

Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy az anaerob fermentáció során a szervezetben keletkező rövid szénláncú zsírsavaknak (különösen a butirátnak) és az arachidonsav metabolitoknak milyen szerepük van a gastrointestinalis sejtek osztódásában és a sejtek apoptózisának kiváltásában. Régóta ismert, hogy a millimoláris koncentrációban a vastagbélben jelenlévő butirát gátolja az eukarióta sejtek hiszton deacetiláz aktivitását, ezáltal a hisztonfehérjék hiperacetilálttá válnak és a sejtek osztódása G1/S fázisban leáll. Arra is számos példát találunk, hogy a hiszton deacetiláz gátlók fokozzák a sejtek apoptózisát, ezért a tumor ellenes terápiában egyre specifikusabb hiszton deacetiláz inhibitorokat fejlesztenek ki. A sejtek túlélési mechanizmusában az arachidonsav metabolitok (elsősorban a prosztaglandinok) szerepe is közismert. Az arachidonsav metabolizmusában a ciklooxygenáz (COX) és lipoxigenáz (LOX) enzimek játszanak szerepet. Ezek aktivitását nem szteroid gyulladáscsökkentőkkel (NSAIDs) gátolva a sejtek osztódása zavart szenved, és nő az apoptózis kialakulásának mértéke. Számos felmérés utal arra, hogy az acetilszalicilsav rendszeres alkalmazása esetén csökkenhet bizonyos tumoros megbetegedések előfordulása, azonban bizonyított az is, hogy a prosztaglandin szintézis gátlása a sejtek elhalását okozva gyomorfekély, nyombélfekély kialakulását idézheti elő. Ennek fő oka az, hogy a folyamatosan működő COX-1 által termelt prosztaglandinokra az említett sejteknek kizárólagos szükségük van, továbbá az, hogy az először alkalmazott NSAIDs elsősorban COX-1 gátlók voltak. Felismerték azt is, hogy a folyamatosan működő COX-1 mellett egy indukálható COX-2 is előfordul, amely a gyulladásos folyamatok kialakulásában játszik szerepet, továbbá a tumor sejtekben a COX-2 folyamatosan is expresszálódhat. Ezért a továbbiakban COX-2 specifikus inhibitorok kifejlesztésére törekedtek. Mivel az NSAIDs alkalmazása túlnyomó többségben szájon át történik, a gastroenteralis traktusban keletkező butirát és az NSAIDs hatása együttesen is jelentkezhet. A kutatási eredmények szerint mind a butirát, mind az NSAIDs gátolják a tumor sejtek életképességét, és együttes alkalmazásuk esetén hatásuk fokozódik. Ennek ellenére metotrexát (dihidrofólsav reduktáz gátló) rezisztens colorectalis adenocarcinoma sejteknél (HT29-12, HT29-21) - évekkorábban végzett vizsgálataink során - azt találtuk, hogy bár a butirát és a nem specifikus COX-1 gátló, az indometacin külön-külön alkalmazva csökkenti a sejtosztódást (butirát IC₅₀ 4-5 mmol/l, indometacin IC₅₀ 0,3-0,5 mmol/l), viszont együttes alkalmazásuk során az indometacin paradox módon felfüggeszti a butirát sejtosztódást gátló hatását és butirát rezisztencia alakul ki (a sejtosztódás 50%-os gátolhatósága >15 mmol/l butirát). Ez azt jelenti, hogy a vastagbélben, ahol a butirát mindig jelen van (≈10 mmol/l), egyes tumor sejtek osztódási előnyre tehetnek szert indometacin jelenlétében. Mivel ezt a jelenséget fontosnak ítéltük,

továbbá nem volt ismert az irodalomban, pályázatot adtunk be, hogy a paradoxon hátterét feltárjuk, és ezáltal megoldást találjunk a butirát rezisztencia megszüntetésére. Ezek alapján a következő vizsgálatok elvégzését terveztük:

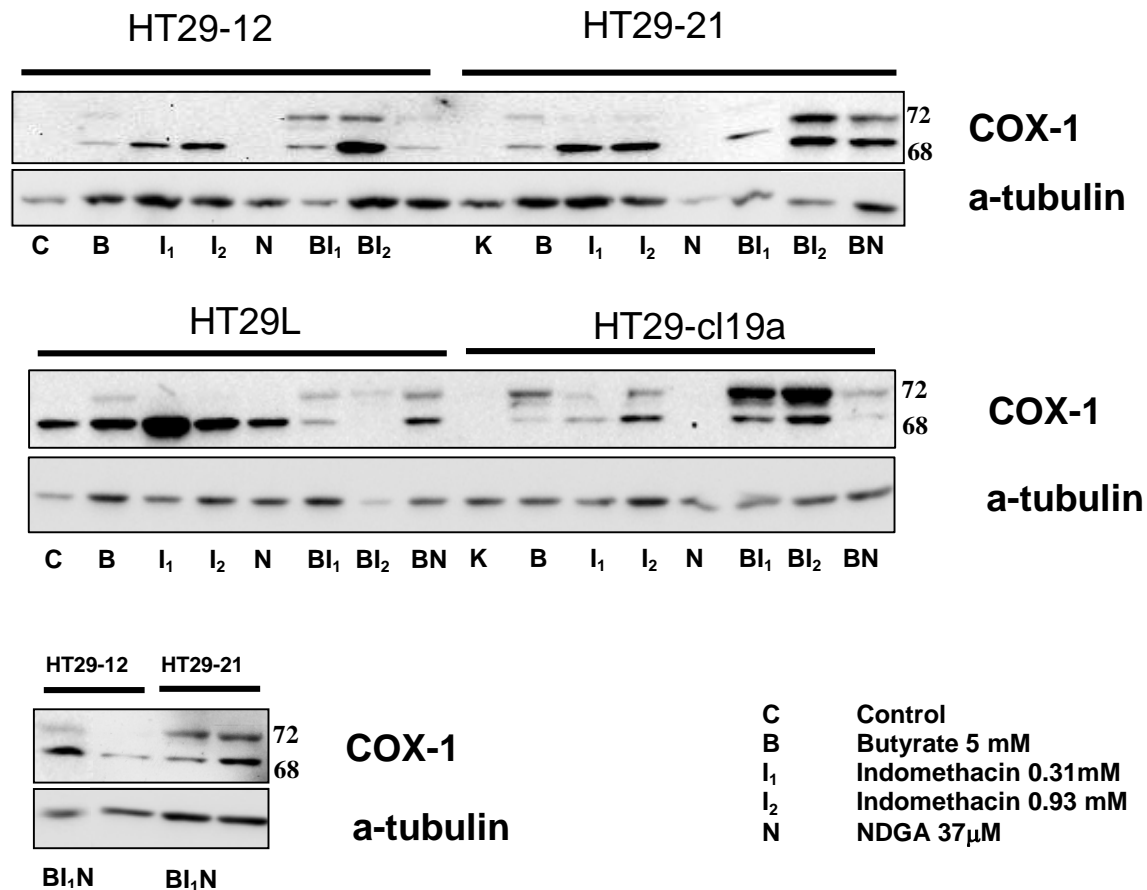
- (1) A butirát sejtosztódást gátló hatásának kimutatása és összehasonlítása nem tumoros gastrointestinalis /IEC-18=rat small intestine, REC=ruminal epithelial cells, RCTC=ruminal connective tissue cells/ tumoros gastrointestinalis (metotrexát szenzitív /HT29L, HT29R, HT29cl.19a, Caco-2H, Caco-2P=colorectalis carcinoma sejtek/ és rezisztens /HT29-12, HT29-21=colorectalis carcinoma sejtek/) és tumoros vagy nem tumoros nem gastrointestinalis sejteken /MG-63=osteosarcoma, MMT=mouse mammary tumour, A-549=lung carcinoma, J-111=monocytic leukemia, Cl=Chang liver/. A kísérletekhez butirátot - és mivel egyes sejtekben a butirát metabolizálódik - egy butirát analógot, amely nem metabolizálódó hiszton deacetyláz inhibitor, a trichostatin-A-t használtunk. A vizsgálatok során rezisztens sejteket kerestünk, mivel feltételeztük, ha a rezisztencia okát megismerjük, annak leküzdése is lehetővé válik. 2002. év
- (2) Mivel a hiszton deacetyláz inhibitorok, a butirát és a trichostatin-A a sejtek halálát (apoptosis, necrosis) is okozhatják, vizsgáltuk az apoptosis és a necrosis kialakulását, választ keresve arra, hogy a sejtosztódás gátlás mértéke és a sejthalál kialakulása között van-e összefüggés. Arra gondoltunk, ha a sejtosztódás gátolhatóságának mértéke összefügg az apoptosis vagy a necrosis kialakulásával, akkor a sejtosztódás gátolhatóságának befolyásolásán keresztül a sejthalál mértékét is irányítani tudjuk. 2003. év
- (3) Az arachidonsav metabolitok szerepét azok szintézisének gátlásán keresztül vizsgáltuk. Ehhez COX-1 specifikus gátló acetilszalicilsavat, COX-1 nem specifikus gátló indometacint, COX-2 specifikus gátló NS-398-at és általános LOX gátló nordihidrogvajarsavat használtunk. A kísérletek során arra kerestünk választ, hogy a butirát sejtosztódást gátló hatását (és az apoptosis/necrosis kialakulását) az említett vegyületek hogyan befolyásolják. 2004. év
- (4) Végül a kapott kísérleti eredményekből tisztázni kívántuk a NSAIDs szerepét a butirát rezisztencia kialakulásával kapcsolatban. Az ehhez szükséges további munkát csak az előző kísérletek eredményei alapján lehetett megtervezni. 2005. év

