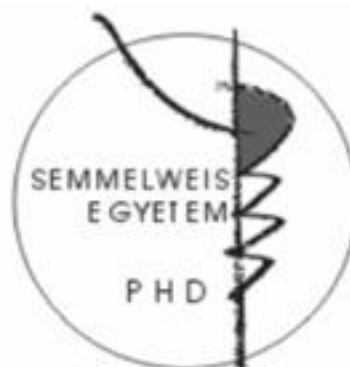


Új megközelítések a multidrog rezisztens tumorok terápiájában

Doktori tézisek

Füredi András

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szakács Gergely, MD PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Szebeni János, MD PhD DSc, intézetigazgató
Dr. Szállási Zoltán, MD PhD, assistant professor

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, MD PhD, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ladányi Andrea, PhD, osztályvezető
Dr. Kenessey István, MD PhD, szakorvos

Budapest
2017

Bevezetés

A daganatos megbetegedések következtében bekövetkező halálesetek száma világszerte növekszik. Míg 2008-ban 12,7 millió embert diagnosztizáltak rosszindulatú daganattal és 8,2 millió rákkal kapcsolatos halálesetet regisztráltak, addig 2012-ben a diagnózisok száma 11 százalékkal emelkedett, és 8 százalékkal magasabb volt a daganatos betegségek okozta halálesetek száma. Annak ellenére, hogy az újabb, célzott rákellenes gyógyszerek jelentősen megnövelik a betegek várható túlélését több tumor típusnál is, a klinikai siker gyakran átmenetinek bizonyul a kemoterápiával szemben kialakuló rezisztencia miatt.

Korai megfigyelés, hogy a tumorokban fellépő rezisztencia nem csak a kezdetben alkalmazott kezeléssel, hanem több, szerkezetükben és hatásmechanizmusukban eltérő vegyülettel szemben is kialakulhat (multidrog rezisztencia (MDR)). A kezelésnek ellenálló daganatsejtek számos mechanizmussal biztosíthatják túlélésüket: csökkenthetik a gyógyszerek célpontjául szolgáló fehérjék mennyiségét, módosíthatják az apoptotikus útvonalakat, fokozhatják a toxikus vegyületeket lebontó enzimfehérjék számát, vagy növelhetik a DNS-hibajavítás mértékét. A sejtszintű rezisztencia mechanizmusok egyik leggyakoribb és leghatásosabb formája a toxikus vegyületek sejtől való eltávolítása, mielőtt azok kifejthetnék intracelluláris hatásukat. A rosszindulatú daganatoknál tapasztalt kemoterápia-rezisztencia gyakran az ATP Binding Cassette (ABC) transzporterek közé tartozó P-glikoprotein (ABCB1, MDR1, Pgp) működésével függ össze. A multidrog transzporterek az ATP energiáját felhasználva kipumpálják a citosztatikus vegyületeket a sejtekből.

Annak ellenére, hogy a Pgp által közvetített rezisztencia régóta ismert, még nem született klinikailag is alkalmazható megoldás a kiküszöbölésére. A transzporter specifikus gátlása ugyan ígéretes megközelítésnek mutatkozott, azonban a gátlószerek nem várt farmakológiai mellékhatásaik miatt nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. A dolgozat két alternatív megközelítést mutat be, melyek a rezisztens fenotípussal együtt járó kollaterális érzékenységet, illetve a transzporter „megkerülését” célozzák.

Azok a biológiai változások, melyek bizonyos körülmények között képesek egy tumor sejt túlélését biztosítani, egyben terápiásan kihasználható „gyengeségeket” is létrehozhatnak. A kollaterális (járulékos) érzékenység fogalmát Szybalski és Bryson vezette be 1952-ben, mikor észlelték, hogy egy adott antibiotikummal szemben kialakuló rezisztencia egyben nagyobb érzékenységet eredményez egy másik antibiotikummal szemben. Csoportunk korábban olyan vegyületeket azonosított, amelyek képesek a Pgp-t kifejező rezisztens tumor sejtek kollaterális érzékenységének kiaknázására. Az ún. MDR-szelektív molekulák alkalmazásával lehetőség

nyílhat a már rezisztenssé vált tumorok visszaszorítására, a kemoterápia alatt megjelenő rezisztens sejtek elpusztítására, vagy a rezisztens daganatok újraérzékenyítésére.

