

Humán prosztatarák sugárérzékenységének fokozása szelektív 12-lipoxigenáz-gátlással preklinikai modellben

Lövey József¹, Nie Daotai², Tóvári József¹, Kenessey István³, Kandouz Mahmoud^{4,5,6},
Tímár József³, Kásler Miklós¹, Honn Kenneth V.^{4,5,6}

¹Országos Onkológiai Intézet, ²Department of Medical Microbiology, Immunology, and Cell Biology, Southern Illinois University School of Medicine, Springfield, IL, ³Semmelweis Egyetem, 2. Sz. Patológiai Intézet, Budapest, ⁴Department of Pathology, Wayne State University School of Medicine, ⁵Karmanos Cancer Institute, ⁶Bioactive Lipids Research Program, Detroit, MI

A kutatás a következő támogatások segítségével jött létre: DOD IDEA Award W81XWH-11-1-0519, Fund for Cancer Research, TÁMOP 4.2.1.B-09/1-KMR-2010-001.

A prosztatarák a fejlett világban a leggyakrabban előforduló daganat a férfiakban. A sugárkezelés a sebészet mellett a prosztatarák egyik kuratív kezelési módszere. Az egyre fejlődő technika és az emelkedő sugárdózisok ellenére a betegek mintegy 30%-ánál kell lokális kiújulással számolni. Az arachidonsavról és metabolitjairól régóta kimutatták, hogy jelentős szerepük van a daganatok kórélettani folyamataiban. A 12-lipoxigenáz (12-LOX) enzimről korábban már bizonyították, hogy jelentősen fokozza a prosztatarák progresszióját az apoptózis szabályozásán és a sejttúlélés elősegítésén keresztül. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a 12-LOX gátlása milyen hatással van a prosztataráksejtek sugárérzékenységére in vitro és in vivo. Humán prosztataráksejteket 12-LOX-gátló molekulákkal, sugárral, valamint a 12-LOX-gátlók és besugárzás kombinációjával kezeltük in vitro, illetve állatkísérletes modellben. A kezelések hatását in vitro az apoptózis és a klonogén túlélés, illetve in vivo a beültetett tumorok növekedésének vizsgálatával mértük. A 12-LOX enzim szelektív gátlása és a sugárzás is növelte az apoptózist és csökkentette a sejtek klonogén túlélését in vitro. A kombinált kezelések szinergisztikusnak bizonyultak. Az állatkísérletes modellben azt találtuk, hogy mind a 12-LOX gátlása, mind a sugárkezelés csökkenti a xenograft tumorok növekedését, de a két kezelési módszer kombinációja szignifikánsan nagyobb mértékben késlelteti a daganatok növekedését, mint az egyedüli kezelések. A kísérleteink során és a korábban nyert adatok meggyőzően bizonyítják, hogy a 12-LOX enzimnek jelentős szerepe van a prosztataráksejtek progressziójában és sugárérzékenységében. Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a szelektív 12-LOX-gátlók ígéretes molekulák, melyeket érdemes továbbfejleszteni, mert klinikai körülmények között is hatékony sugárérzékenyítőnek bizonyulhatnak és jelentősen javíthatják a sugárkezelés eredményeit a prosztatarákos betegekben. Magyar Onkológia 58:211-218, 2014

Kulcsszavak: prosztatarák, sugárkezelés, 12-lipoxigenáz, sugárérzékenyítés

Prostate cancer is one of the leading cancer types in males in the developed world. Radiotherapy is a major method in the curative treatment of prostate cancer however, up to 30% of the patients experience local relapse. Arachidonic acid metabolites have been shown to have important role in cancer. 12-lipoxygenase (12-LOX) has been proven to significantly influence prostate cancer

Levelezési cím: Dr. Lövey József, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György utca 7-9.,
telefon: +36 1 224 8600, e-mail: lovey@oncol.hu

Közlésre érkezett: 2014. június 20. • Elfogadva: 2014. augusztus 12.

progression, by apoptosis regulation and by promoting cancer cell survival. In this study we examined whether 12-LOX inhibition may increase radiation sensitivity of prostate cancer cells in vitro and in vivo. Prostate cancer cell lines were treated with 12-LOX inhibitors, different doses of radiation and the combination of 12-LOX inhibitors and radiation. We measured the effect of these treatments through clonogenic survival and apoptosis in vitro and tumor growth in vivo in a tumor xenograft model. 12-LOX inhibition and radiation both increased apoptosis and decreased clonogenic survival of prostate cancer cell lines in vitro. Combined treatment resulted in a supra-additive effect in vitro. In vivo both 12-LOX inhibition and radiotherapy caused delay in growth of the xenograft tumors but the combined treatment resulted in the strongest growth inhibition. The presented data prove that 12-LOX and its metabolite 12(S)-HETE have a major role in prostate cancer cell progression and radiosensitivity. We have shown by different methods in vitro and in vivo that inhibition of 12-LOX activity significantly sensitizes prostate cancer cells to radiation. Therefore we can state that 12-LOX inhibitors are promising compounds to be developed to become a new class of clinical radiation sensitizers in prostate cancer.

Lövey J, Nie D, Tóvári J, Kenessey I, Kandouz M, Tímár J, Kásler M, Honn KV. Selective 12-lipoxygenase inhibition potentiates the effect of radiation on human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Hungarian Oncology* 58:211-218, 2014

Keywords: prostate cancer, radiotherapy, 12-lipoxygenase, radiosensitivity

BEVEZETÉS

Az arachidonsav metabolizmusában részt vevő kulcsenzimek, a ciklooxygenáz (COX) és lipoxigenáz (LOX) számos olyan bioaktív lipidet hoznak létre, melyeknek fontos szerepe van a sejtek túlélésében, a sejtciklus szabályozásában, a sejtek inváziójában és az angiogenetikus fenotípus kialakításában (1–4). Számos tanulmány foglalkozott a prosztataráksejtekben található arachidonsavat metabolizáló enzimek aktivitásával és azok daganatokra jellegzetes változásaival. Ezek alapján bizonyítottak tűnik, hogy a prosztatacarcinóma-sejtekben a COX-2, a tromboxánszintáz (TXS), a p12-LOX és a 15-LOX1 upregulálódik, míg a 15-LOX2 downregulálódik. Ennek hatására a metabolitok jellegzetes mintázata jön létre. Így a sejtekben nagyobb mennyiségben található PGE2, TX, 12(S)-HETE és 13(S)-HODE (1). A 12-LOX-expressziót az őssejtekre jellemző tulajdonságnak is tartják, mivel mindkét izomerje, a vérlemezke- és a leukocitátípus, alaphelyzetben is expresszálódik a csontvelői progenitorsejtekben (5).

