

Állatmodellek szerepe a multidrogrezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésében

Füredi András¹, Tóth Szilárd¹, Hámori Lilla¹, Nagy Veronika¹, Tóvári József², Szakács Gergely¹

¹MTA Lendület Membránfehérje Kutatócsoport, Enzimológiai Intézet, MTA Természettudományi Kutatóközpont,

²Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály, Budapest

A tumorellesztő szerek alapjául szolgáló vegyületeket többnyire in vitro kísérletekben azonosítják. Problémát jelent, hogy a szűrésekhez használt sejtvonalak érzékenysége nem mutat teljes átfedést az állatmodellek eredményeivel, illetve a klinikai tapasztalatokkal: míg a sejtvonalakat és a laboratóriumi egereket hatékonyan „gyógyíthatjuk”, a daganatos megbetegedések eredményes kezelése a terápia során rendszerint kialakuló multidrog-rezisztencia (MDR) miatt a mai napig nem megoldott. Új irányt jelentenek a genetikailag módosított egerekben kialakuló spontán tumor modellek, melyek a kemoterápiás kezelés következtében válnak ellenállóvá. A spontán fejlődő tumorok evolúciójának, szövettanának, terápiára adott válaszána tanulmányozása révén megismerhetővé válnak a klinikailag releváns rezisztenciamechanizmusok, és lehetőség nyílik a multidrogrezisztens tumorokat célzó kemoterápia fejlesztésére. Magyar Onkológia 59:338–345, 2015

Kulcsszavak: multidrog-rezisztencia, állatmodellek, kemoterápia, gyógyszerfejlesztés

Anticancer compounds are typically identified in in vitro screens. Unfortunately, the in vitro drug sensitivity of cell lines does not reflect treatment efficiency in animal models, and neither show acceptable correlation to clinical results. While cell lines and laboratory animals can be readily “cured”, the treatment of malignancies remains hampered by the multidrug resistance (MDR) of tumors. Genetically engineered mouse models (GEMMs) giving rise to spontaneous tumors offer a new possibility to characterize the evolution of drug resistance mechanisms and to target multidrug resistant cancer.

Füredi A, Tóth S, Hámori L, Nagy V, Tóvári J, Szakács G. Relevance of animal models in the development of compounds targeting multidrug resistant cancer. Hungarian Oncology 59:338–345, 2015

Keywords: multidrug resistance, animal models, chemotherapy, drug development

Levelezési cím: Szakács Gergely, MTA TTK Enzimológiai Intézet,
Magyar Tudósok körútja 2., H-1117 Budapest. Tel.: +36 1 3826 715, e-mail: szakacs.gergely@ttk.mta.hu

Közlésre érkezett: 2015. szeptember 21. • Elfogadva: 2015. október 28.

BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések következtében bekövetkező halálozások 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 halálozások száma (1, 2). Annak ellenére, hogy az újabb, célzott rákellenes gyógyszerek jelentősen megnövelik a betegek várható túlélését több tumortípusnál is (3), a klinikai siker gyakran átmenetinek bizonyul a kialakuló rezisztencia miatt. A kezelésnek ellenálló daganatsejtek számos mechanizmussal biztosíthatják túlélésüket: csökkenthetik a gyógyszerek célpontjával szolgáló fehérjék mennyiségét, módosíthatják az apoptotikus útvonalakat, fokozhatják a toxikus vegyületeket lebontó enzimfehérjék számát vagy növelhetik a DNS-hibajavítás mértékét (4). A sejtszintű rezisztenciamechanizmusok egyik leggyakoribb és leghatásosabb formája a toxikus vegyületek sejtől való eltávolítása, mielőtt azok kifejtethetnék intracelluláris hatásukat (5).

A sejtek membránján keresztüli anyagáramlást transzmembrán fehérjék szabályozzák. A daganatos megbetegedések ellen alkalmazott kemoterápiás szerek gyakran azért hatástalanok, mert a tumorsejtekben kifejeződő ATP Binding Cassette (ABC) transzporterek, elsősorban a P-glikoprotein (ABCB1, MDR1, Pgp) az ATP energiáját felhasználva kipumpálják a citosztatikus vegyületeket a sejtekből (6, 7). A P-glikoprotein rendkívül széles szubsztrátspecifitással rendelkezik, és hatékony védelmet nyújt számos antivirális, antibakteriális és tumorelles vegyülettel szemben (8). Egészséges szöveti környezetben a Pgp a farmakológiai barrierekben (például vér-agy gát, vér-here gát) támogatja a szervezet xenobiotikumokkal szembeni védekezését (9), azonban a Pgp-státusz független prognosztikai faktor akut mieloid leukémiában (AML) (10): a Pgp expressziója AML-ben (11) és akut nem-limfoblasztos leukémiában (ANLL) (12) negatív korrelációt mutat a kezelésre adott válasszal (13).

Bár az utóbbi évtizedekben számos próbálkozás történt a Pgp funkciójának gátlására, klinikailag hatásos megoldás még nem született. Az *in vitro* vizsgálatok több olyan vegyületet azonosítottak, melyek hatékonyan gátolják a Pgp transzporter funkcióját, ám ezek a vegyületek rendre elbuktak a klinikai próbákon (14). A kezdeti kudarcot az első generációs gátlók másodlagos farmakológiai hatása, valamint a klinikai kísérletek hibás protokollja magyarázta. Az utóbbi években végzett klinikai próbák bár megfeleltek a szigorú szakmai kritériumoknak, a zosuquidarral vagy placebóval kiegészített kemoterápiás kezelés eredménye (medián túlélés és remissziós arány) között mégsem mutat-

