

In vitro kísérleti megközelítések az emlőrák kezelésére: az olaparib, az oxaliplatin és egy PI3K-gátló kombinált kezelésétől a mitokondriális targetinghez egy új Mito-CP-származékkal (HO-5114)



PhD Értekezés

Andreidesz Kitti

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Molekuláris és Celluláris Biokémia Program

Doktori Iskola vezetője és Programvezető: Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Témavezető: Dr. Kovács Krisztina

2022

1. BEVEZETÉS

Az előfordulási gyakoriságot tekintve az emlőrák a nők körében a leggyakoribb ráktípus. Heterogén és hormonfüggő betegség; az esetek körülbelül 65-75%-a hormonreceptor-pozitív (HR+; ösztrogénreceptor-pozitív és/vagy progeszteronreceptor-pozitív), míg 15-20%-a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2) pozitív. A tripla-negatív altípus (TNBC) az esetek 15-20%-át teszi ki. A HR+ és/vagy HER2+ emlőrák esetében célzott terápiák állnak rendelkezésre. Ezzel szemben a TNBC esetében a kezelési protokoll főként kemoterápiára korlátozódik. A korlátozott terápiás lehetőségek mellett a TNBC esetében a megjelenő tumorrezisztencia és a rossz prognózis jelent új kihívást.

A ciszplatin és a karboplatin széles körben alkalmazott platinaalapú kemoterápiás szerek a nem kissejtes tüdőrák, valamint az emlő-, petefészek- és hererák kezelésében. Terápiás alkalmazásuk egyik fő korlátozó tényezője, hogy a rákos sejtek a kezeléssel szemben belső vagy szerzett rezisztenciát fejlesztenek ki. Az oxaliplatin egy harmadik generációs platinavegyület. Egyik előnye a ciszplatinhoz és a karboplatinhoz képest a csökkent mutagén aktivitása, és gyakran hatásos a ciszplatinrezisztens daganatokban. Az FDA már engedélyezte a vastagbélrák kezelésére, és potenciálisan más platinavegyületek helyettesítésére is alkalmas más ráktípusok, köztük a TNBC terápiájában.

A nukleáris poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP) egy olyan enzimcsalád, amely elsősorban a DNS-javításban, nevezetesen a bázis- és nukleotid-exciziós javításban vesz részt. A PARP gátlása citotoxikus a BRCA1 és BRCA2 mutáns petefészek- és emlőrákban. Az olaparib napjainkban a klinikai terápiában a legszélesebb körben alkalmazott PARP-gátló. A BRCA 1/2 mutáns petefészekrák és metasztatikus emlőrák kezelésére engedélyezték.

A PI3K/Akt/mTOR útvonal fontos szerepet játszik a karcinogenezisben és az apoptózis rezisztenciában, elősegítve a tumor növekedését és proliferációját, és a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) aktiválódását összefüggésbe hozták az endokrin rezisztenciával, amely az emlőrák kezelésének egyik fő problémája. A közelmúltban az FDA engedélyezte (fulvestrannal, egy ösztrogénreceptor-antagonistával kombinálva) a PI3K p110 α -izoforma-specifikus gátlóját, az alpelisibet a HR+/HER2- metasztatikus emlőrák kezelésére. Az izoform-specifikus PI3K-gátlók immunellenőrzési pont-, receptor- vagy enzimgátlókkal, köztük PARP-gátlókkal való kombinációja azonban kiterjesztheti terápiás alkalmazásukat a HER2+ vagy tripla-negatív emlőrákra is. A rákellenes gyógyszerek akkor a leghatékonyabbak, ha kombinációban adják őket. Számos DNS-adduktot képző szer más, más molekuláris hatású gyógyszerekkel - például a fehérjeszintézis vagy a DNS-javító

mechanizmusok gátlásával - kombinálva növelheti terápiás hatékonyságát a monoterápiához képest, és legyőzheti a kemoterápiás rezisztenciát. Számos preklinikai vizsgálat szinergista hatást talált a platinaszerek és a PARP-gátlók között. A mitokondriumokat célzó terápiás szerek alkalmazása nagyon ígéretesnek tűnik a rákellenes gyógyszerek hatékonyságának fokozására. Emellett a mitokondriális targeting enyhítheti a kezeléssel szemben kialakuló rezisztenciát, ami a mai rákellenes terápia másik döntő limitáló tényezője. A mitokondrium-célzott nanohordozók és a mitokondrium-célzott ligandumokhoz konjugált szerek a legelterjedtebb megközelítések.

A lipofil kationokat, például a trifenilfoszfóniumot (TPP) gyakran használják konjugátumként a mitokondriumokra irányuló rákellenes szerek tervezésénél, és emellett gombaölő-, parazita pusztító- és antioxidáns hatásúak is. A lipofil kationok, például a TPP által történő „mitokondriális célzás” kémiai hátterében az áll, hogy a delokalizált pozitív töltés lehetővé teszi a hatóanyag számára, hogy könnyen áthatoljon a lipid kettősrétegeken, ami előny a hidrofób vegyületekkel szemben, amelyeknek szövetspecifikus hordozókra (receptorokra) kell támaszkodniuk. A lipofil kationok a mitokondriumokban a mitokondriális membránpotenciáltól (-150-180 mV) függően több százszoros koncentrációt és felhalmozódást érhetnek el. A rákos sejtek mitokondriális membránpotenciálja ($\Delta\Psi_m$) magasabb a citoszoljukhoz és a nem rákos sejtekhez képest, ezért szelektív célzás érhető el. Az utóbbi időben a rákos sejtek bioenergetikája egyre nagyobb érdeklődésre tart számot a terület kutatói körében. Az emlőrákos sejtek jelentős bioenergetikai, szövettani és genetikai különbségeket mutatnak a normál sejtekhez képest. Mivel a tripla-negatív emlőrák (TNBC) az esetek 15-20%-át teszi ki, és rossz prognózissal és korlátozott terápiás lehetőségekkel jár, új terápiás eszközök kifejlesztésére van szükség. Az anyagcsere és a mitokondriumok megcélzása hasznos terápiás megközelítés lehet a TNBC esetében, mivel a mitokondriumok kulcsfontosságú szerepet játszanak a TNBC korai relapszusában és metasztatikus terjedésében. Korábbi kutatások azt is kimutatták, hogy a glikolízis célzott kezelése nem biztos, hogy hatékony stratégia a TNBC terápiájában, és azt sugallták, hogy a mitokondriális segédrezerveket szelektíven kell blokkolni.

