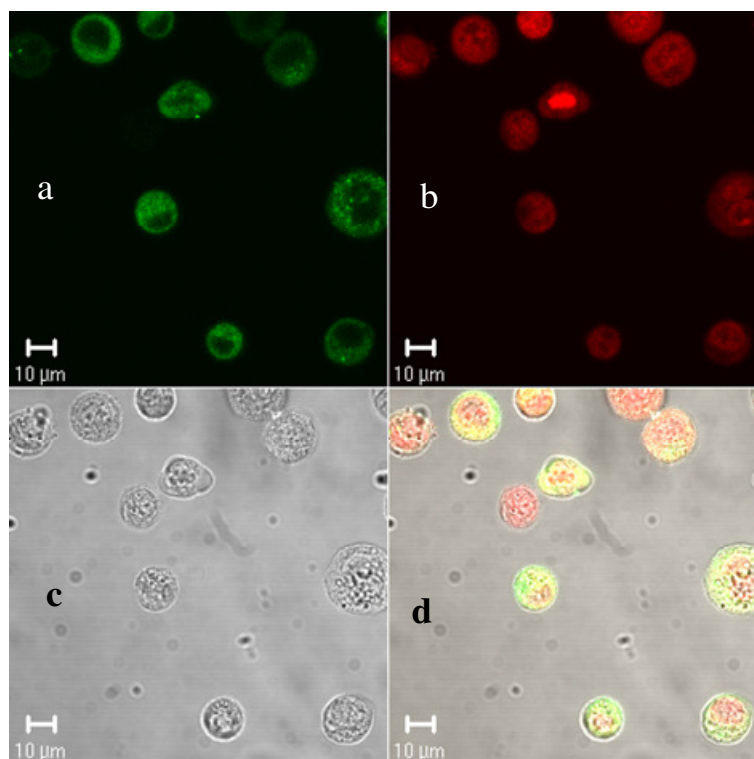
B.



10. ábra. A 17. sz. beteg asciteséből származó sejtek Pgp expressziójának és a Pgp pumpa működésének párhuzamos áramlási citométeres mérése.

A: Kontroll és cyclosporin A (CSA) kezelt sejtek R123 felvételének hisztogramjai.

B: MM6.15 antitesttel és FITC-RAMIG másodlagos antitesttel jelölt sejtek, valamint az izotipikus kontroll fluoreszcencia hisztogramjai.



11. ábra. Konfokális fluoreszcens mikroszkóp felvétel FITC-MM6.15 antitesttel (a) és PI-al jelölt (b) ascites sejtekről. Transzmissziós fénymikroszkópos felvétel ugyanezen mintáról (c), valamint fluoreszcens és transzmissziós képek fúziója (d). 17. számú minta.

Betegek Száma	Sejt koncentráció $\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$	$R_{\text{MM6.15}}$	Pgp ⁺ sejt % (MM6.15)	R_{R123} 3	R123 ⁺ sejt %	PI ⁺ %
15	0.1	9	28	1.57	20	10
16	0.4	6	43	1.4	30	8
17	5.5	18	76	2.1	70	5
18	0.5	14	47	2.6	40	7
19	1	17	21	2	20	3
21	1.2	8	58	2.8	60	3
22	0.7	11	67	1.3	60	10
23	3.7	16	89	2.5	70	10

2. táblázat. Az ascites sejtek Pgp pumpa működésének és expressziójának vizsgálata.

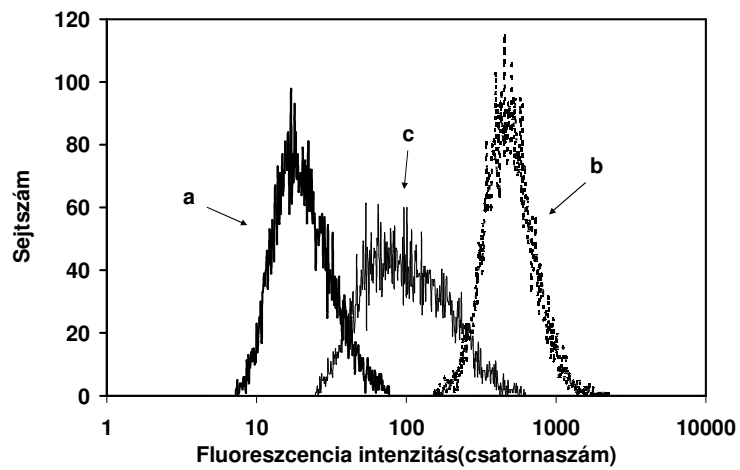
A sejteket MM6.15 Pgp-specifikus antitesttel jelöltük és mértük a sejtek R123 szubsztrát felvételét. A Pgp expresszió mértékét az $R_{\text{MM6.15}}$ értékkel, a Pgp pumpa működését pedig az R_{R123} értékkel jellemeztük. MM6.15 antitest jelölést és PI festést követően meghatároztuk a Pgp⁺ sejtpopulációt, valamint a PI⁺ sejtek arányát.

4.2 Paclitaxel kezelés hatása a tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációjára P-glikoprotein pozitív és negatív sejtekben

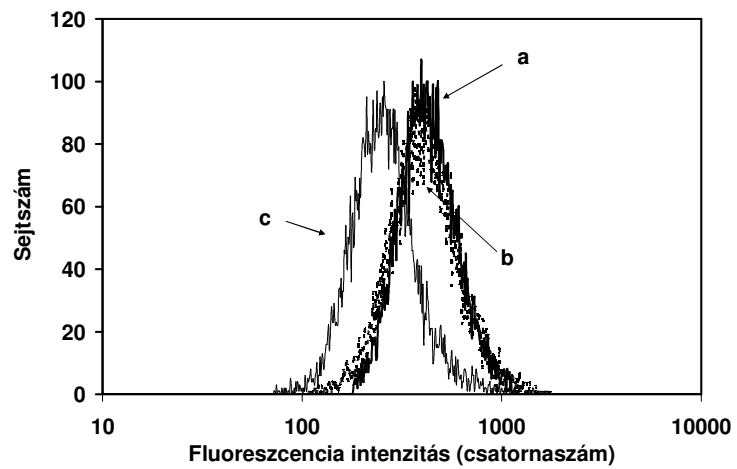
A Pgp expressziós szintjének és működésének meghatározása

A Pgp-t a fehérje extracelluláris epitópjához kötődő monoklonális antitesttel (UIC2) mutattuk ki indirect immunofluoreszcens 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, $n=3$). A 12. ábrán az A2780AD Pgp⁺ (A) és A2780 Pgp⁻ (B) sejtek R123 felvételét mutatjuk be a Pgp modulátor VER és CSA jelenlétében, ill. hiányában. A R123 felhalmozódás a Pgp⁺ sejtekben alacsonyabb, mint a Pgp⁻ sejtekben, mert a pumpa a szubsztát R123 jelenlétében aktiválódik és ez kisebb nettó influxot eredményez. Ha a Pgp pumpa működését VER vagy CSA modulátorral blokkoltuk, a Pgp⁺ sejtekben a R123 felhalmozódás növekedett, míg a Pgp⁻ sejtekben nem változott szignifikánsan. Hasonló eredményeket kaptunk egy másik Pgp szubsztát, a DNR használatakor is.

A.



B.



12. ábra. Az A2780AD Pgp⁺ (A) és A2780 Pgp⁻ (B) sejtek R123 felvételének fluoreszcencia histogramjai a Pgp modulátor VER és CSA jelenlétében ill. hiányában. a: kontroll, b: 20 μM CSA, c: 50 μM verapamil.

A paclitaxel hatása a tumordiagnosztikai radiofarmakonok felhalmozódására rákos sejtekben

A 13. A ábrán az A2780AD és A2780 sejtek ^{18}F FDG felvételének kinetikáját mutatjuk be paclitaxel jelenlétében és hiányában. Egy órás inkubáció után, az A2780AD sejtek ^{18}F FDG felvétele 73%-al volt magasabb, mint az A2780 sejté. Paclitaxel kezelés a ^{18}F FDG felhalmozódást tovább növelte, mind az A2780AD mind az A2780 sejtek esetében. Paclitaxel a humán limfoid JY sejtvonalban is megnövelte a ^{18}F FDG felvételt. Amennyiben a JY sejteket 25, 50 vagy 75 μM paclitaxel jelenlétében 30 percig inkubáltuk, a ^{18}F FDG felvétel a sejtekben a kontroll (paclitaxel nélküli inkubálás) 140, 160 ill. 170%-ára emelkedett.

A Pgp^+ sejtvonal $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvétele szignifikánsan kisebb volt, mint a Pgp^- párjéé, jelezve, hogy a Pgp kipumpálja a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI szubsztrátot a mutidrog rezisztens sejtekből (13. B ábra). Paclitaxel többszörösére növelte a Pgp^+ sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvételét, de csak csekély mértékben növelte meg azt, az A2780 és JY Pgp -t nem expresszáló sejtekben (14. ábra).

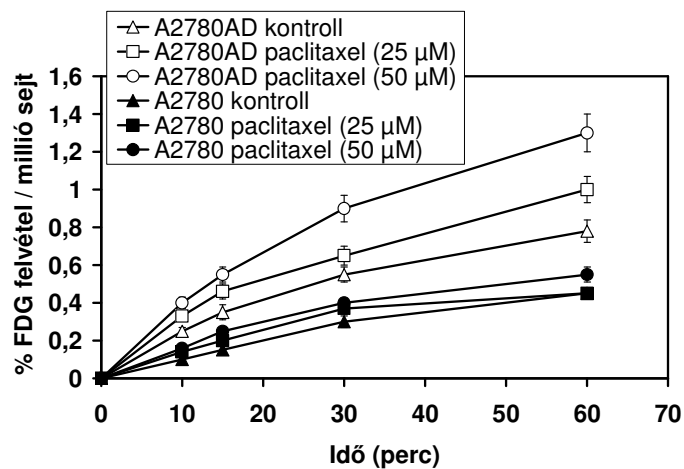
Az 3. Táblázat adataiból látható, hogy a paclitaxel koncentráció függő mértékben megnövelte mind a Pgp^+ mind a Pgp^- sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvételét, de a növekedés a Pgp^+ sejtek esetében sokkal kifejezettebb volt. A paclitaxel 30 perces inkubációs idő alatt nem változtatta meg szignifikánsan egyik vizsgált sejtvonal (A2780AD, A2780 és JYsejtek) ^{11}C -kolin felvételét sem.

Az A2780AD és A2780 sejtek R123, DNR, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, ^{18}F FDG és ^{11}C -kolin felvételét a 3. Táblázatban foglaltuk össze. VER (50 μM) és CSA (20 μM) gyakran használt Pgp modulátorok megnövelték az R123 és DNR felhalmozódását az A2780AD Pgp^+ sejtekben de nem változtatták meg azt az A2780 Pgp^- sejtekben. A CSA teljesen visszaállította, a VER pedig nem befolyásolta a Pgp^+ sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvételét. A paclitaxel (70 μM) megnövelte a Pgp^+ sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvételét (a kontroll érték 16x-osára), és szintén növelte a Pgp^- sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI felvételét de kisebb mértékben (csak a kontroll kétszeresére).