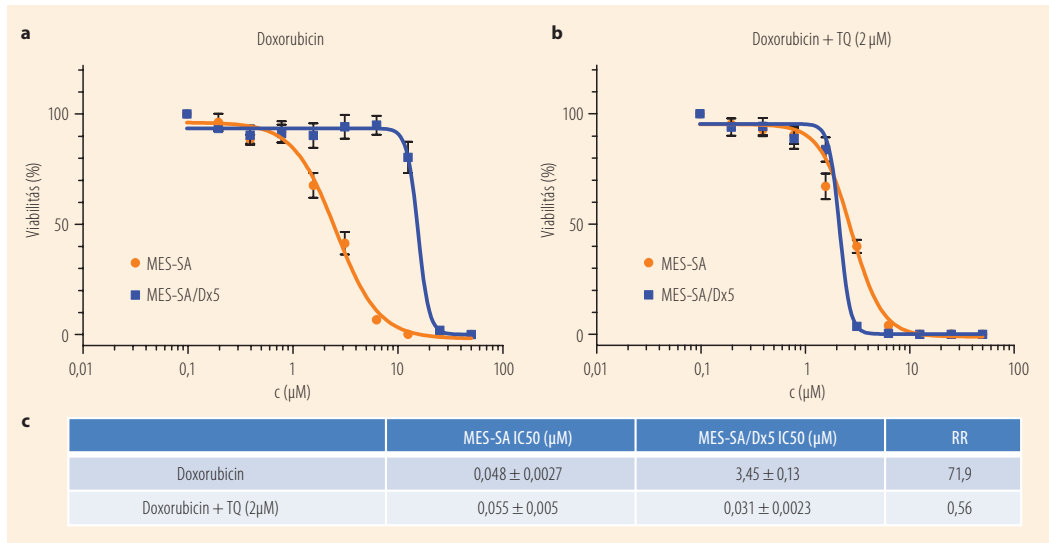
kozott eltérés (15). Összességében kijelenthető, hogy a Pgp célzott gátlásán alapuló terápiás megközelítés nem váltotta be az *in vitro* eredmények által táplált reményt.

A transzporterek gátlásán alapuló terápiás kísérletek kudarca új megközelítéseket hívott életre (14). Laboratóriumunkban olyan vegyületek fejlesztésén dolgozunk, melyek paradox módon éppen a multidrogrezisztens tumorokat célozzák, azaz képesek a Pgp-t kifejező daganatsejtek szelektív elpusztítására. Az ún. MDR-szelektív molekulák alkalmasak lehetnek arra, hogy viaszorítsák a már rezisztenssé vált tumorokat, elpusztítsák a kemoterápia során megjelenő rezisztens sejteket, vagy akár újra érzékenyvé tegyék a daganatokat a konvencionális kemoterápia hatóanyagaival szemben (16). A Pgp-gátlók klinikai kudarca arra figyelmeztet, hogy a multidrog-rezisztencia hatékony leküzdése csak a megfelelő modellek megválasztásával sikerülhet. Jelen tanulmányunkban áttekintést adunk a multidrog-rezisztencia vizsgálatára alkalmazott preklinikai modellekről, és bemutatjuk az MDR-szelektív vegyületek fejlesztésében elért eredményeinket.

A PGP-T KIFEJEZŐ SEJTEK DOXORUBICINREZISZTENCIÁT MUTATNAK, MELY A PGP SPECIFIKUS GÁTLÁSÁVAL FELFÜGGESZTHETŐ

Az új gyógyszerjelölt vegyületek azonosításának egyik első lépése többnyire *in vitro* modelleken történik. Bár a gyógyszer-molekulák szervezetre gyakorolt hatása összetett folyamat eredménye, a sejtvonalakon mért biológiai adatok többnyire jó megközelítést adnak a tesztelt vegyületek hatásosságáról. A Pgp sejtvédő hatása *in vitro* rendszerekben meglepően könnyen reprodukálható és befolyásolható. A MES-SA sejtvonalat 1983-ban alapították egy 56 éves betegből eltávolított szarkómából (17). A drog-naiv MES-SA sejteket több hónapon át tartó doxorubicinszelekciónak kitéve rezisztens sejtek nyerhetők (MES-SA/Dx5). Az *in vitro* citotoxicitási tesztek eredménye szerint a MES-SA/Dx5 sejtek mintegy két nagyságrenddel magasabb doxorubicinkoncentrációt tolerálnak (1.a ábra). A MES-SA/Dx5 sejtek rezisztenciát mutatnak doxorubicinnal és más, szerkezetükben és hatásukban eltérő kemoterápiás szerekkel szemben. A multidrog-rezisztencia fenotípusát a P-glikoprotein emelkedett kifejeződése okozza (18). A magas Pgp-expresszióval járó MDR fenotípus stabil, azaz a MES-SA/Dx5 sejtek doxorubicinrezisztens állapotban tenyésztethetők. A MES-SA/Dx5 sejtek rezisztenciája a Pgp funkcióját gátló tariquidar jelenlétében megszűnik (1.b ábra), igazolva, hogy a transzporter célzott gátlásával az *in vitro* doxorubicinérzékenység helyreállítható.

1. ábra. A P-glikoprotein hatása humán uterin szarkómasejtek *in vitro* doxorubicinérzékenységére. (a) A Pgp-t expresszáló MES-SA/Dx5 sejtvonal (kék vonal) jelentős doxorubicinrezisztenciát mutat a droгнаiv MES-SA sejtekhez képest (narancs vonal). (b) A Pgp specifikus inhibitora (tarquidar TQ, 2 μ M) jelenlétében a MES-SA/Dx5 sejtek érzékennyé válnak. Az ábrán feltüntetjük a citotoxicitási görbékéből számolt IC₅₀ értékeket (a sejtek 50%-át elpusztító doxorubicinkoncentráció), valamint a rezisztens és szenzitív sejteken mért IC₅₀ értékek hányadosát (resistance ratio, RR)



A P388 – P388/ADR EGÉR LIMFOBLASZTOS LEUKÉMIA ALLOGRAFT MODELL

Az állatkísérleteket az Állami Állategészségügyi Intézet engedélyével (engedélyszám: 22.1/2291/3/2010) és az Európai Unió legújabb állatkísérletes direktíváinak betartásával végeztük.