Az MDR tumorokkal szembeni fellépés másik lehetősége a jelenleg alkalmazott gyógyszerek hatékonyabb célba juttatásával, azaz a Pgp „kikerülésével” valósulhat meg. Ehhez olyan formulációkra van szükség, amelyek képesek „elrejtetni” a gyógyszer-molekulákat a transzporterek elől, ezzel megelőzve a sejten kívülrre juttatásukat.

A pegilált liposzómális doxorubicint (PLD) eredetileg azért fejlesztették, hogy felülkerekedjenek a doxorubicin súlyos mellékhatásain. A doxorubicin mellékhatásainak csökkentése komoly áttörés volt, ami bizonyította a fejlett gyógyszerhordozó rendszerek létjogosultságát, azonban a PLD hatását sosem vizsgálták az MDR tumorokra vagy a gyógyszer rezisztencia evolúciójára.

Munkám során a multidrog rezisztens tumorokkal szemben alkalmazható stratégiákat dolgoztam ki, amelyek a már kialakult rezisztencia leküzdésével, vagy a rezisztencia kialakulásának lassításával segíthetnek a terápiák hatékonyabbá tételében.

Célkitűzések

Mivel a kemoterápia sikerét a rákos sejtek ellenállása jelentős mértékben korlátozza, általános célunk a multidrog rezisztens tumorok ellen hatékony stratégiák kidolgozása volt. Doktori munkám során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Új MDR-szelektív vegyületek azonosítása és jellemzése in vitro rendszerekben.
2. MDR-szelektív molekulák Pgp expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata sejtvonalakon, primer tumorból izolált sejteken, valamint a vér-agy gát sejtmodelljén.
3. A PLD hatásának vizsgálata szenzitív és rezisztens in vitro és allograft modelleken
4. A PLD terápiás hatásának vizsgálata egy klinikailag releváns egér emlő tumor modellen.

Anyagok és módszerek

Drog érzékeny és drog rezisztens sejtvonal párok. A MES-SA (szenzitív), MES-SA/Dx5 (rezisztens), MDCKII (szenzitív), MDCKII-ABCB1 (rezisztens), A431 (szenzitív), A431-ABCB1 (rezisztens), KB-3-1 (szenzitív), KB-V1 (rezisztens), P388 (szenzitív), P388/ADR (rezisztens) sejtvonal párokat és a humán emlő daganat sejtvonal panelt (MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, Hs578T, BT-549) az American Type Culture Collection-től (ATCC) vagy az NCI DTP sejtgyűjteményéből szereztük be. A sejtvonalakat DMEM vagy RPMI

tápotdatban (Life Technologies) tenyésztettünk, amit 10% FBS, 5mmol/L glutaminnal és 50 egység/mL penicillin/sztreptomycin (Lonza) kombinált antibiotikummal egészítettünk ki. Minden sejtvonalat 37°C hőmérsékleten és 5% CO₂-ot tartalmazó környezetben tenyésztettünk.

Vér-agy gát endotél sejtvonal. A hCMEC/D3 immortalizált vér-agy gát endotél sejtvonalat EndoGRO™-MV médiumban tenyésztettük 1 ng/ml FGF-2 növekedési faktor jelenlétében. A kultúrák megfelelő növekedéséhez a tenyésztőedények felületét, mind a normál tenyésztés, mind a kísérletek során, 20-szorosan hígított I. típusú kollagénnel vontuk be a sejtek szélesztése előtt.