Korábbi kutatási eredmények azt mutatták, hogy a 12-LOX terméke, a 12(S)-HETE a daganatsejtekben aktiválja az antiapoptotikus, sejtmotilitási és angiogenetikus mechanizmusokat (6–8). A 12(S)-HETE a génexpressziót is befolyásolja, pl. a VEGF expresszióját (8). A 12-LOX overexpressziója egyenes összefüggést mutat a prosztatarák grade-jével és a stádiummal (9). Elősegíti a daganatnövekedést az angiogenezis fokozása által (10). A 12-LOX enzim szelektív gátlása apoptózist indukált és a daganatsejtek metasztatikus képességét csökkentette emberi prosztataráksejtvonalban (11).

A szűrés és a korai felismerés hatására egyre több beteget diagnosztizálnak korai, lokalizált prosztatarákkal. A prosz-

tatarák kuratív kezelése sebészi és sugárterápiás lehet (12). Az utóbbi időben a betegek preferenciája és a viszonylag alacsonyabb morbiditási ráta mellett elért hasonló gyógyulási eredmények miatt a radikális sugárterápia alkalmazása mind külső, mind belső kezelés formájában (brachyterápia) egyre növekvő tendenciát mutat (13). A prosztatarákok sugárérzékenysége különböző, a sugárérzékenység fokozásának kifejezett klinikai jelentősége lehet (14). Tekintve a 12-LOX szerepét a különböző daganatfélések progressziójában (1), feltételeztük, hogy a 12-LOX által létrehozott bioaktív lipidek az ionizáló sugárzás sejtpusztító hatását jelentősen befolyásolni tudják, a 12-LOX gátlásával esetleg a sugárzás hatását fokozni lehet.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtvonalak. A PC-3, DU-145 és LNCaP humán prosztataráksejtek (ATCC, Manassas, VA) 10% főtális borjúsavot tartalmazó RPMI1640, vagy DMEM médiumban (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) tartottuk fenn, 37 °C-on, 5% CO₂-tartalom mellett.

In vitro kezelések. A kezelések előtt a prosztataráksejtek 10 cm átmérőjű tenyésztőedénybe helyeztük és 12 órát hagytunk a letapadásra. A sejteket sugárzással, 12-LOX-gátló baicaleinnel (Biomol, Plymouth, PA) (15), vagy N-benzil-N-hidroxi-5-fenilpentamiddal (BMD122, Biomide Corp., Grosse Pointe Farms, MI) (11), 5-LOX-gátló Rev-5901-gyel (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI), illetve a sugárzás és a fenti gátlószerek kombinációival kezeltük. A specifikus hatás bizonyítására a kísérleteket 12(S)-, 5(S)- és 15(S)-HETE visszaadásával is elvégeztük. A sugárkezelést Cs-137 gamma irradiátorral végeztük, 85 cGy/perc dózisteljesítménnyel. Az egyedüli kezeléseket a BMD122 és Rev-5901

esetén 10–50 μM koncentrációval, a baicalein esetében pedig 3–15 μM koncentrációval végeztük. A sugárkezelés dózisait 25–500 cGy között változtattuk. A kombinált kezeléseknél 25 μM koncentrációt alkalmaztunk a BMD122-nél és Rev 5901-nél és 7,5 μM -t a baicalein esetében, 1 órával a besugárzás előtt. A kombinált kezelésnél az előbb említett sugárdózisokat alkalmaztuk. A visszaadós kísérleteknél 100 ng/ml 5(S)-, 12(S)-, illetve 15(S)-HETE-t adtunk a sejtekhez, közvetlen a LOX-gátlók alkalmazása előtt.