A P388 limfoblasztos leukémia sejtvonalat kémiai indukcióval hozták létre 1955-ben, DBA/2 egerek bőrének 3-metilkolantrénnel történő ecsetelésével (19). Az *in vitro* tenyésztett sejteket kísérleti egerek hasüregébe fecskendezve aszcitesz tumorok nyerhetők, a sejtvonal *in vivo* propagálható és vizsgálható. A sejtek multidrogrezisztens klónjait emelkedő koncentrációjú *in vitro* doxorubicinkezelés során izolálták (P388/ADR) (20). Az *in vitro* sejt kultúrában kapott eredményeknek megfelelően a Pgp kifejeződése jelentősen befolyásolja a P388/ADR sejtek doxorubicinérzékenységét egér aszciteszmodellben is. Intraperitoneális doxorubicinkezelés hatására a P388 sejtekkel beoltott állatok túlélése szignifikánsan megemelkedik, míg a rezisztens tumorú egerek aszcitesz tumorára ugyanez a kezelés nincs jelentős hatással (2. ábra). A hasüregbe oltott, nem szolid tumorok esetében az állatok egészségi állapota könnyen követhető a Test Kondíció Pontozás (Body Condition Scoring, BCS) módszer alkalmazásával, ami segít megválasztani az eutanázia időpontját és elkerülhetővé teszi a tartós fájdalmak okozását az egereknek (21).

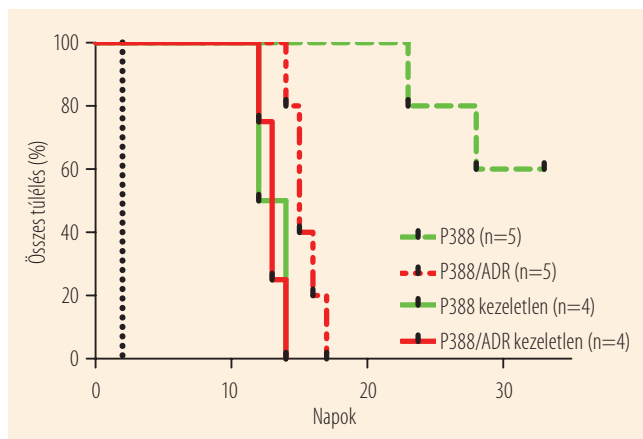
A doxorubicin-kezelés ellenére a Pgp-t expresszáló P388/ADR sejttel beoltott csoport medián túlélése 15 nap volt, míg a transzportert nem expresszáló P388 csoportban a 33 napos megfigyelés alatt mindössze két egeret kellett eutanáziában részesíteni, ami szignifikáns eltérést jelent a két csoport között ($p < 0,01$). A kezeltlen kontrollok mindkét sejtvonal esetében 13 napos medián túlélést mutattak. Az aszciteszmodell eredménye jó egyezést mutat a klinikai tapasztalatokkal, melyek szerint az

AML-blasztsejteken a diagnózis időpontjában mért Pgp-szint korrelál a kemoterápiára adott válasszal. Számos vizsgálat bizonyította, hogy a Pgp-pozitív blasztsejtekkel diagnosztizált betegek rosszabbul reagálnak a kezelésre, és túlélési esélyük is romlik (12). Az aszcitesztumorokat elsősorban a gyorsan osztódó sejtekből álló hematológiai daganatok érzékenységének modellezésére használják (22). A vérképző szervek és a nyirokrendszer rosszindulatú daganatainál fellépő multidrog-rezisztencia vizsgálatára a P388/ADR modell gyors, olcsó és viszonylag nagy áteresztőképességű módszert biztosít, ugyanakkor az aszciteszmodell korlátai miatt a szolid tumorokra vonatkozó klinikai relevanciája megkérdőjelezhető.

MES-SA ÉS MES-SA/DX5 UTERIN SZARKÓMA XENOGRAFT MODELL

Az *in vitro* tesztrendszerben használt humán tumorsejtekből xenograftmodellek alapíthatók. A MES-SA és MES-SA/Dx5 sejtek immunhiányos egerekbe oltva szolid tumorokat képeznek, és lehetőséget adnak a Pgp hatásának egy, a humán patológiát jobban modellező rendszerben történő vizsgálatára. A MES-SA és MES-SA/Dx5 sejtekből létrehozott tumorokat intravénás doxorubicinterápiával próbáltuk meg visszaszorítani. A kezelést a sejtek szubkután inokulációját követő második napon kezdtük (2 mg/kg iv. doxorubicin), melyet megismételtünk a 10., 20., 30. és 40.

2. ábra. A drog-naiv P388 (szaggatott zöld vonal) és a Pgp-expresszáló P388/ADR (szaggatott piros vonal) sejtvonalpárból létrehozott allograft tumorok doxorubicin- (3 mg/kg *ip.*) érzékenysége BDF1 egerekben. A piros és zöld egyenes vonalak a kezeletlen kontrollállatokat, míg a pontozott vonal a kezelés hatását mutatja



napon. A MES-SA sejtekből indított xenograftok reagáltak a kezelésre, a kísérlet időtartama alatt ebben a csoportban nem tapasztaltunk elhullást. A Pgp-pozitív MES-SA/Dx5 xenograftot hordozó állatok ezzel szemben rezisztensnek bizonyultak, a medián túlélés ebben a csoportban 20 nap volt ($p < 0,01$, 3. ábra). A nem kezelt, MES-SA és MES-SA/Dx5 tumorokat hordozó állatok medián túlélése 15,5 nap volt.

