

Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium
a daganatos halálozás csökkentésére

1/48/2001

3. Részjelentés: 2003. November 30.-2004. december 31.

**RP.8. A rákellenes gyógyszerhatás feltételeinek
molekuláris és farmakológiai vizsgálata**
*8.a. Az extracelluláris matrix biológiai és farmakológiai
hatásának vizsgálata*

Dr. Jeney András

Semmelweis Egyetem, 1.sz. Patológiai és Kísérleti
Rákkutató Intézete

RP8. A rákellenes gyógyszerhatás feltételeinek molekuláris és farmakológiai vizsgálata

Témavezető: dr. Kralovánszky Judit

1. Az extracelluláris matrix biológiai és farmakológiai hatásának vizsgálata

Témavezető: dr. Jeney András, SE, 1. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézete

1.1. Az ECM egyes alkotórészei, valamint azok származékai hatásának vizsgálata a tumorsejtek in vitro klónképző, migrációs és in vivo tumorképző sajátosságaira.

1.2. Az ECM és a tumorsejtek kapcsolatának prognosztikai vizsgálata.

1.3. Gyógyszerhatástani értékmérő módszer kialakítása

Összefoglalás

Az ECM biopolimerek a tumorsejtek proliferációját, migrációját és feltehetően ezzel kapcsolatban a tumorsejtek molekuláris sajátosságait jelentősen képesek megváltoztatni. Az általunk bevezetett in vitro mikroinvazivitási módszerrel végzett vizsgálatokból azt a következtetést vonhattuk le miszerint a *migráció ugyan a tumorsejtek sajátossága, annak mértékét és irányát a környezeti biopolimerek módosítani képesek. A linolsav jelentősen fokozta, míg egyes ECM biopolimerek gátolták a tumorsejtek migrációját.* Feltételezhető, hogy az ECM biopolimerek eltérő mechanizmus szerint változtatják meg a tumorsejtek proliferációját és migrációját. Ebben a vonatkozásban különösen érdekesnek tartjuk az ECM gélben megjelenő vándorló Osort sejtek topoizomeráz I és II expressziójának és katalitikus aktivitásának az ellentétes irányú változását, valamint a timidilátszintáz gén és fehérje szintü emelkedését. Úgy gondoljuk, hogy az extracelluláris matrix egyes alkotórészeinek a tumorsejt migrációját módosító hatásában szerepet játszó mechanizmusok megismerése a közeljövőben hasznosítható lesz az onkológiai diagnosztikában és gyógyszertervezésben.

Az ECM biopolimerjei biológiai hatásainak a tanulmányozása során szerzett tapasztalatokat hasznosítottuk a petefészek rákok prognosztikai élesztő vizsgálatában. Megállapítottuk, hogy a műtétilag eltávolított petefészek rákokban az emelkedett MMP-9 aktivitás és fibronectin koncentráció jelzi, hogy rövid időn belül recidiváló tumor maradt a beteg szervezetében. Az ECM gélbe történő tumor migráció modellezésére bevezetett in vitro vizsgálati módszer a daganat elleni gyógyszerkutató újabb lehetőségét tárta fel. Ezzel a módszerrel egyidőben állapítható meg a tesztvegyületek sejtproliferációra és migrációra irányuló hatása. Megállapítottuk, hogy viszonylag szelektíven a tumorsejt migrációt gátló borrelidin az ECM irányította jelátvitelt és a fehérje szintézis szabályozó rendszerét módosítja.

A kutatásu munka indoklása és előzményei

A tumorsejt genetikai állománya hibáinak (mutáció, deleció,amplifikáció) a megismerése előrehaladást jelentett a tumorbiológiai szemléletben, ugyanakkor felvetődött a környezet felől érkező szabályozási jelekre adott celluláris válaszok szélesebbkörű tanulmányozásának az igénye. Az extracelluláris matrix (ECM) biopolimerek megváltoztatják a tumorsejtek genetikai szabályozását, a tumorsejtek termékei pedig módosítják a mikrokörnyezetet. Feltehetően ezek a mechanizmusok döntik el a tumorsejt potenciális biológiai sajátosságainak a megvalósulását, pl. : osztódását, ellenállóképességét, vándorlását. (Liotta és Kohn 2001, Bissel és mtrai. 2001).