A Mito-CP, egy TPP-konjugált szuperoxid-dizmutáz mimetikum, volt az első mitokondriumokra irányuló nitroxidvegyület. A mitokondriális szuperoxid rákos sejtek proliferációjában betöltött szerepének vizsgálatára használták. A mito-CP citotoxikus tulajdonságokat mutatott különböző rákos sejtekben, köztük emlőrákos sejtekben, anélkül, hogy a nem rákos sejteket jelentősen befolyásolta volna. Nemrégiben szintetizálták a Mito-CP egy új komponens-származékát, egy pirrolin-nitroxidhoz kötött difenilfoszfin vegyületet, a

HO-5114-et, amely a TNBC és hormonreceptor pozitív humán emlőrák (HR+BC) sejtvonalakkal szemben a Mito-CP-nél jelentősen nagyobb citotoxicitást (sejtpusztító hatást) mutatott.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk különböző típusú emlőrákos sejtvonalak válaszát vizsgáltuk:

-A hagyományos kemoterápiás szer és a szintetikus letalitáson alapuló terápiás vegyület kombinációjára, kiegészítve Akt-gátlószerral, hogy megelőzzük az utóbbi nemkívánatos citoprotektív hatásait. Az MDA-MB-231 TNBC sejtvonalat és az MCF7 ösztrogén- és progesteronreceptor-pozitív sejtvonalat használtuk, és ezeket a harmadik generációs platinavegyület oxaliplatinnal, a PARP-gátló olaparibal és a PI3K-gátló LY294002-vel kezeltük. Ezek hármas kombinációját indokolt *in vitro* vizsgálni a kemoterápiás stratégiák további javítása érdekében. Ha ebben a kísérletben megfelelő rákellenes hatások mutathatók ki, akkor ez megnyitja az utat az *in vivo* kísérletek felé, hogy új humán kemoterápiás protokollokat fejlesszünk ki az onkológiai terápiák javítása érdekében.

- A Mito-CP új komponens-származéka, egy pirrolin-nitroxidhoz kötött difenilfoszfin vegyület, a HO-5114. Célunk annak vizsgálata volt, hogy a HO-5114 citotoxikus és antiproliferatív hatásaiban részt vehetnek-e a mitokondriális hatások. A kísérletekben MDA-MB-231 és MCF7 sejteket használtunk. A vizsgálat eredményei alapján *in vivo* kutatásokkal lehetne kiegészíteni a HO-5114 *in vivo* toxicitásának és antineoplasztikus hatásának vizsgálatát.

3. EREDMÉNYEK I - Olaparib, oxaliplatin, LY294002 és kombinált kezelésük MDA-MB-231 és MCF7 sejteken

3.1 Az olaparib, az oxaliplatin és a LY294002 hatása a sejtek viabilitására

Az olaparib, az oxaliplatin és a LY294002 önmagában és kombinációban az MDA-MB-231 és MCF7 sejtek életképességére gyakorolt hatásának meghatározására MTT-tesztet végeztünk. A PARP-gátló olaparib önmagában nem csökkentette jelentősen a viabilitást egyik sejtvonal esetén sem. Az MDA-MB-231 sejtek életképessége több mint 90 %-ot ért el, az MCF7 sejtek esetében pedig ez az érték meghaladta a 80 %-ot. Az oxaliplatin azonban jelentősen, körülbelül 60 %-ra csökkentette az MDA-MB-231 TNBC sejtvonal viabilitását, és még kifejezettebben az ösztrogén- és progesteronreceptor-pozitív, nem TNBC-vonal MCF7-ét, ahol az életképes sejtek aránya körülbelül 40 % volt. Bár számos cikk utal a PARP-gátlók és a platinavegyületek közötti szinergiára, eredményeink azt mutatják, hogy az olaparib és az oxaliplatin az alkalmazott koncentrációkban sem szinergista, sem additív hatást nem fejtett ki, mivel kombinációjuk körülbelül ugyanolyan mértékű sejthalált okozott, mint az oxaliplatin önmagában. Az MDA-MB-231 sejtek több mint 95 %-a életképes volt a LY294002 kezelést követően, ami azt jelzi, hogy a TNBC sejtek rezisztensek voltak az Akt-útvonallal szemben.

Ezzel szemben a LY294002 jelentős mértékű (~50%) sejthalált okozott az MCF7 sejtvonalban. Míg az oxaliplatin citotoxikus hatását a LY294002 mindkét sejtvonalon fokozta, az olaparib kezelésben ez a hatás nem volt megfigyelhető. Továbbá a PARP-inhibitor hozzáadása az oxaliplatin és a LY294002 együttes kezeléséhez nem növelte a sejthalált az MDA-MB-231 és az MCF7 esetében.

3.2 Az olaparib, az oxaliplatin és a LY294002 hatása a sejthalál folyamataira

Áramlási citometriával vizsgáltuk, hogy az olaparib, az oxaliplatin és a LY294002 milyen típusú sejthalált idézett elő. Az áramlási citometriai méréseket a kezelt sejtek fluoreszcensen jelölt Annexin V-vel és propidium-jodiddal történő kettős festése után végeztük el, az apoptózis, illetve a nekrosis kimutatására. Megállapítottuk, hogy a vizsgált vegyületek által okozott sejthalál kevesebb, mint 5%-a volt nekrotikus, és az elhaló sejtek többsége az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között a korai apoptotikus stádiumban volt. Az olaparib kezelés nem okozott apoptózist az emlőrákos sejtvonalakban, mivel az élő sejtek aránya mindkét sejtvonalban megközelítőleg 82% volt. Az oxaliplatin szignifikánsan növelte a korai apoptózist mindkét sejtvonalban, a késői apoptózis az MDA-MB-231 és az MCF7 sejtekben is

nőtt, szignifikánsan az MCF7 sejtekben. A LY294002 önmagában körülbelül ugyanolyan mértékű apoptózist okozott mindkét sejtvonalban, mint az olaparib. Másrészt a sejtek LY294002-vel való kezelése olaparabbal, oxaliplatinnal vagy ezek kombinációjával együtt nem változtatta meg jelentősen a sejtek eloszlását az élő, korai és késői apoptotikus populációk között egyik sejtvonalban sem.

3.3 Az olaparib, az oxaliplatin és az Akt-útvonali inhibitor hatása a ROS termelésre

Az olaparib, az oxaliplatin és a LY294002 ROS termelő képességét karboxi-H₂DCFDA-méréssel mértük. A ROS oxidálhatja a nem fluoreszcens festéket, így annak fluoreszcens formája keletkezik, amelynek intenzitása mérhető. Az MDA-MB-231 és MCF7 sejtek között markáns különbségeket találtunk a kezelt csoportok esetén. Az olaparib növelte a ROS termelést az MCF7 sejtekben, bár a hatás nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. Ezzel szemben a szer nem indukált ROS termelést az MDA-MB-231 sejtekben. Az oxaliplatin jelentős ROS termelődést okozott a tripla-negatív emlőráksejtekben, amelyet az olaparib együttes kezelése fokozott, bár az olaparib fokozó hatása nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. Az Akt-útvonali inhibitor sem önmagában, sem az olaparib és az oxaliplatin kombinációjában nem befolyásolta a ROS termelést. Másrészt az oxaliplatin nem befolyásolta az MCF7 sejtek ROS termelését, és mérsékelte az olaparib, a LY294002 vagy ezek kombinációja által kiváltott ROS termelődést. Az oxaliplatin e negatív hatásai azonban nem érték el a statisztikailag szignifikáns szintet. Az Akt-útvonali gátló önmagában hasonló szintű ROS termelést indukált az MCF7 sejtekben, mint az olaparib által okozott (önmagában alkalmazva).