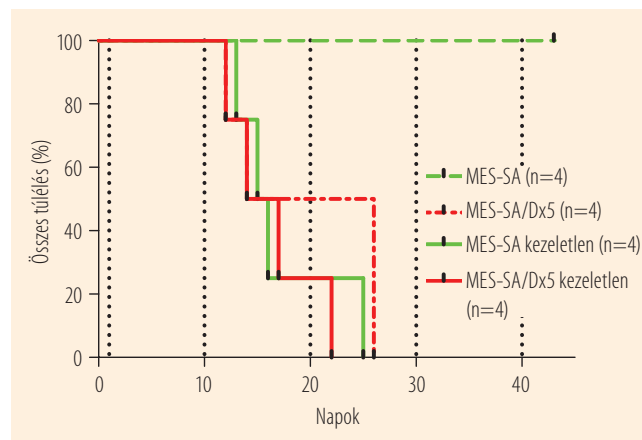
A rezisztens sejtekből alapított xenograftmodellek terápiás érzékenysége javítható a Pgp-inhibitorok egyidejű alkalmazásával (23). A Pgp-gátló vegyületek klinikai kudarca azonban arra figyelmeztet, hogy az állatkísérletek eredményeit fenntartással kell kezelnünk. Figyelemre méltó, hogy az összes preklinikai tesztben sikeresnek ítélt tumorelles vegyület alig 8%-át sikerült hasznosítani a klinikumban (24). Az alacsony határfokot részben az alkalmazott modellek korlátai magyarázzák. A többéves (néha több évtizedes) *in vitro* tenyésztéssel fenntartott sejtvonalak immunhiányos állatokba való beoltásával nyert tumorok valójában nem képesek a klinikai tumorok komplexitásának modellezésére. A sejtkultúra egy *in vitro* szelekciónak tekinthető, melynek eredményeként a gyorsan osztódó sejtklónok túlsúlyba kerülnek, és a sejtvonal elveszti kezdeti heterogenitását. Az *in vitro* tenyésztés alatt a sejtvonalak adaptálódnak a valódi tumorok növekedését szabályozó mikrokörnyezethez (pl. a strómasejtek) hiányához és a laboratóriumi körülményekhez (plasztikaderencia, médium összetevői stb.). A humán sejtvonalak xenograftként sem nyerik vissza kezdeti jellemzőiket. A xenograftok anatómiai jellemzői, a daganatot felépítő struktúrális elemek, az érhalózat, a nem malignus

mikrokörnyezet mind jelentős eltérést mutatnak a valódi daganatok felépítésétől (25). Végül a xenograft rendszerek ellen szól az is, hogy alkalmazásukhoz immunhiányos egerekre van szükség. A drogrezisztencia kutatása szempontjából különösen fontos megjegyezni, hogy a drogszelekcióval előállított rezisztens törzsekre jellemző Pgp-expresszió rendkívül magas értéket mutat a klinikumban megfigyelt szintekhez képest (26). Mint láttuk, a P388 – P388/ADR, vagy a MES-SA – MES-SA/Dx5 tumormodellek alkalmasak a Pgp okozta MDR demonstrálására, de a rezisztencia természetellenes mértéke miatt a gátlószerek kezelésre gyakorolt hatása klinikailag nem tekinthető relevánsnak. A xenograft modelleket alkotó sejtvonalak a beültetés pillanatában már fel vannak vértézve a túlélésüket biztosító rezisztenciamechanizmusokkal. A valódi tumorok rezisztenciája ezzel szemben általában a kezelés hatására alakul ki. A sejtvonalakra jellemző gyors sejtosztódás miatt a xenograftokkal végezhető kísérletek időtartama behatárolt – a valódi tumorok ezzel szemben olykor évekig növekednek, míg képessé válnak a kemoterápia kivédésére. A xenograftmodellek korlátai miatt szükségessé vált egy jobb, a klinikai drogrezisztenciát pontosabban követő modell kialakítása.

A DROGREZISZTENCIA EVOLÚCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA TRANSZGENIKUS BRCA1–/–;P53–/– SPONTÁN KIALAKULÓ EGÉREMLŐTUMOR-MODELLBEN

A klinikai drogrezisztencia kialakulása egy evolúciós folyamatként értelmezhető. A kemoterápia kezdetén a tumor többnyire reagál a kezelésre, később azonban a terápiára adott válasz mértéke csökken, míg végül a kezelés teljesen

3. ábra. MES-SA (zöld) és MES-SA/Dx5 (piros) sejtvonalakból létrehozott xenograft tumorok doxorubicin- (2 mg/kg *iv.*) kezelésre adott válasza. Az egyenes vonalak a kezeletlen kontroll állatokat, míg a pontozott vonalak a kezeléseket mutatják