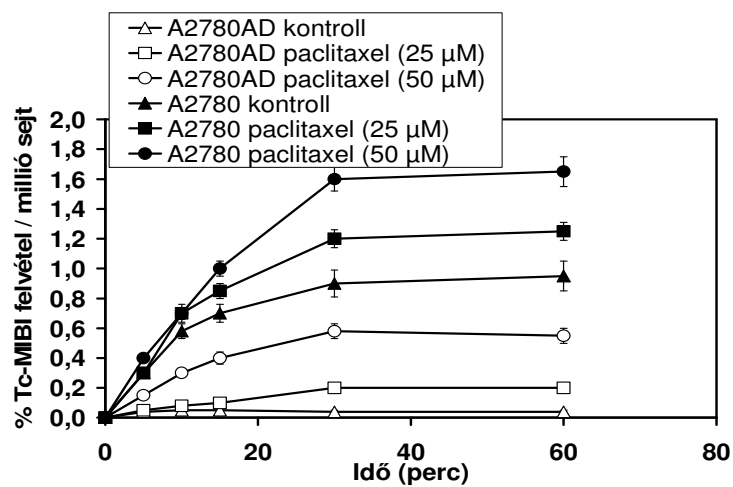
A paclitaxel megnövelte, mind az A2780AD, mind az A2780 sejtek ^{18}F FDG felvételét, azt sugallva, hogy ez a növekedés nem Pgp függő hatás következménye.

Áramlási citometriás méréseinkben a paclitaxel (25-75 μM) megemelte a Pgp^+ sejtek R123 és DNR felvételét a kontroll 200 ill. 150%-ára, ugyanakkor lecsökkentette a Pgp^- sejtek R123 és DNR felvételét a kontroll 80%-ára. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a Pgp^+ sejtek megnövekedett R123 és DNR felvétele Pgp függő. A paclitaxel (10-70 μM) és CSA kezelések nem változtatták meg a Pgp^+ és Pgp^- sejtek ^{11}C -kolin felvételét. A VER kezelés egyaránt lecsökkentette a ^{11}C -kolin akkumulációt a Pgp^+ és Pgp^- sejtekben, ami azt mutatja, hogy a VER hatása Pgp független.

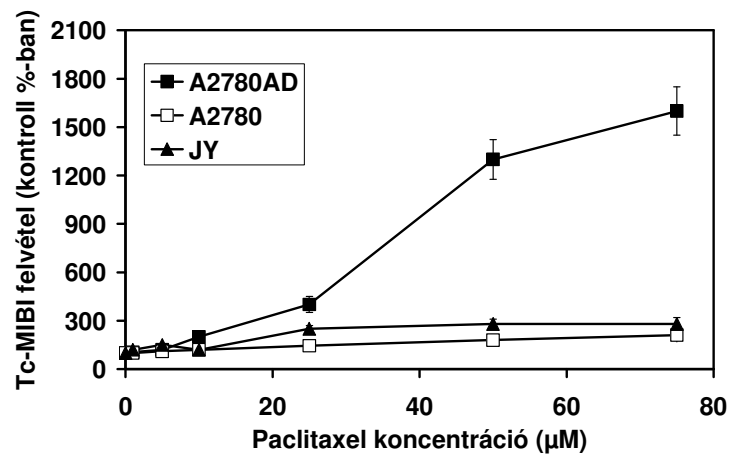
A.



B.



13. ábra. Az A2780AD (Pgp⁺) és az A2780 (Pgp⁻) sejtek ^{18}F FDG (A) és $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI (B) felvételének kinetikája paclitaxel jelenlétében és hiányában.



14. ábra. Paclitaxel kezelés hatása epitheliális petefészek tumoros sejtek ^{99m}Tc -MIBI felvételére.

Proliferációs ráta

Az A2780AD és A2780 sejteknek a sejtciklus különböző fázisaiban történő megoszlása teljesen azonos volt (4. Táblázat), bizonyítva azt, hogy a Pgp pozitív sejtek magasabb energia felvétele proliferációs aktivitásbeli különbségből nem származhat.

3.táblázat. R-123, DNR, ^{99m}Tc-MIBI, ¹⁸FDG és ¹¹C-kolin akkumuláció összehasonlító vizsgálata A2780AD és A2780 sejteken

Kezelés	R123 felvétel a kontroll %-ban	DNR felvétel a kontroll %-ban	^{99m} Tc-MIBI felvétel a kontroll %-ban	¹⁸ FDG felvétel a kontroll %-ban	¹¹ C-kolin felvétel a kontroll %-ban
A2780AD					
CSA (20 µM)	2100 ± 120 [*]	550 ± 15 [*]	1700 ± 70 [*]	140 ± 11 [#]	101 ± 3
VER (50 µM)	1200 ± 63 [*]	800 ± 21 [*]	92 ± 7	145 ± 12 [#]	52 ± 5 ^{**}
Paclitaxel (10 µM)	180 ± 10 ^{**}	150 ± 11 ^{**}	120 ± 9	120 ± 8	98 ± 4
Paclitaxel (25 µM)	210 ± 10 ^{**}	150 ± 6 ^{**}	250 ± 8 ^{**}	130 ± 11	102 ± 4
Paclitaxel (50 µM)	208 ± 13 ^{**}	150 ± 11 ^{**}	1200 ± 110 [*]	165 ± 20 ^{**}	97 ± 6
Paclitaxel (70µM)	212 ± 11 ^{**}	150 ± 11 ^{**}	1600 ± 130 [*]	160 ± 20 ^{**}	95 ± 7
A2780					
CSA (20 µM)	108 ± 5	92 ± 6	180 ± 8 ^{**}	145 ± 12 [#]	103 ± 3
VER (50 µM)	91 ± 13	96 ± 8	130 ± 7	92 ± 12	49 ± 6 ^{**}
Paclitaxel (10 µM)	86 ± 6	92 ± 11	110 ± 8	111 ± 8	97 ± 4
Paclitaxel (25 µM)	80 ± 7	91 ± 6	150 ± 6 ^{**}	123 ± 11	97 ± 5
Paclitaxel (50 µM)	83 ± 9	88 ± 11	180 ± 15 ^{**}	140 ± 12 [#]	102 ± 6
Paclitaxel (70µM)	80 ± 11	75 ± 5	210 ± 17 ^{**}	145 ± 17 [#]	96 ± 7

A sejteket 10 percig előinkubáltuk CSA, VER és paclitaxel különböző koncentrációjú oldataival. Ezt követően a mintákat tovább inkubáltuk 30 percig R123, DNR, ^{99m}Tc-MIBI, ¹⁸FDG vagy ¹¹C-kolin hozzáadásával. A ligand felvételeket a kontrollhoz viszonyított %-os változásokkal jellemeztük. Az adatok három független mérés átlag ± szórás adatait tartalmazzák. Szignifikancia szintek a kontrollhoz viszonyítva: ^{*}p<0.001, ^{**}p<0.01, [#]p<0.05,

4. táblázat. A2780AD és A2780 sejtek megoszlása a sejtciklus különböző fázisaiban.

Sejtciklus fázisai	A2780AD sejtvonal (% -os megoszlás)	A2780 sejtvonal (%-os megoszlás)
G1	51 ± 5	53 ± 3
S	22 ± 2	21 ± 3
G2+M	27 ± 2	26 ± 3

Az adatok hat független mérés átlag ± szórás adatait tartalmazzák.

4.3 FDG-PET vizsgálatok kvantitatív értékelő módszereinek összehasonlítása

Öt egészséges kísérleti személy három különböző módszerrel meghatározott agyi glükóz-hasznosítási jellemzői közötti összefüggéseket vizsgáltuk korrelációs analízissel. Az összehasonlítás alapját az öt független analízisből számolt R^2 korrelációs együtthatók értékei képezték, amelyek utalnak az egyes módszerek közötti azonosságokra, illetve eltérésekre. A 15.-17. ábrák mindegyikén egyetlen vizsgálati személy adatait felhasználva mutatjuk be az összehasonlítandó mennyiségek kapcsolatát. Hasonló ábrákat ill., számításokat nem célszerű az összes vizsgálati személy adatainak felhasználásával készíteni, ill. elvégezni, mert a személyek szerinti átlagolás torzítaná a különböző módszerekkel meghatározott SUV, $GMR_{\text{ált}}$, GMR_{pat} értékek kapcsolatát.

Elsőként megvizsgáltuk a különböző agyi területek 40.-60. percek közötti adatgyűjtésből származó SUV-értékeinek kapcsolatát ugyanezen területek más időrend szerint meghatározott SUV-értékeivel. Ezek a paraméterek nagyon szoros korrelációt mutattak egymással, függetlenül attól, hogy a bolus injekció beadását követő 40. perc után milyen időintervallumból nyert adatokból számítottuk azokat. A regressziós analízisből nyert $R^2=0,999$ alapján megállapítható, hogy az FDG-akkumulációt a 40. perc utáni bármely SUV-érték egyformán jól jellemzi. A SUV- és a többi módszer közötti összehasonlításhoz a továbbiakban a 40.-60. percek közötti adatgyűjtésből származó

SUV-értékeket használtuk fel, hangsúlyozva, hogy a kapott eredmények a nagyon szoros korreláció miatt a 40. perc utáni többi SUV-értékekre is érvényesek.

Az egyes agyi struktúrák általános modellel meghatározott $GMR_{\text{ált}}$ -értékeinek függvényében ábrázolva ugyanezen területek 40.-60. percek közötti adatgyűjtésből származó SUV-értékeit szembeötlő, hogy a nagy aktivitású régiók esetén ez a két mennyiség nagyon jó korrelációt mutat (15. ábra), van azonban néhány agyi terület, elsősorban alacsony aktivitású régiók, ahol kevésbé jó a korreláció. Összességében a SUV-módszerrel meghatározott értékek kielégítő korrelációt mutattak az általános módszerrel meghatározott legpontosabb értékekkel, amit a korrelációs determináns magas értéke ($R^2=0,92$) támaszt alá. Hasonló eredményt kapunk ($R^2=0,90$), ha a régiók általános módszerrel meghatározott $GMR_{\text{ált}}$ -értékei és ugyanezen területek Patlak-módszerrel meghatározott GMR_{Pat} -értékei közötti összefüggést vizsgáljuk. A régiók Patlak-módszerrel meghatározott GMR-értékeinek ugyanazon régiók SUV-értékeivel való összehasonlítása szoros korrelációra utal $R^2=0,96$ értékkel (16. ábra). A korreláció mindhárom esetben egyaránt jó és mindig a nagy aktivitású régiók azok, amelyeknél ez az átlagosnál is szorosabb, a kis aktivitású régióknál pedig kevésbé szoros.

Akár a Patlak-, akár a SUV-módszerrel meghatározott glükóz felhasználást hasonlítottuk össze a Phelps-féle általános modell alapján meghatározott értékekkel, a regressziós egyenesre legkevésbé illeszkedő pontok ugyanazon régiókhoz tartoztak, nevezetesen: corpus callosum, cerebellum l.u., capsula interna l.u., gyrus rectus l.u., pons. A következőkben az FDG-t legkevésbé halmozó nyolc régióra és a többi régióra külön határoztuk meg a korrelációt jellemző regressziós koefficiens (R), illetve négyzetének értékét. A Phelps-féle általános és Patlak-módszerrel meghatározott GMR-értékek közötti kapcsolatra az FDG-t gyengén halmozó nyolc régió esetén igen gyenge korrelációt ($R^2=0,07$) kaptunk, az FDG-t viszonylag jobban halmozó régiók esetén pedig szoros korrelációra utaló, magas korrelációs együttható érték ($R^2=0,98$) adódott.

A SUV- és az Phelps-módszer összehasonlítása során az előzőekhez nagyon hasonló képet kaptunk. Lazább volt a két módszerrel meghatározott GMR-értékek közötti kapcsolat ($R^2=0,26$) az FDG-t kevésbé halmozó régiók esetén (17A. ábra) és szorosabb ($R^2=0,98$) az FDG-t nagyobb mértékben halmozó régiók esetén (17B. ábra).