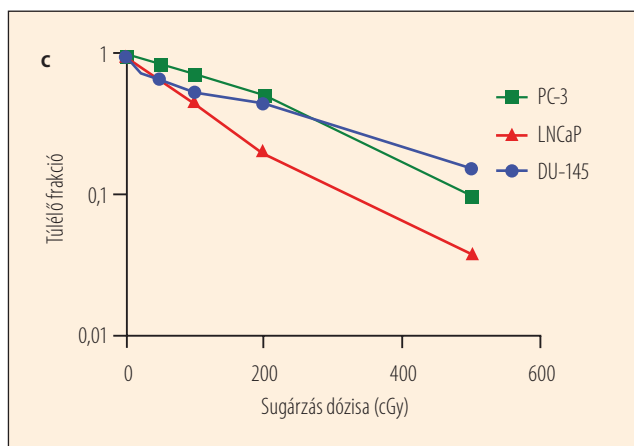
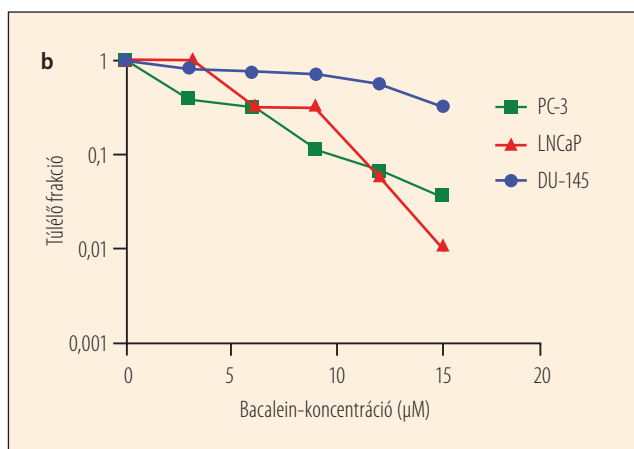
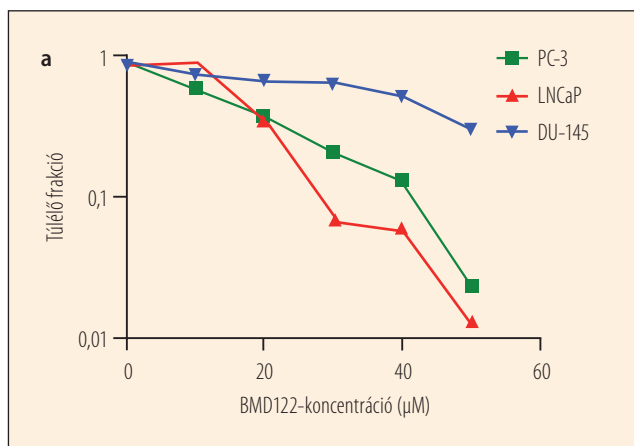
Klonogén túlélés vizsgálata. A prosztatacarcinóma-sejteket 6 lyukú tenyésztőedénybe helyeztük, és szérumban jelenlétében 24 órát hagytunk a letapadásra. A sejteket ezt követően az előbb leírt protokollok szerint kezeltük. A sejteket 14 napig inkubáltuk (kivéve a gyorsan növekvő LNCaP sejteket, melyeket csak 7 napig), 37 °C fokon, 10% FBS-t tartalmazó médiumban. Ezt követően a sejteket 4 százalékos pufferrel formaldehiddel fixáltuk és kristályibolyával festettük meg. A legalább 50 sejtet tartalmazó kolóniákat számoltuk össze, és a túlélő frakciót a kezeltlen kontrollra normalizáltuk.

Apoptózis vizsgálata. Az apoptózist TUNEL módszerrel mértük (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN). A sejteket 10 cm-es Petri-csészékbe helyeztük, és a korábbiakban leírt protokollok szerint kezeltük. A sejteket a teljes kísérlet ideje alatt szérumban tartottuk. A kezeléseket követően 13 órával a sejteket tripszin-EDTA segítségével felszedtük, PBS-sel mostuk, és jég hideg etanollal fixáltuk 1 óráig. A permeabilizációt jég hideg 0,15% Triton-X100 és 0,1% nátrium-citrát segítségével végeztük, 3 percen keresztül. A sejteket ismét PBS-sel mostuk, és hozzáadtuk a TUNEL munkaidőanyagot. A sejteket 1 óráig 37 °C fokon inkubáltuk, majd reszuszpendáltuk PBS-ben. Az apoptotikus frakciót lézer-flow-citometriával mértük.

Western-blot. A sejteket a leírt protokoll szerint kezeltük. 48 órával a kezelés után teljes sejtelvonásokat készítettünk. 20 μg fehérjét futtattunk előre gyártott SDS-poliakrilamid gélen, majd a fehérjéket nitrocelullóz membránra transzferáltuk. Ötszázalékos tejport tartalmazó 0,1 M Tris puffer-0,9% NaCl és TBS-0,1% Tween keverékben inkubáltuk a membránt 1 óráig. A blottokat éjszakán át 4 °C fokon tartottuk BCL-2, Bax és survivin elleni, 1:1000 hígítású primer antitestekkel (R&D Systems, Minneapolis, MN). A fehérjesávokat szemi-kvantitatív módszerrel, denzitometriával is értékeltük.

In vivo tumornövekedés. A kísérletekhez SCID egereket használtunk, amelyekbe 10^6 PC-3 sejtet injektáltunk szubkután. A daganatokat engedték 5 mm átmérőjűre nőni. A 12-LOX-gátló BMD122-t intraperitoneálisan alkalmaztuk (100 mg/kg/nap) 4 napon keresztül. A sugárkezelés röntgenterápiás készülékkel (100 kV, 15 mA) a 16. napon történt 5 Gy dózissal. A daganatok növekedését 2 héten keresztül követtük. A daganatok mindkét átmérőjét mértük

1. ábra. A prosztataráksejtek érzékenysége besugárzásra és 12-LOX-gátló kezelésre. Klonogén túlélési vizsgálat PC-3, LNCaP és DU-145 humán prosztatarák-sejtvonalakon, melyeket különböző koncentrációjú BMD122 (a), baicalein (b) 12-LOX-gátlókkal kezeltünk 1 óráig, illetve különböző dózisu sugárzásban részesítettük (c). Minden pont háromszoros mérési eredményeket jelent (SD<10%)



háromnaponként. A kísérleteket a 28. napon termináltuk Nembutal-túladagolással.

Statisztikai elemzés. A szinergizmus vizsgálatához kombinációs indexet (CI) számoltunk a Calcsyn (Biosoft) program segítségével. A számolás Chou–Talalay-összefüggésen alapul, amely a medián hatás elvét alkalmazza (16). A klonogén túlélés görbéinek elemzését Graphpad szoftverrel végeztük (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). A szoftver a görbék dőlésszögét és távolságát hasonlítja össze; amennyiben ezek közül egy is szignifikánsan különbözik, akkor a két görbe statisztikailag különbözőnek bizonyul. A összehasonlításhoz elvi, számított addíciós görbét készítettünk a túlélési görbék kombinálásával. Így, ha a kombinált hatás az elvi addíciós görbe felett vagy az alatt helyezkedik el, akkor a hatás supra- (szinergisztikus) vagy szubadditív. Az egyéb adatok közlésénél a standard deviációt (SD) adtuk meg.

