

Doctor of Philosophy (Ph.D.) tézisek

**Az inzulin érzékenyítő roziglitazon
5-fluorouracil okozta csontvelő toxicitást mérséklő, myeloprotectív hatása**

Katayoun Djazayeri M.D.

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

Debrecen, 2005.

Doctor of Philosophy (Ph.D.) tézisek

**Az inzulin érzékenyítő roziglitazon
5-fluorouracil okozta csontvelő toxicitást mérséklő, myeloprotectív hatása**

Katayoun Djazayeri M.D.

Témavezető:
Dr. Benkő Ilona Ph.D

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

Debrecen, 2005.

1. BEVEZETÉS

A malignus betegségek mortalitása napjainkban is magas. A modern komplex daganatellenes terápia ellenére kb. 50 % az 5 éven belüli halálozás a szisztémás kezelést igénylő betegek körében. Így a halálozási listán a rosszindulatú betegségek képviselik a 2. leggyakoribb halálokot a kardiovaszkuláris betegségek mögött (WHO report 2003).

A daganatellenes kemoterápia leggyakoribb dózist limitáló mellékhatása a hematotoxicitás, mely a csontvelő vérképzésének gátlásával neutropénia, anémia és thrombocytopenia képében manifesztálódik. Elsősorban a gyakran jelentkező neutropénia miatt szükséges a dózis csökkentése, mely a sikeres terápiához szükséges kemoterápiás ciklusok késleltetését is jelenti. A neutropéniás időszakban akár opportunisták kórokozói is súlyos, életveszélyes fertőzéseket okozhatnak. Az infekciós szövődés fellépte a neutropénia időtartamával és súlyosságával mutat összefüggést (Kuhn, 2002). A klinikai tapasztalat azt mutatja, hogy a beteg állapota addig nem javul, míg az abszolút granulocita szám nem normalizálódik (Bodey et al., 1994). A kemoterápia kiváltotta hematológiai toxicitás mérséklése fontos megoldandó feladat az onkológiai betegek sikeres terápiájának érdekében. E célra gyakran használnak hemopoetikus növekedési faktorokat.

Az inzulin és az inzulinhoz hasonló (IGF) növekedési faktorok a vérképző stem és progenitor sejtek számára korai növekedési faktorként viselkednek. Széleskörben használják őket a hemopoetikus stem és progenitor sejtek kolóniaképzésének fenntartására in vitro sejttenyészetekben. Ennek ellenére a vérképzésben in vivo játszott szerepük nincs dokumentálva az irodalomban. Az inzulin vérképzésben kifejtett esetleges hatásait in vivo számos egyéb hatás

elfedi (pl. az inzulin anyagcserét befolyásoló hatásai vagy az IGF elsősorban az erythropoezisre gyakorolt hatásai). Az inzulin valószínűleg fokozza a hemopoetikus sejtek túlélését. Szignifikánsan több progenitor sejt, köztük kétszer annyi granulocytá-macrophag progenitor sejt (GM-CFU) és az erythropoezisért felelős BFU-E progenitor nyerhető a CD34+ korai progenitor sejtek long-term tenyészetéből *ex vivo* az inzulint nem tartalmazó kontroll tenyészetekhez képest. Saját munkánkban egerekben vizsgáltuk az inzulin hatásait *in vivo* a normal és károsodott csontvelői vérképzésre. Mivel a gyakorlati felhasználhatóság szempontjából az inzulin számos anyagcsere hatása kedvezőtlen, kipróbáltuk, hogy vajon a sokkal mérsékeltebb szisztémás anyagcsere hatásokkal rendelkező inzulin érzékenyítő roziglitazon képes-e hasonló hatásokat kiváltani a csontvelőben.

A 2. típusú, nem inzulin függő diabetes mellitushoz vezető leggyakoribb kóroki tényező az inzulin rezisztencia. A roziglitazon tiazolidindion vegyületek közé tartozik. Az inzulin érzékenyítő tiazolidindion vegyületeket, melyek az inzulin rezisztenciát különböző celluláris mechanizmusokon keresztül tudják enyhíteni, a 2. típusú diabetes mellitus kezelésére használják. A tiazolidindion vegyületek a peroxiszóma proliferációt aktiváló receptor gamma a PPAR γ parciális agonistái. A PPAR γ számos szövetben expresszálandó magi receptor. Így a tiazolidindionok multiplex hatásokat produkálnak a szervezetben. A PPAR γ kulcs-szerepet játszik a sejtek lipid és szénhidrát anyagcsere szabályozásában, a sejtek energia ellátásában. Szintetikus ligandjai inzulin érzékenyítő hatásokat mutatnak az obes betegek esetében. Bár a PPAR g stimulátorainak *in vivo* hatásmechanizmusa nem tisztázott minden részletében, annyit tudunk, hogy nagy mennyiségben expresszálandó a zsírsejtekben és a macrophagokban.

