

Csonka Ákos¹

⋮ Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Traumatológiai Klinika
⋮ csonka.akos81@gmail.com

SZTEROID VEGYÜLETEK HATÁSA TUMOR SEJTVONALAKON *IN VITRO*

The Effect of Steroid Compounds on Various Tumor Cell Lines In Vitro

Uticaj steroidnih jedinjenja na ćelijske linije tumora in vitro

A kemoterápia sikertelenségének oka a tumorsejtekben lévő multidrog-rezisztencia (MDR) mechanizmusokban rejlik. Ezek közül az egyik legismertebb a membránban lokalizálódó különböző efflux pumpák fokozott expressziója. Korunk egyik égető problémája olyan új, hatékony vegyületek kifejlesztése, melyekkel képesek leszünk leküzdeni a tumorsejtek rezisztenciamechanizmusait. Az általunk szintetizált szteroid származékokat egér T-lymphoma, valamint humán prosztatatarák sejtvonalakon vizsgáltuk meg *in vitro*. A vizsgált egér T-lymphoma sejtekben lévő multidrog-rezisztencia a humán *ABCB1*-génhez köthető. Ez azt jelenti, hogy a sejtmembránban lévő P-glikoprotein, más néven *ABCB1* transzporter efflux pumpa nagy mennyiségben kifejeződik a sejtekben, így a tumorsejtekbe jutó toxikus vegyületeket és kemoterápiás szereket képes eliminálni. A PC3 prosztatatarák sejtvonalban megjelenő rezisztenciamechanizmusok a következők lehetnek: a gyógyszer kötő sejtfelszíni receptorok hiánya, a gyógyszer megváltozott metabolizmusa vagy a sejten belüli kötődési hely mutációja. A sztereoizomerek antiproliferatív hatását MTT-módszerrel vizsgáltuk. Az *ABCB1* transzporterre ható gátlást az *ABCB1* szubsztrát rhodamine123 sejten belüli akumulációjával határoztuk meg, áramlási citometria segítségével. A doxorubicin és a szteroid vegyületek közötti kölcsönhatást is vizsgáltuk, ezen eredményeket CompuSyn software-rel interpretáltuk. A szteroidszármazékok *ABCB1* pumpára kifejtett gátló hatását a különböző szubsztituens csoportok befolyásolták. Annak ellenére, hogy a vizsgált szteroidszármazékoknak nincs markáns citotoxikus és antiproliferatív hatásuk a vizsgált sejtvonalakon, doxorubicinnel kombinálva legtöbbjük potenciálja annak hatását.

Kulcsszavak: multidrog-rezisztencia, *ABCB1* transzporter, egér T-lymphoma, PC3 prosztatatarák sejtvonal, szteroidszármazékok

Spengler Gabriella¹, Ana Martins^{1,3}, Vincze Irén², Molnár József¹

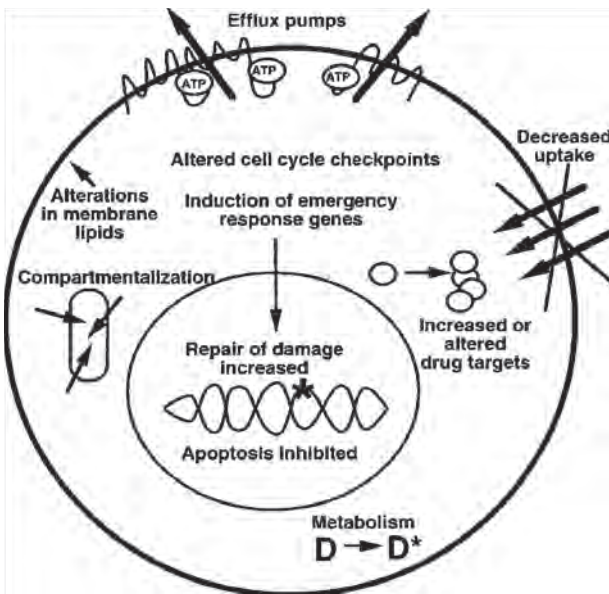
¹ Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

² Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szerves Kémiai Tanszék

³ Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

A prosztatatarák elsősorban az idősebb férfiak betegsége. Az életkor előrehaladásával kialakulásának valószínűsége egyre nő. Az Európai Unióban évente 417 000 megbetegedést diagnosztizálnak. Magyarországon minden évben kb. 1250 férfi halálát okozza. A prosztatatarák és az egészséges prosztata működésében is fontos szerepet játszanak a mellékhere Leydig-féle intersticiális sejtjei által termelt tesztoszteron és 5α -dihydrotesztoszteron hormonok. A klinikumban ezt az androgén dependenciát próbáljuk kihasználni a tumorsejtek kezelése során. A betegség megelőzéséhez, illetve a már kialakult tumor progressziójának monitorozásához a mindennapi gyakorlatban jól használható a PSA (prosztata specifikus antigén) nevű glycoprotein enzim szintjének vérmintából történő mérése. A szakirodalomban egyéb elnevezéseivel is találkozhatunk mint például Gamma-seminoprotein vagy kallikrein-3. Normál értéke 4 ng/ml-nél kisebb, de egyes szerzők ezt a határt 2,5 ng/ml alatt tartják elfogadhatónak.

A kemoterápia sikertelenségének oka a tumorsejtekben lévő multidrog-rezisztencia (MDR) mechanizmusokban rejlik (1. ábra). Ezek közül az egyik legismertebb a membránban lokalizálódó különböző efflux pumpák fokozott expressziója. Ilyen efflux pumpák az ABC-transzporterek, melyek az egyik legnagyobb és legősibb fehérje szupercsalád. Emberben eddig kb. ötven ABC-transzportert azonosítottak, melyeket hét alcsaládba soroltak ATP-kötő doménjük (NBF – nucleotide binding fold) aminosavsorrendje és elrendeződé-



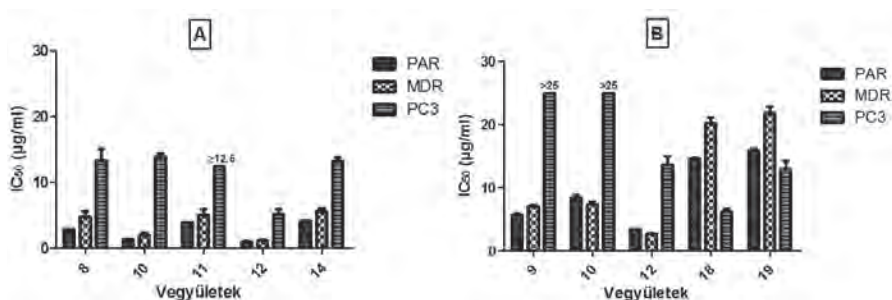
1. ábra. MDR efflux rendszerek

se alapján. A transzportált anyagok lehetnek gyógyszerek, metabolitok, lipidek, szteroidok. Korunk egyik égető problémája olyan új, hatékony vegyületek kifejlesztése, melyekkel képesek leszünk leküzdeni a tumorsejtek rezisztenciamechanizmusait.

A különböző szteroid vegyületek prosztatarák sejtvonalon történő vizsgálatának alapját annak androgéndependenciája adja. A szteroidok a lipidek családjába tartozó szerves molekulák. Alapvázuk az úgynevezett gonánváz vagy perhidro-ciklopentano-fenantrénváz. Négy gyűrűből áll, melyek közül az A, B, C gyűrű ciklohexán, a D pedig ciklopentán gyűrű. Az állatokban, növényekben és gombákban több száz szteránváz vegyület található. Állatok és gombák esetén lanoszterinből, növények esetén pedig cikloarteninből keletkeznek szkvalén nevű triterpén típusú molekulából ciklizációs folyamat révén.

Az általunk szintetizált 23 szteroid származékot egér T-lymphoma, valamint humán prosztatarák sejtvonalakon vizsgáltuk meg *in vitro*. A vegyületek közti különbséget a szubsztituált csoportok adták, alapvázuk egységesen a szteroid gonánváz volt. A vizsgált egér T-lymphoma sejtekben lévő multidrog-rezisztencia a humán *ABCB1*-génhez köthető. Ez azt jelenti, hogy a sejtmembránban lévő P-glikoprotein, más néven ABCB1 transzporter efflux pumpa nagy mennyiségben kifejeződik a sejtekben, így a tumorsejtekbe jutó toxikus vegyületeket és kemoterápiás szereket képes eliminálni. A PC3 prosztatarák sejtvonalban megjelenő rezisztenciamechanizmusok a következők lehetnek: a gyógyszert kötő sejtfelszíni receptorok hiánya, a gyógyszer megváltozott metabolizmusa vagy a sejten belüli kötődési hely mutációja.