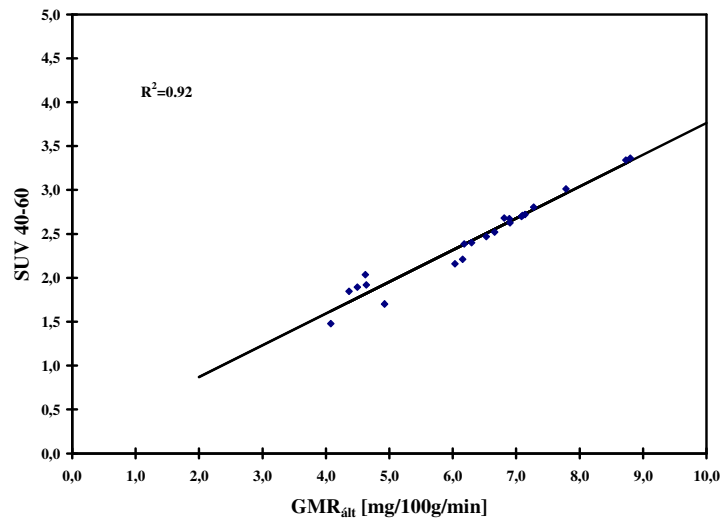
Az öt vizsgálati személy adataiból számolt korrelációs együtthatókat az 5. táblázatban foglaltuk össze. Jól látható, hogy a három módszernek a 15.-17. reprezentatív ábrákon dokumentált kapcsolata – az R^2 értéke – a vizsgálati személyek mindegyikénél hasonló.

A 18. ábra szemlélteti, hogyan változik az egyes régiókhoz meghatározott Phelps-féle általános és a Patlak-módszerrel meghatározott GMR-értékek százalékos különbsége a k_4 sebességi állandó, vagyis a defoszforiláció mértékének függvényében. A pontokra illesztett függvény alakja vizsgálati személyenként változik, de mindig monoton növekvő. A tengelymetszet minden esetben különbözik nullától, ami arra utal, hogy a két módszer által meghatározott GMR-értékek között $k_4=0$ esetén is jelentős a különbség.

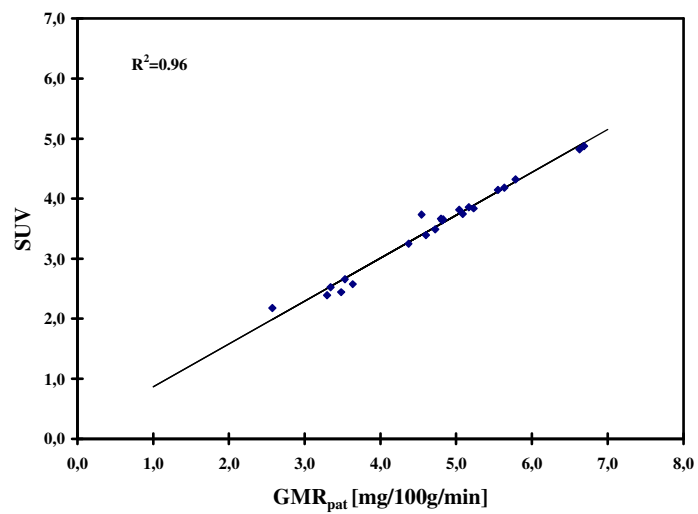
Szimulációs vizsgálatok

TACT-görbéket szimuláltunk olyan feltételek mellett, hogy a kinetikai állandók értékeit véletlenszerűen generáltuk a $k_1 = 0.243-0.846$, $k_2 = 0.78-0.981$, $k_3 = 0.101-0.005$, és $k_4 = 0-0.016$ intervallumokon belül, egyenletes eloszlás feltételezésével. A választott intervallumhatárok az egészséges és a melanóma áttéttel infiltrált májszövet állandóit reprezentálják (Wu és mtsai. 1996).

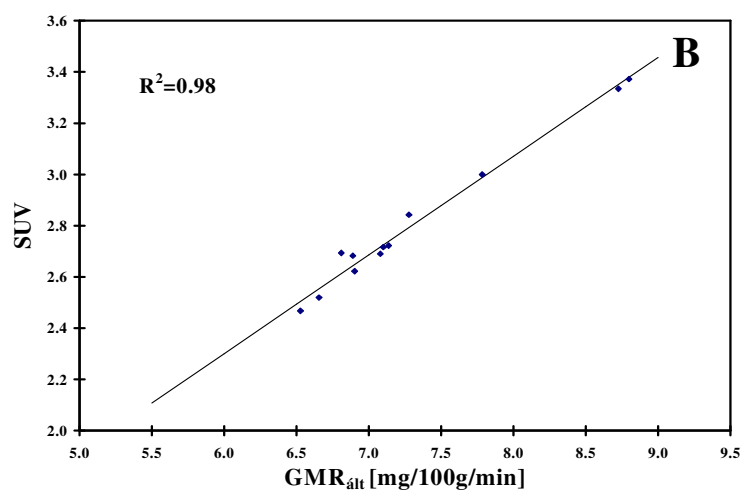
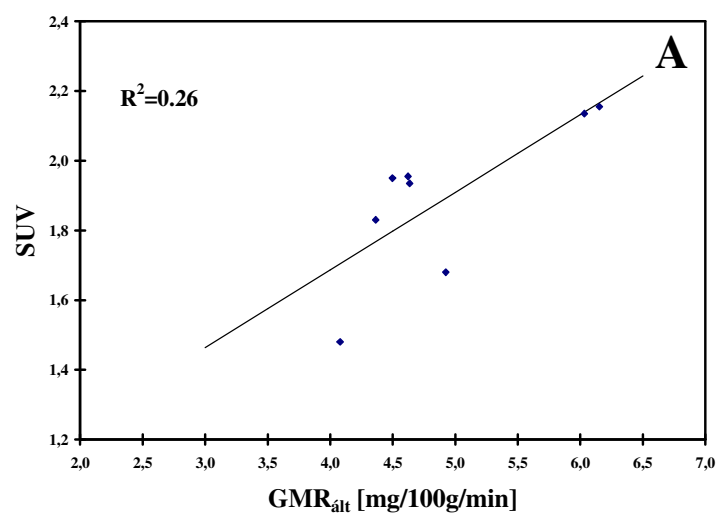
A 19. A ábrán bemutatjuk a 10000 szimulációs ciklusban nyert SUV-értékeket az FDG metabolikus sebesség függvényében. Érdekes, hogy ha $k_1=0,1$ és $k_4=0$ rögzített értékek mellett megengedjük, hogy k_2 és k_3 egyidőben és egymással azonos arányban változzon a $k_2=0,138-0,129$, illetve a $k_3=0,027-0,062$ intervallumhatárokon belül, úgy növekvő K értékekhez csökkenő SUV-értékek tartoznak (19. B ábra).



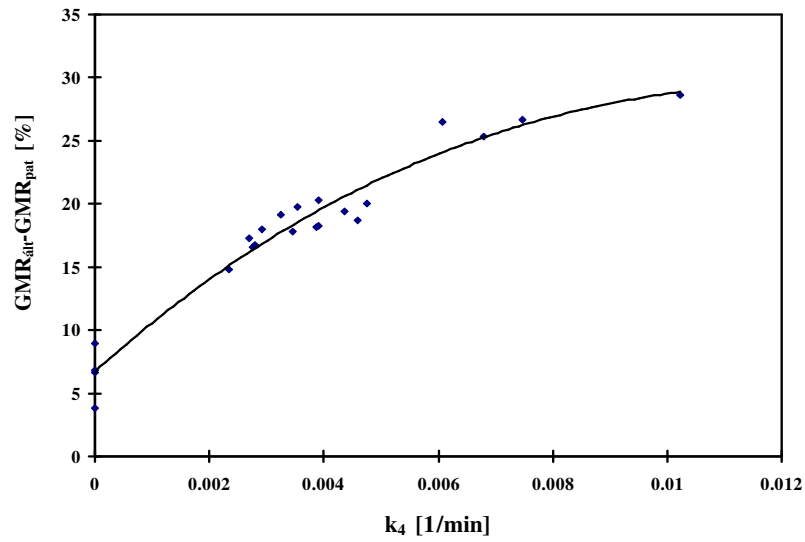
15. ábra. A régióként meghatározott SUV-értékek és az általános módszerrel meghatározott GMR_{ál}-értékek korrelációja.



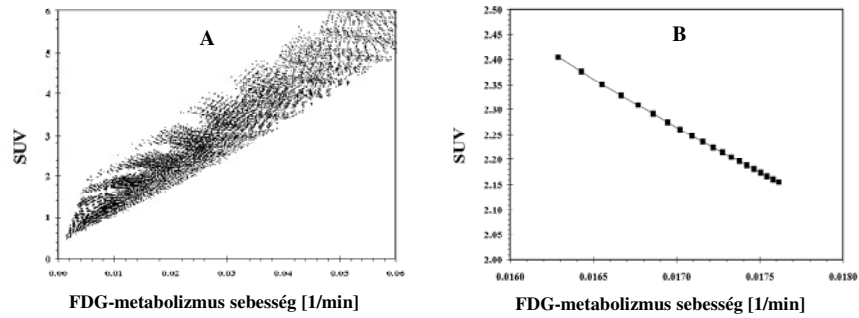
16. ábra. A régiók Patlak-módszerrel meghatározott GMR_{Pat}- és SUV-értékeinek korrelációja.



17. ábra. Az FDG-t kisebb (A) és nagyobb (B) mértékben halmozó régiókhoz tartozó SUV-értékek és a Phelps-módszerrel meghatározott $GMR_{\text{átl}}$ -értékek korrelációja.



18. ábra. A régiók általános- és Patlak-módszerrel meghatározott GMR-értékeinek százalékos különbsége a k_4 sebességi állandó függvényében.



19. ábra. A SUV és a K-paraméterek korrelációja 10000 szimulációs ciklus adatai alapján (A). Példa a SUV és K-paraméterek negatív korrelációjára különböző $k_1, \dots, k_4$ kinetikai állandóval szimulált TACT-görbék esetén (B).

Vizsgálati személy sorszama	R^2						
	$GMR_{\text{ált}} - SUV$			$GMR_{\text{ált}} - GMR_{\text{pat}}$			$SUV - GMR_{\text{pat}}$
	ROI csoport I.	ROI csoport II.	Összes ROI	ROI csoport I.	ROI csoport II.	Összes ROI.	Összes ROI
1.	0.26	0.98	0.92	0.07	0.98	0.90	0.96
2.	0.32	0.97	0.93	0.11	0.94	0.93	0.96
3.	0.41	0.96	0.93	0.25	0.95	0.95	0.98
4.	0.57	0.95	0.96	0.35	0.92	0.95	0.98
5.	0.44	0.96	0.94	0.26	0.97	0.93	0.97

5. táblázat. Három különböző módszerrel számolt glükóz-hasznosítás jellemző (SUV , $GMR_{\text{ált}}$, GMR_{pat}) közötti korrelációs determináns (R^2) értékei vizsgálati személyenként. Az R^2 értékeit külön-külön is meghatároztuk az FDG-t gyengén (ROI csoport I.) és jobban halmozó régió csoportokhoz (ROI csoport II.), valamint az összes régióra vonatkozóan (összes ROI)

5. Megbeszélés

5.1 A Pgp pumpa expressziójának és működésének kimutatása petefészek tumoros betegek asciteséből származó sejteken

A tumor mintákban lévő multidrog-rezisztens sejtek felismerése és karakterizálása fontos klinikai paraméter. Élő sejteken az áramlási citometria a legmegfelelőbb eljárás a fluoreszcensen jelölt Pgp jelenlétének és funkciójának kimutatására. A Pgp működését nyomon követhetjük és mérhetjük fluoreszcens szubsztrátok intracelluláris felhalmozódásának meghatározásával. Ilyen szubsztrát például a rodamin 123 (Homolya és mtsai. 1996). Ez idáig számos fluoreszcens módszert dolgoztak ki a multidrog rezisztens és multidrog szenzitív sejtek felismerésére és elkülönítésére (Feller és mtsai. 1995, Homolya és mtsai. 1996, Holló és mtsai. 1998, Karászi és mtsai. 2001) azonban egyikük sem foglalkozik petefészek tumoros betegek asciteséből gyűjtött malignus sejtek vizsgálatával.