Citotoxicitási vizsgálatok. A sejtek viabilitását PrestoBlue® reagenssel (Life Technologies) mértük a gyártó által megadott protokoll szerint. A sejteket 96-lyukú mikrolemezekben tenyésztettük, majd a letapadást követő 24 órán belül a sejteket a megadott vegyületekkel kezeltük. 72 ill. 120 órás inkubációt követően a sejteket 5%-os PrestoBlue®/PBS oldatban tartottuk, majd a viabilitást spektrofotometriás módszerrel mértük EnSpire mikrolemez olvasóval (Perkin Elmer). A viabilitási görbék számításait Prism szoftverrel végeztük a szigmoidális dózis-válasz modellt alkalmazva. Az IC₅₀ értékeket görbe illesztés statisztikai elemzéssel nyertük.

Immuncitokémia. 5000 MES-SA ill. MES-SA/Dx5 sejtet tettünk ki üvegaljú 8-lyukú tenyésztőkamrára (Thermo Scientific). 24 óra elteltével a sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk. Ezt követően a fixált sejteket 2 mg/mL BSA (borjú szérum albumin), 1% hal zselatin, 5% kecske szérum és 0.1% Triton-X 100 tartalmú komplett blokkolóban permeabilizáltuk. A mintákat 1 óráig jelöltük P-glikoprotein ellenes elsődleges antitesttel (1:500, MRK16, Kamiya Biomedical), majd Alexa Fluor® 488-konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos antitesttel (Life Technologies) festettük a kultúrákat 250-szeres hígításban. A sejtmagokat minden esetben DAPI (Dojindo Molecular Technologies) festéssel vizualizáltuk. A jelölt mintákat Zeiss LSM 710-es konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

RNS izolálás és RT-PCR. A hirtelen fagyasztott tumor mintákat folyékony nitrogén alatt porítottuk, majd TRIzol™ reagensben (Life Technologies) homogenizáltuk. Az így gyűjtött mintákból a Direct-zol® MiniPrep kittel (Zymo Research) izoláltunk RNS-t a gyártó által megadott módon. 300 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé a Promega Reverz Transcription System-et használva. A Real-Time PCR vizsgálatokhoz előre gyártott egér Béta-Aktin (Aktβ) próbát (Life Technologies) használtunk endogén kontrollként, míg az egér Abcb1a és Abcb1b gének

expresszióját a megfelelő TaqMan® primerekkel kvantifikáltuk. Az RT-PCR analízist StepOne™ Real-Time PCR készüléken végeztük (Life Technologies).

Áramlási citometria. A P-glikoprotein funkciójának méréséhez calcein esszét használtunk. MES-SA és MES-SA/Dx5 sejteket 0,1%-os tripszin oldattal választottuk le a tenyésztőedény felületéről, majd 250.000 darab sejtet a P-glikoprotein inhibitor verapamil (10 µM) mellett vagy nélkül jelöltünk meg 0.25 µM Calcein AM (Dojindo Molecular Technologies) festékkel 37°C hőmérsékleten. Az áramlási citometriás méréseket FACSCANTO II készülékkel (BD Biosciences) végeztük.

Allograft tumorok. A P388 és P388/ADR egér leukémia sejtekből aszcitesz tumorokat hoztunk létre BDF1 (Országos Onkológiai Intézet) egerek hasüregében, melynek során 10^6 sejtet injektáltunk intraperitoneálisan 6-8 hetes állatokba. 48 órával a beoltást követően egyetlen adag fizioológias sóoldatot, doxorubicint (3 mg/kg) vagy PLD-t (3 vagy 5 mg/kg) adtunk intraperitoneálisan az egereknek. Az állatok testtömegét hetente 3 alkalommal mértük és naponta ellenőriztük, hogy az egyedek szenvednek-e bármilyen nemű fájdalomtól.