A sztereoizomerek antiproliferatív és citotoxikus hatását MTT-módszerrel vizsgáltuk (2. ábra). A sejtekre gyakorolt hatást 96 lyukas mikrolemezen vizsgáltuk. A sejtekhez a vizsgált vegyületeket emelkedő koncentrációban adtuk hozzá. A gátló hatást az IC_{50} értékek meghatározásával végeztük. MTT (3-[4.5-dimethylthiazol-2-yl]-2.5 diphenyl tetrazolium bromide) -módszer-



2. ábra. A leghatékonyabb szteroid vegyületek antiproliferatív (A) és citotoxikus (B) hatása PAR/MDR egér T-lymphoma és PC3 prosztatarák sejtvonalon

rel történt a kolorimetriás detektálás Multiscan EX ELISA készülékkel. Az IC_{50} értékek számítását GraphPad Prism software-ral végeztük. Az ABCB1 transzporterre ható gátlást az ABCB1 szubsztrát rhodamine123 sejten belüli akkumulációjával határoztuk meg, áramlási citometria segítségével (1. táblázat). A vizsgálat során a fluoreszcencia aktivitási hányadost (FAR-érték) számoltuk ki. Ez mutatja a sejtekben felhalmozódott rhodamine123 mennyiségét.

Vegyületek	FAR	Vegyületek	FAR
Verapamil	17.21	13	58.79
1	54.28	14	2.20
2	37.64	15	1.76
3	59.28	16	75.48
4	37.92	17	16.69
5	29.07	18	77.41
6	9.21	19	52.90
7	10.21	20	45.82
8	1.47	21	1.07
9	39.14	22	10.43
10	1.19	23	12.26
11	2.77	DMSO	0.78
12	7.41		

1. táblázat. ABCB1 transzporterre ható gátlás humán ABCB1 (MDR1) génnel transzfektált egér T-lymphoma sejtvonalon. FAR=Fluoreszcencia aktivitási hányados

A verapamilt pozitív kontrollként alkalmaztuk, mely fokozta a sejtek szenzitivitását a rhodamine123 akkumulációjának tekintetében. A méréseket Partec CyFlow készülékkel végeztük. A 23 szteroid vegyület és a mindennapi gyakorlatban alkalmazott kemoterápiás szer, a doxorubicin közötti kölcsönhatást is vizsgáltuk PC3 sejtvonalon. A sejtekre gyakorolt hatást ebben az esetben is 96 lyukas mikrolemezen vizsgáltuk. Ezen eredményeket CompuSyn software-ral interpretáltuk (2. táblázat). A szteroid származékok ABCB1 pumpára kifejtett gátló hatását a különböző szubsztituens csoportok befolyásolták. Annak ellenére, hogy a vizsgált szteroidszármazékoknak nem volt markáns citotoxikus és antiproliferatív hatásuk a vizsgált sejtvonalakon, doxorubicinnel kombinálva legtöbbjük potenciálja annak hatását. Ennek hátterében a szubsztituált csoportok jellege állhat, de ez még további vizsgálatok tárgyát képezi.

Vegyületek	Arány	CI	Interakció
1	5:1	0.44	Szinergizmus
2	5:1	0.47	Szinergizmus
3	10:1	0.91	Nincs kölcsönhatás
4	5:1	0.28	Jelentős szinergizmus
5	5:1	0.82	Mérsékelt szinergizmus
8	10:1	0.4	Szinergizmus
9	10:1	0.17	Jelentős Szinergizmus
10	10:1	0.26	Jelentős Szinergizmus
12	5:1	0.55	Szinergizmus
14	10:1	0.29	Jelentős Szinergizmus
16	10:1	0.53	Szinergizmus
17	10:1	0.38	Szinergizmus
18	10:1	0.96	Nincs interakció
19	20:1	0.61	Szinergizmus
22	20:1	0.27	Jelentős szinergizmus
23	20:1	0.3	Szinergizmus

2. táblázat. Doxorubicin és a 23 szteroid vegyület közötti kölcsönhatás PC3 sejtvonalon. CI=Kombinációs index

IRODALOM

- Catalona, W. J., Richie J. P., Ahmann F. R., Hudson M. A., Scardino P. T., Flanigan R. C., Dekernion J. B., Ratliff T. L., Kavoussi L. R., Dalkin B. L. 1994. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter clinical trial of 6630 men. *The Journal of urology* 151 (5): 1283–1290.
- Chou T. C., Martin N. 2005. *CompuSyn for Drug Combinations*. PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀ Values, ComboSyn Inc, Paramus, (NJ).
- Cornwell M. M., Pastan I., Gottesman M. M. 1987. Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 262: 2166–2170.
- Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J. W. W., Comber H., Forman D., Bray F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of cancer* 49 (6): 1374–1403.
- Gottesman M. M. 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53: 615–627.