Munkánkban először számolunk be egy olyan klinikai vizsgálatsorozat eredményéről, amely a petefészekrákos betegek asciteséből gyűjtött sejtekben kifejezett multidrog transzporterek kimutatásával és funkciójának vizsgálatával foglalkozik. Eredményeink különböző szintű Pgp expressziót mutattak az ascites sejteken. A Pgp pozitív sejtek aránya 10% és 79% között mozgott. Holló és mtsai. (1998) szintén beszámoltak humán MDR/Pgp és MRP1 immunológiai kimutatásáról és funkciójának vizsgálatáról. Ők külső és belső epitópokhoz kötődő fluoreszcensen jelölt antitestet használtak a Pgp kimutatására és arra a következtetésre jutottak, hogy az MDR ellenes külső epitópokhoz kötődő antitestek (UIC2 és MKR16) messze felülmúlják érzékenységükben a belső epitópokhoz kötődő antitesteket. Mi kísérleteinkben szintén külső epitópokhoz kötődő UIC2 és MM6.15 antitesteket használtunk. Megvizsgálva számos beteg asciteséből származó sejteket, amelyekben a Pgp szint tág határok között változott, a két antitesttel való jelöléssel meghatározott értékek között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk.

Meghatároztuk a proliferációs indexet és összehasonlítottuk azt a Pgp expressziós ill. funkcionális szintjével. Azt tapasztaltuk hogy a mintáról mintára változó Pgp expressziós és funkcionális különbségek nem a sejtek különböző proliferációs szintjének a következményei.

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 igen rövid idő alatt biztosít kiváló lehetőséget a Pgp jelenlétének és funkciójának vizsgálatára. A nagyszámú sejten végzett vizsgálat további előnye a biztos statisztikai feldolgozhatóság. Ezért bár egyedi sejteken szintén lehetséges a Pgp mikroszkópos kimutatása, mi azt csak mint egy hasznos további módszert javasoljuk, speciális esetekben. Tanulmányunkban kiváló korrelációról számolunk be a Pgp expressziója és a multidrog rezisztencia szintje között, extracelluláris immunjelölést és a CSA általi Pgp pumpa gátlás technikáját alkalmazva. Ez utóbbi megakadályozza a R123 intracelluláris koncentrációjának a Pgp működése miatt történő lecsökkenését.

Az R123 szubsztrátja számos ABC transzporternek, így a Pgp-nek de az MPR1-nek és a BCRP-nek is. Az azonban nagyon valószínű, hogy az immunofluoreszcens jelöléssel kimutatott Pgp a legfőbb oka a funkcionális assay-ben tapasztalható, (CSA-val blokkolt Pgp működés miatti) R123 falhalmozódásnak. Ezt a véleményünket az is alátámasztja, hogy a R123-at csak azok a mutáns BCRP-t expresszáló sejtek tudják kipumpálni, amelyekben glycín vagy treonin van a 420 pozíciójú arginin helyén (Honjo és mtsai. 2001), valamint az, hogy a MRP R123 transzportja tízszer kisebb mint a Pgp-é. 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 több beteg a kemoterápia hatására vált Pgp pozitívvá. Az ascites jelenléte és a Pgp pozitivitás között szignifikáns pozitív korrelációt találtak ($p=0.013$).

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

5.2 Paclitaxel kezelés különböző módon befolyásolja a tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációját a P-glikoprotein pozitív és negatív sejtekénél

Bár jelenleg igen intenzív kutatások folynak a kemoterápiában használt drogok hatásmechanizmusának, azok más drogokkal való interakciójának, ill. az ellenük való rezisztencia kialakulásának vizsgálatára (Shin és mtsai. 2003, Ferlini és mtsai. 2003, Horowitz és mtsai. 2004, Choi és Li 2005, Varma és Panchagnula 2005), a paclitaxel közvetlen hatását a tumordiagnosztikai radiofarmakonok akkumulációjára a Pgp⁺ és Pgp⁻ sejtekben még nem vizsgálták.

Kimutattuk, hogy az A2780AD humán petefészek carcinóma Pgp⁺ sejtek energia felhasználása szignifikánsan magasabb volt, mint az A2780 Pgp⁻ sejteké. Márián és mtsai. (2003) leírták, hogy a KB-V1 Pgp⁺ sejtek és ugyanabból a sejtvonalból képzett xenograftok szignifikánsan nagyobb ¹⁸FDG felvételt és magasabb glükóz metabolikus értékeket mutatnak, mint a KB-3-1 Pgp⁻ sejtek ill. a belőlük képzett xenotranszplantátumok.

Az, hogy a Pgp-t kifejező sejtek alap ATP aktivitása külsőleg hozzáadott szubsztrátok hiányában is magasabb, mint a Pgp-t nem kifejező sejteké azzal magyarázható, hogy valószínűleg endogén szubsztrátok tartják működésben a pumpát. (Sarkadi és mtsai. 1992, Druley és mtsai. 2001). Azt szintén megfigyelték, hogy a Pgp-t expresszáló sejtek intracelluláris pH-ja lúgosabb mint Pgp-t nem expresszáló társaiké (Goda és mtsai. 1996). A lúgosabb pH fenntartása szintén oka lehet a Pgp⁺ sejtek magasabb energia felhasználásának.

A paclitaxel hasonló mértékben növelte meg mind a Pgp⁺ mind a Pgp⁻ sejtek ¹⁸FDG felvételét, amiből arra következtethetünk, hogy a növekedésben Pgp független mechanizmusok játszhatnak szerepet (13. ábra, 3. Táblázat). A rákos sejtekben a

paclitaxel kezelés hatására megnövekedett glükóz felvétel okaként többféle mechanizmus is szerepet játszhat. A paclitaxel megváltoztathatja a membránban a glükóz transzporter fehérjéket körülvevő lipid környezetet. Például a membrán fluiditás megváltozása is létrehozhat ilyen hatásokat (Nadari és mtsai. 1989, Wiles és mtsai. 1994). A paclitaxel közvetlen kölcsönhatása a glükóz transzporter fehérjékkel szintén elképzelhető.

A 30 perces vizsgálati idő alatt (ez az időintervallum összemérhető a PET-kolin vizsgálatok idejével) a paclitaxel kezelés nem befolyásolta ^{11}C -kolin -az egyre elterjedtebben használt PET tumordiagnosztikai tracer (Torizuka és munkatársai 2003, Tian és munkatársai 2004)- akkumulációját a vizsgált sejtekben. Ezen időintervallumon belül nem változott a Pgp pozitív és negatív sejtek kolin felvétele sem a paclitaxel kezelés hatására. Fentiek alapján javasolhatjuk a ^{11}C -kolin vizsgálatokat azokban az esetekben, amikor a betegek paclitaxel kezelést kaptak.

A paclitaxel az egyik leghatásosabb drog a daganatos betegségek (beleértve az emlő és petefészek rákokat) kemoterápiás kezelésére (Holmes és mtsai. 1991, Gregory és DeLisa 1993, Jordan és mtsai. 1993). A mitózisban blokkolja a sejtosztódást azáltal, hogy a β -tubulin alegységekhez kötődik és nagyon stabil microtubulin polimereket képez amelyek ellenállnak a depolimerizációnak (Horowitz, 1992). Emellett a hatás mellett a paclitaxel számos más mechanizmuson keresztül is fejt ki citotoxikus hatást (Yusuf és mtsai. 2003). Kísérleteinkben a paclitaxel koncentráció függő mértékben visszaállította a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI akkumulációját a Pgp⁺ humán petefészek carcinóma sejtekben, ugyanakkor bár sokkal kisebb mértékben növelte a Pgp⁻ sejtek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI akkumulációját is (13. és 14. ábra). A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI akkumuláció kismértékű változása a Pgp⁻ sejtekben a paclitaxelnek a sejtmembrán struktúrájára és annak permeabilitására gyakorolt aspecifikus hatásával magyarázható. Pajeva és mtsai. (2004) arról számoltak be, hogy a doxorubicin (egy Pgp szubsztrát) és a Pgp modulátor verapamil együttes jelenléte a sejtmembrán fázisátmeneti hőmérsékletének jelentősebb csökkenését okozhatja, mint a szubsztrát egymagában. Ez a hatás utalhat az előbbi ligandok kombinált hatására és arra, hogy ez a hatás a membrán fluiditásával is kapcsolatban lehet. Vagyis arra, hogy a paclitaxel jelenlétében egyéb ligandok passzív diffúziója a membránon keresztül gyorsabban mehet végbe.

Yusuf és mtsai. (2003) leírták, hogy az MDR3, egy másik multidrog rezisztenciát okozó fehérje, amely közeli rokonságban áll a Pgp-vel, szintén szállítja a paclitaxelt de – hacsak mutációt nem szenved- csak nagyon kis mértékben. Ennek a fehérjének a szerepe a paclitaxel rezisztenciában nem bizonyított. Ez ideig nincsen határozott bizonyíték arra, hogy a paclitaxel rezisztenciában az MRP1, az LRP és a BCRP pumpákon kívül más fehérjéknek is lenne szerepe. Shin és mtsai. (2003) beszámoltak arról, hogy szignifikánsan nagyobb tumor/normál tüdő (T/N) ^{99m}Tc -MIBI akkumulációt tapasztaltak Pgp⁻ betegekben, a Pgp⁺ betegekhez hasonlítva. Ugyanakkor, nem találtak különbséget az LRP pozitív és negatív betegek ^{99m}Tc -MIBI akkumulációjában. Horiwitz és mtsai. 2004-ben ismertették szemikvantitatív real-time PCR kísérleteik eredményeit, A2780 sejtvonalat, valamint cisplatin, paclitaxel, topotecan és adriamycin ligandokat használva. A kontroll és rezisztens sejtvonalak teljes RNS reverz transzkripciója után négy különböző gén (MDR1, popoisomerase-1, MRP1, és β -actin) cDNS primereit amplifikálták. Az MDR1 mRNS expressziós szint volt az egyetlen, ahol a sejtvonalak között szignifikáns különbséget találtak. Tekintetbe véve a megfigyelést, hogy az MRP1 szintén jelen van az A2780 sejtvonalon is, feltételezhetjük, hogy a paclitaxel hatása független az MRP1 jelenlététől.

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. A paclitaxel, bár szintén megemelte a sejtek R123 és DNR felvételét –a Pgp expresszió függvényében- de ez a hatás, viszonyítva ^{99m}Tc -MIBI-hez, 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 (Shaphiro és mtsai. 1999, Loo és mtsai. 2003).

Következtetésül megállapíthatjuk, hogy a paclitaxel Pgp függő és független módon is befolyásolja a tumordiagnosztikai tracerek (^{18}F FDG és ^{99m}Tc -MIBI) felvételét,

ugyanakkor nem befolyásolja a ^{11}C -kolin akkumulációját. A paclitaxel fenti hatásának ismerete segíthet a Pgp^+ és Pgp^- tumorok korrekt *in vivo* diagnosztizálásában és a megfelelő terápia kialakításában.