Spontán kialakuló, átültethető Brca1^{-/-};p53^{-/-} egér emlő tumorok. A Brca1^{-/-};p53^{-/-} FVB egerekben spontán kialakult emlő daganatokból származó tumor darabokat Dr.Sven Rottenberg (Holland Rákkutató Intézet) bocsájtotta rendelkezésünkre. A tumor darabokat altatás alatt, ortotopikusan ültettük be. A kezeléseket akkor kezdtük, amikor a tumorok elérték a ~200mm³-t. Ekkor a DOX és a PLD maximálisan tolerálható dóziséval (MTD, DOX: 5 mg/kg, PLD: 8mg/kg) kezeltük intravénásan az állatokat a farki vénán keresztül. A kezeléseket 10 naponta ismételtük, amennyiben a tumor térfogata nem csökkent 50%-al a kezdeti állapothoz képest, viszont ha kezelésre adott válasz több volt, mint 50%, akkor a következő dózist csak akkor kapták az egerek, ha a tumor újra elérte az eredeti méretét. Az állatokat nyaki diszlokációval eutanáziában részesítettük, ha a tumor elérte a ~2000 mm³-es térfogatot.

Primer tumor sejtek izolálása spontán kialakuló egér emlő daganatokból. A frissen kiműtött tumor szövetet közel 1 mm³-es darabokra vágtuk, disszociációs médiumban felvettük (200 egység/ml IV-es típusú kollagenáz és 0,6 egység/ml diszpáz komplettált DMEM-ben oldva), majd két órán keresztül emésztettük. Az így nyert sejt szuszpenziót komplettált médiummal egészítettük ki.

DOX és PLD koncentráció kimutatása vérből. Az egereket intravénásan kezeltük egyetlen dózis doxorubicinnal (5 mg/kg) vagy PLD-vel (8 mg/kg). Vérmintákat gyűjtöttünk a kezelés előtt,

majd a kezelést követő 5, 15, 30, 60, 180, 360, 1440 és 2880 percben szív punkcióval, miután az állatokat elaltattuk. A vérsavót centrifugálással szeparáltuk 4000 rpm-en, 15 percig 4°C-on. A felülúszót steril csőbe vittük át, majd -20°C-on tároltuk a tömeg spektrometriai mérésig.

Eredmények

1. Új MDR-szelektív vegyületek azonosítása és jellemzése in vitro rendszerekben

Korábban kimutattuk, hogy a Pgp mRNS szintjeit és a publikus DTP toxicitási profilokat korrelálva lehetőség nyílik Pgp szubsztrátok és olyan MDR-szelektív vegyületek azonosítására, amelyek toxicitása funkcionális Pgp jelenlétében növekszik. A sejtek hiperérzékenyek mutatkoznak ezekkel a vegyületekkel szemben, és ez az érzékenység arányos a sejtek Pgp expressziójával, de elvész, amint a Pgp funkcióját gátlószerekkel vagy géncsendesítéssel megszüntetjük. Ahhoz, hogy korábbi, kisebb adathalmazból származó vegyületek csoportját több hasonló molekulával bővíthessük, meghatároztuk a korrelációt 49169 vegyület citotoxicitási mintázata és az NCI60 sejtpanel panel sejtjein mért Pgp expressziós szintek között. Analízisünk 21 új, lehetséges MDR-szelektív anyagot eredményezett, amelyek közül három molekula (NSC57969, NSC297366, NSC608465) részletes karakterizálását végeztük el három különböző sejtpanel-páron. A három vegyület közül kettő (NSC57969, NSC297366) mind toxicitásában, mind szelektivitási hányadosában jelentősen felülmúlta a korábban azonosított MDR-szelektív molekulákat. Az új szerkezetek átlagosan 6-7-szer szelektívebbek a Pgp-kifejező sejtekre, és az IC50 értékeik nagyjából egy nagyságrenddel alacsonyabbak. A toxicitás Pgp-függését szelektív gátlószerekkel (Tariquidar, TQ) hozzáadásával ellenőriztük, ami képes a transzporter funkciójának teljes és reverzibilis gátlására. A vártnak megfelelően a molekulák, melyek célzottan pusztították el a Pgp expresszáló sejteket, csökkent hatást mutattak a gátlószerek jelenlétében, azonban hatékonyságuk nem változott jelentősen a Pgp-negatív parentális sejtpanelokon.