Ez azt jelzi, hogy ezekben a sejtekben fontos szerepet tölthetnek be. A PPAR γ receptor gyakran képez heterodimert az RXR retinoid receptorokkal, mely azt a feltevést táplálja, hogy a sejtek differenciálódásában hasonló moduláló szerepe lehet. A vérképzésben a PPAR γ receptorok megjelenését tapasztalhatjuk a monocyta-macrophage differenciálódás során és a PPAR γ /RXR complex regulálta gének aktiválódását láthatjuk a macrophage irányba történő differenciálódás beindulásakor (Nagy és mtsai. 1998). A PPAR γ dysregulációjával találkozhatunk néhány leukémiás sejtvonal aberráns differenciálódása során. A ligand-aktiválta PPAR γ /RXR α heterodimer a myelomonocytás leukemia sejtvonalakban macrophagokra jellemző változásokat indukál.

3.ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletek az Európai Közösség által kiadott laboratóriumi állatok kezelésével kapcsolatos irányelvek betartásával történtek. A kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága engedélyezte. A betegektől nyert minták vételével kapcsolatban a Helsink Deklarációban meghatározott szabályokat betartva jártunk el. A Debreceni Egyetem Regionális Humán Etikai Bizottsága a protokollokat engedélyezte.

3.1. CFU-GM progenitor sejtek lágy-gél tenyészetei

Az állatokat cervicalis dislocatio alkalmazásával extermináltuk. Majd a femurt aseptikus körülmények között kipreparáltuk. A csontvelői sejteket a femur táptalajjal való átmosásával nyertük ki. A csontvelői sejtekből vékony tűn történő többszöri szuszpendálással egysejt szuszpenziót készítettünk, melyet mikroszkóp alatt ellenőriztünk. A szuszpenzióhoz McCoy 5A mediumot használtunk. A csontvelői sejtek végkoncentrációját a tenyészetekben 10^5 /ml-re állítottuk be. Speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk 1.2% methylcellulose felhasználásával. A sejtek életben maradását a McCoy 5A táptalaj módosításával segítettük aminosavak, Na-pyruvát, NaHCO_3 és 25% lószérum hozzáadásával. A táptalaj streptomycint és penicillint tartalmazott. A granulocyta-macrophag progenitor sejtek (CFU-GM) kolóniaképzését biztosító növekedési faktor forrásként WEHI 3B sejtek kondicionált mediuma szolgált. A csontvelőtenyészeteket Greiner petricsészékben CO_2 inkubátorban 5% CO_2 és telített páratartalom mellett 1 hétig 37° -on tenyésztettük. A progenitor sejteket jelző kolóniákat sztereomikroszkóp (Olympus, Hamburg, Németország) alatt számoltuk meg. Kolóniáknak az 50 sejtből álló sejtcsoportokat tekintettük.

3.2. A csontvelő funkció vizsgálata

A csontvelői károsodást 5-fluorouracil (5-FU) egyszeri subletális intraperitoneális dóziséval váltottuk ki. A vizsgálati anyagokkal az egereket in vivo 5 napon keresztül előkezeltük az 5-FU dózist megelőzően. A csontvelői funkciót 0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 nappal az 5-FU-val kiváltott károsodás után vizsgáltuk. Kontrollként vehiculummal kezelt, ill. csak 5-FU- kapott csoportok szolgáltak. A myelotoxicitás mértékét a csontvelő cellularitásának valamint a CFU-GM progenitor sejtek károsodását jelző kolóniaszám és CFU-GM pool csökkenésével jellemeztük. A cellularitást a femur csontvelő összsejtszáma jelentette, amit a sejtszám és a sejtszuszpenzió térfogatának szorzataként kaptunk. A CFU-GM progenitor sejtek előfordulási gyakoriságát 10^5 csontvelői sejthez viszonyítva a 10^5 csontvelői sejtet tartalmazó tenyészetek kolóniaszáma jelentette. A femur CFU-GM poolját a femur teljes CFU-GM tartalmának kiszámításával adtuk meg, mely a cellularitás és az előfordulási gyakoriság szorzata.