hatástalanná válik. A daganatok evolúciójának vizsgálatát a genetikailag módosított egérmodellek (Genetically Engineered Mouse Models, GEMM) megjelenése tette lehetővé. Laboratóriumunkban beállítottunk és jellemeztünk egy *Brca1*^{-/-}, *p53*^{-/-} kettős mutáns egerekből származó, szeriális ortotopikus transzplantációval propagálható spontán tumor modellt, melyben a humán tumorok klinikai viselkedéséhez hasonlóan a rezisztencia a kezelés hatására alakul ki (27). A genetikailag módosított egerekben megjelenő emlőtumorsejtek jól reprodukálják a humán megbetegedésekből ismert, invazív duktális karcinómákra jellemző molekuláris, hisztopatológiai és morfológiai tulajdonságokat. A kialakult tumorok vad típusú egerekben is propagálhatók a tumordarabok tejlécbe történő oltásával. A szeriális, ortotopikus transzplantáció előnye, hogy a kísérletek hossza jelentősen rövidíthető, hiszen nem kell megvárni a genetikailag módosított egérben kifejlődő tumor megjelenését (6–8 hónap). A lefagyasztott tumordarabok ortotopikus beültetésével a tumor heterogenitása, evolúciója reprodukálható módon modellezhető (28). Kísérleteinkben a Holland Rákkutató Intézetből származó *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumordarabokat FVB egerek tejlécbe ültettük. Az egereket 200 mm³-es tumortérfogat elérésekor doxorubicinnal kezeltük (maximálisan tolerálható dózis (MTD): 5 mg/kg *iv.*). A doxorubicin hatására a daganatok térfogata jelentősen csökken. A kezelések ismétlésével a daganat növekedése gátolható, a tumorok azonban rendre rezisztenssé válnak, és néhány kezelést követően nem reagálnak az alkalmazott terápiára (4. ábra).

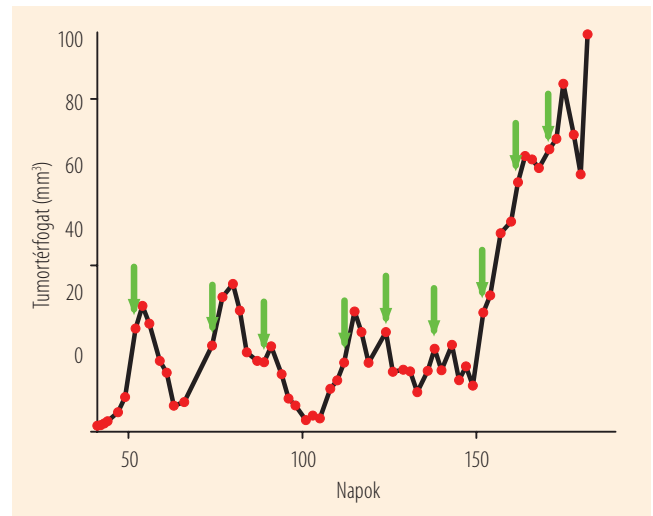
Irodalmi adatok szerint a *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorok doxorubicinrezisztenciája az egér P-glikoprotein fehérjék fokozott kifejeződésével magyarázható (28). Míg a kísérlet kezdetén a tejlécbe oltott tumordarabban Pgp-expresszió nem volt kimutatható, a rezisztenssé vált tumorban az *Abcb1a* és *Abcb1b* (egérben a P-glikoprotein fehérjét két gén kódolja) mRNS expressziója szignifikánsan megemelkedett (5. ábra).

Eredményeink megerősítik, hogy a kezelés hatására kialakuló rezisztencia mögött a Pgp áll. A sejtvonalakon alapuló *in vitro* modellel szemben a spontán tumorokban csekély mértékű, az egészséges szövetekben tapasztalható Pgp-expresszió detektálható. A spontán modellben a Pgp kémiai gátlása a terápia átmeneti sikeréhez vezet, a kísérletek szerint azonban a daganatok később újra rezisztenssé válnak (29).

A PGP-T EXPRESSZÁLÓ MULTIDROGREZISZTENS TUMORSEJTEK CÉLZOTTAN ELPUSZTÍTHATÓAK

Azok a biológiai elváltozások, melyek adott körülmények között biztosítják egy tumorsejt túlélését, egyben képesek lehetnek terápiásan kihasználható „gyengeségeket” létre-

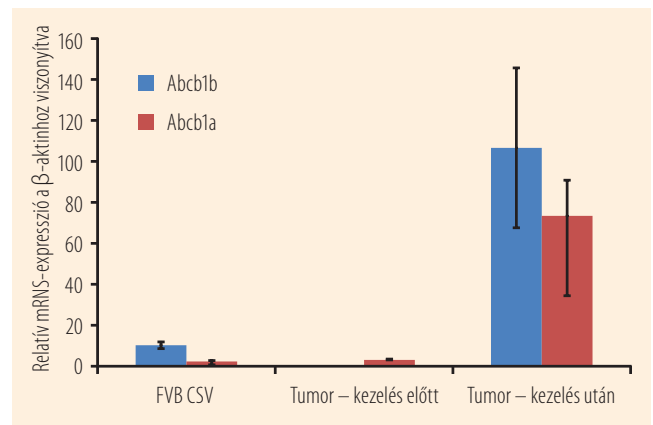
4. ábra. Genetikailag módosított egerekben spontán kialakuló emlődaganatok kezelése doxorubicinnal. A kezelések (5 mg/kg *iv.* doxorubicin) időpontját zöld nyilak jelölik. A reprezentatív görbe a tumortérfogat változását mutatja az idő függvényében



hozni (30). Szybalski és Bryson 1952-ben fogalmazta meg a kollaterális (járulékos) érzékenység fogalmát, melynek során „egy vegyülettel szemben kialakuló rezisztencia egyben nagyobb érzékenységet eredményez egy másik kezeléssel szemben” (31).