The Effect of Steroid Compounds on Various Tumor Cell Lines In Vitro

The lack of effectiveness of chemotherapy lies in the multidrug resistance mechanisms (MDR) found in tumor cells. The most known among these mechanisms is the increased expression of membrane-localized efflux pumps. A burn-

ing issue of our times is to develop new efficient compounds to overcome the resistance mechanisms of tumor cells. Our new steroid derivatives were examined *in vitro* on mouse T-lymphoma as well as on cell lines of human prostate cancer cell lines. MDR found in mouse T-lymphoma cells can be linked with the ABCB1 gene. This means that the P-glycoprotein found in the cell membrane, also called as ABCB1 transporter efflux pump, is overexpressed in cells, eliminating thus the effect of toxic compounds and chemotherapeutic agents in tumor cells. The resistance mechanisms occurring in the PC3 prostate cancer cell line can be as follows: the lack of receptors in surface cells binding the drug; altered drug metabolism; or the mutation of the binding place within the cell. The antiproliferative effect of stereoisomers was examined by MTT method. The inhibiting effect on ABCB1 transporter was determined by the accumulation of ABCB1 substrate in rhodamine 123 cells with flux cytometry. We also examined the interaction between the doxorubicin and the steroid compounds, interpreting the results using CompuSyn software. The inhibition of steroid compounds on ABCB1 pump was influenced by various substituents. Despite the fact that the examined steroid derivatives have no pronounced cytotoxic and antiproliferative influence on the examined cell lines, combined with doxorubicine, most of them enhance the influence.

Key words: multidrug resistance, ABCB1 transporter, mouse T-lymphoma, PC3 prostate cancer cell line, steroid derivatives

Uticaj steroidnih jedinjenja na ćelijske linije tumora in vitro

Razlog neuspešnosti kemoterapije krije se u mehanizmima multidrog-rezistencije (MDR). Jedan od najpoznatijih je povećana ekspresija raznih efluks-pumpi lokalizovanih uz ćelijsku membranu. Jedan od gorućih problema današnjice je razvijanje novih, efikasnih hemijskih jedinjenja kojima ćemo moći savladati mehanizme rezistencije ćelija tumora. Derivati steroida koje smo sintetizovali, ispitivali smo *in vitro* na ćelijskim linijama T-limfoma miša kao i na ćelijskim linijama ljudskog raka prostate. Multidrog-rezistencija u posmatranim ćelijama mišjeg T-limfoma može se vezati za humani ABCB1-gen. To znači da je P-glikoprotein u ćelijskoj membrani, drugim rečima ABCB1 transporter efluks-pumpa u velikoj meri se javlja u ćelijama, te je sposobna da eliminiše toksična jedinjenja i kemoterapijska sredstva koja su prodrle u ćelije tumora. Mehanizmi rezistencije koji se javljaju u PC3 ćelijskim linijama ljudskog raka prostate mogu imati sledeće uzroke: nedostatak površinskih ćelijskih receptora koji vezuju lekove, promenjen metabolizam lekova, ili pak, mutaciju mesta vezivanja unutar ćelije. Antiproliferativno dejstvo stereoisomera analizirali smo MTT-metodama. Inhibiciju, koja utiče na ABCB1 transporter, odredili smo

pomoću unutarćelijske akumulacije ABCB1 supstrata rodamina123, primenom protočne citometrije. Posmatrali smo i interakciju između doksorubicina i steroidnih jedinjenja, a dobijene rezultate interpretirali smo pomoću softvera CompuSyn. Supstituenti derivata steroida su uticali na inhibiciju ABCB1 pumpe. Uprkos tome što ispitivani derivati steroida ne ispoljavaju markantno citotoksično i antiproliferativno dejstvo na posmatrane ćelijske linije, u kombinaciji sa doksorubicinom većina njih potencira njegov uticaj.

Ključne reči: multidrog-rezistencija, ABCB1 transporter, T-limfoma miša, PC3 ćelijska linija raka prostate, derivati steroida

Beérkezés időpontja: 2014. 10. 25.

Közlésre elfogadva: 2014. 11. 30.