Előző vizsgálataink, - amelyekben megfigyeltük, hogy az emberi eredetű szájüregi laphámrákból kialakított xenograft tumor invazív növekedése a mikrokörnyezet ellenőrzése alatt áll, - irányították érdeklődésünket az extracelluláris mátrix és a tumorsejtek kölcsönhatásának a tanulmányozására. (Babó és mtrai. 1999). Úgy gondoltuk, hogy a tumorsejtek tenyésztése extracelluláris matrix jelenlétében olyan három-dimenziós in vitro kísérleti rendszert biztosít, amely lehetővé teszi a tumorsejtek invazív növekedésére vonatkozó ismeretek gazdagítását és hasznosítását a klinikai gyakorlatban.

In vitro mikroinvazívitási modellt dolgoztunk ki, amelynek lényege a tumorsejtek kiáramlása a monolayer tenyésztetre ráhelyezett ECM biopolimereket tartalmazó gél-be. Ez a három dimenziós tumorsejt-tenyésztet közelebb áll a klinikai tumorok környezeti feltételeihez, mint a monolayer tenyésztet ezért várhatóan az eddigi módszereknél alkalmasabb a tumorsejtek migrációját módosító tényezők megismerésére, prognosztikai kérdések megválaszolására és új gyógyszerek fejlesztésére.

3. Gyógyszerhatástani értékmérő módszer kialakítása és alkalmazása az új hatóanyagok antimetasztatikus tulajdonságának felismerésére in vitro.

Az extracelluláris matrix biopolimerjei nemcsak befolyásolják a tumor sejtek migrációját és a proliferációját, hanem a migráció számára mozgási teret is szolgáltatnak. A három dimenziós sejtenyészteti, amelyben a tumorsejtek a monolayerből az ECM vagy fibrin gélbe vándorolnak, megfelelő módszernek bizonyult a proliferáció és a migráció változásának az egyidejű vizsgálatára. Feladatunknak tartottuk, megvizsgálni, hogy az ECM tartalmú közegbe történő tumor sejt migráció szelektíven, legalább is a proliferáció gátlásánál alacsonyabb koncentrációban gátolható-e. Elvárásunk elvi lehetőségét támasztja alá az a vizsgálati eredmény, amely szerint az MMP-9 antiszenz- oligodezoxi nukleotid kizárólag a tumorsejtek vándorlását csökkenti.

3.1 MMP-9 antiszenz-oligodezoxinukleotid vizsgálata.

HT-1080 monolayer sejtenyésztet kezelése MMP-9 AON (CRIC/2-12) 24 óráig történt majd az ECM gél rárétegzése után újabb 24 óráig inkubáltuk a sejtenyésztet. A monolayerben maradt és az ECM gélbe vándorolt sejtek szétválasztásával és megszámlálásával meghatároztuk a migráció és a proliferáció változását. I

	Összes	(Sejtek száma $\times 10^4 \pm SD$) monolayerben maradt	vándorolt az ECM gélbe
Kontroll CRIC-2	33.2 \pm 2.9	108.9 \pm 4.7	150 \pm 3.9
1 μ g/ml	37.5 \pm 4.3	85.1 \pm 4.5	148.6 \pm 7.5
5 μ g/ml	42.4 \pm 3.54	78.9 \pm 3.4	146. \pm 4.8
25 μ g/ml Treatment	49.9 \pm 2.0	71.8 \pm 3.9	152.9 \pm 6.6

3.2. Citotoxikus gyógyszerek hatásának összehasonlítása Oscort tumorsejtek proliferációjára és migrációjára.

A klinikai gyakorlatban széleskörben alkalmazott citotoxikus gyógyszerek relatív hatékonysága a sejtproliferációra és a migrációra igen eltérő lehet. Az Oscort sejttenyészet vizsgálatakor azt lehetett tapasztalni, hogy a taxol alacsony koncentrációban a taxol csak a monolayerben maradt sejtek számát csökkentette, de nem a vándorló sejtekét. Ezzel szemben a doxorubicin alacsony koncentrációban jobban befolyásolta a vándorló, mint a nem vándorló sejtpopuláció nagyságát.