3.4 Az olaparib, az oxaliplatin és az Akt-útvonali inhibitor hatása a sejtciklusra

Áramlási citometriával határoztuk meg, hogy az olaparib, az oxaliplatin és a LY294002 különböző kombinációival történő kezelés után a sejtek melyik sejtciklus-fázist érték el. A kontroll MDA-MB-231 sejtek G₁, S és G₂/M fázisok közötti megoszlása 55,57%, 22,8% és 21,63% volt, amit a PARP-gátló olaparib, az Akt-útvonali gátló LY294002, illetve ezek kombinációja nem befolyásolt. Ezzel szemben az oxaliplatin kezelés a sejteket a ciklusuk S fázisában állította meg, amit az olaparib együttes kezelése nem befolyásolt. A LY294002 együttes kezelése azonban mérsékelte az oxaliplatin sejtciklus leállító hatását, amely tovább csökkent, amikor az olaparibot is bevontuk a kombinációs kezelésbe.

A kontroll MCF7 sejtek sejtciklus-fázis eloszlása kissé különbözött az MDA-MB-231 sejtekétől. A kontroll sejtek körülbelül 51,26%-a G1, 28,64%-a S és 20,1%-a G2/M fázisban volt. Az MDA-MB-231 sejtvonalhoz hasonlóan az oxaliplatin az MCF7 sejteket a ciklusuk S fázisában állította le, és az olaparib társkezelésnek nem volt további hatása. A PARP-gátló azonban növelte a G2/M fázisú sejtek számát az S fázis rovására, bár ez a hatás nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. Emellett a LY294002 szignifikánsan növelte a G1-fázisú sejtek számát az S- és G2/M-fázisú sejtek rovására. Ezt a hatást nem befolyásolta az olaparib együttes kezelése, de az oxaliplatin jelentősen ellensúlyozta.

3.5 Az olaparib, az oxaliplatin és az Akt-útvonali inhibitor hatása a kolóniaképződésre

A sejtek proliferációs képességének értékelésére kolóniaképződési vizsgálatot végeztünk. Az olaparib és az oxaliplatin szignifikánsan csökkentette mindkét sejtvonal kolóniaszámát, bár a nem TNBC, MCF7 sejtvonal érzékenyebb volt a citosztatikumokra, mint a TNBC MDA-MB-231. Továbbá az oxaliplatin sokkal nagyobb mértékben csökkentette a kolóniaképződést, mint az olaparib. Az olaparib és az oxaliplatin kombinációja hasonló mértékű kolóniaképződés-csökkenést okozott, mint az oxaliplatin önmagában, ami a két hatóanyag közötti szinergia, sőt additivitás hiányára utal. A LY294002 önmagában körülbelül ugyanolyan mértékben csökkentette a kolóniaképződést, mint az olaparib az MDA-MB-231 sejtekben. Az MCF7 sejtek esetében az LY294002 még nagyobb kolóniaszám-csökkenést okozott, mint az olaparib-kezelés. A PARP-gátló és nagyobb mértékben az oxaliplatin is fokozta az Akt-útvonali inhibitor kolóniaképződésre gyakorolt hatását. Az olaparib és az oxaliplatin kombinációja ugyanolyan hatást fejtett ki, mint az utóbbi önmagában.

3.6 Az olaparib és oxaliplatin hatása az invazív növekedésre

A sejtvonalak invazív növekedését az xCelligence Real-Time Cell Analysis (RTCA) rendszerrel értékeltük. A kolóniaképződési kísérletekhez hasonlóan az olaparib és - sokkal nagyobb mértékben - az oxaliplatin mindkét sejtvonalban csökkentette az invazív növekedést. Az MCF7 sejtvonal ismét érzékenyebb volt a PARP-gátlóra és a citosztatikus szerre, mint az MDA-MB-231, és a két szer kombinációja körülbelül ugyanolyan hatást fejtett ki, mint az oxaliplatin önmagában.

3.7 Az olaparib, az oxaliplatin és az Akt-útvonali inhibitor hatása az invazív növekedésre

Az Akt-útvonali gátlója csökkentette az invazív növekedést, és az MCF7 sejtekre gyakorolt hatása kifejezettebb volt, mint az MDA-MB-231 sejtekre. Mind az olaparib, mind az oxaliplatin kezelés fokozta a LY294002 hatását, az invazív növekedést a kimutatási határig csökkentve.

4. DISZKUSSZIÓ ÉS KONKLÚZIÓ I

Számos tanulmány számolt be a PARP-gátlók és a kemoterápiás platina szerek szinergista hatásáról különböző daganatokban. Az olaparib és a karboplatin szerény hatékonyságot mutatott sporadikus tripla negatív melltumoros betegségben szenvedő egyéneknél. A PJ34 PARP-gátló és a ciszplatin antineoplasztikus szer kombinációja citotoxikus szinergiát mutatott az A549 nem kissejtes tüdőrákvonalon. Továbbá a PJ34 fokozta a ciszplatin proliferációt gátló hatását a HepG2 májrákos sejtvonalon. Kiemelték a PI3K/Akt útvonali jelentőségét a terápiás rezisztenciában, bizonyítva, hogy aktiválása csökkent érzékenységet eredményez a kemoterápiás szerekkel szemben. Továbbá ismert, hogy a PI3K/Akt-útvonali inhibitorai kedvezőbb kimenetelt mutatnak, ha a szokásos rákellenes szerekkel együttesen alkalmazzák őket. A TNBC-ben alkalmazott kombinációs terápia logikájának kísérleti alátámasztására Zhao és munkatársai az olaparib, a karboplatin és a buparlisib, egy PI3K-gátló különböző kombinációit vizsgálták két humán TNBC-vonalon és egy HR+ emlőrákos sejtvonalon. A medián-hatás egyenleten alapuló számítással a TNBC-vonalakon a kombinációs terápia szinergista citosztatikus hatását találták, de a HR+ sejtvonalakon ez nem volt kimutatható. A szinergia kérdését gyakorlati szempontból közelítettük meg. A dózis-hatás meghatározása helyett az egyes szerek egyszeri, terápiásan releváns koncentrációit használtuk, és ezeket egyenként és minden lehetséges kombinációban alkalmaztuk az életképességre, a sejthalál típusára, a ROS termelésre, a sejtciklus-fázisra, a kolóniaképződésre és az invazív növekedésre vonatkozó kísérletekben.

Megállapítottuk, hogy 72 órás olaparib kezelés sokkal nagyobb mértékben csökkentette az MCF7 sejtek életképességét, mint az MDA-MB-231 sejtekét. Emelkedett PARP-1 expresszióról számoltak be számos humán rákbetegségben, beleértve az emlőrákot is, és különösen magas PARP-1 expressziót találtak a TNBC-ben, ami magyarázhatja eredményeinket. Továbbá, adatainkkal teljes összhangban más tanulmányok az oxaliplatin citotoxikus hatását nagyobbak találták az MCF7 sejtekben, mint a TNBC sejtekben. Számos tanulmány számolt be a PARP-gátlók és platina szerek szinergista citosztatikus hatásáról, egy