2. MDR-szelektív molekulák Pgp expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata sejtpanelokon, primer tumorból izolált sejteken, valamint a vér-agy gát sejtmodelleken

Már az MDR-szelektív vegyületek felfedezését követően nem sokkal kiderült, hogy az MDR sejtek folyamatos MDR-szelektív vegyülettel történő kezelésnek kitéve elveszítik Pgp transzportereiket és újra érzékennyé válnak a konvencionális kemoterápiás szerekkel szemben, melyekre korábban nagyfokú rezisztenciát mutattak. Ez az eredmény tovább erősítette az elméletet, miszerint az MDR-szelektív molekulák hatása szorosan összefügg a sejtek membránjában működő Pgp fehérjével. Hogy az újonnan talált vegyületek Pgp-csökkentő

hatását is fel tudjuk mérni egy újfajta megközelítést alkalmaztunk. Ezt az eljárást a MES-SA/Dx5 sejtvonalon alkalmaztuk, mivel ebben a sejtvonalban a magas Pgp expresszió doxorubicinban történő szelekció eredménye. Meglepő módon a három új vegyület egyetlen, 5 napig tartó, IC₂₀ dózissal történő kezelés után a Pgp-negatív sejtek szintjére csökkentette a fehérje funkcióját, míg a kontroll kezelést követően a Pgp funkció nem változott. A kezelés hatására Pgp-negatívvá vált MES-SA/Dx5 sejtek újra érzékennyé váltak a doxorubicinra és rezisztenssé más MDR-szelektív molekulával szemben, tovább bizonyítva, hogy a Pgp jelenléte és funkciója szükséges és elégséges feltétele az MDR-szelektív vegyületek által mutatott specifikus toxicitásnak.

Ahhoz, hogy felmérjük, vajon az azonosított vegyületek MDR-szelektív toxicitása használható stratégia olyan tumor sejtek ellen is, amelyek a klinikai drog rezisztenciához hasonló szinten fejezik ki a Pgp-t, felhasználtuk a multidrog rezisztencia egyik genetikailag módosított egér emlő tumor modelljéből izolált primer tumor sejteket. Ebben a modellben doxorubicin rezisztenciát okozó Pgp expresszáló karcinóma sejtek szelektíven eliminálhatóak voltak egyetlen NSC57969 kezeléssel, ami arra utal, hogy az MDR-szelektív terápia hatékonyan képes lehet az MDR fenotípus visszafordítására még klinikailag releváns Pgp szintek mellett is.

A tumor sejteken kapott eredményekkel szemben a humán agyi mikroerekből izolált primer endotél hCMEC/D3 sejtek magas Pgp expressziója nem csökkent az NSC57969 kezelést követően. Ez az eredmény arra utal, hogy a normál szövetekben található Pgp szintek nem érzékenyítik szelektíven az egészséges sejteket az MDR-szelektív vegyületekkel szemben, ehhez a malignus transzformáció során elért Pgp mennyiségre és rapid osztódási képességre van szükség.

3. A PLD hatásának vizsgálata szenzitív és rezisztens in vitro és allograft modelleken

A doxorubicint (DOX) és a ciszplatint (CDDP) széles körben alkalmazzák az emlő daganatok különböző stádiumaiban, ezért a PLD toxicitását ezekhez a vegyületekhez hasonlítva vizsgáltuk az NCI60 sejtvonal panel emlő tumor sejtjein. A hat elérhető sejtvonalon (BT-549, Hs578T, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7, T47D) tesztelve, a DOX kezelés magas toxicitást mutatott, míg a PLD dózis-hatás görbéiből számolt IC₅₀ értékei átlagosan 45-ször bizonyultak magasabbnak, ami azt jelenti, hogy a PLD jóval magasabb hatóanyag koncentrációban éri el ugyanazt a hatást, amit a DOX.