5.3 FDG-PET vizsgálatok kvantitatív értékelő módszereinek összehasonlító analízise

A nagy érzékenységű PET-vizsgálatok egyik lehetséges alkalmazási köre a terápia hatékonyságának ellenőrzése. A különböző időpontban végzett mérések eredményei azonban csak akkor hasonlíthatók össze közvetlenül, ha azok abszolút skálán fejezhetők ki. A kvantitálás egzakt módon elvégezhető a Phelps-féle (Phelps és mtsai. 1979) tracer kinetikai analízis segítségével. Ez az eljárás azonban túlságosan hosszadalmas, jelentős számítógépes kapacitást igényel, ezért helyette egyszerűbb közelítő módszereket szokás alkalmazni (Woodard és mtsai. 1975, Patlak és mtsai. 1983, Patlak és Blasberg 1985).

Egészséges személyeken végzett agyi FDG-PET-vizsgálataink eredményei egyértelműen dokumentálják, hogy az agyszövet glükóz-metabolizmus sebességének meghatározásához használt egyszerűbb tracer-kinetikai modellek pontossága a különböző agyi régiókra nem azonos. A nagy glükóz igényű régiók Patlak- és SUV- módszerrel nyert glükóz metabolikus intenzitás adatai nagyon jó korrelációt mutatnak a Phelps-féle általános és legpontosabbnak tekintett módszer eredményeivel (5. táblázat 3. és 6. oszlopa). Ugyanakkor olyan régiók is vannak, melyek glükóz-metabolizmusának egyszerűsítő modellekkel történő meghatározása jelentős torzításokhoz vezet (5. táblázat 2. és 5. oszlopa).

Az utóbbi típusú régiók között a Patlak- és a SUV-módszer esetében egyaránt a következőket azonosítottuk: gyrus rectus (l.u.), pons, capsula interna (l.u.), corpus callosum, cerebellum (l.u.). A fenti agyi területek vagy alacsony metabolikus aktivitású, fehérállományú régiók (corpus callosum, capsula interna), vagy nagy ér közelében fekvő, illetve koponyaalapú képletek (pons, gyrus rectus, cerebellum). A régiók általános és Patlak-módszerrel meghatározott glükóz-metabolikus sebességei közti különbség két tényezőtől adódhat. A Patlak-módszer, egyrészt nem számol a szövetekben történő

defoszforilációval, másrésről a SUV-módszerhez hasonlóan figyelmen kívül hagyja és nem vesz korrekciót a mért szöveti radioaktiváshoz a vaszkuláris térből származó járulékra. Ez a kétféle elhanyagolás bizonyos régiók esetében a GMR-értékek számottevő torzításához vezethet. A 18. ábra meggyőzően dokumentálja mindkét hatást, hiszen a k_4 defoszforilációs állandó növekedésével együtt nő a Phelps-féle módszerrel és az egyszerűsített modellek segítségével nyert glükóz metabolikus aktivitásértékek különbsége és ez a különbség $k_4 = 0$ mellett sem tűnik el. A vaszkuláris tértől származó látszólagos szöveti aktivitás torzító hatása különösen jelentős lehet az FDG-t kismértékben halmozó régiók egyszerűsített modellek alapján meghatározott paramétereinél. A felsorolt területek esetében a vaszkuláris térből származó látszólagos szöveti aktivitás, illetve a defoszforiláció fokozott mértéke okozhatta a két egyszerűsítő modell használatakor tapasztalt eltérést.

Vizsgálataink eredményeképpen megállapíthatjuk, hogy a Patlak- és a SUV-módszerek kielégítő eredményt adnak a nagy metabolikus aktivitású régiók esetében, azonban a kis aktivitású (nagyobb fehérállomány tartalmú), illetve a nagy erek közelében fekvő koponyaalapi régiók glükóz-metabolizmus rátájának pontos meghatározásához az egyszerűsítő feltételeket nem tartalmazó, általános modell használata szükséges. Egészséges (fiziológiás) agyi régiókon végzett vizsgálataink folytatásaként a jövőben tanulmányozni lehetne, hogy milyen pontossággal lehet követni a taglalt módszerekkel a különböző régiókban a malignus kórképekkel járó, ill. a különböző terápiák hatására bekövetkező glükóz metabolikus változásokat.

A SUV és GMR-értékek közötti nem eléggé szoros korreláció (vagy akár ellenkező irányú változás) több okra is visszavezethető. A SUV-módszerrel nyert paramétert kizárólag a látótérben felhalmozódott aktivitás határozza meg. Ebbe az aktivitásba beletartozik a szövetekben lévő, még nem foszforilált vagy defoszforilált FDG-aktivitása is, valamint az esetleg közeli vaszkuláris térből (a véges felbontóképesség miatt) származó radioaktivitás-járulék. A GMR ugyanakkor az FDG, ill. a glükóz foszforilációjának a sebességét jellemzi és értékét az előbbi faktorok nem befolyásolják.

Az FDG felhalmozódását leíró, három-kompartmentes kinetikai modell segítségével végzett számítógépes szimuláció szerint a SUV-paraméter és a K

glükózhasznosítás között nincs meghatározott függvénykapcsolat. Fiziológiás és patológiás körülmények esetén a két mennyiség szorosabb vagy lazább korrelációban van egymással, de előfordulnak olyan állapotváltozások is, amelyek során a két mennyiség ellenkező irányban változik.

Fentiekre való tekintettel, mielőtt egy-egy konkrét kórkép esetén a szöveti glükóz-metabolismus jellemzésére a SUV-módszert használnánk, előzetes vizsgálatokat kell folytatni. Ennek során dinamikus PET-vizsgálatokkal nyert adatokból SUV-értékeket kell számolni és meg kell határozni az általános Phelps-modell szerinti analízissel a $k_1, \dots, k_4$ kinetikai állandókat, illetve a K glükózhasznosítás értékét is. Ha az előzetes vizsgálatokból nyert SUV és K értékek azonos módon és egymással korrelációban változnak, úgy megengedhető, hogy a malignus kórkép jellemzésére vagy a terápia eredményének le mérésére az egyszerű SUV-módszert lehessen alkalmazni.

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. Következtetésként 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.

Summary

In our experiments we detected the presence and measured the function of the P-glycoprotein using fluorescence and isotope techniques. We showed for the first time in clinical samples that the Pgp is present to different extents in the cells derived from the ascites of patients with ovarian cancer. The percentage of Pgp positive cells in the ascites of patients treated with chemotherapy was between 10-79%. The expression of the Pgp pump was proved by indirect immunofluorescence method, while the function by the detection of the accumulation of R123 fluorescence dye in the cells. We found strong correlation between the rate of the expression and the function of the protein.

We observed higher ^{18}F FDG PET radiotracer accumulation in the Pgp⁺ human adenocarcinoma-derived ovarian cell line A2780AD than its P-gp⁻ counterpart A2780. Paclitaxel treatment further enhanced the difference in ^{18}F FDG accumulation but did not influence the accumulation of the ^{11}C -choline tumor-diagnostic PET radiotracer. The accumulation of the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI Pgp substrate and SPECT radiotracer was significantly lower in the A2780AD Pgp⁺ cells than in their Pgp⁻ counterparts. Paclitaxel treatment influenced the accumulation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI on Pgp dependent and Pgp independent way. Based on our observations we may draw the conclusion that paclitaxel treatment influences the accumulation of the tumor-diagnostic tracers in different ways in Pgp positive and negative cells which should be taken into consideration upon coming to correct diagnostic decision.

We carried out detailed analyses of the same set of data using three different methods to quantitate the FDG accumulation in different regions of the human brain. Using correlation analyses we proved, that the simplifying methods such as the SUV and Patlak methods can only be used in certain regions of the brain with good correlation to the general Phelps method. We also proved that both of the simplifying methods lead to distortion in the same regions of the brain. A possible reason of the distortion is that the simplifying methods do not take into consideration the degree of dephosphorylation of FDG-6P and the virtual appearance of the drug which can be relatively high in the vicinity of vascular compartments.

6.1 Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

1. Az ascites sejtekre kidolgozott áramlási citométeres Pgp detektálási módszerünk segíthet a petefészek tumoros betegek megfelelő kezelési protokolljának kidolgozásában.
2. Hasonlóan hozzájárulhat egy *in vivo* Pgp detektálási módszer kidolgozásához az az eredményünk is, hogy a petefészek tumoros sejtvonal ^{18}F FDG felvétele, azaz a glükóz metabolizmusa nagyobb ugyanazon sejtvonal Pgp-et expresszált populációjában, mint a Pgp-et nem expresszált párjánál. Kiegészítve az ^{18}F FDG-PET vizsgálatokat $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI-SPECT vizsgálatokkal, az *in vivo* detektálási módszer tovább pontosítható.
3. Annak kimutatása, hogy a tumoros sejtekben a paclitaxel citosztatikum kezelés *in vitro* körülmények között megváltoztatja (Pgp függő és Pgp független módon is) az ^{18}F FDG és a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI akkumulációs kinetikáját, a képalkotó diagnosztikai technikák esetében a helyes diagnózis felállításánál plusz információt jelent.
4. Azon megfigyelésünk, hogy a petefészek tumoros sejtvonal ^{11}C -kolin akkumulációját a paclitaxel kezelés nem befolyásolja, további érvként szolgálhat ahhoz, hogy a ^{11}C -kolint szélesebb körben is alkalmazzák a PET tumordiagnosztikában, nőgyógyászati daganatok, illetve korábbi paclitaxel kezelések esetén.
5. A különböző módszerekkel végzett kvantitatív ^{18}F FDG-PET vizsgálatok kritikai összehasonlítása segítséget nyújthat a különböző helyeken, időben és módszerekkel végzett PET vizsgálatok összehasonlítására. Az így nyert ismeretek hatékony segítséget jelenthetnek a helyes diagnózis felállításában, a kórlefolyás prognosztizálásában és a terápia hatékonyságának ellenőrzésében. A kapott eredmények felhasználhatók a multidrog rezisztencia ^{18}F FDG-vel történő *in vivo* kimutatási módszerének kidolgozásánál is.

7. Irodalomjegyzék

Ambudkar S, Kim IW, Sauna ZE. The power of the pump. Mechanism of action of P-glycoprotein (ABCB1). Eur. J. Pharm. Sci. 27, 392-400, 2006.

Arao S, Suwa H, Mandai M, Tashiro H, Miyazaki K, Okamura H, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M. Expression of multidrug resistance gene and localization of P-glycoprotein in human primary ovarian cancer. Cancer Res. 54, 1355-1359, 1994.

Aslam N and Marino CR. Malignant ascites: new concepts in pathophysiology, diagnosis, and management. Arch. Intern. Med. 161, 2733-2737, 2001.

Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. Anticancer Res. 20, 1061-1067, 2000.

Barbics, E., Kronauge, J.F., Cohen, D., Davison, A., Jones, A.G., Croop, J.M. Characterization of P-glycoprotein transport and inhibition *in vivo*. Cancer Res. 58, 276-282, 1998.

Beck WT, Grogan TM. Methods to detect P-glycoprotein and implications for other drug resistance-associated proteins. Leukemia 11, 1107-1109, 1997.

Beck WT, Grogan TM, Willman CL, Cordon-Cardo C, Parham DM, Kuttesch JF, Andreeff M, Bates SE, Berard CW, Boyett JM, Brophy NA, Broxterman HJ, Chan HSL, Dalton WS, Dietel M, Fojo AT, Gascoyne RD, Head D, Houghton PJ, Srivastava DK, Lehnert M, Leith CP, Paietta E, Pavelic ZP, Rimsza L, Roninson IB, Sikic BI, Twentymen PR, Warnke R, Weinstein R. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. Cancer Res. 56, 3010-3020, 1996.

Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease, Annu. Rev. Biochem. 71, 537-592, 2002.