Az érett sejtek mennyiségének változását a perifériás vér sejtszámainak és a kvalitatív vérkép kiértékelésével meghatározott előfordulási gyakoriságok szorzataként nyert abszolút sejtszámok segítségével követtük nyomon. A sejtszámok meghatározásához Bürker kamrát, a kvalitatív vérképek kiértékeléséhez fénymikroszkópot használtunk. A vérképek kiértékelése May-Grünwald-Giemsa festése után 200 sejt differenciált számolásán alapult.

3.3. Az inzulin érzékenység meghatározása hiperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp módszerrel

Az állatokat tiopental-Na-mal 50 mg/kg dózist alkalmazva altattuk, szükség esetén az előbbi dózist ismételtük. Két vénás és egy artériás katéter beültetése történt a kétoldali v. juguláris externába és a jobb a. carotisba. A humán inzulin 20 mg/kg/min folyamatos adása közben glükóz infúzióval tartjuk egyensúlyban a vér glükóz szintjét, melyet a 120 perces vizsgálat alatt 10 percenként ellenőrizve állapítjuk meg a steady state állapot fenntartásához szükséges infúziós sebességet. A steady state állapotban alkalmazott glükóz infúzió sebessége mg/kg/min –ben adja meg az inzulin érzékenységet.

3.4. Plasma inzulin és glükóz szint mérése

Az inzulin és glükóz koncentrációkat az egerek szívpunkciójával nyert vérből határoztuk meg. A glükóz meghatározást AccuChek készülékkel határoztuk meg. A plazma inzulin szint meghatározását a kereskedelmi forgalomban elérhető radioimmuno- assay segítségével történt (RK 400M izotóp Intézet, Budapest, Magyarország).

3.5. CFU-GM progenitorok kolóniaképzésének vizsgálata *in vitro*

A rosiglitazon *in vitro* hatásait az egér CFU-GM sejtek methylcellulose lágy-gél tenyésztésében vizsgáltuk. A sejteket rosiglitazon (1 μ M) jelenlétében ill. anélkül tenyésztve a tenyésztési idő 5. napján 5-fluorouracillal kezeltük 1 mg/ml végkoncentrációt alkalmazva. A kontroll tenyésztésekben táptalajt alkalmaztunk az előbbi anyagok helyett. Az előbbieken leírtak szerinti módosított szupplementált McCoy's 5A táptalajt és WEHI 3B kondicionált médiumot

használtunk. 7 napig CO₂ inkubátorban 5% CO₂ és telített páratartalom mellett 1 hétig 37⁰-on tenyésztettük. A kolóniákat sztereomikroszkóp alatt számoltuk. Két további tenyészetben a sejteket PPAR γ antagonistá (5 μ M) jelenlétében tenyésztettük rosiglitazon jelenlétében ill. anélkül.

3.6. A csontvelői ősz- és progenitor sejtek mobilizálása

4 g/m² dózisú Cytosannal és 48 MU G-CSF (2x naponta 3.-11. napig) mobilizáltuk a perifériás vérbe a betegek csontvelői ősz- és progenitorait. A mobilizált perifériás őssejteket leukapheresissel szeparáltuk. (Fresenius ComTech System, Hamburg, Németország). Az apheresist a kemoterápia utáni regeneráció 10-11. napján indítottuk, ha a CD34⁺ sejtszám a vérben 20/ μ l sejtszám felett volt. A betegekből 2-3x 10⁸/kg mononucleáris sejtet és 3-4x10⁶/kg CD34⁺ sejtet nyertünk ilyen módon. A sejteket reszuszpendáltuk 100 ml Iscove's módosított Dulbecco mediummal és 1 %-os humán szérum albuminnal majd lassan egyenlő arányban összekevertük speciális DMSO-t tartalmazó fagyasztó oldattal. A mintákat komputer-vezérelt fagyasztó rendszerrel -190 °C-ig hűtöttük folyékony nitrogént alkalmazva (CryoMed Freezer, Thermo Forma, Marietta, Ohio, USA).