A Pgp-expresszió hatását a PLD kezelésre drog-szenzitív és –rezisztens sejtvonal-párokon teszteltük. Meglepő módon a Pgp expresszáló sejtek elpusztíthatatlannak mutatkoztak a PLD-

vel szemben. A jelenséget tovább vizsgálva a sejtekhez DOX-ot és PLD-t adtuk TQ-val kombinálva. Amíg a PLD magában hatástalan volt a már MDR sejteken, addig TQ-val kombinációban alkalmazva a Pgp-pozitív és -negatív sejtek közötti PLD érzékenységbeli különbség eltűnt, ami arra utal, hogy a Pgp funkciója önmagában elég arra, hogy teljes rezisztenciát alakítson ki a PLD-vel szemben.

Ahhoz, hogy felfedjem, vajon a Pgp egy *in vivo* tumor modellben is védelmet nyújt a PLD kezelés ellen, ascitesz képző allograft daganatokat hoztam létre P388 és P388/ADR sejtekből BDF1 egerekben. A P388 tumorok megfelelően reagáltak a DOX és PLD kezelésekre és 29 (DOX), 28 (3 mg/kg PLD), illetve >63 (5 mg/kg PLD) napos medián túlélést mutattak a fiziológiás sóoldattal kezelt csoport 15.5 napos túlélésével szemben. Ezzel ellentétben a drog rezisztens P388/ADR tumorokkal oltott állatok esetében semmilyen túlélési előnyt nem jelentett egyik kezelés sem, míg a kontroll csoport medián túlélése 15.5 nap volt, addig a DOX kezelt csoport medián túlélése 12.5, a PLD (3 mg/kg) 13, a PLD (5 mg/kg) pedig 16 nap volt. Ez a 63 napos megfigyelési periódus bizonyította, hogy a Pgp-pozitív tumorok DOX és PLD kezelése nem hatásos, de a kezelést még nem kapott P388 daganatok esetében jelentős túlélés növekedés érhető el, sőt a PLD kezelés erős dózis-függést mutatott.

4. A PLD terápiás hatásának vizsgálata egy klinikailag releváns egér emlő tumor modellen

A tumorok komplex természetét modellezendő a PLD kezelést kipróbáltuk egy klinikailag releváns, örökletes egér emlő daganat modellben is. Ebben a modellben invazív duktális karcinóma (IDK) fejlődik a *Brca1^{-/-};p53^{-/-}* deléciókat hordozó állatok nagy részében és ezek a tumorok jelentős mértékben mutatják az emberi IDK molekuláris, patológiai és immunhisztokémiai karakterisztikáját. Ezeket a tumorokat MTD DOX-xal kezelve gyorsan, a legtöbb esetben Pgp-mediált, rezisztencia alakítható ki. Annak ellenére, hogy a két kezelőszer (DOX és PLD) hatóanyaga megegyezik, meglepő módon a tumorok által a kezelésre adott válaszok nagyon eltérőek voltak, a relapszus-mentes túlélés szignifikánsan hosszabb volt a PLD kezelt csoportban, mint a DOX kezelés esetén (9 vs 56 nap), és a teljes, medián túlélés is jelentősen hosszabbnak bizonyult a PLD kezelést kapott csoportban (49.5 vs 151.5 nap). A két csoport tumorjainak növekedési kinetikájának vizsgálata rávilágított, hogy a túlélésben látott jelentős különbségek a drog rezisztencia kialakulásának idejével van összefüggésben: míg a DOX-kezelt csoport mindegyik tumorában (8/8) gyorsan kialakul a rezisztencia és megakadályozza a további kezelést, addig a PLD-kezelt tumorok két kivételtől eltekintve (2/10) mind folyamatosan reagáltak az adott terápiára. Mi több, a DOX-rezisztens tumorokat tovább ültetve, bizonyítható volt, hogy (a várható módon) hatástalan doxorubicin kezeléssel szemben,

ezekben a már rezisztens daganatokban, a PLD terápia még mindig hatékony (teljes medián túlélés 27 vs 142 nap) és ez összevethető a drog-naiv tumoroknál látott eredményekkel (142 vs 151.5 nap) is. Ezzel szemben a relapszus-mentes túlélés a PLD-kezelt csoportban 56 napról 15 napra csökkent.