EREDMÉNYEK

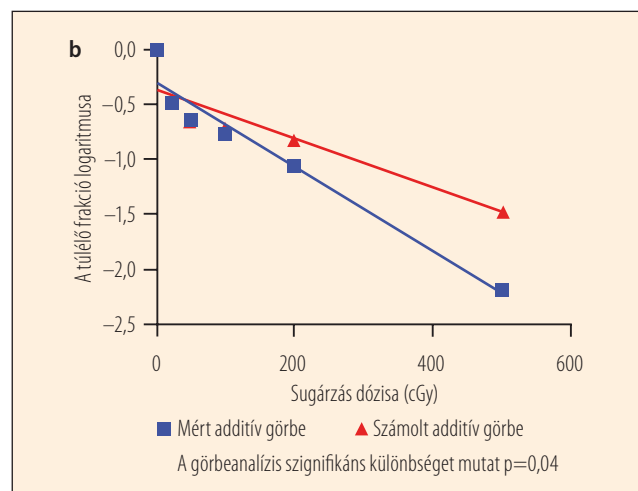
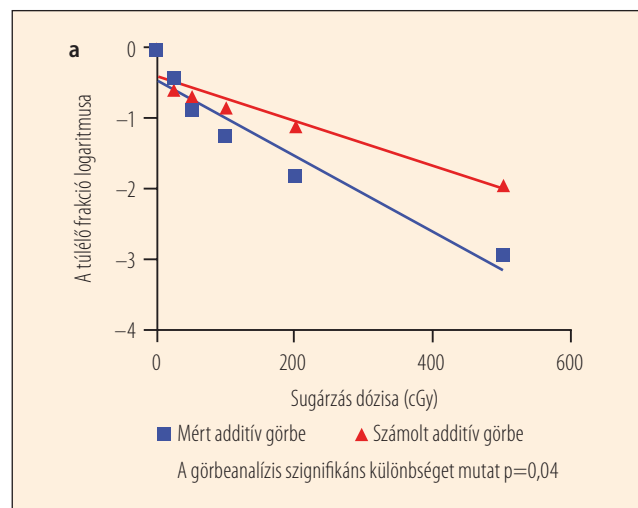
A 12-LOX-gátlás és sugárzás hatása a prosztataráksejtek klonogén túlélésére

A PC-3, DU145 (hormonrezisztens) és LNCaP (hormonérzékeny) humán prosztataráksejtek kezelése különböző koncentrációjú 12-LOX-gátlóval (baicalein vagy BMD122, 1.a,b ábra) vagy sugárkezeléssel (1.c ábra) a dózistól függően a sejtek klonogén túlélésének csökkenéséhez vezetett. A 12-LOX-gátlásra legkevésbé érzékeny sejtvonal a DU-145 volt, míg a sugárkezelésre a három különböző sejtvonal egyforma érzékenységet mutatott, bár a PC-3 kis dózisok esetén viszonylag rezisztensnek bizonyult. A kombinációs kezelések során a sejteket 0–500 cGy sugárdózissal, illetve 25 μ M BMD122-vel kezeltük. A szinergizmust a már említetteknek megfelelően a Chou–Talalay-összefüggés alapján vizsgáltuk. A PC-3 sejtvonalon a kombinált kezelés szinergisztikusnak mutatkozott. Az LNCaP sejteknél ugyanez a szinergisztikus hatás a magasabb sugárdózisnál

1. táblázat. A 12-LOX-gátlás és besugárzás szinergizmusának vizsgálata a kombinációs index (CI) alapján. Az 1 alatti CI szinergizmust (szupraadditív hatást) jelez

Sugárzás dózisa (cGy)	PC-3		LNCaP		DU-145	
	25 μ M BMD122	7,5 μ M baicalein	25 μ M BMD122	7,5 μ M baicalein	25 μ M BMD122	
25	0,87	0,35	1,23	1,10	1,12	
50	0,66	0,57	0,89	1,01	1,05	
100	0,64	0,13	0,76	0,87	1,36	
200	0,61	0,10	0,56	0,69	1,54	
500	0,50	0,11	0,62	0,58	1,23	

2. ábra. Szinergisztikus hatás kolóniaképző vizsgálatban a sugárzás és 12-LOX-gátló baicalein együttes alkalmazásával LNCaP (a) és PC-3 (b) prosztataráksejteken



(100 cGy felett) volt észlelhető. A PC-3 és LNCaP sejtekkel ellentétben a DU-145 sejtekben a kombinált kezelés csak egyszerű additív hatást eredményezett (1. táblázat). Végeztünk kombinációs kísérleteket a másik 12-LOX-gátlóval, a baicaleinnel is, az eredmények a BMD122-höz hasonlóak voltak. A kombinált kezelés supraadditív volt az LNCaP és a PC-3 sejtek esetében, tehát mind hormonérzékeny, mind hormonrezisztens sejtvonalakon (2. ábra).

A 12-LOX-gátlás nem sugárérzékenyíti az egészséges prosztatahámsejteket és bőrfibroblasztokat

Annak vizsgálatára, hogy a 12-LOX-gátlás a normális sejteket is érzékenyíti-e a besugárzásra, egészséges emberi prosztatahámsejteket és humán bőrfibroblasztsejteket (Clonetics,

San Diego CA) kezeltünk 7,5 μ M baicaleinnel és 800 cGy sugárzással. Sem a 12-LOX-gátlás, sem a sugárkezelés nem fokozta az apoptózist az egészséges sejtekben (az adatokat nem mutatjuk). Az, hogy az egészséges sejtekben a 12-LOX-gátlás nem erősítette a sugárkezelés hatását, annak tulajdonítható, hogy e sejtekben a 12-LOX kevésbé vagy egyáltalán nem expresszálódik (9).