Brooks TA, Kennedy DR, Gruol DJ, Ojima I, Baer MR, Bernacki RJ. Structure-activity analysis of taxane-based broad-spectrum multidrug resistance modulators. Anticancer Res. 24, 409-415, 2004.

Broxterman HJ, Lankelma J, Pinedo HM. How to probe clinical tumour samples for P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein. Eur. J. Cancer 32, 1024-1033, 1996.

Buchholz S, Keller G, Schally AV, Halmos G, Hohla F, Heinrich E, Koester F, Baker B, Engel JB. Therapy of ovarian cancers with targeted cytotoxic analogs of bombesin,

somatostatin, and luteinizing hormone-releasing hormone and their combinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 10403-10407, 2006.

van der Burg ME. Advanced ovarian cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2, 109-118, 2001.

Bush JA, Li G. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *Int. J. Cancer* 98, 323-330, 2002.

Cherif A, Farquhar D. N-(5,5-diacetoxypent-1-yl)doxorubicin - a new intensely potent doxorubicin analog. *J. Med. Chem.* 35, 3208-3214, 1992 .

Choi J, Li X. The effect of verapamil on the pharmacokinetics of paclitaxel in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24, 95-100, 2005.

Choi Y, Hawkins RA, Huang SC, Gambhir SS, Brunken RC, Phelps ME, Schelbert HR. Parametric images of myocardial metabolic rate of glucose generated from dynamic cardiac PET and 2-[¹⁸F]Fluoro-2-deoxy-d-glucose studies *J. Nucl. Med.* 32, 733-738, 1991.

Costa S, Terzano P, Santini D, Ceccarelli C, Martoni A, Angelelli B, Panetta A, Bovicelli A, Cristiani P, Lipponen P, Erzén M, Syrjänen S, Syrjänen K. Regulators of cell cycle, apoptosis and proliferation as determinants of response to therapy and disease outcome. *Am J. Clin. Pathol.* 116, 729-737, 2001.

Daemen BJG, Elsinga PH, Paans AMJ, Wieringa AR, Konings AW, Waalburg W. Radiation-induced inhibition of tumor growth as monitored by PET using L-[1-¹¹C]Tyrosine and Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose. *J. Nucl. Med.* 33, 373-379, 1992.

Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 6, 123-142, 2005.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42, 1007-1017, 2001.

Del Vecchio S, Ciarmiello A, Salvatore M. Clinical imaging of multidrug resistance in cancer. *Q. J. Nucl. Med.* 43, 125-131, 1999.

Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss L. Quantitative studies using positron emission tomography (PET) for diagnosis and therapy planning of oncological patients. *Hell. J. Nucl. Med.* 9, 10-21, 2006.

Druley TE, Stein WD, Roninson IB. Analysis of MDR1 P-glycoprotein conformational changes in permeabilized cells using differential immunoreactivity. *Biochemistry* 40, 4312-4322. 2001.

Eckhardt S, Hernádi Z, Thurzó L, Telekes A, Sopkova B, Mechl Z, Pawlicki M, Kerpel-Fronius S. Phase II clinical evaluation of etoposide (VP-16-213, Vepesid) as a second line treatment in ovarian cancer. *Oncol.* 47, 289-295, 1990.

Eid H, Bodrogi Y, Csokay B, Olah E, Bak, M. Multidrug resistance of testis vancers: the study of clinical relevance of P-glycoprotein expression. *Anticancer Res.* 16, 3447-3452, 1996.

Eid H. Mibgfang L, Insitoris E, Bodrogi I, Bak M. MRP expression of testicular cancers and its clinical relevance. *Anticancer Res.* 20, 4019-4022, 2000.

Emri M, Kisely M, Lengyel Z, Balkay L, Márián T, Mikó L, Berényi E, Sziklai I, Trón L, Tóth A. Cortical projection of ppheripheral vestibular signaling. *J. Neurophysiol.* 89, 639-2646, 2003.

Emri M, Márián T, Kövér G, Berényi E, Ésik O. Registration: a powerful tool to combine information by different imaging modalities, In *Positron Emission Tomography: A Critical Assessment of Recent Trends*. Edited by Gulyás B., Müller-Gärtner, H.W., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 143-153, 1998.

Endres CJ, Hsiao P, Chung H, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 501-517, 2006.

Evans, A.C., Diksic, M., Yamamoto, Y.L., Kato A., Dagher A., Redies C., Hakim A.. Effect of vascular activity in the determination of rate constants for the uptake of ¹⁸F-labeled 2-Fluoro-2deoxy-D-glucose: Error analysis and normal values in older subjects. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6, 724-738, 1986.

Fanti S, Franchi R, Battista G, Monetti N, Canini R. PET and PET-CT. State of the art and future prospects. *Radiol. Med.* 110, 1-15, 2005.

Feller N, Kuiper CM, Lankelma J, Ruhdal JK, Scheper RJ, Pinedo HM, Broxterman HJ. Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. *Br. J. Cancer* 72, 543-549, 1995.

Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, Distefano M., Filippetti F, Martinelli E, Ferrandina G, Gallo D, Ranelletti FO, Scambia G. Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. *Mol. Pharmacol.* 64, 51-58, 2003.

Fishman A, Alpert N. FDG-PET in oncology: There's more to it than looking at pictures. *J. Nucl. Med.* 34, 6-11, 1993.

Friedenberg WR, Spencer SK, Musser C, Hogan TF, Rodvold KA, Rushing DA, Mazza JJ, Tewksbury DA, Marx JJ. Multi-drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 34, 171-178, 1999.

Fukunaga T, Okazumi S, Koide Y, Isono K, Imazeki K. Evaluation of esophageal cancers using fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET. *J. Nucl. Med.* 39, 1002-1007, 1998.

Gambhir SS, Schwaiger M, Huang SC, Krivokapich J, Schelbert HR, Nienaber CA, Phelps ME. Simple noninvasive quantification method for measuring myocardial glucose utilization in humans employing positron emission tomography and fluorine-18-deoxyglucose. *J. Nucl. Med.* 30, 359-366, 1989.

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity, *Curr. Drug Delivery* 1, 27-42, 2004.

Goda K, Balkay L, Márián T, Trón L, Aszalós A, Szabó G Jr. Intracellular pH does not affect drug extrusion by P-glycoprotein. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 34, 177-182, 1996.

Goda K, Fenyvesi F, Bacsó Zs, Nagy H, Márián T, Megyeri A, Krasznai Z, Juhász I, Vecsernyés M, Szabó G, Jr. Complete inhibition of P-glycoprotein by simultaneous treatment with a distinct class of modulators and the UIC2 monoclonal antibody. *J. Pharmacol, Exp. Ther.* 320, 81-88, 2007.

Goda K, Nagy H, Mechetner E, Cianfriglia M, Szabó G Jr. Effects of ATP depletion and phosphate analogues on P-glycoprotein conformation in live cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 2672-2677, 2002.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2, 48-58, 2002.

Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 385-427, 1993.

Gregory RE, DeLisa AF. Paclitaxel: a new antineoplastic agent for refractory ovarian cancer. *Clin. Pharm.* 12, 401-415, 1993.

Haberkorn U, Bellemann ME, Altmann A, Gerlach L, Morr I, Obedorfer F, Brix G, Doll J, Blatter J, van Kaick G. PET 2-fluoro-2-deoxyglucose uptake in rat prostate adenocarcinoma during chemotherapy with Gemcitabine. *J. Nucl. Med.* 38, 1215-1221, 1997.

Hamacher K, Coenen HH, Stöcklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-(¹⁸F)-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. J. Nucl. Med. 27, 235-238, 1986.

Hamada H, Tsuruo T. Functional-role for the 170-kDa to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor-cells as revealed by monoclonal-antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7785-7789, 1986.

Hamberg LM, Hunter GT, Alpert NM, Choi NC, Babich JW, Fischman AJ. The dose uptake ratio as an index of glucose metabolism: useful parameter or over simplification? J. Nucl. Med. 35, 1308-1312, 1994.

Hawkins RA, Phelps ME, Huang SC. Effects of temporal sampling, glucose metabolic rates, and disruptions of the blood brain barrier on the FDG model with and without a vascular compartment: studies in human brain tumors with PET. J. Cereb. Blood Flow Metab. 6, 170-183, 1986.

Hendrikse NH, Franssen E, van der Graaf WTA, Vaalburg W, de Vries EGE. Visualization of multidrug resistance *in vivo*. Eur. J. Nucl. Med. 26, 283-293, 1999.

Hernádi Z. Single agent and combination chemotherapy with epidoxorubicin in advanced ovarian cancer. Turkish J. Canc. 18, 107-110, 1988.

Hernádi Z, Juhász B, Póka R, Lampé L. Prospektív, randomizált tanulmány a Cyclophosphamid és Cisplatin kombinált kemoterápiával elérhető gyógyulási eredmények és mellékhatások összehasonlítására, előrehaladott stádiumú petefészekrákos betegekben. Magy. Onkol. 31, 250-257, 1987.

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

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

Hernádi Z, Huga S, Lukácskó L, Krasznai Z, Sápy T. Rezisztencia a petefészekrákos betegek platina-bázisú kemoterápiája során – a paclitaxel, mint kezelési lehetőség. Magy. Nőorv. L. 64, 249-254, 2001.

Hernádi Z, Juhász B, Póka R, Lampé L. Randomised trial comparing combinations of cyclophosphamide and cisplatin with or without doxorubicin and 4' epi-doxorubicin in the treatment of advanced ovarian cancer. Int. J. Gynec. Obstet. 27, 199-204, 1988.

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

Hernádi Z, Krasznai Z, Sápy T. The prevalence of the HPV genom integrated viral status and p53 genotype in cervical cancer population of North-Eastern Hungary, the correlation with established markers of tumor progression. *Eur. J. Obstet. Gynaecol.* 113(1), 83-86, 2003b.

Hernádi Z, Krommer K, Mayer Á, Pulay T, Szánthó A, Thurzó L, Huga S. Előrehaladott stádiumú petefészekrákos betegek konvencionális és magas dózisu cyclophosphamid + cisplatin (CP) kezelése Amifostine védelemben. *Magy. Nőorv. L.* 62, 463-472, 1999.

Hernádi Z, Lukácskó L, Sápi T, Borsos A. Petefészekrákos betegek cyclophosphamid és cisplatin (CP) kombinált kemoterápiája Amifostine (WR-1065) védelmében. *Magy. Nőorv. L.* 61, 489-496, 1998.

Hernádi Z, Pásti G, Lampé L, Juhász B. Petefészekrákos betegek kemoterápiákkal szembeni érzékenységének előrejelzése biopsziából származó szövetminták in vitro vizsgálatával. *Magy. Onkol.* 29, 175-182, 1985a.

Hernádi Z, Pásti G, Lampé L, Juhász B. Praetherapeutische Chemosensibilitätstestung des Ovarialkarzinoms und Möglichkeiten der klinischen Anwendung. *Zbl. Gynäkol.* 107, 1065-1071, 1985b.

Hernádi Z, Szőke K, Sápy T, Krasznai Z, Soós Gy, Veress Gy, Gergely L, Kónya J. Role of human papillomavirus (HPV) testing in the follow-up of patients after treatment for cervical precancerous lesions. *Eur. J. Obstet. Gynecol.* 118(2), 229-234, 2005.

Higashi K, Ueda Y, Ikeda R, Kodama Y, Guo J, Matsunari I, Oguchi M, Tonami H, Katsuda S, Yamamoto I. P-glycoprotein expression is associated with FDG uptake and cell differentiation in patients with untreated lung cancer. *Nucl. Med. Commun.* 25, 19-27, 2004.