Munkacsoportunk korábban olyan vegyületeket azonosított, melyek csak a funkcionális Pgp-vel rendelkező (a hagyományos kemoterápiás szereknek ellenálló) daganatsejteket célozzák. A 6. ábrán egy MDR-szelektív vegyület

5. ábra. Az *Abcb1a* és *Abcb1b* gének mRNS-szintjének változása *Brca1*^{-/-}; *p53*^{-/-} tumorok doxorubicinkezelése előtt és után. Kontrollként feltüntetjük az FVB egerek csontvelőjéből izolált sejtek (FVB CSV) *Abcb1a*-b mRNS-szintjeit is



citotoxicitási vizsgálatát mutatjuk be. A MES-SA/Dx5 sejtek, melyek nagy mennyiségben expresszálják a Pgp-t és 72-szeres rezisztenciát mutatnak a doxorubicinre a MES-SA sejtvonalhoz képest, hiperszenzitívek az MDR-szelektív vegyülettel szemben (6.a ábra). Tariquidar jelenlétében a Dx5 sejtek fokozott érzékenysége elmaradt, ami arra utal, hogy az MDR-szelektív vegyületek paradox toxicitása a P-glikoprotein funkciójának következménye (6.b ábra).

MEGBESZÉLÉS

A daganatos betegek legnagyobb része azért veszti életét, mert a távoli metasztázisok már nem reagálnak a kezdetekben hatékony kemoterápiára. Gyakori megfigyelés, hogy a tumorsejtek már nemcsak a kezdetben alkalmazott kezeléssel szemben mutatnak ellenállást, hanem rezisztenssé válnak több, egymástól strukturálisan és hatásmechanizmusban eltérő vegyülettel szemben is (32). Az újabb és még hatékonyabb terápiás szerek megjelenésével (pl. EGFR-gátlószerek) a betegek túlélése szignifikánsan meghosszabbodott (33), a rezisztencia azonban ezekkel a kemoterápiás szerekkel szemben is rendre kialakul (34, 35). A bemutatott *in vitro* és *in vivo* modellekkel igazolható, hogy doxorubicinre adott terápiás válasz a P-glikoprotein transzporter jelenlété-

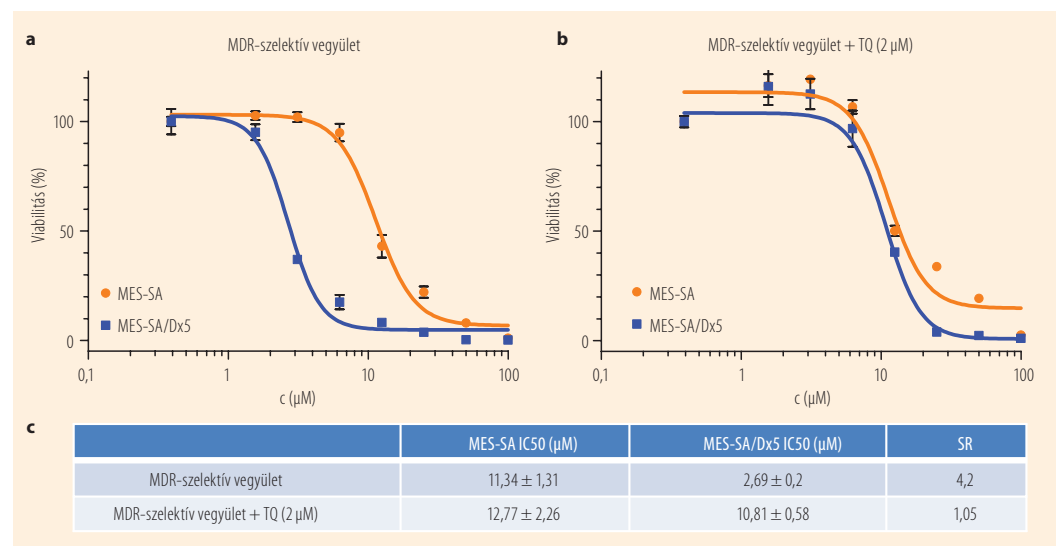
nek függvénye. *In vitro*, a Pgp-t expresszáló MES-SA/Dx5 sejtvonal mintegy 70-szer rezisztensebbnek bizonyult a parentális, Pgp-t nem expresszáló MES-SA sejtvonalpárjánál. Ez a különbség elegendő volt ahhoz, hogy a xenograftmodellekben alkalmazott doxorubicin-kezelés teljesen elveszítse a hatását.

A xenograft-tumormodellek ismert korlátja, hogy a kísérleti vegyületekre erőteljesebb választ adnak, mint a klinikai daganatok (36, 37). A drogrezisztens (transzfektált vagy szelektált) sejtvonalak használatának további hátulütője az extrém magas P-glikoprotein-expresszió és a gyors növekedés. A transzgenikus, spontán kialakuló egértumorsejtek jobb modellt kínálnak a daganatos megbetegedések tanulmányozására (38–42). A Brca1- és p53-hiányos, klinikailag releváns egérmelőkarcinóma-modell nagy hasonlóságot mutat a nők örökletes Brca1-hiányos, tripla-negatív daganataihoz az expresszált markerek, a differenciáltság és a növekedési mintázat tekintetében (27). Amint az a 4. és 5. ábrán mutatott eredményekből kitűnik, a spontán tumorokat doxorubicinnal kezelve a kezdeti sikereket követően rezisztencia lép fel, melyet a P-glikoprotein fokozott expressziója eredményez (28).

Bár a Pgp gátlószerei mind *in vitro*, mind *in vivo* rendszerekben hatásosnak bizonyultak, a klinikai gyakorlatba történő bevezetésük mégis kudarcot vallott. A gátlószerek kudarca elsősorban a Pgp fiziológiai funkciójának

nem kívánt gátlásával magyarázható. A P-glikoprotein életani funkciója, hogy megvédje a fontosabb szerveket a szervezetbe kerülő különböző xenobiotikumoktól. A Pgp expressziója kimutatható több vér-szövet határon (vér-agy vagy vér-he-re gát), illetve méregtelenítő szervekben, így a májban, vesében vagy a bélhám sejteiben. A klinikai próbák során a Pgp gátlószereit kemoterápiás szerekkel együtt adagolták, és ez a kemoterapeutikumok nem várt fel-dúsulásához vezetett több szervben is (43).