3.7. A humán mobilizált perifériás őssejtek kolóniaképzésének vizsgálata

1,2 % végkoncentrációban methylcellulózt (Methocel, 3000-5000 centipoise) alkalmaztunk a szemisolid kultúrák matrixához. A mononucleáris sejteket Ficoll-Iodamid gradiens centrifugálással 15 percig, 1000 g-n szeparáltuk. A mononucleáris sejteket tartalmazó rétegből a sejteket kétszeri mosás után nyertük ki, melyeket 10⁵/ml sejtkoncentrációban tenyésztettük. A McCoy's 5A módosított táptalajt aminosavakkal és nyomelemekkel dúsítottuk. A kolóniaképzés elősegítésére 5x10⁵ M 2-merkaptoetanol és 20 % foetal calf

serumot kevertünk a tenyészetekhez a citokinekkal együtt. A hemopoetikus növekedési faktorokat frissen közvetlenül a petricsészékbe való szélesztés előtt adtuk a táptalajhoz. 300 mg/l végkoncentrációban G-CSF-et és 100 mg/l GM-CSF-et alkalmaztunk. A rosiglitazont a táptalajhoz kevertük, míg az 5-fluorouracilt az 5. tenyésztési napon adtuk a tenyészetekhez. A tenyésztési idő 14 nap volt.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A modern daganatellenes kemoterápia eredményességét az újabb citosztatikumok fejlesztése mellett a technikai fejlődés és a csontvelőtoxicitás farmakológiai befolyásolása javíthatja. Mindez reményeink szerint jobb túlélést és kedvezőbb életminőséget eredményezhet.

4.1. Az inzulin in vivo hatásai a granulopoezisre citosztatikummal károsított és normál csontvelőben.

Hipotézisünk szerint az inzulin korai-növekedési faktor tulajdonságait próbáltuk felhasználni myeloprotektív célokra. Bár az inzulint széles körben alkalmazzák in vitro sejt kultúrákban a hemopoetikus sejtek fenntartására, in vivo hatásairól nem olvashatunk. Első célunk volt az inzulin esetleges myeloprotektív hatásainak vizsgálata egerekben. 5-Fluorouracillal egyszeri szubletális dóziséval súlyos csontvelőkárosodást hoztunk létre. 70 ill. 100 mg/kg dózisban jelentős mértékű CFU-GM kolóniaszámcsökkenést lehetett kimutatni a regeneráció 2. napján. 6 U/kg inzulin szubkután adása 5 napon keresztül az 5-FU-t megelőzően szignifikánsan növelte a CFU-GM progenitorok számát az 5-FU-val kezeltékhez képest. Az inzulinnak nem volt hatása a normál csontvelő CFU-GM sejtjeinek kolóniaképzésére. Ez lehet az egyik oka annak, hogy nem foglalkoztak az inzulin in vivo hatásainak vizsgálatával. Azonban a progenitor sejtek kevésbé károsodtak a csontvelőt ért toxikus hatások esetén.

A hematopoezist a citokinek egész hálózata kontrollálja, melyben számos interakció jön létre. A sok párhuzamos és interaktív hatás érvényesül benne.

Nem meglepő, hogy nem növeli a kiegyensúlyozott normál hematopoézis esetén az optimális kolóniaszámokat. Azonban károsodás esetén hamarabb tud regenerálódni és feltöltődni a CFU-GM pool a csontvelőben. Az inzulin inkább csak a túlélést növeli és önmagában nem okoz proliferáció fokozódást. A túlélés és az apoptózis közötti arányt tolja el kedvező irányba az inzulin alkalmazása. Az igen flexibilis, rugalmas hematopoetikus rendszerben néhány növekedési faktor helyettesítheti egymást és sok közülük potenciózza a differenciálódási sornak megfelelően következő citokin hatását. Az inzulin más kolónia stimuláló faktorok stimulatív hatásait potenciózva amplifikálja hatásaikat így tudja gyorsítani a CFU-GM pool feltöltődését és a csontvelő regenerációját.

4.2. A rosiglitazon inzulin érzékenyítő anyag hatásai a granulopoézisre hasonlóak az inzulinéhoz

A rosiglitazon inzulin érzékenyítő dózistartományának meghatározása után vizsgáltuk a rosiglitazon esetleges myeloprotektív hatásait. Az inzulinhoz hasonlóan a rosiglitazon sem befolyásolta a CFU-GM kolóniaszámot a normál vérképzés esetén. Azonban hasonló kezelési protokollt alkalmazva a rosiglitazon is mérészkelt az 5-FU toxikus hatásait, melyeket a regeneráció utáni 2. napon mértünk le. A CFU-GM pool a progenitor sejtek expanziója kompenzálta a károsodást. A jelenleg a neutropénia megelőzésére használatos G-CSF kétszeresre növelte az 5-FU-val károsított femorális csontvelő CFU-GM tartalmát egerekben (Gilmore és mtsai. 1995), míg a rosiglitazon előkezelés kísérleteinkben 3.7-szeresre emelte.