A 12-LOX-gátlás sugárérzékenyítő hatása az enzim egyedüli metabolitján, a 12(S)-HETE molekulán keresztül jön létre

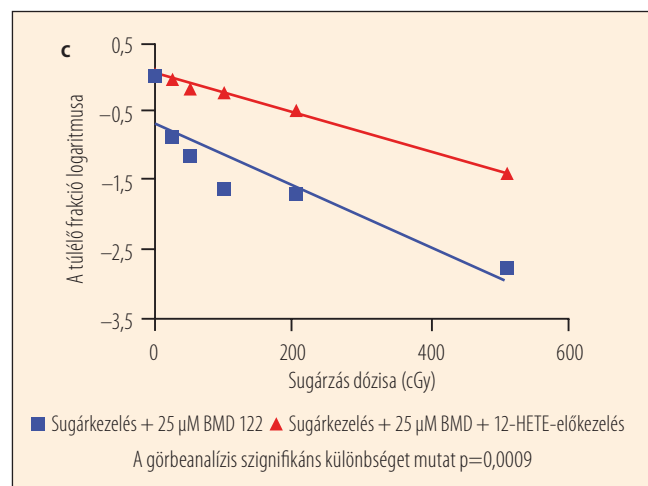
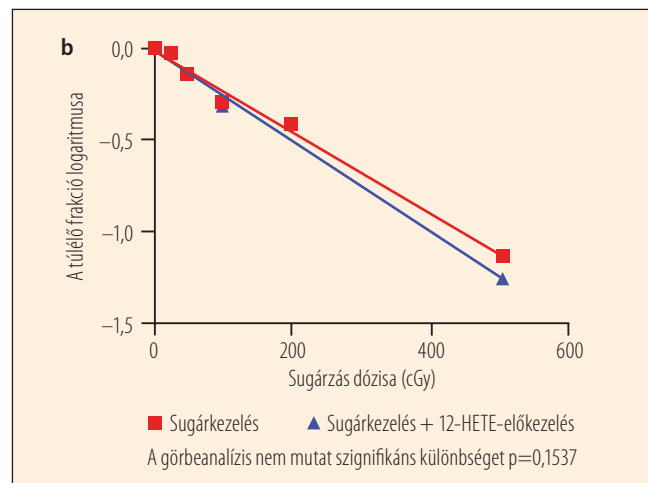
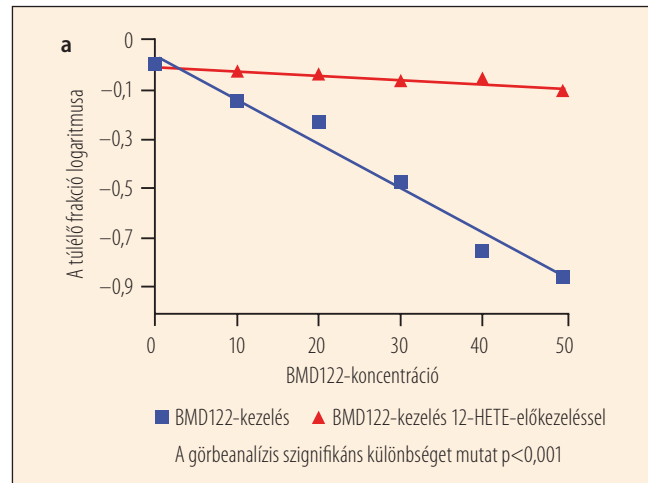
Annak bizonyítására, hogy a sugárérzékenyítő hatást a 12(S)-HETE, a 12-LOX egyetlen arachidonsav-metabolitja hozza létre, PC-3 sejteket a korábbiaknak megfelelő protokoll szerint BMD122 inhibitorral, sugárkezeléssel és ezek kombinációival kezeltük, de a klonogén túlélési kísérleteket úgy is elvégeztük, hogy a sejtekhez 100 ng/ml 12(S)-HETE-t adtunk 1 órával a kezelések előtt. A 12(S)-HETE visszaadása felfüggesztette a BMD122 gátló hatását, de nem volt hatással a sugárkezelésre. Ugyanígy felfüggesztette a BMD122 sugárérzékenyítő hatását is (3. ábra). Annak érdekében, hogy egyértelműen tisztázzuk, hogy ezekért a hatásokért kizárólag a 12-LOX útvonal felelős, a kísérletet elvégeztük egy 5-LOX-gátló szerrel, a Rev-5901-gyel is, és ahogy a 12-LOX esetében, itt is végeztünk méréseket 5-HETE és 15-HETE visszaadásával is. Az 5-LOX-gátló alkalmazása során nem találtunk semmilyen szignifikáns hatást a sejtek túlélésére és az 5-és 15-HETE visszaadásának sem volt hatása (az adatokat nem mutatjuk). Tovább vizsgálandó a 12-LOX szerepét, a 12-LOX-overexpressziót mutató transzfektált PC-3 (nL8) és vektor kontroll (neoS) sejt vonalakat használva is elvégeztük a kísérleteket (17). A 12-LOX-overexpressziót mutató sejtek jelentős rezisztenciát mutattak a vektor kontrollokhoz képest (nem mutatott adatok).

A 12-LOX-gátlók és a sugárkezelés hatása az apoptózisra

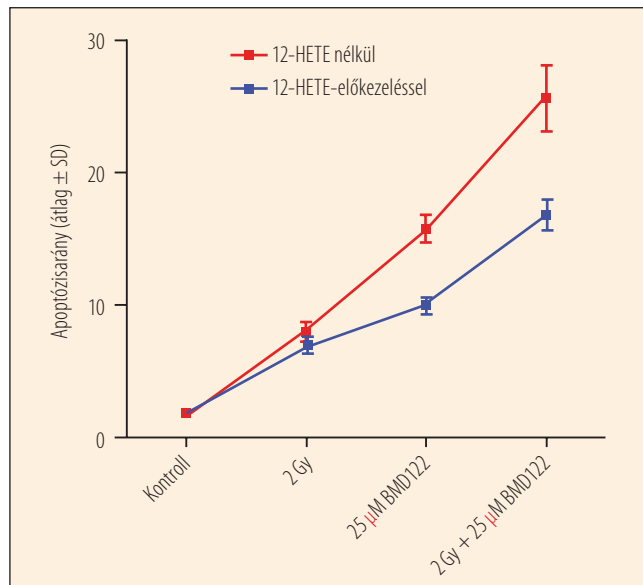
Mivel a 12-LOX szerepet játszik a prosztataráksejtek apoptózisának szabályozásában (6, 18, 19), a 12-LOX-gátlás és sugárkezelés apoptózisindukciós hatását vizsgáltuk PC-3 sejteken, TUNEL-assay és flow-citometria segítségével. Két Gy dózisu sugárkezelés mérsékelt, de szignifikáns apoptózisindukciót okozott (8%), 25 μ M BMD122 ennek mintegy a kétszeresét (15%), míg a két kezelés kombinációja eredményezte a maximális hatást, 25% apoptózisindukciót (4. ábra).