Kezelés	A Monolayer		B ECM-gél		B/(A+B) Inváziós index %
	$\times 10^4$	(%)	$\times 10^4$	(%)	
Kontroll	12.5 \pm 2.0	(100)	19.0 \pm 3.1	(100)	60,3
Taxol 0.1ng/ml	7.8 \pm 0.9	(57)	17.6 \pm 1.2	(93)	69,3
Doxorubicin 0.05 μ /ml	10.4 \pm 2.8	(83)	2.7 \pm 0.6	(14)	20,6
Campto 0.05 μ g/ml	10.0 \pm 1.8	(80)	9.0 \pm 2.1	(47)	47,3
Rapamycin 0.05 μ g/ml	11.8 \pm 3.5	(94)	3.7 \pm 0.8	(19)	23.9

Makrolid antibiotikum, a borrelidin antimetasztikus hatásának és molekuláris mechanizmusának tanulmányozása.

A borrelidin 18 szénatomból felépülő természetes eredetű, makrolid szerkezetű hatóanyag (antibiotikum), amely nevét a Borrélia spirochéta fajokra irányuló citotoxikus hatása miatt kapta. A közelmúltban megállapították, hogy a borrelidin gátolja a tumorok neovascularizációját és áttétképzését. Munkacsoportunk megerősítette a borrelidin

antiangiogenetikus és antimigrációs hatását, továbbá felismerte az extracelluláris matrix egyes alkotórészeinek szerepét hatásmódjában. A borrelidin citotoxikus hatását ECM biopolimerekkel (pl. fibronectin, vitronektin) csökkenteni lehetett, emellett a $\alpha\beta 5$ integrin sejtfelszíni expresszióját jelentősen csökkenti. A jelátvitel PI3-K/AKT útvonalának a szabályozásban közreműködő PTEN csökkenése mellett emelkedett a MEKp38 és az eIF4E foszforiláltsága. Ez utóbbi jelentős szerepet játszik a hosszú 5'-UTR –el rendelkező mRNS-ek átírásában, amelyet az elmúlt évben hoztak kapcsolatba a metasztázis specifikus fehérjék képződésével. Ez a tanulmány felhívja a figyelmet az antimetasztatikus gyógyszerek egyik ígéretes támadási pontjára.

Közlemények:

1. Tevyashova, Anna, Sztaricskay F., Batta, Gy., Herczegh P., Jeney, A., Formation of aquaric acid amides of anthracycline antibiotics..Synthesis and cytotoxic properties. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 14 : 4783-4789 2004.

kéziratok

1. Harisi R. Dudás J., Timár F., Kovalszky I., Pogány G., Szendrői M., Jeney A., Modulation of invasive growth of human osteosarcoma cells by extracellular matrix biopolymers.
2. Harisi R. Dudás J., Kovalszky I. Jeney A., The antiproliferative and antimigratory action of doxorubicin in human osteosarcoma cell culture exposed to extracellular matrix proteins.
3. Babó I., Oláh J., Szarvas T., Timár F., Polony G., Kenessey I., Kovalszky I., Jeney A. Elevated MMP-9 activity and ECM dependent migration associated to decreased proliferation of HT-1080 fibrosarcoma cells
4. Harisi R. Dudás J., Timár F., Kovalszky I., Jeney A. The antiproliferative and antimigratory action of doxorubicin in human osteosarcoma cell culture exposed to extracellular matrix proteins. (Cancer Chemotherapy and Pharmacology)