tanulmány pedig az olaparibot, karboplatin és a PI3K-gátló buparlisibot tartalmazó kombinált terápia szinergizmusáról számolt be TNBC vonalakban, de HR+ emlőrák vonalon nem. Ezzel szemben a mi kísérleti körülményeink között az olaparib nem fokozta az oxaliplatin citotoxikus tulajdonságait, és nem tudtunk szinergizmust, de még additív hatást sem kimutatni a két szer között. A PI3K-gátló LY294002 csökkentette a TNBC, de nem a HR+ sejtvonal viabilitását, ha olaparibbal, oxaliplatinnal vagy mindkettővel kombináltuk. Ezek a hatások azonban nem érték el a statisztikailag szignifikáns szintet. Ezek az adatok meggyőzően jelzik, hogy terápiásan releváns koncentrációkban a platinavegyület citotoxicitása dominált a PARP-gátló és a PI3K-gátlóé felett. Alacsonyabb platinavegyület és magasabb PARP- és PI3K-koncentrációknál valószínűleg szinergista hatás jelentkezik, és egy regresszió alapú modell általános szinergiát jelezhet, ami magyarázatot adhat a mi eredményeink és mások eredményei közötti ellentmondás feloldására. Továbbá a platinavegyületek ROS termelést indukálnak, a PARP-gátlók pedig köztudottan védenek az oxidatív stresszel szemben, ami megmagyarázhatja a PARP-gátló és a platina szer általunk megfigyelt szinergia hiányát. Ennek megfelelően a PI3K/Akt útvonal blokkolása a PI3K-inhibitor LY294002-vel növelte az olaparib és az oxaliplatin együttes kezelésének citotoxicitását, bár a hatás nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet.

Megállapítottuk, hogy az olaparib és az oxaliplatin az MDA-MB-231 és MCF7 sejteket elsősorban apoptózis útján pusztította el. A két sejtvonal apoptózis-rezisztenciája eltérő. Az MDA-MB-231 vonalban magas a mutáns p53 szintje, míg az MCF7 vonalban vad típusú p53 van. Emellett a TNBC sejtek 10-szer nagyobb foszfolipáz D (PLD) aktivitással rendelkeznek, mint az MCF7 sejtek. A mutáns p53 és az emelkedett PLD-aktivitás jelentős szerepet játszik a rákos sejtek túlélésében, és hozzájárulhat az apoptózis elnyomásához. Mindazonáltal a különböző kezelések hatása az élő, korai és késői apoptotikus populációk közötti megoszlásra hasonló volt mindkét sejtvonalban. Ebben a tekintetben érdemes megjegyezni, hogy a festési eljárás előtti és utáni mosási lépések eltávolítják a legtöbb nem tapadó sejtet, és a sejthalál típusának meghatározására használt áramlási citometriai módszer csak a festett sejteket elemzi, függetlenül az eredeti sejtszámtól és a különböző kezelésekre való érzékenységüktől. Más mechanizmusok mellett a ROS-közvetített folyamatok kiemelkedő szerepet játszanak az apoptózisnak ellenálló, fokozott metasztatikus tulajdonságokkal rendelkező rákfenotípusok átalakításában. A szolid tumorokban a hipoxia és az ebből eredő hipoxia-indukálható faktor (HIF)-1 α által közvetített metabolikus plaszticitás kulcsfontosságú szerepet játszik a rosszindulatú átalakulásban. A sejtenyészési körülmények között azonban az egyenes oxigén parciális nyomás és a gyakorlatilag kimeríthetetlen extracelluláris tápanyagellátás

elhomályosítja ezeket a folyamatokat. Ennek megfelelően vizsgáltuk a ROS termelést, amely tükrözi a metabolikus plaszticitást, és összeegyeztethető a sejttenyésztési körülményekkel. A platinavegyületek által megnövekedett ROS termelés DNS töréseket indukálhat, amelyek a PARP gátlása esetén felhalmozódhatnak, ami a sejtek halálához vezethet. Egy ilyen mechanizmus magyarázhatja a platinavegyületek és a PARP-gátlók között megfigyelt szinergizmust. Az irodalommal teljes összhangban azt találtuk, hogy az oxaliplatin-, de nem az olaparib vagy az Akt-útvonal inhibitor LY294002- indukálta a ROS képződést a TNBC MDA-MB-231 vonalban és az LY294002 fokozta, de az olaparib nem fokozta az oxaliplatin hatását. Ezzel szemben a kezelések önmagukban vagy kombinációban nem indukáltak jelentős ROS termelődést a nem TNBC MCF7 sejtvonalon. Az MCF7 sejtek fokozott érzékenysége a kezelésekkel szemben azonban az MDA-MB-231 sejtekhez képest halálozási arányt eredményezett, így kevesebb túlélő sejt maradt ROS termelésre. Továbbá az MCF7 sejtek kevesebb ROS-t termelhetek, mivel a TNBC MDA-MB-231 sejtvonalhoz képest a metabolikus átalakulás korábbi szakaszát képviselik. Ezeknek és esetleg más tényezőknek a kombinációja magyarázhatja a sejtvonalak között megfigyelt különbséget.

A sejtciklus S fázisában bekövetkező centroszóma amplifikációról ismert, hogy különböző szövettípusokban rosszindulatú átalakulással jár együtt. A centroszóma amplifikációt az agresszivitás markerének tekintik, még az invazív emlő- és prosztaták esetében is. Ennek megfelelően azt vártuk, hogy az MDA-MB-231sejtek nagyobb arányban vannak a ciklusuk S fázisában, mint az MCF7 sejtek. Azonban a két sejtvonalban megfigyelt ellentétes tendencia azt jelzi, hogy más tényezők, valószínűleg a sejtciklusok szinkronizálása a tenyésztés során történő passzások miatt dominált a centroszóma amplifikáció a sejtciklus-fázisok eloszlásának meghatározásában ebben a két emlőrákos sejtvonalban. Mindkét sejtvonalban, bár eltérő mértékben, az oxaliplatin a sejtek többségét az S fázisban állította le, és ezt az olaparib társkezelés nem befolyásolta. Ezek az adatok összhangban vannak a platinavegyület DNS-keresztelő hatásával, amely megakadályozza, hogy a sejtek átlépjék a G2 ellenőrzőpontot.

Az MDA-MB-231 TNBC sejtvonal agresszívebb, apoptózis- és terápiareszisztens fenotípust képvisel, mint a nem TNBC MCF7 vonal. Ennek az agresszivitásnak a mérőszámaként a kolóniaképződést és az invazív növekedést vizsgáltuk. Ezek az adatok teljes mértékben összhangban voltak az viabilitásra vonatkozó eredményekkel, az irodalmi adatokkal és a két sejtvonal agresszivitására vonatkozó, fent említett nézettel. Két további kísérleti bizonyítékot szolgáltatnak az olaparib és az oxaliplatin közötti szinergia hiányára. Továbbá arra utalnak,

hogy az Akt-útvonat gátlása előnyös lehet a PARP-gátlókkal kombinált terápiában, mivel blokkolja azok Akt által közvetített citoprotektív hatását.

Összefoglalva, kísérleti bizonyítékot szolgáltatunk az olaparib, a rákterápiában széles körben alkalmazott PARP-gátló és az oxaliplatin, egy harmadik generációs platinavegyület közötti szinergia hiányára. Ezek az eredmények ellentétben állnak mások eredményeivel, valószínűleg azért, mert terápiásan reális koncentrációban a platinavegyület citosztatikus hatása dominál a PARP-gátlóé felett. Azt is kimutattuk, hogy egy Akt-útvonat inhibitor alkalmazása előnyös a platinavegyület citosztatikus tulajdonságainak fokozására és/vagy a PARP-gátlás citoprotektív hatásainak megelőzésére. Továbbá kimutattuk az MDA-MB-231 TNBC vonal terápia rezisztenciáját az MCF7 ösztrogén- és progesteronreceptor-pozitív vonallal szemben, bár nem sikerült továbbfejlesztenünk a különböző típusú emlőrákok kemoterápiára való érzékenységeinek különbségeivel kapcsolatos ismereteinket.