Annak bizonyítására, hogy az apoptózisindukció kizárólag a 12-LOX-gátlásnak köszönhető, a kísérleteket 12-HETE visszaadásával itt is elvégeztük (100 ng/ml 30 perccel a kezelések előtt). A 12-HETE hozzáadása 15-ről 10%-ra csökken-

3. ábra. A 12-LOX-gátlók sugárérzékenyítő hatásának visszafordítása 12(S)-HETE-előkezeléssel. 100 ng/ml 12(S)-HETE-előkezelés hatása a PC-3 sejtek klonogén túlélésére. a) BMD122 kezelés, b) sugárzás, c) kombinációs kezelés



4. ábra. A sugárzás és a 12-LOX-gátlás hatása az apoptózisra PC-3 sejtekben. A sejteket BMD122-vel, sugárzással, illetve a kettő kombinációjával kezeltük. 24 óra elteltével az apoptózist TUNEL-reakcióval mértük (átlag \pm SD, n=5)



tette a BMD122, és 25%-ról 16,5%-ra a kombinált kezelés hatását (4. ábra).

A 12-LOX-gátlás és sugárkezelés összefüggésének további tanulmányozására megvizsgáltuk a kezelések hatását az apoptózisszabályozásban részt vevő fehérjék expressziójára. 12-LOX-gátlás és a kombinált kezelések következtében a Bcl-2 szintje szignifikánsan csökkent, míg az apoptózist elősegítő Bax szintje nem változott lényegesen. E mellett a survivin, egy apoptózisinhibitor fehérje szintje nem változott a sugárkezelés hatására, de szignifikánsan csökkent a BMD122, vagy a kombinált BMD122 és sugárkezelés után (az adatokat nem mutatjuk).

A 12-LOX-gátlás és sugárkezelés hatása *in vivo*

Végül, a 12-LOX-gátlás sugárérzékenyítő hatásának bizonyítására *in vivo* prosztatarák-xenografton végeztünk kísérleteket. PC-3 sejteket (10^6) SCID egerek bőre alá ültettünk be, majd engedünk nőni 100 mm^3 méretig (16 nap). Ezt követően az egereket a 12-LOX-gátló BMD122-vel kezeltük intraperitoneálisan (100 mg/kg) 4 napon keresztül, vagy a 16. napon az egereket besugaraztuk, vagy a két kezelés kombinációját alkalmaztuk. A kísérletet a 28. napon termináltuk. Az adatok azt mutatják, hogy a BMD122-kezelés egyedül nem befolyásolta a szubkután PC-3 tumorok növekedését, míg 5 Gy egyedüli dózis szignifikáns növekedésslassulást okozott a 21. és 25. napok között. A legkifejezettebb hatás a kombinált kezelések eredményeként

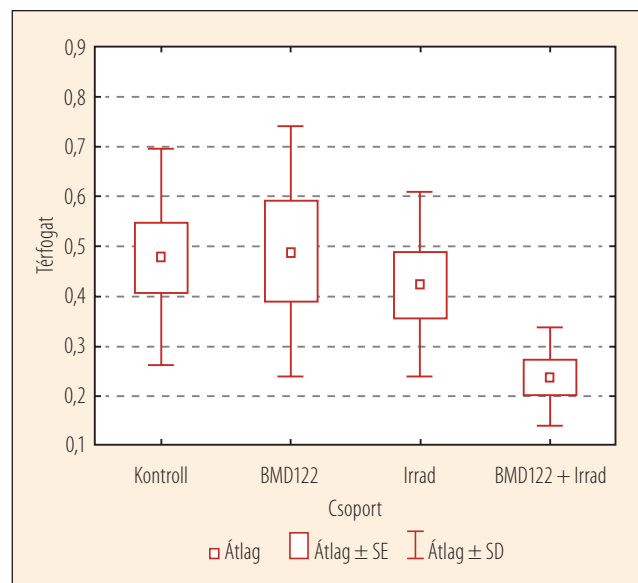
jött létre a 25. napon (5. ábra). Az adatok tehát azt mutatják, hogy a 12-LOX-gátlás *in vivo* is hatékony sugárérzékenyítő hatással bír.

MEGBESZÉLÉS

A prosztatarák a fejlett világban a leggyakrabban előforduló daganat a férfiaknál. Az alapvető kezelése a műtét vagy a sugárkezelés, hormonkezeléssel vagy anélkül. A kuratív sugárkezelés után azonban mintegy 30%-ban helyi kiújulás jelentkezik, ami felveti, hogy a prosztatarák sugárérzékenységét fokozni szükséges (20, 21).