Annak eldöntésére vajon a progenitor sejtek túlélésére van-e hatása a rosiglitazonnak megnéztük, hogy közvetlenül az 5-FU adása után mennyi a CFU-GM sejtek mennyisége a csontvelőben. Azt találtuk, hogy már a toxikus hatás pillanatában kedvezőbb a kép, azaz szignifikánsan több progenitor sejt

maradt életben az előkezelt állatokban. Ez azt jelenti, hogy az 5 napos előkezelés végére a progenitor sejtek rezisztensebbekké váltak az 5-FU toxikus hatásaival szemben.

4.3. Hogyan befolyásolja a rosiglitazon a csontvelő regenerációját és mérsikli-e a neutropénia súlyosságát?

Hasonló protektív hatások a gyakorlatban csak akkor kamatoztathatók, ha elég erősek ahhoz, hogy következményesen az ős- és progenitor sejt-populáció helyreállításának gyorsításával a csontvelő regenerációját fokozni tudják. A csontvelő funkciókat a csontvelő cellularitásával, CFU-GM progenitorok előfordulási gyakoriságával és a femur teljes CFU-GM tartalmával jellemeztük és ezek alakulását vizsgáltuk az idő függvényében. Az egyszeri 100 mg/kg 5-FU hatására a csontvelő funkciókat jelző paraméterekben még a 3. napon is kifejezett csökkent értékek voltak mérhetőek. A csontvelő teljes sejt-tartalma 30%-ra a CFU-GM tartalma a normális érték 10%-ra esett vissza. A hematopoezis regenerációja igen lassú volt. Az 5-FU adását követő 6. napon a cellularitás egy 18 %-os mélypont után ismét 30%-os volt, a CFU-GM tartalom a kontroll érték 40 %-a a CFU-GM sejtek intenzív proliferációja ellenére. 5 napon keresztül 6 mg/kg rosiglitazonnal történt előkezelés hatására az előbb ismertetett paraméterek szignifikánsan magasabb értékeket mutattak. A teljes sejttartalom a kontroll 50%-a a CFU-GM kolóniaszám pedig már a 3. napon normális volt. A rosiglitazon sem hatott a normál vérképzésre de az 5-FU okozta károsodás mértékét csökkentette.

A rosiglitazon progenitor sejtekre gyakorolt hatása nem egyedülálló. Wang és mtsai. (2004) kimutatták, hogy csontvelői eredetű primitív őssejtek differenciációját képes volt endotél sejt irányába fokozni egerekben. Az általuk mért hatásos dózis a mi kísérleteinkben hatásos tartományba esett.

A rosiglitazon protektív hatása a csontvelői progenitor sejtekre tükröződött a periférián mért érett neutrophil granulocyták számában. Az abszolút neutrophil granulocyták szám a szignifikánsan magasabb volt az előkezelt állatok esetében a vizsgált periódusban.

A rosiglitazon myeloprotektív hatása számos direkt és indirekt hatás eredője lehet. Az inzulin érzékenyítő hatás részvétele valószínűnek látszik, mivel az inzulin érzékenyítő dózistartományban az inzulinhoz hasonló védő hatást mutatott, mint az inzulin. Ex vivo az inzulin használatos a CD34+ sejt kultúrákban és szérum-mentes táptalajt alkalmazva nem mutatható ki stimulatív hatás. Ratajczak és mtsai szerint az inzulin inkább a többi növekedési faktor stimulatív hatásainak potenciózásával fejt ki hatását, ill. a szérum-mentes táptalajban jól kimutatható, hogy védi őket az apoptózissal szemben. A rosiglitazon az inzulinhoz hasonlóan nem mutatott hatást a CFU-GM kompartmentre normál csontvelő esetén. Elképzelhető, hogy a rosiglitazon az inzulin receptor szignál transzdukcióját fokozza. Az inzulin receptor szubsztat IRS1 molekula amely az inzulin stimulatív hatásait közvetíti a hemopoetikus sejtekben közös az IGF-1 molekuláéval. A rosiglitazon csökkenti a szerin gátló hatású foszforilációját az IRS1 molekulán mind *in vitro* mind *in vivo*.