6. ábra. Az MDR-szelektív vegyületek célzottan elpusztítják a Pgp-t expresszáló, multidrogrezisztens tumorsejteket. (a) Az MDR-szelektív vegyület szelektíven toxikus a Pgp-t magasan expresszáló MES-SA/Dx5 sejtvonalra (kék vonal) a Pgp-mentes MES-SA (narancs vonal) sejtvonalhoz képest. (b) A transzporter tariquidarral (TQ) történő gátlásával az MDR-szelektív vegyület toxicitása csökken a Pgp-expresszáló MES-SA/Dx5 sejtekre nézve, de változatlan marad a Pgp-t nem expresszáló MES-SA sejtek esetében. (c) A MES-SA és Dx5 sejteken mért IC_{50} értékek. A szelektivitási hányadost (SR) a következő formula alapján számoltuk ki: $IC_{50}Pgp\text{-negatív sejtvonal}/IC_{50}Pgp\text{-pozitív sejtvonal}$

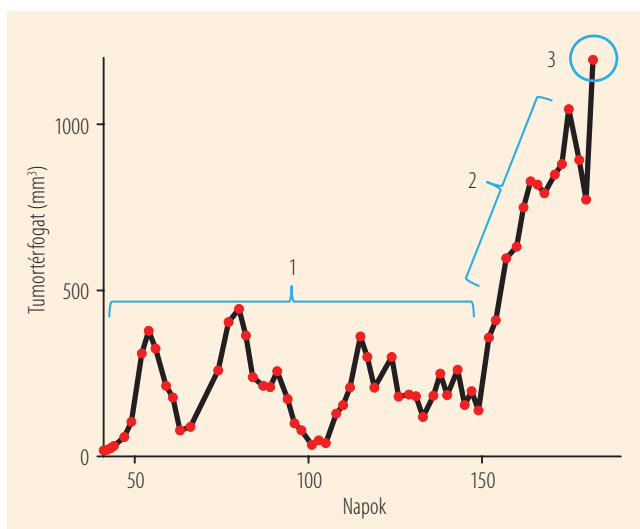


A toxikus mellékhatások miatt az orvosok kényszerűen csökkentették a kemoterápiás kezelés intenzitását, ám ez óhatatlanul a kezelés hatékonyságának a csökkenéséhez vezetett. Bár a gátlószerek nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, a Pgp-expresszió még mindig egyike a legelterjedtebb és legjobban megismert rezisztencia-mechanizmusoknak. A kemoterápia-rezisztens daganatok gyógyításához újfajta stratégiákra van szükség. A Pgp peptidekkel vagy antitestekkel történő gátlása, illetve az MDR1 gén célzott csendesítése ígéretes megoldások lehetnek (14), de gondot okozhat a fiziológiás Pgp működésének gátlása.

A rezisztens fenotípussal társuló kollaterális érzékenység jelentőségét az adhatja, hogy szelektív támadási lehetőséget kínál a rezisztens sejtek elpusztítására. Az MDR-szelektív vegyületek célzottan elpusztítják a rezisztens sejteket. Hosszú távú kezelés során eltűnik a Pgp-expresszió, és a sejtek újra érzékennyé válnak a klasszikus kemoterápiás szerekkel szemben (44).

Egyes leukémiákban, ill. szolid tumorokban a tumorsejtek egy meghatározott, önmegújulásra és differenciálódásra egyaránt képes csoportja felelős a tumorszövet utánpótlásáért. Ezeket a sejteket, melyek alig egy százalékat adják a tumort felépítő sejteknek, tumorössejteknek

7. ábra. Terápiás modalitások. Bár a konvencionális kemoterápiás szerek képesek a tumorszövet jelentős hányadának elpusztítására, az MDR-transzportereket kifejező tumorössejtek és a relapszusban felszaporodó sejtklónok túlélnek a kezelést. A multidrogrezisztens sejtek szelektív elpusztítása jelentősen csökkenthetné a tumorsejtek számát, és a tumorössejtek eliminációja révén megakadályozná újraképződésüket is. Az MDR-szelektív vegyületek gátolják a rezisztens tumorsejtek megjelenését (1), képesek lehetnek az MDR fenotípus revertálására (2), illetve az MDR sejtek célzott eliminációjára (3)



nevezték el, mivel számos tulajdonságukban emlékeztetnek a szöveti őssejtekre. A konvencionális kemoterápiás szerek hatékonyan elpusztítják a gyorsan osztódó, differenciálódó vagy már differenciált sejteket, és így jelentősen csökkenthetik a tumorsejtek számát. A kezelésnek ellenálló tumorössejtek azonban újratermelik a malignus sejteket, relapszust idézve elő. Napjaink egyik kiemelt kutatási célja olyan célzott (targeted) vegyületek fejlesztése, melyek képesek a tumorössejtek hatékony elpusztítására. A szöveti őssejtekhez hasonlóan azonban a tumorössejtek magas szinten expresszálnak ABC-transzportereket, melyek hatékony védelmet nyújtanak a legtöbb kemoterápiás szerrel szemben (45). A klinikai drogrezisztencia univerzális markere, a P-glikoprotein a multidrogrezisztens tumorössejtek molekuláris targetje lehet. A multidrogrezisztens tumorsejtek hatékony elpusztítása jelentősen csökkenthetné a tumorsejtek számát, és az őssejtek eliminációja révén megakadályozná újraképződésüket is.