Az eikozanoidok, az arachidonsav metabolitjai, hatékony lipidmediátorokként szerepelnek számos biológiai folyamatban, például a gyulladásban (22) vagy a daganatok kóros folyamataiban (23–25). Több kutatás bizonyította, hogy a 12-LOX és metabolitja, a 12(S)-HETE számos területen részt vesz a biológiai működések szabályozásában, mint pl. sejtek túlélése, mátrixadhézió (26, 27), motilitás (7), vagy az extracelluláris mátrix bontásában részt vevő enzimek elválasztása (24). Ennek megfelelően számos daganatfélésegekben, ahol a 12-LOX aktivitása magas, részt vesz a daganat progressziójában és áttétképzésében (24, 28, 29). Munkacsoportunk és mások is kimutatták, hogy a 12-LOX fontos szerepet

5. ábra. 12-LOX-gátló (BMD122) hatása sugárzás daganattelenes hatására PC-3 prosztatarákra *in vivo* xenograft modellben. 10^6 PC-3 sejtet ültettünk szubkután SCID egerekbe. A daganatokat a 16. napon sugaraztuk be 5 Gy dózissal, vagy az egereket ip. 100 mg/kg dózissal BMD122-vel kezeltük 4 napon át, illetve a két kezelés kombinációját alkalmaztuk. A daganatok átmérőjét a 25. napon mértük. A box plot a tumortérfogat átlagát \pm SD/SE mutatja (n=5)



tölt be a sejtciklus-szabályozásban. Korábbi munkáinkban felderítettük azokat a mechanizmusokat, amelyek segítségével a 12-LOX befolyásolja a sejtciklust. Kimutattuk, hogy a 12-LOX gátlása a G0-G1 fázisban a sejtciklus leállításához vezet, és következményesen Bcl-2- és kaszpázfüggő apoptózist indukál (18). A sejtciklus és az apoptózis nagyon fontos a különböző kezelések, így a sugárterápia hatékonysága szempontjából is (30–34). Mivel a sugárkezelésnek kiemelkedő szerepe van a prosztatatarák terápiájában, különleges jelentőséggel bírhat a prosztatatarák sugárérzékenységeinek növelése. A prosztatatarák sugárérzékenysége a sejtek apoptotikus képességétől és a hypoxiától függ leginkább. Korábban kimutatták, hogy az antiapoptotikus fehérjék (Bcl-2 és Bcl-XL, Bcl-2/BAX arány), a clusterin és a kaszpáz-1 expressziója összefüggést mutat a sugárérzékenységgel (35–37), és a Bcl-2-gátlók sugárérzékenyítő hatással bírnak (38).

A fenti eredményekre építve azt feltételeztük, hogy a 12-LOX gátlásával hatékonyan elő lehet segíteni a sugárzás okozta sejtpusztítást. Ebben a preklinikai tanulmányban kimutattuk, hogy a 12-LOX szelektív gátlása különböző inhibitorok segítségével elősegítette a sugárzás daganatpusztító hatását. Mindhárom prosztatatarák-sejtvonalról korábban kimutatták, hogy különböző mértékben expresszálják a 12-LOX és 15LO1 enzimeket (38), melyek 12-HETE-t hoznak létre (39). Az általunk használt sejtvonalak között különbség mutatkozott: míg a PC-3 és LNCaP sejtvonalakon a 12-LOX gátlása szupraadditív hatást ért el, addig a DU-145 vonalon csupán additív. Érdekes, hogy mind a hormonérzékeny, mind a hormonrezisztens sejtvonalakon sikerült sugárérzékenyítést elérni. A hormonérzékenység komoly jelentőséggel bír a prosztatatarákok kezelésében, a hormonrezisztens daganatoknak rosszabb a prognóza (40). A magas kockázatú lokális prosztatatarákok esetében pedig a kuratív sugárkezelés előtt a jelenlegi kezelési protokollok szerint 3 hónap megelőző hormonkezelést szükséges folytatni, hogy a prosztatataráksejteket érzékenyítsék a sugárzásra (41). A 12(S)-HETE visszaadása felfüggesztette a 12-LOX-gátlás hatását, amikor egyedül vagy sugárkezeléssel együtt alkalmaztuk. Ezzel meggyőzően bizonyítottuk, hogy a sugárérzékenyítő hatás a 12-LOX gátlása útján jön létre. Ezt tovább erősíti, hogy 12-LOX-transzfektált PC-3 sejtvonalat alkalmazva a transzfektált sejtek szignifikánsan ellenállóbbnak bizonyultak a sugárzással szemben. Legvégül, tumorxenograft modellen is sikerült megerősíteni, hogy a 12-LOX gátlása hatékonyan növeli a sugárkezelés által kiváltott választ prosztatatarákban *in vivo*.

Jelen eredményeink klinikai jelentőségét alátámasztják korábbi munkáink, melyek szerint a 12-LOX-expresszió a prosztatatarákok stádiumával és differenciálatlanságával egyenes összefüggést mutat (9, 28, 42). Az általunk vizsgált

beteg 38%-ában találtunk emelkedett 12-LOX-expressziót a normális szöveteikhez képest. Az emelkedett 12-LOX-expresszió kimutatása fontos lehet a prosztatatarákban szenvedő, sugárkezelésben részesülő betegek esetében, főleg, ha a 12-LOX-gátlóval ezt a negatív hatást ki lehet küszöbölni.

Korábban *in vitro* kimutattuk, hogy alacsony dózisú gamma-sugárzás serkenti a 12-LOX aktivitását és a 12(S)-HETE szintézisét (42). B16 melanómasejtekben 0,5 Gy besugárzás már 5 perccel a kezelés után szignifikánsan emelte a 12(S)-HETE szintjét. Az emelkedett 12(S)-HETE a B16 sejtek fokozott adhézióját eredményezte a fibronectinhez és fokozta a sejtek metasztatizáló hajlamát *in vivo* (42). Ezek az adatok azt sugallják, hogy olyan alacsony dózisú sugárkezelés, mely összevethető a külső sugárkezelés során adott egy frakció dóziséval, a 12-LOX aktivitásának gyors növekedéséhez vezethet (43). Ez a számos adat felhívja a figyelmet a 12-LOX metabolikus aktivitásának jelentőségére a sejtek sugárérzékenységeiben.

A 12-LOX sugárérzékenyítő hatását szabályozó mechanizmusok a Bcl-2/Bax apoptotikus útvonalon zajlanak. Egy korábbi közlés szerint a Bcl-2/Bax arány klinikai körülmények között prediktívnek bizonyult a prosztatatarák sugárérzékenysége (35). Ezt mi is így találtuk, továbbá eredményeink a survivin lehetséges szerepére hívják fel a figyelmet.