4.4. Ismételt 5-FU dózisokat alkalmazva a rosiglitazon egyidejű adása védi-e a CFU-GM progenitor sejteket?

A klinikai gyakorlatban a citosztatikumokat frakcionáltan, rövid intenzív ciklusokban alkalmazzuk. A védő hatású anyagokat így nehéz elkülönítve alkalmazni, a szimultán adagolás könnyebben kivitelezhető. Ezek daganatellenes protokollokba való beillesztése meglehetősen nehéz. A hematopoetikus kolónia-stimuláló faktorokat használják gyakran a

myelotoxicitás mérséklésére, azonban a G-CSF a jelenleg ilyen célra leggyakrabban alkalmazott szer esetében aktuálisan a beteg állapotának romlását figyelhetjük meg, ha a citosztatikum előtti napokon adjuk. G-CSF csak akkor segít a neutropénia megelőzésében, ha a citosztatikum után alkalmazzuk. Mindezt a protokollok kialakítása közben fontos figyelembe venni. Ezért vizsgáltuk, hogy a rosiglitazon folyamatosan együttadva az 5-FU-lal ismételt 7 napon keresztül hogyan befolyásolja a CFU-GM progenitorok jelenlétét a csontvelőben. Misaki és mtsai szerint ugyanis a G-CSF csak akkor volt hatásos az egérkísérleteiben, ha a citosztatikum adása előtti 2 napon nem alkalmazta. Ha a citosztatikum dózisa előtti napokon vagy a rákövetkező napokon adta a G-CSF-et fokozta a citosztatikum okozta myelotoxicitást. Ezzel szemben kísérleteinkben a rosiglitazon nem csökkentette hanem növelte a CFU-GM progenitorok jelenlétét a csontvelőben. A CFU-GM tartalom a kombináltan kezelt 3-szor, ill. 50-szer volt nagyobb, mint a megfelelő, 25 mg/kg, ill. 50 mg/kg 5-FU-t kapott csoportokban. Bár a CFU-GM kompartment szignifikánsan nagyobb volt a kombináltan kezelt állatokban, az abszolút neutrophil granulocytá számban nem volt szignifikáns eltérés. A neutrophilek csaknem teljesen eltűntek a perifériás vérből a legtöbb egérben és a CFU-GM pool növekedése ellenére valószínűleg több időre van szükség a granulocytákká valóérésükhöz.

4.5. Befolyásolja-e a rosiglitazon a plasma inzulin és glükóz szintet?

Bár az irodalom szerint nem várható, hogy az inzulin érzékenyítő rosiglitazon hyperinzulinémiát okozzon, kísérleteinkben a 6 mg/kg dózist alkalmazva láttunk ilyen tendenciát, ami azonban nem volt szignifikáns mértékű. Nem kizárt ennek lehetősége sem, mivel Walter és mtsai. szerint(2005) a plazma glükóz szint oszcillálásával kiváltott inzulin kiáramlást fokozza a pancreas béta sejtjeiből. Bár nem kizárt az inzulin kiáramlás a mi kísérleteinkben sem, ennek

mértéke nem érte el a szignifikáns szintet, így valószínű, hogy más mechanizmusok is szerepet játszanak a myeloprotektív hatásban. A rosiglitazon számos direkt és indirekt hatáson keresztül befolyásolhatja a hematopoézist. Ezek vizsgálata közül elsőként azt próbáltuk eldönteni, vajon van-e direkt hatása a CFU-GM progenitor sejtek kolóniaképzésére.

4.6. Van-e a rosiglitazonnak direkt hatása a CFU-GM sejtek kolóniaképzésére?

A kérdés megválaszolására aze gér CFU-GM progenitor sejtejeinek in vitro tenyészeit alkalmaztuk. A sejteket rosiglitazon jelenlétében ill. anélkül tenyésztettük, majd az 5. napon 5-FU hozzáadásával károsítottuk őket. Mivel hasonlóan az in vivo eredményekhez, in vitro is kimutatható volt, hogy a CFU-GM progenitor sejtek kevésbé károsodtak az 5-FU hatására, ha rosiglitazon jelenlétében tenyésztettük őket, így legalább részben direkt hatások is szóbajönnek.

4.7. PPAR γ receptoriális hatások vizsgálata a CFU-GM progenitorok kolóniaképzésére

PPAR γ antagonista jelenlétében tenyésztett CFU-GM progenitorok kolóniaképzése nem módosult a kontrollhoz képest. Azonban, ha a rosiglitazon mellett PPAR γ antagonistát is alkalmaztunk a CFU-GM sejtek károsodása az 5-FU hatására ugyanolyan volt, mint a csak 5-FU-t kapott tenyészetekben. Ez azt mutatta, hogy a rosiglitazon protektív hatását blokkolni tudta a PPAR γ antagonista jelenléte, így legalább részben a PPAR γ nucleáris receptor részvétele a protektív hatásban valószínűsíthető.