A tumorok mRNS szintű Pgp-expressziójának vizsgálata megmutatta, hogy a PLD-vel szembeni rezisztencia kialakulásához átlagosan közel 100-szor magasabb P-glikoprotein mRNS expressziós szintre van szükség, mint a DOX kezelés esetében.

A kezelések után mért vérplazma doxorubicin szintek magyarázhatják a PLD hatékonyságát a DOX terápiával szemben. Az összességében 60%-kal magasabb doxorubicin dózis (5 vs 8 mg/kg) a PLD kezelt állatokban 35-ször magasabb maximális csúcs koncentrációt (885.67 ± 240 vs 31600 ± 6023 ng/μl) eredményezett 5 perccel a beadást követően, és míg a DOX vérben mért szintje gyorsan csökkenni kezdett, addig a PLD kezelt egerek vérében még 7 napot követően is olyan magas koncentrációt mértünk, amely összevethető volt a DOX maximális csúcs koncentrációjával a beadást követően. A PLD AUC értéke („Area Under the Curve”, a szervezetet érő teljes hatóanyag mennyiség egy kezelés alatt) közel 2600-szor (!) magasabb volt, mint a DOX beadást követően (4.47×10^7 vs 1.7×10^4 ng×h/ml). A nagyon magas koncentráció és hosszú keringési idő ellenére az állatok nem mutatták jelét fájdalomnak, súlyos mellékhatásnak vagy súlyvesztésnek.

Következtetések

1. Az *in silico* korrelációs és *in vitro* szűrési technikák segítségével olyan új MDR-szelektív vegyületeket azonosítottam, melyek toxikusabbak és szelektívebbek a korábban talált molekuláknál.
2. Kimutattam, hogy az új molekulák képesek a Pgp-pozitív multidrog rezisztens sejteket egyetlen, nagy dózisú kezeléssel újra Pgp-negatívvá tenni, ezzel újra érzékenyítve őket a konvencionális kemoterápiákkal szemben.
3. A *brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} egér emlő tumorokból alapított primer sejt kultúrák alkalmazásával igazoltam, hogy az MDR-szelektív vegyületek képesek szelektíven elpusztítani a Pgp-t klinikailag releváns szinten expresszáló drog rezisztens sejteket.
4. Egy fiziológiás vér-agy gát sejtmodell segítségével bebizonyítottam, hogy a Pgp kifejeződést érintő hatás nem jelent veszélyt a fontos vér-szöveti határokon P-glikoproteint expresszáló testi sejtekre.
5. Összehasonlítottam a doxorubicint (DOX) és a pegilált liposzómális doxorubicint (PLD) az NCI60 sejt vonal panel összes emlő tumorból származó vonalán, valamint egy

Pgp-negatív és –pozitív sejtpárokat tartalmazó panelen is és kimutattam, hogy *in vitro* a DOX kezelés toxikusabb, mint a PLD, de mindkét anyag hatástalan a Pgp-t túlexpresszáló sejteken.

6. A Pgp PLD-rezisztenciára kifejttet hatását tovább vizsgálva igazoltam, hogy a P388 drog érzékeny és P388/ADR drog rezisztens egér leukémia tumorokat kezelve, csak azok a daganatok szoríthatóak vissza a DOX és PLD kezelésekkkel, amelyek nem fejezik ki a P-glikoproteint.
7. Kísérletesen bizonyítottam, hogy egy genetikailag módosított *brca1^{-/-};p53^{-/-}* egér emlő tumor modellben a PLD kezelés szignifikánsan megnöveli a relapszus-mentes és a teljes túlélést, úgy, hogy kitolja a terápia rezisztencia kialakulásának idejét.
8. Kimutattam, hogy a PLD kezeléssel szemben kialakult rezisztencia hátterében a P-glikoprotein mRNS expressziójának megnövekedése áll, ami a DOX terápia során fellépő Pgp expresszió változás akár százszorososa is lehet.
9. Bizonyítottam, hogy a DOX-rezisztenciát okozó Pgp expresszió nem elegendő a PLD kezeléssel szemben, így a DOX-rezisztens daganatok újratezelése PLD-vel hatékony stratégia.

Dolgozat részét képező publikációk

Veronika F.S. Pape, Szilárd Tóth, András Füredi, Kornélia Szebényi, Anna Lovrics, Pál Szabó, Michael Wiese, Gergely Szakács: **Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance**, European Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 117:335-354 (IF: 4.519)

András Füredi, Szilárd Tóth, Kornélia Szebényi, Veronika F.S. Pape, Dóra Türk, Nóra Kucsma, László Cervenák, József Tóvári and Gergely Szakács: **Identification and validation of compounds selectively killing resistant cancer: delineating cell line specific effects from P-glycoprotein-induced toxicity**, Molecular Cancer Therapeutics, 2017, 16: 45-56 (IF: 5.764)

András Füredi, Kornélia Szebényi, Szilárd Tóth, Mihály Cserepes, Lilla Hámori, Veronika Nagy, Edina Karai, Tímea Imre, Pál Szabó, Dávid Szűts, József Tóvári, Gergely Szakács: **Pegylated liposomal doxorubicin increases treatment efficacy by delaying resistance in *Brca1^{-/-};p53^{-/-}* mammary tumor bearing mice**, Journal of Controlled Release, 2017 Sep 10;261:287-296 (IF: 7.786)

„MDR-reversing 8-hydroxy-quinoline derivatives” című és P1600234 alapszámú szabadalmi bejelentés (2016)

Dolgozatban nem szereplő publikációk

Lóránd Kiss, Éva Hellinger, Ana-Maria Pilbat, Ágnes Kittel, Zsolt Török, András Füredi, Gergely Szakács, Szilvia Veszélka, Péter Sipos, Béla Ózsvári, László G. Puskás, Mónika Vastag, Piroska Szabó-Révész, Mária A. Deli: **Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit P-glycoprotein in Caco-2 intestinal epithelial cells**, Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 103:3107-3119 (IF: 2.59)

Kornélia Szebényi, András Füredi, Orsolya Kolacsek, Rózsa Csohány, Ágnes Prókai, Katalin Kis-Petik, Attila Szabó, Zsuzsanna Bősze, Balázs Bender, József Tóvári, Ágnes Enyedi, Tamás I. Orbán, Ágota Apáti, Balázs Sarkadi: **Visualization of calcium dynamics in kidney proximal tubules**, Journal of the American Society of Nephrology, 2015, 26:2731-2729 (IF: 8.491)

Kornélia Szebényi, András Füredi, Orsolya Kolacsek, Enikő Pergel, Zsuzsanna Bősze, Balázs Bender, Péter Vajdovich, József Tóvári, László Homolya, Gergely Szakács, László Héja, Ágnes Enyedi, Balázs Sarkadi, Ágota Apáti, Tamás I. Orbán: **Generation of a homozygous transgenic rat strain stably expressing a calcium sensor protein for direct examination of calcium signaling**, Scientific Reports, 2015, 5:12645 (IF: 5.228)

Füredi András, Tóth Szilárd, Hámori Lilla, Nagy Veronika, Tóvári József, Szakács Gergely: **Állatmodellek szerepe a multidrogeiztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében**, Magyar Onkológia, 2015, Vol. 59, Nr 4, 338-345

Zsolt Szabó, László Héja, Gergely Szalay, Orsolya Kékesi, András Füredi, Kornélia Szebényi, Árpád Dobolyi, Tamás I. Orbán, Orsolya Kolacsek, Tamás Tompa, Zsombor Miskolczy, László Biczók, Balázs Rózsa, Balázs Sarkadi, Julianna Kardos: **Extensive astrocyte synchronization advances neuronal coupling in slow wave activity in vivo**, Scientific Reports, 2017 Jul 20;7(1):6018 (IF: 4.259)