Eredmények és következtetések: A vizsgálatok megkezdése előtt a sejtvonalak eredetét STR (short tandem repeat) analízissel kontrolláltuk, továbbá mikoplazma mentességüket is ellenőriztük. A sejtvonalak osztódása, gátolható volt butiráttal és butirát analóg trichostatin-A-val, függetlenül attól, hogy gastrointestinalis eredetűek voltak vagy nem, tumorból származtak vagy nem, továbbá rezisztensek voltak metotrexáttal szemben vagy nem. Kimutattuk azt is, hogy a vizsgált gastrointestinalis nem tumor sejtek osztódása már 1-2 mmol/l butiráttal 50 %-ban mérsékelhető volt, a tumor eredetű gastrointestinalis sejtek esetében viszont csak 4-6 mmol/l butirát okozott 50 %-os gátló hatást, függetlenül a metotrexát rezisztenciától. Ugyanakkor a nem gastrointestinalis sejtek esetén függetlenül attól, hogy tumor vagy nem tumor szövetből származtak, több mint 10 mmol/l butirát kellett a sejtosztódás 50%-os gátlásához. A trichostatin-A-val végzett vizsgálatok hasonló tendenciát mutattak, tehát a butirát metabolizmusa nem befolyásolhatta a kapott eredményeket. Beláttuk, hogy ezek a kísérletek nem vezettek el a közvetlen megoldáshoz, sőt azt mutatták, hogy a gastrointestinalis sejtek esetében – osztódásuk gátolhatóságában - nem alakul ki butirát rezisztencia, annak ellenére sem, hogy az említett sejtek nap mint nap butirát hatásának vannak kitéve.

A további kutatások szerint, a sejtek halála, az apoptózis és a necrosis kialakulása butirát jelenlétében jelentős különbségeket mutatott az egyes sejtvonalaknál. Az apoptózis számos típusának kialakulását megfigyelhettük, így a receptorialis apoptózis jelentkezését /A-549/, a mitokondriális úton létrejövő apoptózist /HT29R/, vagy a sejtmagfragmentáció nélküli formát /MMT/ is. Más esetekben ugyanannál a sejtvonalnál több apoptózis típus egyidőben is jelentkezett, sőt megfigyeltünk olyan esetet is /REC/, amikor a butirát még magas koncentrációban sem váltott ki apoptózist. A vizsgálatokat összegezve megállapíthattuk, hogy a butirát (és a trichostatin-A) apoptózist (necrosist) kiváltó hatása és a sejtosztódás gátolhatósága között nincs összefüggés. (Gálfi, P., Neogrády, S., Csordás, A. /2002/ Apoptosis sensitivity is not correlated with sensitivity to proliferation inhibition by the histone deacetylase inhibitors butyrate and TSA. *Cancer Letters* **188**, 142-152.).