Adataink alapján a 12-LOX gátlása ígéretes módszernek tűnik a prosztatatarák sugárérzékenyítésében. A továbbiakban fontos lenne klinikai körülmények között is megvizsgálni a szelektív 12-LOX-gátlók sugárérzékenyítő képességét.

IRODALOM

1. Nie D, Che M, Grignon D, et al. Role of eicosanoids in prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 20:195–206, 2001
2. Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274:23679–23682, 1999
3. Funk CD, Furci L, FitzGerald GA. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythrocyte cell 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5638–5642, 1990
4. Yoshimoto T, Suzuki H, Yamamoto S, et al. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2142–2146, 1990
5. Timar J, Tovari J, Raso E, et al. Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology* 69:185–201, 2005
6. Tang DG, Chen YQ, Honn KV. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5241–5246, 1996
7. Timar J, Silletti S, Bazaz R, et al. Regulation of melanoma-cell motility by the lipoxygenase metabolite 12-S-HETE. *Int J Cancer* 55:1003–1010, 1993
8. Nie D, Krishnamoorthy S, Jin R, et al. Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 281:18601–18609, 2006
9. Gao X, Grignon DJ, Chbihi T, et al. Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology* 46:227–237, 1995

10. Nie D, Nemeth J, Qiao Y, et al. Increased metastatic potential in human prostate carcinoma cells by overexpression of arachidonate 12-lipoxygenase. *Clin Exp Metastasis* 20:657–663, 2003
11. Tang DG, Li L, Zhu Z, et al. A novel hydroxamic acid compound demonstrates potent anti-prostate cancer effects in vitro and in vivo by inducing apoptosis: requirements for mitochondria, reactive oxygen species, and proteases. *Pathol Oncol Res* 4:179–190, 1998
12. Klein EA, Kupelian PA. Localized prostate cancer: radiation or surgery? *Urol Clin North Am* 30:315–330, 2003
13. Lee WR, Moughan J, Owen JB, Zelefsky MJ. The 1999 patterns of care study of radiotherapy in localized prostate carcinoma: a comprehensive survey of prostate brachytherapy in the United States. *Cancer* 98:1987–1994, 2003
14. Ellis WJ. Prostate brachytherapy. *Cancer Metastasis Rev* 21:125–129, 2002
15. Sekiya K, Okuda H. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem Biophys Res Commun* 105:1090–1095, 1982
16. Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J Natl Cancer Inst* 86:1517–1524, 1994
17. Nie D, Hillman GG, Geddes T, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 58:4047–4051, 1998
18. Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, Honn KV. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:2721–2727, 2002
19. Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, et al. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 26:503–524, 2007
20. Allen GW, Howard AR, Jarrard DF, Ritter MA. Management of prostate cancer recurrences after radiation therapy-brachytherapy as a salvage option. *Cancer* 110:1405–1416, 2007
21. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Actas Urol Esp* 35:501–514, 2011
22. Haeggstrom JZ, Rinaldo-Matthis A, Wheelock CE, Wetterholm A. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun* 396:135–139, 2010
23. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer* 10:181–193, 2010
24. Honn KV, Tang DG, Gao X, et al. 12-lipoxygenases and 12S-HETE: role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 13:365–396, 1994
25. Nie D. Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers. *Front Biosci* 12:1574–1585, 2007
26. Timar J, Chen YQ, Liu B, et al. The lipoxygenase metabolite 12S-HETE promotes alpha IIb beta 3 integrin-mediated tumor-cell spreading on fibronectin. *Int J Cancer* 52:594–603, 1992
27. Pidgeon GP, Tang K, Cai YL, et al. Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing alpha5beta3 and alpha5beta1 integrin expression. *Cancer Res* 63:4258–4267, 2003
28. Timar J, Raso E, Dome B, et al. Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. *Int J Cancer* 87:37–43, 2000
29. Raso E, Dome B, Somlai B, et al. Molecular identification, localization and function of platelet-type 12-lipoxygenase in human melanoma progression, under experimental and clinical conditions. *Melanoma Res* 14:245–250, 2004
30. Cuddihy AR, Bristow RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer Metastasis Rev* 23:237–257, 2004
31. Shimura T. Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3beta/cyclin D1 overexpression cycle. *J Radiat Res* 52:539–544, 2011
32. Bristow RG, Benchemol S, Hill RP. The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 40:197–223, 1996
33. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* 31:363–372, 2010
34. Fulda S. Inhibitor of apoptosis IAP proteins as therapeutic targets for radiosensitization of human cancers. *Cancer Treat Rev* 38:760–766, 2012
35. Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, et al. Bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology* 52:1085–1090, 1998
36. Zellweger T, Chi K, Miyake H, et al. Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by inhibition of the cell survival protein clusterin. *Clin Cancer Res* 8:3276–3284, 2002
37. Winter RN, Rhee JG, Kyprianou N. Caspase-1 enhances the apoptotic response of prostate cancer cells to ionizing radiation. *Anticancer Res* 24:1377–1386, 2004
38. An J, Chervin AS, Nie A, et al. Overcoming the radioresistance of prostate cancer cells with a novel Bcl-2 inhibitor. *Oncogene* 26:652–661, 2007
39. Chen YQ, Duniec ZM, Liu B, et al. Endogenous 12S-HETE production by tumor cells and its role in metastasis. *Cancer Res* 54:1574–1579, 1994
40. Nabhan C, Parsons B, Touloukian EZ, Stadler WM. Novel approaches and future directions in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 22:1948–1957, 2011
41. Bolla M, Collette L, Blank L, et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer: an EORTC study: a phase III randomised trial. *Lancet* 360:103–106, 2002
42. Lövey J, Nie D, Tóvári J, et al. Radiosensitivity of human prostate cancer cells can be modulated by inhibition of 12-lipoxygenase. *Cancer Lett* 335:495–501, 2013
43. Onoda JM, Kantak SS, Piechocki MP, et al. Inhibition of radiation-enhanced expression of integrin and metastatic potential in B16 melanoma cells by a lipoxygenase inhibitor. *Radiat Res* 140:410–418, 1994