4.8. Van-e a rosiglitazonnak hasonló protektív hatása humán stem és progenitor sejtek esetében?

Hogy lehet-e jelentősége az általunk egér csontvelői progenitor sejteken észlelt myeloprotektív hatásnak humán alkalmazás szempontjából, a rosiglitazon in vitro hatásait humán sejt kultúrákban vizsgáltuk. A tenyésztésre választott sejtszuszpenzió mobilizált perifériás vér stem és progenitor sejteket tartalmazott. Autolog perifériás őssejt transzplantáció ma már rutinszerűen alkalmazott eljárás. A betegek csontvelői ős- és progenitor sejtjeinek mobilizálásával nyerhető sejteket leukapheresissel gyűjtöttük. A transzplantációra felhasznált CD34+ sejtszuszpenzió maradványából származó sejteket tenyésztettük rosiglitazon jelenlétében és anélkül. Azt találtuk, hogy a rosiglitazon jelenlétében tenyésztett humán progenitor sejtek hasonlóan az egér sejtekhez 5-FU-t alkalmazva kevésbé károsodtak. Ez a jótékony hatás hasonló koncentráció tartományban (0,5-1 μ M) volt észlelhető, mint az egér sejtek tenyésztési esetében, ami felveti a humán alkalmazhatóság reményét.

Új tudományos eredményeink összefoglalása:

1. Bár az inzulin széleskörben használatos in vitro tenyészetekben a hematopoetikus progenitor sejtek életbentartására, in vivo vérképzésre gyakorolt hatásai nincsenek dokumentálva. Az inzulinnak nincs hatása a normál csontvelő granulopoezisére, azonban védi a CFU-GM progenitor sejteket a citosztatikummal okozott károsodással szemben.
2. A rosiglitazonnak inzulin érzékenyítő dózistartományban alkalmazva az inzulinhoz hasonló hatásai vannak a normál és károsodott csontvelő vérképzésére.
3. A rosiglitazon előkezelés fokozta a csontvelő 5-fluorouracil okozta károsodás utáni regenerációját. Ennek következtében a neutropénia kevésbé súlyos formában jelentkezett.
4. A felgyorsult regeneráció alapja a CFU-GM progenitor sejtek érzékenységének csökkenése az 5 napos előkezelés végére az 5-FU okozta toxicitással szemben.
5. A G-CSF, a neutropénia mérséklésére jelenleg a klinikai gyakorlatban alkalmazott növekedési faktor a citosztatikum adása előtti napokban alkalmazva még fokozhatja is a csontvelő toxicitást. Ezzel ellentétben az ismételt és kombinált módon alkalmazott rosiglitazon és 5-FU kezelés után szintén szignifikánsan több CFU-GM sejt volt kimutatható az egerek csontvelőjéből.

6. A myeloprotektív hatás legalább részben direkt hatásnak bizonyult.
7. A rosiglitazon észlelt protektív hatását a PPAR γ receptor antagonistá felfüggesztette *in vitro*.
8. Hasonló dózistartományban bizonyult protektív hatásúnak a rosiglitazon a humán stem és progenitor sejtek és az egér progenitor sejtek *in vitro* tenyészeiben.

Jelentőség

A kapott 5-FU-val szembeni myeloprotektív hatás a kísérletek legfontosabb eredménye. Ez az első olyan közlés, amiben egy egyszerű thiazolidindion molekula hematopoezisre gyakorolt hatásairól szól. Ennek lehet gyakorlati jelentősége. Az egyszerű per os adagolhatóság növelheti a betegek compliance-ét. A thiazolidindion molekulák a 100 leggyakrabban felírt gyógyszerek közé tartoznak a világon. Természetesen vannak mellékhatásaik, elsősorban a máj károsodásra utaló jeleket kell monitorizálni alkalmazásuk során, azonban az emberek milliói szedik világszerte jelentősebb mellékhatások észlelése nélkül. Tekintve, hogy a jelenleg alkalmazott védő anyagok, a kolónia stimuláló faktorok és az amifostin kellemetlen mellékhatásokkal rendelkeznek a betegek jelentős részében valamint subcután vagy i.v. infúzió formájában adagolhatók, a thiazolidindion molekuláknak lehet előnyük velük szemben a betegek compliance-nak javításával. A kemo- és radioterápia alatt a legkellemetlenebb mellékhatás a nausea és hányás, ami pl. az amifostin esetében a betegek 50 %-ában jelentkezik. A rosiglitazon kevesebb mint a betegek 0,5%-ában okoz hányingert.