5. EREDMÉNYEK II - Az MDA-MB-231 és MCF7 sejtek kezelése mitokondrium-céltt pirrolin-nitroxid HO-5114 vegyülettel

5.1 A HO-5114 hatása a sejtek viabilitására

Az antineoplasztikus potenciál értékeléséhez a TNBC MDA-MB-231 és HR+BC MCF7 sejteket 1, 2,5, 5 vagy 10 μM HO-5114 vegyülettel kezeltük 24 és 48 órán keresztül, majd szulforhodamin B (SRB) teszttel határoztuk meg viabilitásukat. Az SRB teszt a fehérjetartalmat méri, amelyet arányosabbnak tartanak a sejttszámmal, mint a metabolikus aktivitást, amely alul- vagy felülbecsülheti a sejttszámot, ha a vizsgált anyag gátolja a mitokondriális oxidatív foszforilációt. A HO-5114 mindkét emlőrákvonalban koncentráció- és időfüggő módon csökkentette az életképességet, és mindkét sejtvonalon szignifikáns különbség volt megfigyelhető a 24 és 48 órás kezelés között, kivéve a 10 μM -os kezelést, ahol az életképesség 24 óra után 10 % alatt volt. Összhangban azzal a nézettel, hogy a TNBC kemoterápiával szemben ellenállóbb, mint a HR+BC, az MDA-MB-231 sejtek ellenállóbbak voltak a HO-5114 kezeléssel szemben, mint az MCF7 sejtek.

5.2 A HO-5114 által kiváltott sejthalál típusának meghatározása

A HO-5114 által kiváltott sejthalál típusát áramlási citometriával határoztuk meg. A sejteket pontosan úgy kezeltük, mint a viabilitásmérésnél 24 órán keresztül, majd kétszeresen festettük meg őket fluoreszcein-izotiocianát (FITC) konjugált Annexin V-vel és propídium-jodiddal

(PI). Ez utóbbi akkor jut be a sejtbe, ha a plazmamembrán megbomlik, kötődik a kettős szálú DNS-hez, és intenzíven fluoreszkál, jelezve a nekrozist. Az előbbi a foszfatidil-szerinhez, egy apoptózis markerhez kötődik, ha a plazmamembrán külső rétegén van. A kettős pozitivitás késői apoptotikus/halott sejteket jelez. Az MCF7 sejtekben a HO-5114 kezelés a teljes vizsgált koncentrációtartományban koncentrációfüggő módon növelte a korai - és sokkal nagyobb mértékben a késői apoptotikus/halott sejtek arányát az élő sejtek rovására. Ezzel szemben a HO-5114 <math>< 5\ \mu\text{M}</math>-os koncentrációi nem voltak jelentős hatással az MDA-MB-231 sejtekre; a

5.3 A HO-5114 hatása a ROS termelésre

Sok esetben a daganatellenes szerek ROS termelést indukálnak a rákos sejtekben. Ennek megfelelően a HO-5114 által indukált ROS termelést vizsgáltuk humán emlőrákvonalakban a dihidrorodamin 123 assay segítségével 4 órás kezelést követően.

Az oxidatív stressz indukciójának a HO-5114 antineoplasztikus hatásában játszott szerepének vizsgálata érdekében megvizsgáltuk, hogy egy antioxidáns hogyan befolyásolja a HO-5114 citotoxicitását BC sejtekben. Ebből a célból az MCF7 és MDA-MB-231 sejteket 1, 2,5, 5 vagy

koncentrációnál azonban nem volt különbség az életképességben a NAC jelenlétében és hiányában kezelt sejtek között.

5.4 HO-5114 hatása a mitokondriális membránpotenciálra ($\Delta\Psi_m$)

A HO-5114 a mitokondriumokat célozza meg a difenilfoszfónium komponensének köszönhetően. Ezért a JC-1 fluoreszcencia mérésével vizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a $\Delta\Psi_m$ -t. Kationos tulajdonságai alapján a JC-1-et a mitokondriumok $\Delta\Psi_m$ -függő módon veszik fel. Egészséges mitokondriumokban vörös fluoreszcens J-aggregátumokat képez. A mitokondriumok károsodása a $\Delta\Psi_m$ csökkenését eredményezi, ami a JC-1 zöld fluoreszcens monomerek formájában történő kisebb felhalmozódásához vezet, míg a fluoreszcencia eltűnik, amikor a $\Delta\Psi_m$ teljesen feloszlik. Csupán 1 órás kezelést követően a HO-5114 1 μM koncentrációban az MCF7 sejtek mitokondriális membránpotenciáljának jelentős csökkenését okozta, míg a hatóanyag koncentrációjának 2,5 μM -ra való növelése masszív $\Delta\Psi_m$ -vesztést eredményezett, amit a JC-1 vörös fluoreszcenciájának szinte teljes eltűnése jelzett. Az MDA-MB-231 vonal ellenállóbb volt a HO-5114 szerrel szemben; ugyanazok a koncentrációk lényegében ugyanazokat a $\Delta\Psi_m$ -változásokat váltották ki, mint az MCF7 sejteknél, de ehhez 2,5 órás kezelésre volt szükség, nem pedig csak 1 órára.

5.5 A HO-5114 hatása a mitokondriális energiatermelésre

Mivel a rák patomechanizmusai között egyre nagyobb szerepet játszik az energiaanyagcsere, a Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit segítségével megvizsgáltuk a HO-5114 hatását az MDA-MB-231 és MCF7 vonalak mitokondriális energiatermelésére. Az eszköz egyidejűleg méri a sejtek valós idejű oxigénfogyasztási sebességét (OCR) és az extracelluláris savasodási sebességet (ECAR), a mitokondriális légzés, illetve az aerob glikolízis mutatóit. A sejteket 1 vagy 2,5 μM HO-5114 szerrel kezeltük 4 órán keresztül, miközben az OCR-t és az ECAR-t a kezelés utolsó 75 percében monitoroztuk. A bazális légzést 15 percig regisztráltuk, majd F_0F_1 ATPáz inhibitor oligomicint adtunk az ATP-termelés értékeléséhez. További 20 perc regisztrálás után a mitokondriális elektrontranszportot és az ATP-szintézist függetlenítettük egymástól a maximális légzés meghatározásához karbonil-cianid 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazon (FCCP) hozzáadásával. További 20 perc felvétel után a mitokondriális légzést a mitokondriális légzési lánc I. és III. komplexének inhibitorai, a rotenon és az antimicin A hozzáadásával blokkoltuk, hogy meghatározzuk a protonszivárgást és a nem-mitokondriális oxigénfogyasztást.