A COX, LOX gátló NSAIDs szerepét is tanulmányoztuk a sejtek osztódására. Az acetilszalicilsav, az indometacin, az NS-398 és a nordihidrogvajaretsav egyaránt gátolta a sejtosztódást, bár más - más koncentrációban. Butirát jelenlétében viszont az indometacin (és kisebb mértékben az NS-398) csak a metotrexát rezisztens gastrointestinalis eredetű tumor sejtvonalak esetében okozott butirát rezisztenciát. Megállapítottuk azt is, hogy az így kialakult

rezisztencia LOX inhibitorral, nordihydrogvajaretsavval felfüggeszthető. (Galfi, P., Zs. Neogrady, A. Amberger, R. Margreiter, A. Csordas (2005) Sensitisation of colon cancer cell lines to butyrate-mediated proliferation inhibition by combined application of indomethacin and NDGA, *Cancer Detection and Prevention* **29**, 276-285.)



Mivel a LOX gátló nordihydrogvajaretsav gátolta az indometacin jelenlétében kialakuló butirát rezisztenciát, ezért vizsgáltuk a sejtek COX, LOX expresszióját is, valamint prosztoglandin termelésüket. Ennek során arra az eredményre jutottunk, hogy a metotrexát rezisztens colorectalis adenocarcinoma sejtek nem expresszálnak COX-1 és COX-2 enzimeket (ezeknél a sejteknél egyik sem konstitutív, a COX-1 kimutatása látható a mellékelt ábrán), és ezzel összhangban nem termelnek se PGE₂-t, se PGF_{2α}-át (M. Heitz, P. Galfi, A. Amberger, S. Neogrady, R. Margreiter, A. Csordas, COX-1 expression levels in colon cancer cell lines are altered in the presence of butyrate or indomethacin, EACR18, 18th Meeting of the EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, Innsbruck, Austria, 3-6 July, 2004). Ezek szerint az indometacin butirát jelenlétében nem a COX gátlásán keresztül okozza a butirát rezisztencia kialakulását. Ezzel szemben a COX-1 expresszáló és prosztoglandint termelő sejteknél (HT29L) a butirát és az