A rosiglitazonnak sok direkt és indirekt hatása lehet a vérképzésre, mely hasznos lehet, különösen ha azt is figyelembe vesszük, hogy a rosiglitazon számos tumor

sejtvonal köztük akut myeloid leukémiás sejtek esetében gátolta azok proliferációját. A rosiglitazon védheti más CFU-GM sejteket a citosztatikumok károsító hatásaival szemben. Így a következményes neutropénia mérséklésével a fertőzések megelőzésével a daganatellenes terápia eredményesebb végégyvitelét tehetik lehetővé. Ugyanakkor a fertőzések megelőzése pl. az orális candidiasis csökkentésével a betegek életminőségét is javíthatjuk. A perifériás vér progenitorainak gyűjtése után a farmakológiai *ex vivo* purgingben is lehet szerepe. Mindezek alapján a rosiglitazon elképzelhető, hogy alternatív módon szóbjöhet mint myeloprotektív szer, de természetesen további kísérletek szükségesek az optimális kezelési protokollok kialakítására.

A Tézis az alábbi publikációkon alapul:

Eredeti közlemények:

1. Benkő, I., **K. Djazayeri**, C. Ábrahám, J. Zsuga, Z. Szilvássy: Rosiglitazone-induced protection against myelotoxicity produced by 5-fluorouracil. Eur. J. Pharmacol. 477, 179-182, 2003.
IF: 2,352
2. **Djazayeri, K.**, Z. Szilvássy, B. Peitl, J. Németh, L. Nagy, A. Kiss, B. Szabó, I. Benkő. Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment. Eur. J. Pharmacol. 522, 122-129, 2005.
IF: 2,432
3. **Djazayeri, K.**, Z. Szilvássy, K. Benkő, B. Rózsa, B. Szabó, A.J. Szentmiklósi, I. Benkő. Effect of rosiglitazone, an insulin sensitizer, on myelotoxicity caused by repeated doses of 5-fluorouracil. Pharmacol. Res. Közlésre elfogadva
IF: 0,740

Egyéb

Abstracts

1. I Benkő, **K Djazayeri**, P Literati-Nagy, G Rablóczy, J Zsuga, B Szabó, Z Szilvássy:
Insulin-sensitization as a novel chemoprotective mechanism.
The Hematology Journal, 4, S2, 39, 2003.
2. Benkő, I., **K. Djazayeri** , B. Rózsa, Zs. Kovács, Z. Dinya, A.J. Szentmiklósi Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced myelotoxicity *in vivo*.
Fund Clin Pharmacol, 18. S1, 89., 2004.
IF: 1,711
3. **K. Djazayeri**, Z. Szilvássy, I. Benkő:
Rosiglitazone, an insulin sensitizing drug, fastened regeneration of bone marrow damaged by 5-fluorouracil in mice.

Fund Clin Pharmacol, 18. S1, 84., 2004.

IF: 1,711

4. B Rózsa, B Szabó, **Katayoun Djazayeri**, T Erdélyi, Zs Szoby, Z Dinya, J Szentmiklósi, I Benkő: Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced myelotoxicity *in vivo*. Magyar Epidemiológia II.évf. 1.sz. S77. 2005.

Kongresszusi részvétel

1. I Benkő, **K Djazayeri**, P Literati-Nagy, G Rablóczy, J Zsuga, B Szabó, Z Szilvássy:
Insulin-sensitization as a novel chemoprotective mechanism.
8th Congress of European Hematology Association , Lyon, 2003. , France
2. **K. Djazayeri**, Z. Szilvássy, I. Benkő:
Rosiglitazone, an insulin sensitizing drug, fastened regeneration of bone marrow damaged by 5-fluorouracil in mice. 4th Meeting of the Federation of European Pharmacological Societies, EPHAR, 2004, Porto, Portugal
3. Benkő, I., **K. Djazayeri** , B. Rózsa, Zs. Kovács, Z. Dinya, A.J. Szentmiklósi: Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced myelotoxicity *in vivo*. 4th Meeting of the Federation of European Pharmacological Societies, EPHAR, 2004, Porto, Portugal
4. B Rózsa, B Szabó, K Djazayeri, T Erdélyi, Zs Szoby, Z Dinya, J Szentmiklósi, I Benkő: Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced myelotoxicity *in vivo*. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa. Pécs, 2005.
5. **K. Djazayeri**, Z. Szilvássy, B. Peitl, B. Szabó, I. Benkő: Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after treatment with rosiglitazone, an insulin sensitizer drug. Symposium of Hungarian Experimental Pharmacology Association Budapest, 2005