A rögzített nyers adatokból a Seahorse műszer a sejtek energiaanyagcseréjének több paraméterét generálta, amelyek mindegyike csökkent a HO-5114 kezelés hatására, kivéve a protonszivárgást, amelyre egyik sejtvonalban sem volt hatással. Továbbá, a kapcsolási hatékonyságot, amely azt jelzi, hogy a légzés mennyire szorosan kapcsolódik az ATP-szintézishez, nem befolyásolta az MCF7 vonalon, de csökkent az MDA-MB-231 sejtvonalon. A mitokondriális oxigénfogyasztással kapcsolatos sejtes energiaanyagcsere paraméterei, mint például az alaplégzés, a maximális légzés és az ATP-termelés, alacsonyabbak voltak a TNBC sejtekben, mint a HR+BC sejtekben. Továbbá, 1 és 2,5 μM HO-5114 körülbelül azonos mértékben csökkentette ezeket a paramétereket az utóbbi sejtvonal esetében, míg az előbbi esetében koncentrációfüggő módon hatott rájuk. Az ATP-szintáz inhibitor oligomicin adagolása csökkentette az OCR-t, ami mindkét sejtvonalban az ECAR emelkedésével járt együtt. A HO-5114 1 és 2,5 μM koncentrációban körülbelül ugyanolyan mértékben csökkentette az ECAR-t az MCF7 vonalban, míg a kontrollhoz képest 1 és 2,5 μM koncentrációban növelte, illetve csökkentette az ECAR-t.

A viabilitási vizsgálatokhoz hasonlóan megvizsgáltuk a NAC hatását a kezeletlen és a HO-5114 szerrel kezelt BC sejtek energiaanyagcseréjére. Ebből a célból a kísérlet során 1 mM NAC-ot adtunk a HO-5114-kezelt sejtek egy csoportjához. NAC jelenlétében a HO-5114 hatása a sejtek energiaanyagcseréjének minden paramétere (kivéve a protonszivárgást) megfordult, mégpedig nagyobb mértékben az MDA-MB-231 sejtvonal esetében, mint az MCF7 vonal esetében. Az MCF7 sejtekben a HO-5114 csökkentette a protonszivárgást, amely NAC jelenlétében tovább csökkent. Ezzel szemben a HO-5114 növelte az MDA-MB-231 sejtek protonszivárgását, ami NAC jelenlétében tovább nőtt.

5.6 A HO-5114 hatása a kolóniaképződésre

A HO-5114 különböző koncentrációival kezelt MCF7 és MDA-MB-231 sejtek proliferációs képességének értékelésére kolóniaképzési vizsgálatot végeztünk. A sejteket 50, 75, 100 vagy 250 nM HO-5114 jelenlétében tenyésztettük hét napig, majd a telepeket megfestettük és megszámloltuk. A szer mindkét sejtvonalban koncentrációfüggő módon hatékonyan csökkentette a kolóniaképződést. Érdekes módon a TNBC vonal érzékenyebb volt a kezelésre, mint a HR+BC vonal. 250 nM HO-5114 teljesen kiirtotta az MDA-MB-231 sejteket, míg az MCF7 sejtek esetében körülbelül 10 kolónia túlélését tette lehetővé.

5.7 A HO-5114 hatása az invazív növekedésre

A sejtproliferáció, a migráció és az invázió fontos szerepet játszik a tumor progressziójának és az áttétek kialakulásának megértésében. Az xCELLigence Real-Time Cell Analysis módszerrel vizsgáltuk a HO-5114 hatását az MCF7 és MDA-MB-231 sejtek invazív növekedési jellemzőire. A műszer egy mikrotiterlemez alsó felületére olvasztott arany mikroelektródák között átvitt elektronáramlást mér, elektromosan vezető tenyésztőközeg jelenlétében. A lemezekben tenyésztett tapadó sejtek megváltoztatják a sejtindexnek nevezett tetszőleges egységekben kifejezett impedanciát, amelynek nagysága a sejtek számától, morfológiájától, méretétől és kötődési tulajdonságaitól függ. A sejteket 75, 100 vagy 250 nM HO-5114 jelenlétében tenyésztettük hét napon át, miközben a sejtindexet valós időben követtük nyomon. A hatóanyag mindkét sejtvonalon koncentrációfüggő módon hatékonyan csökkentette a sejtindexet. A legmagasabb koncentrációban (250 nM) a HO-5114 mindkét sejtvonalon a kimutatási határ közelében csökkentette az invazív növekedést. A kolóniaképződési kísérletekhez hasonlóan a TNBC vonal érzékenyebb volt a kezelésre, mint a HR+BC vonal.

6. DISZKUSSZIÓ ÉS KONKLÚZIÓ II

A TNBC rosszabb prognózissal és korlátozottabb célzott terápiás repertoárral rendelkezik, mint a HR+ altípus. Emellett a két emlőrák altípus energiaanyagcseréje alapvetően különbözik, amit a „mitokondriális mentés” ellentétes hatása jelez a glikolitikusan gátolt HR+BC és TNBC sejtekre; az előbbi esetében negatív, az utóbbi esetében pozitív. Ennek megfelelően a mitokondriumokat célzó, a mitokondriális energiatermelés csökkenését kiváltó vegyületek hatásosnak bizonyulhatnak a TNBC terápiájában. A mito-CP-ről kimutatták, hogy csökkenti a sejtek ATP-szintjét, gátolja a mitokondriális oxigénfogyasztást, befolyásolja a mitokondriumok morfológiáját és szétzilálja a $\Delta\Psi_m$ -t. A Mito-CP komponensszármazékként a HO-5114 várhatóan hasonló mitokondriális hatásokkal rendelkezik. A hatóanyag felülmúlta ezeket a várakozásokat, mivel 10 μ M HO-5114 körülbelül ugyanolyan mértékben csökkentette a viabilitást, mint 50 μ M Mito-CP 24 órás expozíció során. Ezekkel a korábbi eredményekkel teljes összhangban a jelen vizsgálatban azt találtuk, hogy már 1 μ M HO-5114 is több mint 35%-kal csökkentette mindkét humán emlőrákvonal életképességét, míg 10 μ M-os koncentrációban szinte teljesen elnyomta azt. Hosszabb expozíciós idő (48 óra) esetén a hatóanyag antiproliferatív hatása kifejezettebbé vált mind a HR+, mind a TNBC vonalak esetében.

A mitokondriumok legalább három fő mechanizmuson keresztül befolyásolják a rákos sejtek túlélését: energiatermelés, az intrinzik apoptotikus útvonal és a ROS termelés. Ez a három útvonal összefügg egymással, mivel az apoptózis energiafüggő folyamat, míg az energiahány és az ebből eredő $\Delta\Psi_m$ csökkenés pro-apoptotikus intermembrán fehérjék, például a citokróm c, egy apoptózist indukáló faktor és az endonukleáz G felszabadulásához vezet. A ROS károsítja a mitokondriális elektrontranszportláncot és ezáltal az ATP-termelést, míg a károsodott elektrontranszportlánc több ROS-t termel. A ROS a makromolekulák károsításán és a pro-apoptotikus jelátviteli útvonalak megzavarásán keresztül aktiválja az apoptózist. Ez magyarázza, hogy miért volt megfigyelhető az apoptózis jelentős indukciója a 10 μM HO-5114 24 órás expozícióját követően a TNBC vonalban, míg a hatóanyag alacsonyabb koncentrációi hatástalanok voltak ebből a szempontból. Ezzel szemben, és teljes összhangban azzal a széles körben elfogadott nézettel, hogy a TNBC apoptózis-rezisztensebb, mint a HR+BC, már 1 μM HO-5114 is masszív apoptózist indukált az MCF7 vonalban.