A fentiek szerint az MDR-szelektív terápia három támadásponttal rendelkezik (7. ábra). Amennyiben ezeket a molekulákat a hagyományos kemoterápiás szerekkel együtt alkalmazzuk, úgy lehetséges volna a megjelenő Pgp-expresszálo sejtek azonnali eliminálása, amivel a rezisztencia kialakulása megelőzhető vagy időben kitolható lenne (megelőzés). A rezisztencia megjelenését követően a tumor Pgp-expressziója csökkenthető (visszafordítás). Ezzel a módszerrel a rezisztens tumor újra kezelhetővé válna a konvencionális kemoterápiával. Az olyan tumorokban, melyekben már kialakult a rezisztencia vagy a kezelés elején is rezisztensek voltak (intrinszik rezisztencia) és nagyszámú Pgp-pozitív sejtet tartalmaznak, az MDR-szelektív vegyületek hatékonyan elpusztíthatják a Pgp-t expresszálo tumorsejteket (elpusztítás). A konvencionális és MDR-szelektív kezelések ciklikus alkalmazásával a rezisztenciával párhuzamosan kialakuló kollaterális érzékenység folyamatosan kiaknázható.

Összességében elmondható, hogy P-glikoprotein fokozott expressziójával járó multidrog-rezisztencia hagyományos állatkísérletes modelljei jól használhatóak gyógyszerfejlesztés és -tesztelés céljára, de a rezisztencia evolúciójának vizsgálatára nem alkalmasak. Az MDR jelensége és az MDR-t leküzdő terápiás megközelítések kutatására a transzgenikus egérmodellek egyre bővülő skálája ad lehetőséget, melyek esetén az emberi daganatokkal mutatott nyilvánvaló hasonlóságok mellett mód van a terápiára adott válaszok összehasonlítására is. Az MDR transzgenikus állatmodelljei megnyitják az utat a daganatellenes szerek új generációjának, egyben a személyre szabott gyógyszerelést szolgáló új eljárás fejlesztéséhez.

IRODALOM

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69–90, 2011
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108, 2015
3. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62:220–241, 2012
4. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53:615–627, 2002
5. Filipits M. Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 1:229–234, 2004
6. Amiri-Kordestani L, Basseville A, Kurdziel K, et al. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resist Updat* 15:50–61, 2012
7. Shaffer BC, Gillet JP, Patel C, et al. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat* 15:62–69, 2012
8. Aller SG, Yu J, Ward A, et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323:1718–1722, 2009
9. Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 42:59–98, 2003
10. Pirker R, Wallner J, Gotzl M, et al. MDR1 RNA expression is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Blood* 80:557–559, 1992
11. Doxani C, Voulgarelis M, Zintzaras E. MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis. *Biomarkers* 18:425–435, 2013
12. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, et al. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemic cells at diagnosis. *Blood* 79:473–476, 1992
13. Karasz E, Jakab K, Homolya L, et al. Calcein assay for multidrug resistance reliably predicts therapy response and survival rate in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 112:308–314, 2001
14. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:219–234, 2006
15. Cripe LD, Uno H, Paietta EM, et al. Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood* 116:4077–4085, 2010
16. Szakacs G, Hall MD, Gottesman MM, et al. Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem Rev* 114:5753–5774, 2014
17. Harker WG, MacKintosh FR, Sikic BI. Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs. *Cancer Res* 43:4943–4950, 1983
18. Harker WG, Sikic BI. Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA. *Cancer Res* 45:4091–4096, 1985
19. Dawe CJ, Potter M. Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 33:603, 1957
20. Schabel FM, Jr., Skipper HE, Trader MW, et al. Establishment of cross-resistance profiles for new agents. *Cancer Treat Rep* 67:905–922, 1983
21. Ullman-Cullere MH, Foltz CJ. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci* 49:319–323, 1999
22. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* 170:793–804, 2007
23. Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, et al. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res* 61:749–758, 2001
24. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6:114–118, 2014
25. Szakacs G, Gottesman MM. Comparing solid tumors with cell lines: implications for identifying drug resistance genes in cancer. *Mol Interv* 4:323–325, 2004
26. Rottenberg S, Borst P. Drug resistance in the mouse cancer clinic. *Drug Resist Updat* 15:81–89, 2012
27. Liu X, Holstege H, van der Gulden H, et al. Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12111–12116, 2007
28. Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12117–12122, 2007
29. Pajic M, Iyer JK, Kersbergen A, et al. Moderate increase in Mdr1a/1b expression causes in vivo resistance to doxorubicin in a mouse model for hereditary breast cancer. *Cancer Res* 69:6396–6404, 2009
30. Willingham AT, Deveraux QL, Hampton GM, et al. RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene* 23:8392–8400, 2004
31. Szybalski W, Bryson V. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J Bacteriol* 64:489–499, 1952
32. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11:1156–1166, 2001
33. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 290:2149–2158, 2003
34. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361:947–957, 2009
35. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 361:958–967, 2009
36. Kelland LR. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40:827–836, 2004
37. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived—but they can be improved. *Cancer Biol Ther* 2:S134–139, 2003
38. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324:1457–1461, 2009
39. Singh M, Lima A, Molina R, et al. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nat Biotechnol* 28:585–593, 2010
40. Watters JW, Cheng C, Majumder PK, et al. De novo discovery of a gamma-secretase inhibitor response signature using a novel in vivo breast tumor model. *Cancer Res* 69:8949–8957, 2009
41. Zhou Y, Rideout WM, 3rd, Zi T, et al. Chimeric mouse tumor models reveal differences in pathway activation between ERBB family- and KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Nat Biotechnol* 28:71–78, 2010
42. Zuber J, Radtke I, Pardee TS, et al. Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev* 23:877–889, 2009
43. Tamaki A, Ierano C, Szakacs G, et al. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem* 50:209–232, 2011
44. Ludwig JA, Szakacs G, Martin SE, et al. Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res* 66:4808–4815, 2006
45. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5:275–284, 2005