Hoh CK, Dahlbom M, Hawkins RA, Glaspy JA, Yao WJ, Lee SJ, Maddahi J, Phelps ME. Basic principles of positron emission tomography in oncology: Quantification and whole body techniques. *Wien. Klin. Wochenschr.* 106, 496-504, 1994.

Holló Z, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1191, 384-388, 1994.

Holló Z, Homolya L, Hegedűs T, Müller M, Szakács G, Jakab K, Antal F, Sarkadi B. Parallel functional and immunological detection of human multidrug resistance proteins, P-glycoprotein and MRP1. *Anticancer Res.* 18, 2981-2988, 1998.

Holló Z, Homolya L, Hegedűs T, Sarkadi B. Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumour cells. *FEBS Letters* 383, 99-104, 1996 .

Holmes, FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobaghy GN. Phase II Trial of Taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 1797-805, 1991.

Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von Hoff DD, Roninson IB. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1486-1491, 1992.

Homesley H, Benigno B, Williams J, Vaccarello L. A phase I study of weekly topotecan and paclitaxel in previously treated epithelial ovarian carcinoma patients. *Gynecol. Oncol.* 87, 171-7, 2002.

Homolya L, Holló Z, Germann Ua, Pastan I, Gottesman Mm, Sarkadi B. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug-resistance protein. *J. Biol. Chem.* 268, 21493-21496, 1993.

Homolya L, Holló M, Müller M, Mechetner EB and Sarkadi B. A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumor cells. *Br. J. Cancer* 73, 849-855, 1996.

Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Perez YW, Robey RW, Van de Laar A, Litman T, Dean M, Bates SE. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* 61, 6635-639, 2001.

Horowitz NS, Hua J, Gibbs RK, Muth DG, Herzog TJ. The role of topotecan for extending the platinum-free interval in recurrent ovarian cancer: an in vitro model. *Gynecol. Oncol.* 94, 67-73, 2004.

Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 134-136, 1992.
Huang SC, Phelps ME, Hoffman EJ, Sideris K, Selin CJ, Kuhl DE. Noninvasive determination of local cerebral metabolic rate of glucose in man. *Am. J. Physiol.* 238, 69-82, 1980.

Huet S, Marie JP, Gualde N, Robert J. Reference method for detection of Pgp mediated multidrug resistance in human hematological malignancies: A method validated by the laboratories of the French Drug Resistance Network. *Cytometry* 34, 248-256, 1998.

Itsubo M, Ishikawa T, Toda G, Tanaka M. Immunohistochemical study of expression and cellular-localization of the multidrug-resistance gene-product p-glycoprotein in primary liver-carcinoma. *Cancer* 73, 298-303, 1994.

Jachez B, Cianfriglia M, Loor F. Modulation of human p-glycoprotein epitope expression by temperature and/or resistance-modulating agents. *Anti-Cancer Drugs* 5, 655-665, 1994.

Jager P, Vaalburg W, Pruim J, de Vries E, Langen K, Piers A. Radiolabeled amino acids: Basic aspects and clinical applications in oncology. *J. Nucl. Med.* 42, 432-445, 2001.

Jekerle V, Klinkhammer W, Scollard DA, Breitbach K, Reilly RM, Piquette-Miller M, Wiese M. In vitro and *in vivo* evaluation of WK-X-34, a novel inhibitor of P-glycoprotein and BCRP, using radio imaging techniques. *Int. J. Cancer* 119, 414-422, 2006.

Jordan MA, Toso R, Thrower D, Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 9552-9556, 1993.

Karászi É, Jakab K, Homolya L, Szakács G, Holló Zs, Telek B, Kiss A, Rejtő L, Nahajevszky S, Sarkadi B, Kappelmayer J. Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 112, 308-314, 2001.

Kavallaris M, Learby JA, Barrett JA, Friedlander ML. MDR1 and multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression in epithelial ovarian tumors. *Cancer Lett.*, 102, 7-16, 1996.

Kawamoto S, Deguchi T, Nezasa S, Yamada S, Okano M, Kawada Y. Correlation of expression levels of P-glycoprotein with resistance to adriamycin in a renal adenocarcinoma cell line. *Urol. Res.* 25, 407-412, 1997.

Keogh JP, Kunta JR. Development, validation and utility of an in vitro technique for assesment of potential clinical drug-drug interaction involving P-glycoprotein. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 534-554, 2006.

Keyes JW Jr. SUV. Standard Uptake or Silly Useless Value? *J. Nucl. Med.* 36, 1836-1839, 1995.

Kim CK, Gupta NC, Chandramouli B, Alavi A. Standardized Uptake Values of FDG: Body surface area correction is preferable to body weight correction. *J. Nucl. Med.* 35, 164-167, 1994.

Kim RB. Transporters and drug discovery: why, when and how? *Mol. Pharmaceutics* 3, 26-32, 2005.

Kinuya S, Li X, Yokoyama K, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Bunko H, Michigishi T, Tonami N. Reduction of ^{99m}Tc -sestamibi and ^{99m}Tc -tetrofosmin uptake in

MRP-expressing breast cancer cells under hypoxic conditions is independent of MRP function. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 30, 1529-1531, 2003.

Kostakoglu L, Kiratli P, Ruacan S, Hayran M, Emri S, Ergün EL, Bekdik CF. Association of tumor washout rates and accumulation of technetium-99m-MIBI with expression of P-glycoprotein in lung cancer. J. Nucl. Med. 39, 228-234, 1998.

Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanism, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. Eur. J. Pharm. Sci. 11, 265-283, 2000.

Kurdziel KA, Kiesewetter DO, Carson RE, Eckelman WC, Herscovitch P. Biodistribution, radiation dose estimates, and *in vivo* Pgp modulation studies of 18F-paclitaxel in nonhuman primates. J. Nucl. Med. 44, 1330-1339, 2003.

Lehoczky O, Pulay T. Progressziómentes túlélés vizsgálata petefészekrákos betegek első vonalban alkalmazott paclitaxel-carboplatin kezelését követően. Magyar Onkológia 49, 315-318, 2005.

Lehoczky O, Thurzó L., Bagaméri A, Sárosi Z, Udvary J, Pulay T. A kiújult petefészekrákos betegekben alkalmazott doxetaxel kezelés eredményei. Magyar Onkológia 49, 71-75, 2005.

Levchenko A, Mehta BM, Lee JB, Humm JL, Augensen F, Squire O, Kothari PJ, Finn RD, Leonard EF, Larson SM.. Evaluation of ¹¹C-colchicine for PET imaging of multiple drug resistance. J. Nucl. Med. 41, 493-501, 2000.

Licht T, Pastan I, Gottesman M, Herrmann F. P-glycoprotein-mediated multidrug-resistance in normal and neoplastic hematopoietic-cells. Annals of Hematol. 69, 159-171, 1994.

Litman T, Druley TE, Stein DW, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. Cell. Mol. Life Sci., 58, 931-959, 2001.

Loo TW, Barlett MC, Clarke DM. Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein: direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. J. Biol. Chem. 278, 13603-13606, 2003.

Lucignani G, Paganelli G, Bombardieri E. The use of standardized uptake values for assessing FDG uptake with PET in oncology: a clinical perspective. Nucl. Med. Commun. 25, 651-656, 2004.

Luurtsema G, Molthoff CF, Windhorst AD, Smit JW, Keizer H, Boellaard R, Lammerstma AA, Franssen EJ. (R)- and (S)-[11C]verapamil as PET-tracers for

measuring P-glycoprotein function: in vitro and *in vivo* evaluation. Nucl. Med. Biol. 30, 747-751, 2003.

Mandoky L, Geczi L, Doleschall Z, Bodrogi I, Csuka O, Kasler M, Bak M. Expression and prognostic value of the lung resistance-related protein (LRP) in germ cell testicular tumors. Anticancer Res. 24, 1097-1104, 2004.

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 [99mTc]-hexakis-2-methoxyisobutyl isonitrile in tumour cells and its modulation by lipophilic P-glycoprotein ligands. Eur. J. Pharm. Sci. 25, 201-209, 2005(a).

Márián T, Balkay L, Trón L, Krasznai ZT, Szabó-Péli J, Krasznai Z. Effects of miltefosine on membrane permeability and accumulation of [99mTc]-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(b).

Márián T, Szabó G, Goda K, Nagy H, Szincsák N, Juhász I, Galuska L, Balkay L, Mikecz P, Trón L, Krasznai Z. *In vivo* and in vitro multitracer analyses of P-glycoprotein expression related multidrug resistance. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 30, 1147-1154, 2003.

Marie JP, Zhou DC, Gurbuxani S, Legrand O, Zittoun R. MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms. Eur. J. Cancer 32, 1034-1038, 1996.

Materna V, Pleger J, Hoffmann U, Lage H. RNA expression of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response. Gynecol. Oncol. 94, 152-160, 2004.

Mechetner EB, Roninson IB. Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 5824-5828, 1992.

Mechetner EB, Schott B, Morse SB. P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 12908-12913, 1997.

Nadari S, Carruthers A, Melchior DL. Modulation of red blood cell sugar transport by lyso-lipid. Biochim. Biophys. Acta 985, 173-181, 1989.

Nagy H, Goda K, Arceci R, Cianfriglia M, Mechetner E, Szabó G Jr. P-Glycoprotein conformational changes detected by antibody competition. Eur J. Biochem. 268, 2416-2420. 2001.

Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Vonhoff DD, Roninson IB. Quantitative-analysis of *mdr1* (multidrug resistance) gene-expression in human tumors by polymerase chain-reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 7160-7164, 1990.

Ohishi Y, Oda Y, Uchiumi T, Kobayashi H, Hirakawa T, Miyamoto S, Kinukawa N, Nakano H, Kuwano M, Tsuneyoshi M. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 8, 3767-3775, 2002.

Okochi E, Iwahashi T, Tsuruo T. Monoclonal antibodies specific for P-glycoprotein. *Leukemia* 11, 1119-1123, 1997.

Osmak M. Multifactorial molecular mechanisms are involved in resistance of preirradiated human cervix carcinoma-cells to cis-dichlorodiammineplatinum(ii) and vincristine. *Neoplasma* 40, 97-101, 1993.

Pajeva I, Todorov DK, Seydel J. Membrane effects of the antitumor drugs doxorubicin and thaliblastine: comparison to multidrug resistance modulators verapamil and trans-flupentixol. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 243-250, 2004.

Pascali C, Bogni A, Iwata R, Cambie M, Bombardier E. [^{11}C]Methylation on C_{18} Sep-Pak cartridge: a convenient way to produce [N-methyl- ^{11}C]choline. *J. Labelled Comp. Rad.* 43, 195-203, 2000.

Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD. Graphical evaluation of blood to brain transfer constants from multiple time uptake data. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3, 1-7, 1983.

Patlak CS, Blasberg RG. Graphical evaluation of blood to brain transfer constants from multiple time uptake data. Generalizations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5, 584-590, 1985.

Pauwels EKJ, McCready VR, Stoot JHMB, van Deurzen DFP. The mechanism of accumulation of tumour-localising radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med.* 25, 277-305, 1998.

Pawlak W, Zolnierek J, Sarosiek T, Szczylik C. Antisense therapy in cancer. *Treatment Reviews* 26, 333-350, 2000.

Pearson JW, Fogler WE, Volker K, Usui N, Goldenberg SK, Gruys E, Riggs CW, Komschlies K, Wiltout RH, Tsuruo T, Pastan I, Gottesman MM, Longo DL. Reversal of drug-resistance in a human colon cancer xenograft expressing *mdr1* complementary-dna by invivo administration of mrk-16 monoclonal-antibody. *J. Nat. Cancer Institute* 83, 1386-1391, 1991.