A ROS részt vesz a rák fenotípusának átalakításában, amely apoptózis-rezisztenciában és fokozott metasztatikus tulajdonságokban nyilvánul meg. A szolid tumorokban uralkodó krónikus hipoxia a HIF1 α transzkripció faktor folyamatos aktiválódását eredményezi, amely rosszindulatú átalakulással járó metabolikus változásokat indukál; azonban a HO-5114 által kiváltott ROS képződést nagyon hasonló mértékűnek találtuk az MCF7 és az MDA-MB-231 vonalakban, bár az utóbbi a metabolikus átalakulás magasabb stádiumát képviseli, mint az előbbi. A ROS felhalmozódás mérsékelt növekedése a HO-5114 koncentráció 20 μM -ra történő növelésére adott válaszként azt is jelezte, hogy a várakozásokkal ellentétben a ROS termelés a BC vonalakban érzéketlen volt a HO-5114 kezelésre. A szolid tumorok és a sejt kultúra közötti eltérő körülmények, ahol egyenletes oxigén- és tápanyagellátás biztosított, magyarázhatják a várt és a megfigyelt ROS termelés közötti eltérést. Az emelkedett ROS termelés a TNBC sejtek in vitro túléléséhez és növekedéséhez szükségesnek tekinthető, ezért az antioxidánsok várhatóan akadályozzák a túlélésüket. Azonban azt találtuk, hogy az antioxidáns NAC növelte a kontroll MDA-MB-231 sejtek viabilitását, míg az MCF7 sejtekre nem volt hatással, ami arra utal, hogy a magasabb ROS szint akadályozta az előbbieket proliferációját. A NAC viabilitás elősegítő hatása 5 μM -os koncentrációig túlkompenzálta a HO-5114 citotoxikus hatását, 10 μM koncentrációnál azonban nem tudta ezt megtenni. A NAC HO-5114 citotoxicitására gyakorolt hatásának hiánya a HR+BC vonalban nemcsak a TNBC vonalhoz képest csökkent krónikus oxidatív stresszre utalt, hanem a két BC-sejtvonal közötti metabolikus átprogramozásban mutatkozó különbségekre is.

Az ATP szintézis hajtóerejét a $\Delta\Psi_m$ biztosítja; azonban további lényeges szerepe is van, mint például a nukleárisan kódolt mitokondriális fehérjék szállítása, a K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} transzportja, a ROS termelés, a mitokondriális minőségszabályozás és a pro-apoptotikus intermembránfehérjék felszabadulásának szabályozása. A sejtek túlélése alapvetően a $\Delta\Psi_m$ fenntartásán múlik. Ennek megfelelően iszkémiás helyzetekben a FoF1 ATPáz képes fordított üzemmódban működni és ATP-t fogyasztani a $\Delta\Psi_m$ fenntartásához a sejt megmentése érdekében. Az ATP-t ilyen körülmények között a nem-glükóz szubsztrátok szubsztrát-szintű foszforilációja szolgáltatja; figyelembe véve azonban a rendelkezésre álló nem-glükóz szubsztrát pool mennyiségét, ez a túlélési kísérlet gyakran hiábavaló. Szilárd daganatokban a rákos sejteknek a krónikus hipoxiához és a részben iszkémiás helyzethez kell igazítaniuk anyagcseréjüket. A ROS indukcióval ellentétben a HO-5114 kezelésre nagyon érzékeny választ figyeltünk meg a $\Delta\Psi_m$ -vesztésre. Már 1 μM hatóanyag is jelentős változásokat indukált a $\Delta\Psi_m$ -ben olyan rövid kezelés alatt, mint 1 óra az MCF7 vonal esetében és 2,5 óra az MDA-MB-231 vonal esetében.

A rákos sejteknek kettős kihívással kell szembenéznük: elegendő energiát és elegendő metabolikus intermediert kell termelniük a proliferációhoz egy túlnyomórészt hipoxiás és részben iszkémiás környezetben. Többnyire inkább a glikolízisre támaszkodnak, mint a mitokondriális oxidatív foszforilációra, még akkor is, ha az utóbbihoz elegendő oxigén áll rendelkezésre. Ennek megfelelően a fokozott glükózfelvétel a daganatok egyik jellegzetes tulajdonsága, amelyet diagnosztikai célokra ^{18}F -deoxiglükóz pozitronemissziós tomográfiával történő azonosításukra használnak. Másrészt a legtöbb rosszindulatú daganattípus, például az áttétes daganatsejtek, a terápiarezisztens daganatsejtek és a rákos őssejtek a mitokondriális ATP szintézisre támaszkodnak. Ezeknek a sejteknek a túlélése, proliferációja és áttétképzése az oxidatív foszforilációtól függ, és ez képezi terápiarezisztenciájuk alapját. Ennek megfelelően a legtöbb rosszindulatú ráktípus esetében az oxidatív foszforiláció újonnan megjelenő terápiás célpont, és a tumorsejtek anyagcseréjét jelentősen befolyásoló szerek terápiás értékkel bírhatnak. Figyelembe véve a humán emlőrákvonalak energiaanyagcseréjére gyakorolt hatását, a HO-5114 megfelel ennek a kritériumnak. Az 1 és 2,5 μM -os koncentrációban mindkét sejtvonalban jelentősen csökkentette az OCR-rel kapcsolatos összes paramétert, kivéve a kapcsolási hatékonyságot. A HO-5114 2,5 μM koncentrációban csökkentette az ATP termelést, ami hozzájárulhat a hatóanyag antimetasztatikus tulajdonságához. A BC sejtvonalak viabilitására gyakorolt hatásával teljes összhangban a NAC ellensúlyozta a HO-5114 gátló hatását a sejtek energiaanyagcseréjének különböző paramétereire, kivéve a protonszivárgást. Ezek az adatok

alátámasztják azt a következtetést, hogy a HO-5114 befolyásolja a BC vonalak energiaanyagcseréjét. A protonszivárgás a mitokondriális légzési lánc károsodását vagy a mitokondriális ATP szintézis szabályozását jelezheti az uncoupling fehérjék (UCP) révén. Valóban, az UCP2 szerepét a szubsztrát-szintű és az oxidatív foszforiláció közötti egyensúly szabályozásában nemrégiben mutatták ki. Azt találtuk, hogy mindkét BC-vonal növelte az ECAR-t, azaz a szubsztrát-szintű foszforilációt, amikor az oxidatív ATP termelést oligomycinnel blokkoltuk. Az ECAR az MDA-MB-231 vonalban még akkor is visszatért a kezdeti értékre, amikor az oxidatív foszforilációt FCCP-vel leállítottuk, ami azt mutatja, hogy a két ATP termelő gépezet közötti egyensúly a TNBC sejtekben érzékenyebb, mint a HR+BC sejtekben.

A hormonreceptor-státusz meghatározza az emlőrák sejtproliferációs, differenciálódási és rákprogressziós tulajdonságait. Ennek megfelelően az MDA-MB-231 sejtvonal agresszívebb, apoptózis- és terápia rezisztens fenotípust képvisel, mint a HR+ MCF7 sejtvonal. A fent említett, 1-24 órás HO-5114-expozícióval járó kísérletek eredményei összhangban voltak ezzel a nézettel; a kolóniaképzési és invazív növekedési kísérletekben azonban, ahol a sejteket hét napon keresztül 50-250 nM koncentrációjú hatóanyagnak tettük ki, az MDA-MB-231 érzékenyebbnek bizonyult a kezelésre, mint az MCF7 sejtvonal. A HO-5114 kezeléssel szembeni érzékenységekben a rövid és hosszú távú expozíció közötti különbség oka a kísérletek alapján nem egyértelmű.

Összefoglalva, az ebben a vizsgálatban szerzett összes adat azt jelezte, hogy a HO-5114 erőteljes anti-neoplasztikus hatással rendelkezik a tenyésztett BC sejtekre. Továbbá a HO-5114 kezeléssel szembeni rezisztencia nem különbözött jelentősen a HR+ és a TNBC vonalak között. Az utóbbiak még érzékenyebbnek is tűntek a szerre a hosszú távú kezeléssel járó modellekben; azonban az *in vitro* sejtkultúras hatások rosszul transzlálódnak a humán terápiára. Ennek megfelelően a HO-5114 terápiás potenciáljának megállapításához állatmodellekben kell nyomon követési kísérleteket végezni az *in vivo* toxicitás és az antineoplasztikus hatékonyság meghatározására.

7. ÖSSZEFOGLALÓ

A mellrák világszerte a nők egyik fő halálozási oka. A terápiás lehetőségek az elmúlt évtizedekben kiszélesedtek, azonban van az emlőráknak egy olyan altípusa, amelyre nem létezik célzott terápia. A tripla-negatív emlőrák agresszív fenotípus, rosszabb prognózissal.

A tanulmány első részében olaparib, oxaliplatin és PI3K-gátlók, valamint ezek kombinációját vizsgáltuk. Az olaparib a BRCA-mutációval rendelkező betegeknél gyakran alkalmazott PARP-gátló, míg az oxaliplatin egy harmadik generációs platina szer. Korábbi vizsgálatok a PARP-gátlók és a platinavegyületek szinergiáját mutatták ki, ami arra adott ötletet, hogy a két sejtvonalra gyakorolt hatásukat vizsgáltuk. Ebben a vizsgálatban ösztrogénreceptor-pozitív és progeszteronreceptor-pozitív MCF7 sejteket és tripla-negatív MDA-MB-231 sejteket használtunk, hogy megvizsgáljuk a válaszukat egy új gyógyszerkombinációra és egy új Mito-CP-származékra. A két vegyület kombinációját a PI3K-gátló LY294002-vel fokozták az oxaliplatin citotoxikus hatásának fokozása és az olaparib citoprotektív hatásának megakadályozása érdekében. Eredményeink azonban azt mutatják, hogy nincs szinergia közöttük.

Ezért a vizsgálat második részében az új Mito-CP-származékot, a HO-5114-et vizsgáltuk. Egyre nagyobb az érdeklődés a mitokondriumok célba vétele iránt, mivel ezek az agresszív, metasztatikus és kemorezisztens daganatok kezelésének elismert célpontjai. A Mito-CP citotoxikus tulajdonságokat mutatott különböző rákos sejtekben, többek között emlőrákban. Vizsgálatunk megerősítette a HO-5114 jelentős antineoplasztikus hatását mindkét sejtvonalban, érdekes módon a TNBC sejtvonal érzékenyebb volt a hosszú távú kezelésre, mint a HR+ sejtvonal.

PUBLIKÁCIÓK

Andreidesz K, Koszegi B, Kovacs D, Bagone Vantus V, Gallyas F, Kovacs K. Effect of Oxaliplatin, Olaparib and LY294002 in Combination on Triple-Negative Breast Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2021 Feb 19;22(4):2056

IF: 5.924

Andreidesz K, Szabo A, Kovacs D, Koszegi B, Bagone Vantus V, Vamos E, Isbera M, Kalai T, Bognar Z, Kovacs K, Gallyas F Jr. Cytostatic Effect of a Novel Mitochondria-Targeted Pyrroline Nitroxide in Human Breast Cancer Lines. Int J Mol Sci. 2021 Aug 20;22(16):9016

IF: 5.924

TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG

Előadások nemzetközi konferencián

Kitti Andreidesz, Krisztina Kovács: *Investigating the effects of a PARP inhibitor (HO3089) on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat lung tissue*. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences, Pécs, 27th October 2018

Kitti Andreidesz, Krisztina Kovács: *The effect of a PARP inhibitor, Olaparib in combination with Oxaliplatin treatment on breast cancer cell lines* XII. International and XIX. National Interdisciplinary Grastyán Conference, Pécs, April 4-5 2019

Kitti Andreidesz, Krisztina Kovács, Balázs Sümegi, Ferenc Gallyas: *Investigating the effects of a PARP inhibitor (HO3089) on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat lung tissue*. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, 24-25 May 2019

Kitti Andreidesz, Krisztina Kovács: *Investigating the modifications of signaling pathways in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat lung tissue by PARP inhibitor HO-3089*. International Student Congress, Graz, Austria, 30th May – 1st June 2019

Kitti Andreidesz, Krisztina Kovács: *The effects of olaparib and oxaliplatin on breast cancer cell lines*. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences, Pécs, 9th November 2019

Krisztina Kovacs, Kitti Andreidesz, Dominika Kovacs, Balazs Koszegi, Viola Bagone Vantus, Antal Tapodi, Balazs Veres, Ferenc Gallyas: *New therapeutic approaches in the treatment of triple-negative breast cancer*. 17th International Conference on Cancer and Cancer Therapy, Webinar, 12th November 2021

Poszter előadás nemzetközi konferencián

Kitti Andreidesz, Krisztina Kovács, Balázs Sümegi, Ferenc Gallyas: *Investigating the effects of a PARP inhibitor HO-3089 on signaling pathways in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat lung tissue*. Hungarian Molecular Life Science Conference, Eger, 29-31 May 2019

Poszter előadás nemzeti konferencián

Andreidesz Kitti, Kovács Krisztina, Sümegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: *A PARP inhibitor HO-3089 hatása jelátviteli útvonalakra pulmonáris hipertóniában*. 49th Membrane Transport Conference, Sümeg, 14-17 May 2019

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Sok embernek szeretnék köszönetet mondani a hozzájárulásukért. Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kovács Krisztinának, hogy lehetőséget adott a PhD fokozat megszerzésére. Szeretném megköszönni neki a türelmét, útmutatását és folyamatos támogatását az évek során.

Szeretném kifejezni köszönetemet Prof. Gallyas Ferencnek, a Biokémia és Orvosi Kémia Tanszék vezetőjének támogatásáért.

A dolgozat elkészítése nem jöhetett volna létre Dr. Budán Ferenc segítségével nélkül. Köszönöm, hogy folyamatosan motiváltál!

Szeretném megköszönni társszerzőimnek és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Tanszék munkatársainak a segítséget.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni legjobb barátomnak, Rédei Csanádnak és családomnak a szeretetüket, bátorításukat és soha véget nem érő támogatásukat.

„Isten nem azt adja, amit akarsz... Ő teremti meg a lehetőséget, hogy ezt megtehesd.”