indometacin együttesen nagymértékben fokozza az apoptosist és a necrosist, feltehetően a prosztaglandin szintézis gátlásán keresztül. Felmerült a kérdés, hogy a LOX enzimek megnövekedett expressziója és aktivitása során keletkező arachidonsav metabolitok felelősek-e a butirát rezisztencia kialakításáért. Azonban sem a LOX-5, sem a LOX-12, sem pedig a LOX-15 nem mutatott fokozott expressziót. Ugyanakkor megfigyelhettük azt is, hogy a metotrexát rezisztens (és indometacin jelenlétében butirát rezisztenssé váló) sejtvonalaknál butirát+indometacin jelenlétében fokozódik a COX-1 és a COX-2 expresszió, bár prosztaglandinok nem szintetizálódtak. Ennek szerepét a COX peroxidáz aktivitásának kialakulásában láttuk. Kimutattuk, hogy indometacin és butirát jelenlétében nő a butirát rezisztenssé váló sejtvonalak H_2O_2 termelése. Az indometacin nem gátolja - az irodalmi utalások szerint - a COX peroxidáz aktivitását (ami a COX glikolizációja során alakul ki, ezt kimutattuk). Így többek között a COX is szabályozhatja a sejtek H_2O_2 szintjét. A H_2O_2 (és a reaktív intermedierek) jelenléte a butiráttal szemben rezisztenssé váló sejtek számára nélkülözhetetlen (Csordas, A., J. Jakus, T. Molnar, Zs. Neogrady, P. Galfi, NADPH oxidase-derived free radicals protect colon cancer cells from butyrate-induced cell death, P-48, Joint Annual Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, ÖGBT and ANGT, September 16th – 18th, 2005, Vienna, Austria). Leírták, hogy a H_2O_2 (és más reaktív intermedierek) szerepet játszanak az NF κ B aktiválásában (ezt butirát és indometacin jelenlétében a metotrexát és a butirát rezisztens sejteknél mi is kimutattuk). Az NF κ B aktiválódása során, mint ahogy ismert számos közleményből, a sejtek túlélési mechanizmusai is aktiválódnak és így válhatnak rezisztenssé a butiráttal szemben. A teljes mechanizmus véleményünk szerint a következő: Az indometacin a vizsgálati körülmények között prooxidánsná válik, (ezt elektron spin rezonancia spektroszkópiával, gyökcsapdázással mutattuk ki: Csordas, A., J., Jakus, V. Jenei, T. Molnar, Zs. Neogrady, P. Gálfi, Indomethacin attenuates sensitivity to butyrate and alters H_2O_2 and free radical levels in colon cancer cells, P-48, Joint Annual Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, ÖGBT and ANGT, September 16th – 18th, 2005, Vienna, Austria) és fokozza a H_2O_2 keletkezését. Ezt követően, az NF κ B aktiválódása során számos ahhoz kapcsolt vagy ahhoz nem kapcsolt folyamat is aktiválódik. Úgymint: COX-1 expresszió (nem kapcsolt NF κ B-hez), COX-2 expresszió (NF κ B aktivált), dedifferentáció, Ki67 pozitivitás (ami a fokozódott proliferációt mutatja). A folyamat mivel H_2O_2 függő, az antioxidáns nordihidrogvajarsavval és más antiooxidánsokkal is, melyek az adott körülmények között nem viselkednek prooxidánsként, gátolható (Galfi, P., J. Jakus, T. Molnar, Zs. Neogrady, A. Csordas (2005) Divergent effects of resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen, on free radical levels any type of cell death induced by histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin-

A, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **94**, 39-47.). Ezeket a megfigyeléseket támasztja alá az, hogy az indometacin jelenlétében kialakuló butirát rezisztencia megjelenik indometacin jelenléte nélkül is az összefüggő, nem osztódó sejttényészetekben, ahol a sejtek az apoptózis kialakulásával szemben válnak butirát rezisztenssé (össze nem függő sejttényészeteknél az apoptózis rezisztencia nem alakul ki, korábbi /2003. év/ vizsgálatainknál, ahol fiatal, még osztódó sejttényészeteket használtunk, ezért nem is tudtuk kimutatni). A jelenség oka szintén a megemelkedett H₂O₂ koncentrációra vezethető vissza, amely a sejtosztódás leállítását követő differenciálódással hozható összefüggésbe (Csordas, A., J. Judit, T. Molnar, Zs. Neogrady, P. Galfi, NADPH oxidase-derived free radicals protect colon cancer cells from butyrate-induced cell death, P-48, Joint Annual Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, ÖGBT and ANGT, September 16th – 18th, 2005, Vienna, Austria). Ezzel ellentétben az indometacin jelenlétében fellépő butirát rezisztencia, amely a sejtosztódásra vonatkozik, csak alacsony sejtszám esetén, még osztódó, össze nem függő sejttényészetekben jelentkezik. (Galfi, P., J., Jakus, T., Molnar, S., Neogrady, M., Heitz, A. Amberger, R. Margreiter, A. Csordas /2006/ Indomethacin-induced proliferation stimulation is accompanied by enhanced H₂O₂ production, activation of NFκB, and upregulation of cyclooxygenase-1 and 2 in butyrate-treated HT29-derived colon cancer cells, *Biochemical Journal*, elküldve). Végül ki szeretnénk emelni, hogy a sejtosztódásra vonatkozó butirát rezisztencia acetilszalicilsav alkalmazása során egyetlen egy esetben sem alakult ki, sőt a vizsgált sejtek acetilszalicilsav jelenlétében még fokozottabban gátolhatókká váltak butiráttal. Viszont további kísérleteink azt mutatták, hogy egyes COX-2 specifikus NSAIDs (pl. NS-398), szintén prooxidánsként viselkedhetnek, és emiatt – az indometacinhoz hasonlóan - várható mellékhatás, a butirát rezisztencia kialakulása.