Phelps ME, Hoffman EJ, Huang SC, Kuhl DE. Positron tomography: an “*in vivo*” autoradiographic approach to measurement of cerebral hemodynamics and metabolism. *Acta. Neurol. Scand.* 64, 446-447, 1977.

Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann. Neurol.* 6, 371-388, 1979.

Piwnicka-Worms D, Rao V, Kronauge J, Croop J. Characterization of multidrug resistance P-glycoprotein transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 34, 12210-12220, 1995.

Raub JT. P-glycoprotein recognition of substrates and circumvention through rational drug design. *Mol. Pharmaceutics* 3, 3-25, 2005.

Reivich M, Alavi A, Wolf A, Fowler J, Russel J, Arnett C, McGregor RR, Siue CY, Atkins H, Anand A. Glucose metabolic rate kinetic model parameter determination in humans: the lumped constants and rate constants for [18F]fluorodeoxy-glucose and [11C]deoxyglucose. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5, 179-192, 1985.

Reivich M, Kuhl D, Wolf A, Greenberg J, Phelps M, Ido T, Casella V, Fowler J, Hoffman E, Alavi A, Som P, Sokoloff L. The [¹⁸F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilisation in man. *Circ. Res.* 44, 127-137, 1979.

Rochlitz CF, Dekant E, Neubauer A, Heide I, Bohmer R, Oertel J, Huhn D, Herrmann R. PCR-determined expression of the *mdr1* gene in chronic lymphocytic-leukemia *Ann. Hematol.* 65, 241-246, 1992.

Rohren EM, Turkington TG, Coleman RE. Clinical applications of PET in oncology. *Radiology* 231, 305-320, 2004.

Römer W, Hanauske AR, Ziegler S, Thodtmann R, Weber W, Fuchs C, Enne W, Herz M, Nerl C, Garbrecht M, Schwaiger M. Positron emission tomography in Non-Hodgkin's lymphoma: Assessment of chemotherapy with fluorodeoxyglucose. *Blood* 91, 4464-4471, 1998.

Sarkadi B, Müller M. Search for specific inhibitors of multidrug resistance in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 8, 171-182, 1997.

Sarkadi B, Price EM, Boucher R.C, Germann UA, Scarborough GA. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* 267, 854-4858, 1992.

Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur. J. Biochem.* 259, 841-850, 1999.

Sharom FJ. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Membrane Biol.* 160, 167-175, 1997.

Sharom FJ, Yu XH, Lu PH, Liu RH, Chu JWK, Szabó K, Müller M, Hose CD, Monks A, Váradi A, Sepródi J, Sarkadi B. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem. Pharmacol.* 58, 571-586, 1999 .

Shen-Gunther J, Mannels RS. Ascites as a predictor of ovarian malignancy. *Gynecol. Oncol.* 87, 77-83, 2002.

Shin C, Hsu W, Huang W, Wang J, Ho S, Kao A. Usefulness of chest single photon emission computed tomography with technetium-99m methoxyisobutylisonitrile to predict taxol based chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 199, 99-105. 2003.

Schinkel AH, Arceci RJ, Smit JJM, Wagenaar E, Baas F, Doolé M, Tsuruo T, Mechnertner E, Roninson IB, Boers P. Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of the human MDR1 P-glycoprotein. *Int. J. Cancer* 55, 478-484, 1993.

Schmidt KC, Lucignani G, Sokoloff L. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose PET to determine regional cerebral glucose utilization: A re-examination. *J. Nucl. Med.* 37, 394-399, 1996.

Schmidt KC, Mies G, Sokoloff L. Model of kinetic behavior of deoxyglucose in heterogenous tissues in brain: a reinterpretation of the significance of parameters fitted to homogenous tissue models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11, 10-24, 1991.

Schöndorf T, Kurbacher CM, Göhring UJ, Benz C, Becker M, Sartorius J, Kolhagen H, Mallmann P, Neumann R. Induction of MDR1-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res.* 22, 2199-2204, 2002.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew K.D., Sakurada O., Shinohara M. The (¹⁴C)-deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 28, 897-916, 1977.

Szakáll Sz., Boros I., Balkay L., Emri M, Fekete I, Kerényi L, Lehel S, Márián T, Molnár T, Varga J, Galuska L, Trón L, Bereczki D, Csiba L, Gulyaá B. Cerebral effects of a single

dose of intravenous vinpocetine in chronic stroke patients: a PET study. J. Neuroimaging 8, 197-204, 1998.

Tian M, Zhang H, Higuchi T, Oriuchi N, Endo, K. Oncological diagnosis using ¹¹C-choline-positron emission tomography in comparison with 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose positron emission tomography. Mol. Imaging Biol. 6, 172-179, 2004.

Thierry AR, Vige D, Coughlin SS, Belli JA, Dritschilo A, Rahman A. Modulation of doxorubicin resistance in multidrug-resistant cells by liposomes. FASEB J. 7, 572-579, 1993.

Torizuka T, Kanno T, Futatsubashi M, Okada H, Yoshikawa E, Nakamura F, Takekuma M, Maeda M, Ouchi Y. Imaging of gynecologic tumors: comparison of ¹¹C-choline PET with ¹⁸F-FDG PET. J. Nucl. Med. 44, 1051-1056, 2003.

Trock B, Leonessa JF, Clarke, R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta analyses of MDR1/Pgp 170 expression and its possible functional significance. J.Natl. Cancer Inst. 89, 917-931, 1997.

Tsuruo T, Hamada H, Sato S, Heike Y. Inhibition of multidrug-resistant human-tumor growth in athymic mice by anti-p-glycoprotein monoclonal-antibodies. Jpn. Cancer Res. 80, 627-631, 1989.

Xia CQ, Xiao G, Liu N, Pimprale S, Fox L, Patten CJ, Crespi CL, Miwa G, Gan LS. Comparison of species differences of P-glycoproteins in beagle dog, rhesus monkey, and human using ATPase activity assays. Mol. Pharmaceutics 3, 78-86, 2005.

Yusuf RZ, Duan Z, Lamendola DE, Penson RT, Seiden MV. Paclitaxel resistance: Molecular mechanisms and pharmacologic manipulation. Curr. Cancer Drug Targets 3, 1-19, 2003.

Yakirevich E, Sabo E, Naroditsky I, Sova Y, Lavie O, Resnick MB. Multidrug resistance-related phenotype and apoptosis-related protein expression in ovarian serous carcinomas. Gynecol. Oncol. 100, 152-159, 2006.

Vaalburg W, Hendrikse NH, Elsinga PH, Bart J, van Waarda A. P-glycoprotein activity and biological response. Tox. Appl. Pharmacol. 207, S257-260, 2005.

Varma MVS, Panchagnula R. Enhanced oral paclitaxel absorption with vitamin E-TPGS: Effect on solubility and permeability in vitro, in situ and *in vivo*. Eur. J. Pharm. Sci. 25, 445-453, 2005.

Wahl LR. Targeting glucose transporters for tumor imaging. "Sweet" idea, "Sour" result. J. Nucl. Med. 37, 1038-1041, 1996.

Weber WA. Use of PET for monitoring cancer therapy and for predicting outcome. *J. Nucl. Med.* 46, 983-995, 2005.

Wiles ME, Dykens JA, Wright CD. Regulation of polymorphonuclear leukocyte membrane fluidity: effect of cytoskeletal modification. *J. Leukoc. Biol.* 56, 192-199, 1994.

Woodard HQ, Bigler RE, Freed B.: Expression at tissue isotope distribution. *J. Nucl. Med.* 16, 958-959, 1975.

Wu HM, Hoh CK, Huang SC, Yao WJ, Phelps ME, Hawkins RA. Quantification of serial tumor glucose metabolism. *J. Nucl. Med.* 37, 506-513, 1996.

Zhang L, Strong JM, Lawrence WQ, Lesko J, Huang SM. Scientific perspectives on drug transporters and their role in drug interactions. *Mol. Pharmaceutics* 3, 62-69, 2005.

Zhou Y, Gottesman MM, Pastan I. The extracellular loop between TM5 and TM6 of P-glycoprotein is required for reactivity with monoclonal antibody UIC2. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 74-80, 1999.

7.1 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 Z**, 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. *BJOG-Int. J. Obstet. Gynecol.* 110, 205-209, 2003.

IF: 2.171 (JCR 2005)

Szőke 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, Sápy 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)

Egyéb közlemények

Krasznai Z, Morisawa M, Morisawa S, **Krasznai ZT**, Trón L, Gáspár R, Márián T. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. Aquatic Liv. Res. 16, 445-449, 2003.

IF: 0,905 (JCR 2005)

Krasznai Z, Morisawa M, **Krasznai ZT**, Morisawa S, Inaba K, Kassai Zs, Rubovszky B, Bodnár B, Borsos A, Márián T. Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm but does not affect human or ascidian sperm motility. Cell Mot. Cytoskeleton 55, 232-243. 2003.

IF: 2.485 (JCR 2005)

Juhász AG, **Krasznai ZT**, Daragó P, Zatik J, Major T. Management of twin births. Orvosi Hetilap 45(49), 2485-2489, 2004.

Krasznai Z, **Krasznai ZT**, Morisawa M, Bazsáné Kassai Zs, Hernádi Z, Fazekas Zs, Trón L, Goda K, Márián T. Role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation. Cell Motil. Cytoskeleton 63(2), 66-76, 2006.

IF: 2.485 (JCR 2005)

A közlemények összegzett impakt faktora: 22. 697 (JCR 2005).

Független idézetek száma: 18

8. Tárgyszavak

Kulcsszavak: multidrog rezisztencia, P-glikoprotein, petefészek tumor, ascites, paclitaxel, ^{18}F FDG, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, ^{11}C -kolin, pozitron emissziós tomográfia (PET), glükóz metabolizmus, kinetikai modellek.

Key words: multidrug resistance, P-glycoprotein, ovary tumor, ascites, paclitaxel, ^{18}F FDG, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI, ^{11}C -choline, positron emission tomography (PET), glucose metabolism, kinetic models.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetem fejezem ki témavezetőmnek, Prof. Dr. Hernádi Zoltán egyetemi tanárnak, a Nőgyógyászati Onkológia Tanszék vezetőjének a témaválasztásért, amiért felkeltette érdeklődésemet az onkológia iránt, szakmailag irányított, valamint, hogy lehetővé tette számomra, hogy munkámat kutatócsoportjában végezhessem. Köszönöm Prof. Dr. Trón Lajos egyetemi tanárnak, a PET Centrum igazgatójának amiért diákkörösként bevezetett a tudományos kutatómunkába, nagy szakmai tudásával mindig a rendelkezésemre állt, és maximálisan támogatott.

Köszönöm Prof. Dr. Tóth Zoltán és Prof. Dr. Borsos Antal egyetemi tanároknak, a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika igazgatóinak, amiért lehetővé tették számomra, hogy munkámat a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán folytathassam, valamint, hogy munkámat figyelemmel kísérték és biztosították számomra a folyamatos szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönettel tartozom a PET Centrumban dolgozó kollégáknak, valamint Dr. Balkay László tudományos főmunkatársnak a statisztikai analízisekben nyújtott segítségükért és támogatásukért.

Köszönettel tartozom a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet Sejtbiológia tanszéke munkatársainak, Prof. Dr. Szabó Gábor egyetemi tanárnak, Dr. Goda Katalin egyetemi adjunktusnak a multidrog rezisztencia témakörben nyújtott segítségükért és hasznos szakmai tanácsaikért.

Szeretnék köszönetet mondani valamennyi kollégámnak és barátomnak, akik a disszertáció megírásában tanácsaikkal segítettek.

**10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI**