

DEZETIL-AMIODARON: EGY ANTIARITMIÁS GYÓGYSZER METABOLITJÁNAK TUMOR-TERÁPIÁS HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGE

Bognár Zita

PTE, ÁOK, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

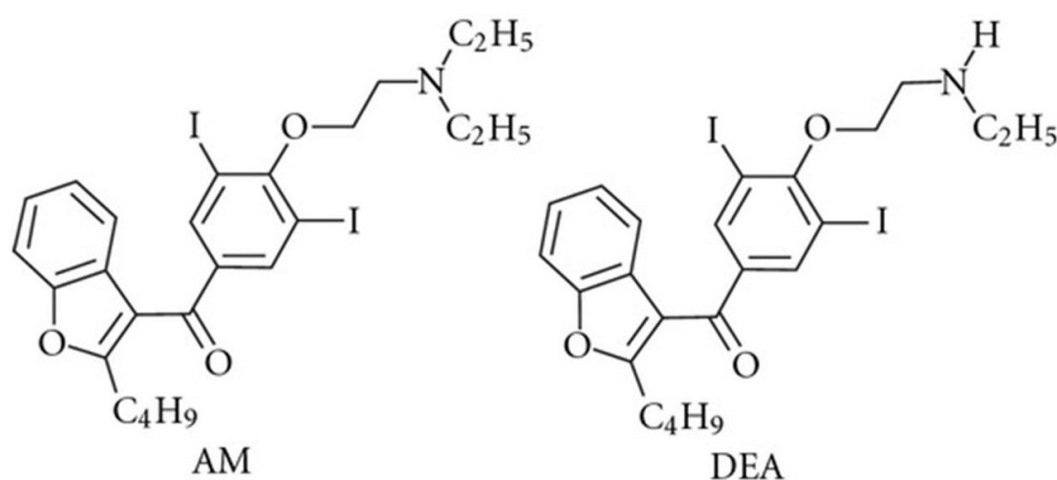
Bár a modern sebészi technikák és az új immunológiai, biokémiai támadáspontokon alapuló modern kemoterápiás szerek alkalmazása jelentősen javítják a daganat ellenes kezelések hatékonyságát, a malignus daganatok máig a második leggyakoribb halált okozó megbetegedést jelentik. Ennek oka a késői felfedezés mellett a magas malignitás és terápia rezisztenciák kialakulása, melyekért nagy százalékban a daganatos őssejtek (SCS) felelősek. Mindezek felvetik új vegyületek kifejlesztésének szükségességét, amelyek felhasználhatók lennének a modern, esetlegesen egyénre szabott kezelések tervezésében. Ugyanakkor, az új vegyületek amúgy teljes mértékben indokolt biztonsági vizsgálatait jelentősen késleltetik az új vegyületek bekerülését a terápiás gyakorlatba. Ezen a problémán segíthet, ha egy már a humán terápiában elfogadott gyógyszert hasznosítunk újra különböző rákbetegségek kezelése céljából. Mi ezt a gondolatot eggyel tovább fordítottuk, amikor a széles körben, több mint 50 éve használt antiaritmiás szer, az amiodaron legfőbb metabolitja, a dezetil-amiodaron (DEA) potenciális rákellenes hatását kezdtük vizsgálni.

A világon az amiodaronnal (AM) kezelt betegek száma milliós nagyságrendű; ez az egyik legszélesebb spektrumú antiaritmiás szer. Hagyományosan a Vaughan-Williams szerinti klasszifikáció III. osztályába tartozik, de összetett hatásmechanizmusa miatt kevert típusúnak is nevezik. Alkalmazható a szupraventrikuláris és kamrai aritmiák legtöbb típusában [1, 2]. Fő indikációs területe szívelégtelenség mellett fellépő súlyos szupraventrikuláris és kamrai tahikardiák akut kezelése [1].

Hosszantartó, magas dózisú kezelés során sajnos extrakardiális mellékhatásokat okoz, amelyek a szer egyes szervekben való akkumulációjával magyarázhatók [2]. Ilyen típusú, gyakran előforduló mellékhatásai miatt nevezik az amiodaront a leghatásosabb és egyben a legtoxikusabb antiaritmikumnak. A számos mellékhatás közül mindenképpen megemlítendő a tüdőfibrózis, a bőr fotoszenzitivitása és szürkés elszíneződése, corneális depozíciók megjelenése, májkárosodás, valamint a gyógyszer jódtartalma és a pajzsmirigyhormonhoz való kémiai hasonlósága miatti hyperthyreosis (gyakrabban) vagy hypothyreosis

(ritkán). Farmakokinetikáját tekintve az amiodaron hosszú (átlagosan 55 napos) felezési idővel rendelkezik, amely szükségessé teszi telítő dózis alkalmazását a kezelés első 1-4 hetében, a terápiás plazmakoncentráció gyors elérése érdekében [2]. Az amiodaron metabolizációjáért a máj citokróm P450 enzimszrendszere felelős: a CYP3A4 és CYP2C8 enzimek alakítják dezetil-amiodaronná [3, 4], amely a gyógyszer legfőbb metabolitja.

A dezetil-amiodaron (DEA) aktív metabolit, amely az alapmolekula mellett szerepet játszik az amiodaronnál leírt hatások kialakulásában [2, 5, 6], szintén antiaritmiás hatású [2], de proaritmiás hatással nem rendelkezik.



<https://www.researchgate.net>

1. ábra. Az amiodaron (AM) és a dezetil-amiodaron (DEA) szerkezete.

A DEA IUPAC neve (2-butyl-1-benzofuran-3-yl)-[4-[2-(etilamino)etoxi]-3,5-di-jodofenil]metanon, vagyis kémiai szerkezetét tekintve egy etilcsoport hiánya különbözteti meg a kiindulási vegyülettől (1. ábra). A névből az is kitűnik, hogy (az amiodaron hasonlóan) a molekula tartalmaz egy benzofurán gyűrűt, ami a lipofilitásért felelős, továbbá az etilcsoport lehasadásával és a tercier nitrogénatom szekunderré válásával az eredeti molekulához képest a DEA kevésbé hidrofíl. A DEA minden amiodaronnal kezelt beteg vérében, szöveteiben előfordul. Tartós amiodaronkezelés során a DEA és az amiodaron koncentráció lassan emelkedik a betegek vérében, azonban a két koncentráció aránya gyakorlatilag állandó marad, mivel a DEA kompetitíven gátolja az anyavegyületének lebontásához szükséges CYP3A4 enzimet és P-glikoproteint [7, 8, 9]. Ezeröttszáz napos követés után az átlagos terápiás plazmakoncentrációk mikromólos nagyságrendet értek el (AM: $1,17 \pm 0,53 \mu\text{M}$, DEA:

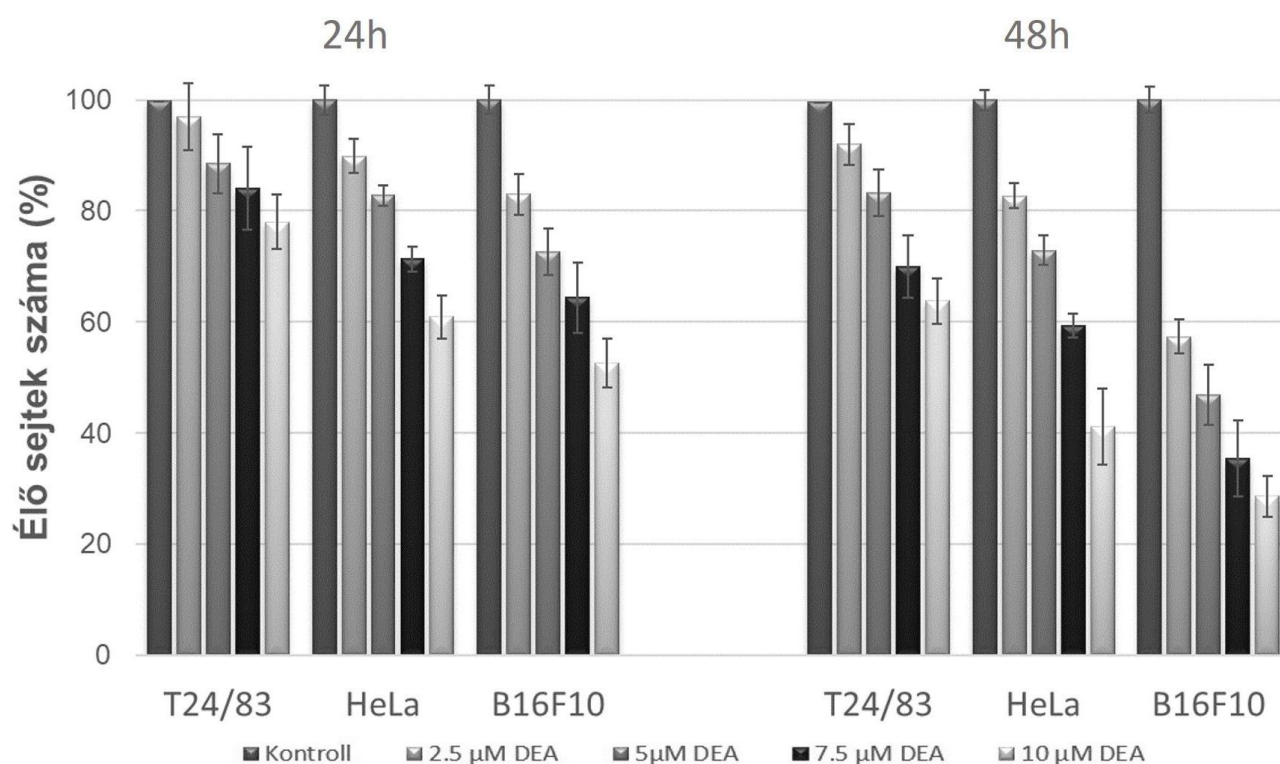
0,92 $\pm$ 0,41 μ M) [7]. A szöveti halmozódás miatt a lipofil szövetekben akár milimólos koncentrációban is előfordulhat mindkét vegyület; a legtöbb vizsgált szövetben a DEA koncentrációja bizonyult magasabbnak. A tüdőre vonatkozóan az AM/DEA arány 0,22 $\pm$ 0,08, azaz a tüdőben a DEA koncentrációja az amiodaronénak átlagosan több mint négyszerese volt [8, 9].

Felvetődött tehát bennünk a kérdés, hogy felhasználható-e ez a szöveti halmozódás arra, hogy a DEA lokálisan kifejtse (később ismertetésre kerülő) pro-apoptotikus hatását az akkumuláció helyén. A kérdés megválaszolása érdekében a DEA hatását olyan daganatos sejtvonalakon terveztük megvizsgálni, amely az előbb említett akkumulációs helyekre gyakran ad áttétet, és az áttétek sikeres kezelése a betegség prognózisa szempontjából releváns. Kísérleteinket ezért tehát T24/83 humán hólyagtumor és B16F10 egér melanóma sejtvonalon végeztük, hiszen az invazív hólyagdaganatok és a metasztatikus melanómák kezelése továbbra is rendkívül nehéz, a páciensek túlélési esélye kedvezőtlen [10, 11]. Ismert, hogy az AM és a DEA egymás sejtkárosító hatását potenciózza [12, 13], és épp ezt a negatív szinergikus hatást teszik felelőssé az AM súlyos mellékhatásaiért.

Kísérleteink másik kiindulópontját egy korábbi, általunk publikált cikk adta, amely az AM és DEA molekuláris hatását vizsgálta ischaemia-reperfúzió során, patkányszív modelleken. A kísérletsorozat során az AM ischaemia mellett alacsony koncentrációkban protektív hatást fejt ki a szívizomsejtek mitokondriumaira úgy, hogy gátolja a pro-apoptotikus apoptózis indukáló faktor (AIF) mitokondriumból való ischaemia által indukált felszabadulását és transzlokációját a sejtmagba. Szintén a protektív hatásokhoz tartozik az AM szétkapcsoló hatása, valamint az a tény, hogy a mitokondriális membránpotenciált csökkenti. Magasabb koncentrációkban azonban az AM gátolta a mitokondriális légzési lánc működését, illetve Cyclosporin A-independens duzzadást váltott ki a mitokondriumokban. A kísérlet során igazolódott, hogy a DEA kis koncentrációkban nem mutat az AM-hez hasonló protektív hatásokat, viszont az amiodaronnál megfigyelt mitokondriumot károsító hatások nagy koncentráció alkalmazásakor jelen vannak a DEA esetében is [14]. Az antiaritmikum indikációban használt DEA-mellékhatások kialakulásának mechanizmusa ismeretében adódott az a kérdés, hogy egy tisztán pro-apoptotikus hatású, jól meghatározott szövetekben nagymértékben dúsuló szer esetében a klinikai gyakorlatban lehet-e ezen „mellékhatások”-nak klinikai haszna. A kérdésre válaszként a malignus daganatos betegségek, ezeknek is

elsősorban a késői stádiumú, kevésbé lokalizált, specifikus terápiával nem vagy nehezen kezelhető esetei adódtak.

A tumorprogresszió kialakulásának sebességét az apoptózis és a sejtproliferáció egyensúlya határozza meg. A tumor ellenes kezelések sejtciklus-leállást és/vagy apoptózist okoznak a tumorsejtekben, ezzel lassítva, meggátolva a daganatot növekedését. Munkánk során sikerült bizonyítanunk a dezetil-amiodaron citotoxikus hatását, mind rövidtávú, mind hosszú időtartamú kísérletekben. A DEA 10 μM , illetve ennél alacsonyabb koncentrációban 24, illetve 48 h inkubáció során idő- és koncentrációfüggő módon pusztította a T24/83 hólyagtumor, a HeLa cervix karcinóma és B16F10 melanóma sejteket (2. ábra) [15-17].

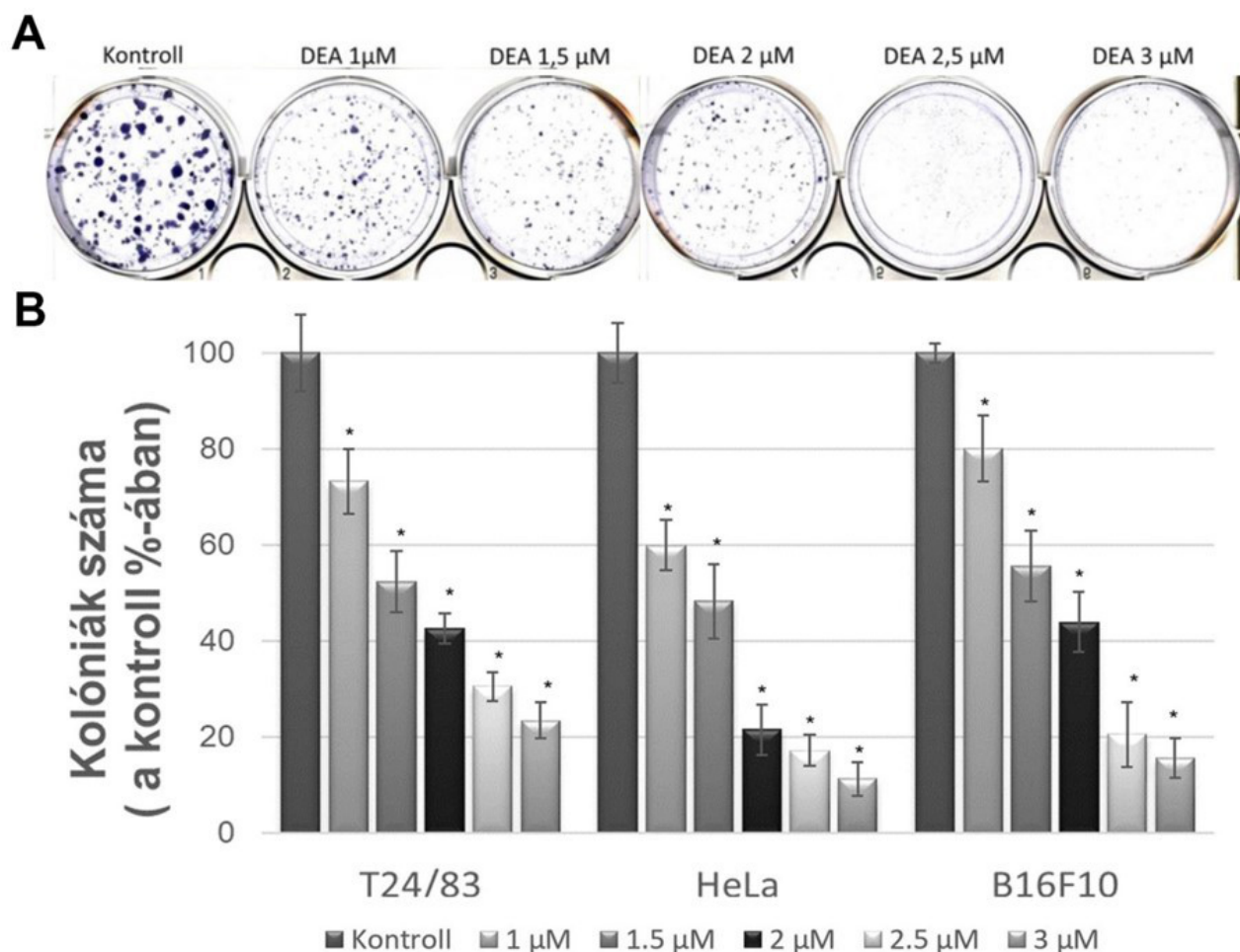


2. ábra. A dezetil-amiodaron (DEA) hatása különböző tumor sejtvonalak túlélésére. A sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltük 24 és 48 órán keresztül, majd Sulforhodamine B assay-t végeztünk. Eredményeinket a kontrollok százalékában mutatjuk be. Az adatok az átlagok $\pm$ SD-t reprezentálják, három független kísérletből, legalább négy párhuzamos minta alapján. *: $p < 0,05$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontrollhoz viszonyítva.

Megvizsgáltuk a DEA hatását a kolónia-formációra is. Ez a rendszer hosszabb, 7 napos inkubációt alkalmaz, és ennek megfelelően azt találtuk, hogy a DEA a túlélési kísérleteknél alkalmazotthoz képest jelentősen alacsonyabb, már 1 μM koncentrációban is hatékonyan gátolta a kolónia-formációt (3. ábra) [15-17].

A dezetil-amiodaronról kimutatták, hogy növeli az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt (ic $[\text{Ca}^{2+}]$) extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében és hiányában egyaránt, ami

azt bizonyítja, hogy az ic $[Ca^{2+}]$ extracelluláris, endoplazmatikus retikulumbeli és mitokondriális raktárakból származott [18]. A fokozott ic $[Ca^{2+}]$ -ról azt is kimutatták, hogy számos pro-apoptotikus útvonalat aktiválhat [19].

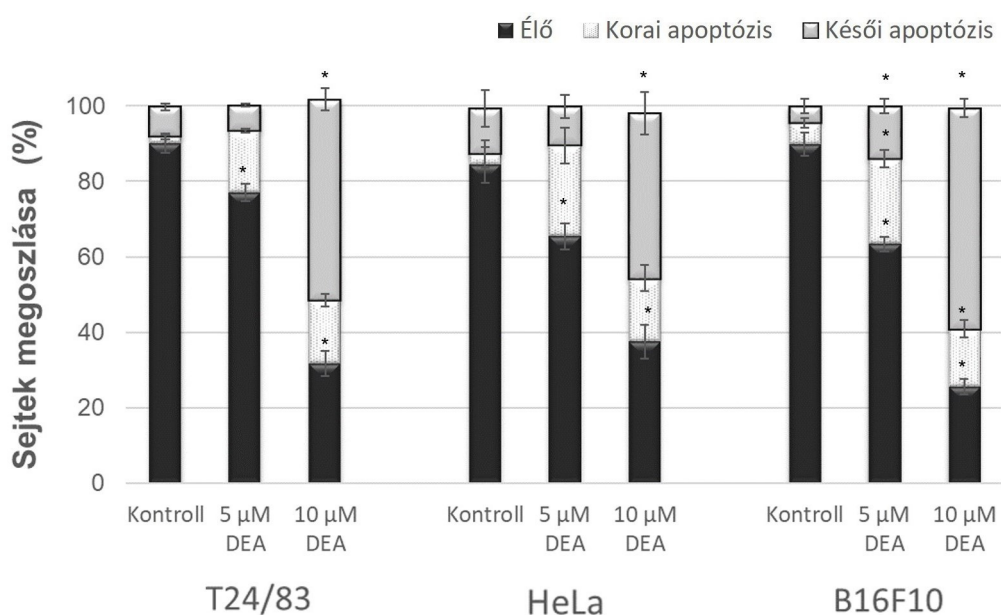


3. ábra. A DEA hatása a kolónia-formációra különböző tumor sejtvonalakban. A sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltük hét napon keresztül, majd Coomassie Brilliant kék festést végeztünk. A kezetlen sejtek szolgáltak kontrollként. A) Reprezentatív fénykép a festett B16F10 melanóma kolóniákról. B) Oszlop diagram a kolóniák számáról T24/83 hólyagtumor, HeLa cervix karcinóma és B16F10 melanóma sejtvonalakban. Az adatok az átlagok $\pm$ SD-t reprezentálják három független kísérletből, legalább 4 párhuzamos minta alapján. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontroll csoporthoz viszonyítva.

Ezen eredményekkel összhangban igazoltuk, hogy a DEA koncentrációfüggő módon indukálta az AIF sejtmagba való transzlokációját, ezzel is segítve az apoptotikus sejthalál kialakulását (4. ábra) [15-17].

A hólyagdaganat mutációs rátája nagyon magas, csak a tüdőrák és a melanóma előzi meg [10]. A magas mutációs ráta miatt a daganatképződés jól ismert és relatíve újonnan felismert útvonalait érintő mutációknak az előfordulása nagyon gyakori. Érintett lehet a sejtciklus, receptor-tirozinkinázok jelátvittele, Ras/

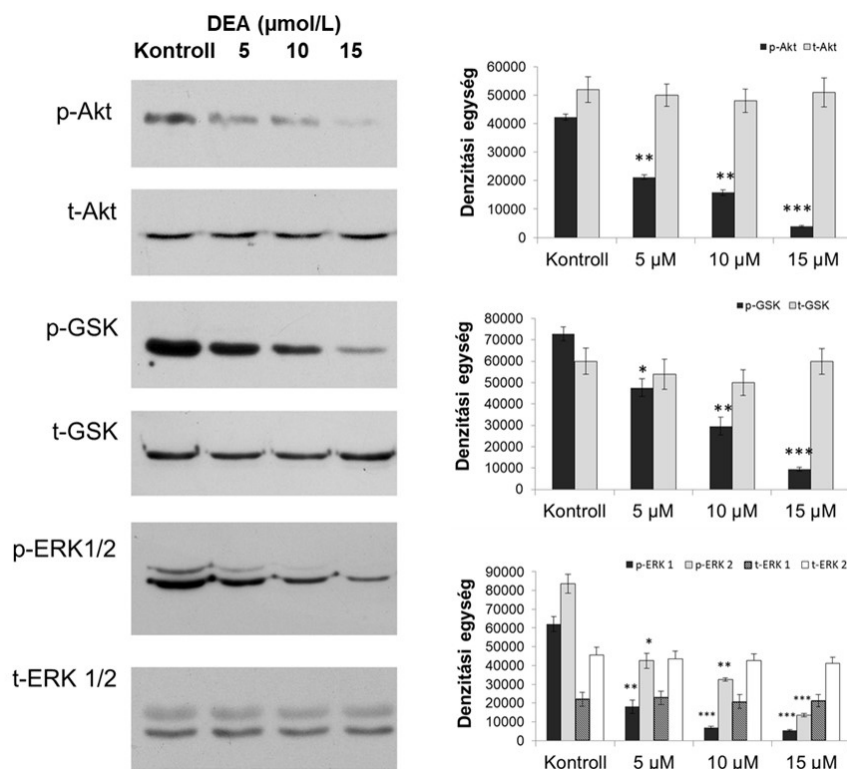
MAPK-út (Ras/mitogén aktivált protein kináz), PI3K/mTOR (foszfatidilinozitol-3-kináz/mammalian target of rapamycin)-útvonal, ezeken belül legfőképp a p16 (cyclin-dependens kináz inhibitor 2A), p53 (Tumor protein P53), RB1 (retinoblasztóma protein), TSC1 (tuberous sclerosis 1 gene) FGFR3 (fibroblast növekedési faktor receptor 3), PIK3CA (foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz alfa katalitikus alegysége) gének [10].



4. ábra. A DEA hatása a sejthalál típusára különböző tumor sejtvonalakban. A sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltük 24 órán át, majd a Muse® Annexin V & Dead Cell Reagent hozzáadása után a Muse® sejtanalizátorral vizsgáltuk. A grafikonokon a sejtek százalékos aránya van feltüntetve. A kezeltetlen sejtek szolgáltak kontrollként. Az eredmények az átlag $\pm$ SD-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontrollhoz viszonyítva.

Az extracelluláris szignál által regulált kinázhoz (ERK) vezető jelátviteli útvonalak több daganattípusban túlzott aktivitást mutatnak, mely gyakran Ras-mutáció következménye [20]. A Ras-géneknek számos mutációja kimutatható a tumorképződés folyamata során. A T24 sejtvonalban túlzott mértékben expresszált Ras onkogén fehérje ismert proximális aktivátora a Raf/MEK/ERK (rapidly accelerated fibrosarcoma kináz/ mitogén-aktivált extracelluláris szignál-regulált kináz/ extracelluláris szignál-regulált kináz) és PI3K/Akt jelátviteli útvonalaknak [10, 20]. Az ERK-jelátvitelt támadó anyagok, például a Raf- vagy a MEK-inhibitorok jelentőst javulást hozhatnak bizonyos daganattípusokban [20]. Számos esetben a kezdeti válaszarány a betegség előrehaladtával csökken, az inhibitorok valamilyen módon hatástalanná válnak és többé nem képesek az ERK-út gátlására és sejthalál kiváltására [21]. Emiatt új, ERK-útvonalat más mechanizmussal gátló molekulák felfedezése innovatív,

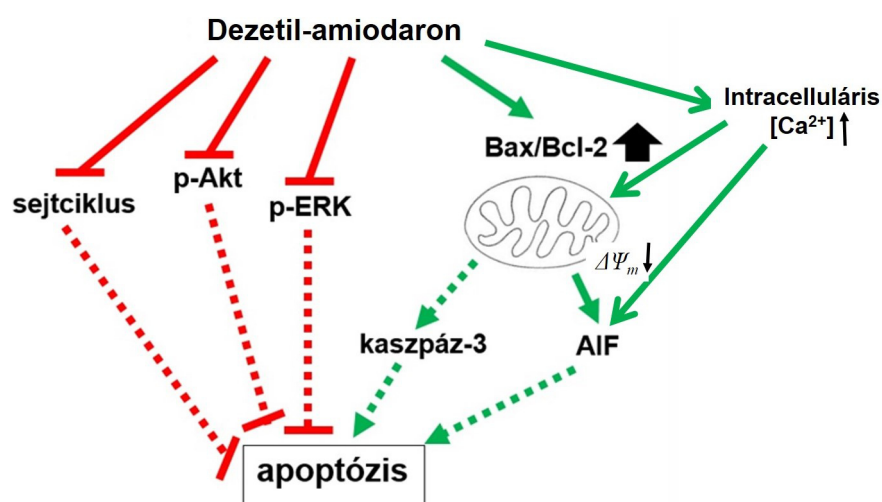
eredményes megközelítést jelenthetne. Az ERK-út sejtproliferációban betöltött kritikus szerepe miatt megvizsgáltuk, hogy a DEA a sejtproliferációt az ERK-útvonalon keresztül gátolja-e. Amint az 5. ábra mutatja, a DEA szignifikánsan gátolta az ERK foszforilációját [15, 16]. Ennek az erős mitogén szignálnak az inaktivációja felelősnek tűnik a dezetil-amiodaron antiproliferatív hatásáért.



5. ábra. A DEA hatása az Akt, GSK3B és ERK jelátviteli útvonalakra T24 sejteken. A T24 sejteket emelkedő koncentrációjú DEA-val kezeltünk 6 órán keresztül. Teljes sejt extraktumokat vizsgáltunk immunoblott technikával. Az eredményeket reprezentatív immunoblottok képei (bal oldal) és a blottok denzitometriás analízisének alapuló oszlopdiagramok (jobb oldal) mutatják. Az eredmények az átlag $\pm$ SD három különböző kísérletről. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ és ***: $p < 0,001$ a megfelelő kontrollhoz viszonyítva. [16] cikk alapján átszerkesztve.

A PI3K-útvonal hiperaktivált vagy módosult számos daganattípusban, igen gyakran hólyagdaganatokban, melanómában is [10]. Az útvonalat sokféle extracelluláris szignál szabályozza, pl. mitogén növekedési faktorok, hormonok, nutriensek, sejt energiaszintek, stressz állapotok [22]. Aktiválhatják receptor-tirozinkinázok ligandjai, többek között az EGF, inzulin, IGF1 (Insulin-like növekedési faktor 1), VEGFA (Vasculáris endotheliális növekedési faktor A), PDGF (Platelet-derived növekedési faktor), így ez az útvonal daganatképződéshez hozzájáruló folyamatokat is szabályoz, például a túlélést, proliferációt, növekedést, metabolizmust, angiogenezist, végül metasztázisképződést és terápiarezisztenciát. A PI3K-útvonal más jelátviteli útvonalakkal is együtt-

működik, elsősorban az előbb említett RAF/MEK/ERK útvonallal [22]. Mind a hólyag tumor, mind a melanóma, valamint a cervix carcinoma sejtvonalon az Akt (Protein kináz B) foszforilációjában szignifikáns csökkenését mutattunk ki (5. ábra) [15-17]. Az Akt kiváltja a GSK3B (Glikogén szintáz kináz-3 β) inaktiváló foszforilációját, ami meggátolja a GSK3B célfehérje által történő β -katenin bontást; ezzel fokozott β -katenin nukleáris transzlokációt engedve, ami a sejtproliferáció és a túlélés fokozásához vezet. Megvizsgáltuk, hogy a DEA - kiváltotta csökkent Akt-foszforiláció okoz-e változást a GSK3B foszforilációjában és azt találtuk, hogy 10-15 μ M koncentrációjú dezetil-amiodaron kezelés hatására a csökkent Akt-foszforilációt csökkent GSK3B foszforiláció kísérte (5. ábra) [15-17]. Az ERK és az Akt aktivációjáról kimutatták, hogy hozzájárulnak a survivin expresszióhoz és a metasztatikus progresszióhoz, így mindkét útvonal gátlása csökkenthetné a citosztatikum-rezisztenciát és a metasztázis-hajlamot [23]. A DEA mindkét kináz gátlása által olyan daganatellenes szer lehetne, amely a metasztázisképzést megelőzheti, és a kemorezisztenciát legyőzheti (6. ábra).

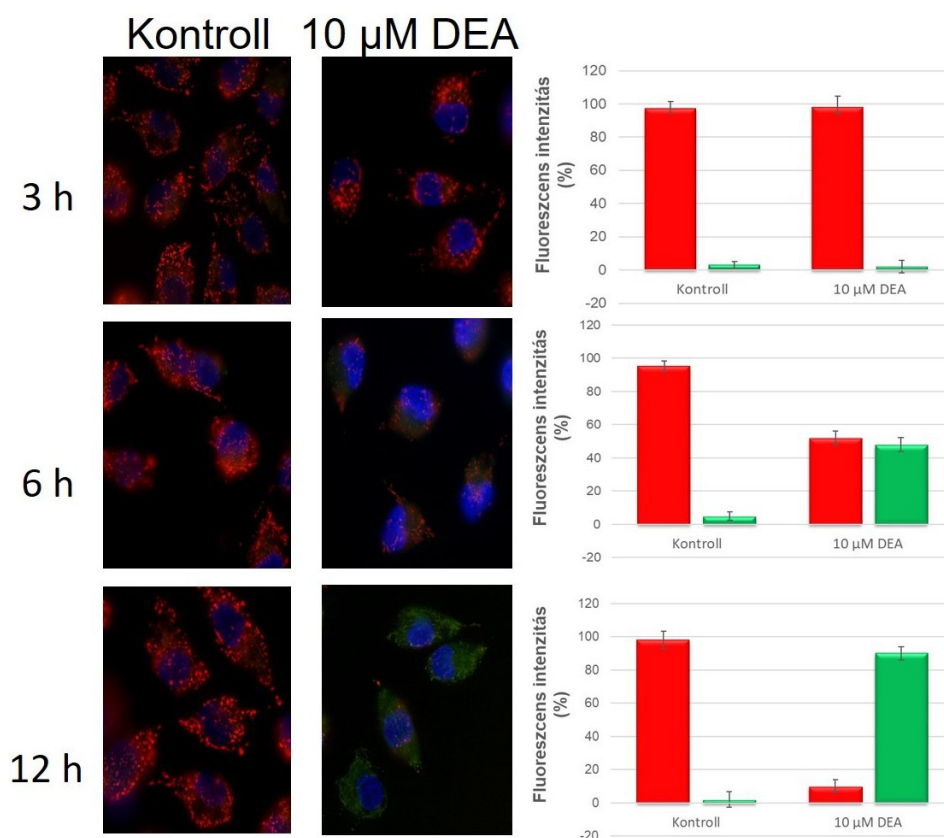


6. ábra. A DEA apoptózisra gyakorolt hatásában résztvevő mechanizmusok sémája. A piros, tompa nyilak gátlást, a zöld, hegyes nyilak aktiválást jelentenek. A fekete nyilak vastagságukkal arányos növekedést, illetve csökkenést mutatnak. A folyamatos vonalak saját eredményeken, a szaggatottak irodalmi adatokon alapulnak. [16] cikk alapján átszerkesztve.

A mitokondriumok többféle módon járulnak hozzá a karcinogenezishez, a tumor túléléséhez és az áttétek képződéséhez. Fiziológiai körülmények között a légzési lánc, amely a belső mitokondriális membránban (IMM) található, felelős az ATP termelés jelentős részéért; emellett hatalmas ROS forrás is, amely szintén hozzájárul különböző betegségek, mint például a daganatos megbetegedések kialakulásához [24]. Az ATP szintézis mozgatórugójaként betöltött szerepe mellett a mitokondriális membránpotenciál alapvető szerepet

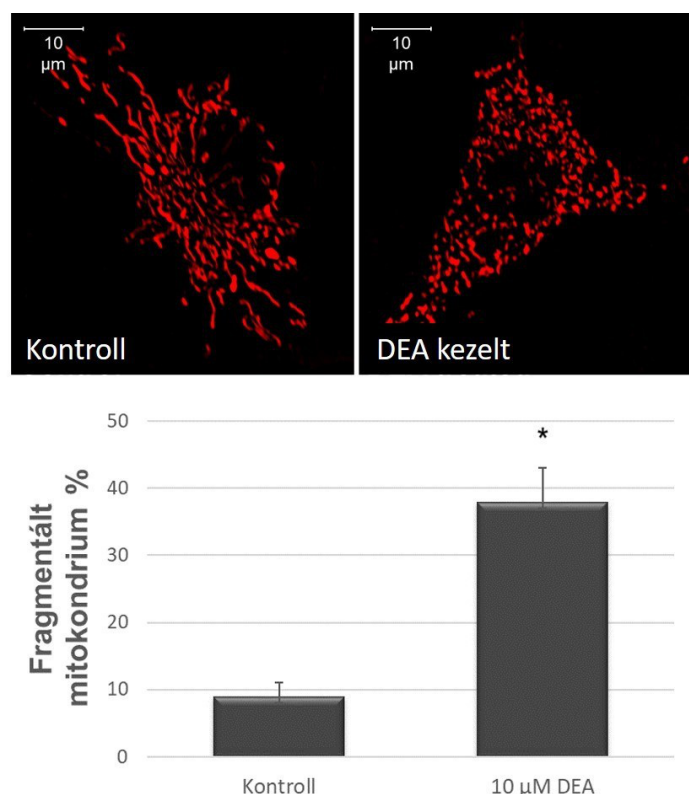
játszik a sejtmagban kódolt mitokondriális fehérjék, valamint kationok, például a K^+ , Ca^{2+} és Mg^{2+} ; szállításában, a ROS generációban, a mitokondriális hálózatok dinamikájának fenntartásában és a pro-apoptotikus intermembrán fehérjék felszabadulásának szabályozásában.

A mitokondriális membránpotenciál fenntartása annyira fontos a sejtek túlélése szempontjából, hogy ischaemiás helyzetekben a F_0F_1 ATPáz fordított üzemmódban is tud működni, így a sejt megmentése érdekében nem ATP-t szintetizál, hanem ATP-t fogyaszt. Ilyen esetben a nem glükóz szubsztrátok szubsztrát szintű foszforilációja biztosítja az ATP-t az F_0F_1 ATPáz számára, ezáltal biztosítva a túlélés lehetőségét [25, 26]. Mivel a tumorsejtek állandó, részleges ischaemiás állapotban léteznek, amelyhez a citoplazmatikus és mitokondriális anyagcsereutaknak alkalmazkodniuk kell, az olyan gyógyszerek, melyek a tumorsejtek anyagcseréjét zavarják, terápiás értékűek lehetnek.



7. ábra. A DEA hatása a mitokondriális membránpotenciálra T24/83 hólyagtumor sejtvonalban. A sejteket 10 μ M DEA -val kezeltük 3, 6 és 12 órán keresztül. A mitokondriális membrán depolarizációt 1 μ M JC-1 membránpotenciál-érzékeny fluoreszcens festékkel mutattuk ki. A zöld és piros fluoreszcens képeket digitális fényképezőgéppel felszerelt fluoreszkáló mikroszkóp segítségével készítettük, majd egy-egy képpé alakítottuk. A) A fluoreszcens intenzitásokat oszlopdiagramokon mutatjuk be. B) Az eredmények az átlag $\pm$ SD-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. ***: $p < 0,001$ a kontrollhoz képest. [16] cikk alapján átszerkesztve.

A DEA a mitokondriális membránpotenciált koncentrációfüggő módon csökkentette mind a T24/83, mind a B16F10 melanóma sejtvonalon (7. ábra) [15-17], mely megállapítás összhangban van a korábban közölt izolált máj és patkány mitokondriumokon kapott eredményeinkkel. Továbbá, a DEA ezen hatása a fenti irodalmi adatok és a pro-apoptotikus fehérjék kiáramlására vonatkozó saját adataink alapján hozzájárulhat a tumorsejtek apoptotikus pusztításához (6. ábra).



8. ábra. A DEA hatása a mitokondriális hálózat fragmentációjára B16F10 melanóma sejtvonalban. A mitochondria-targeted red fluorescent protein (mtRFP) transzfektált sejteket 5-10 µM DEA-val kezeltük 3 órán át. A mitokondriális fragmentációt fluoreszcencia mikroszkópos képek alapján határoztuk meg (fent). Reprezentatív fluoreszcencia képek mellett a mitokondriális fragmentáció mértékét %-ban kifejezve oszlopdiagramokon mutatjuk be (lent). Az eredmények az átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. *: $p < 0,05$. [28] cikk alapján átszerkesztve.

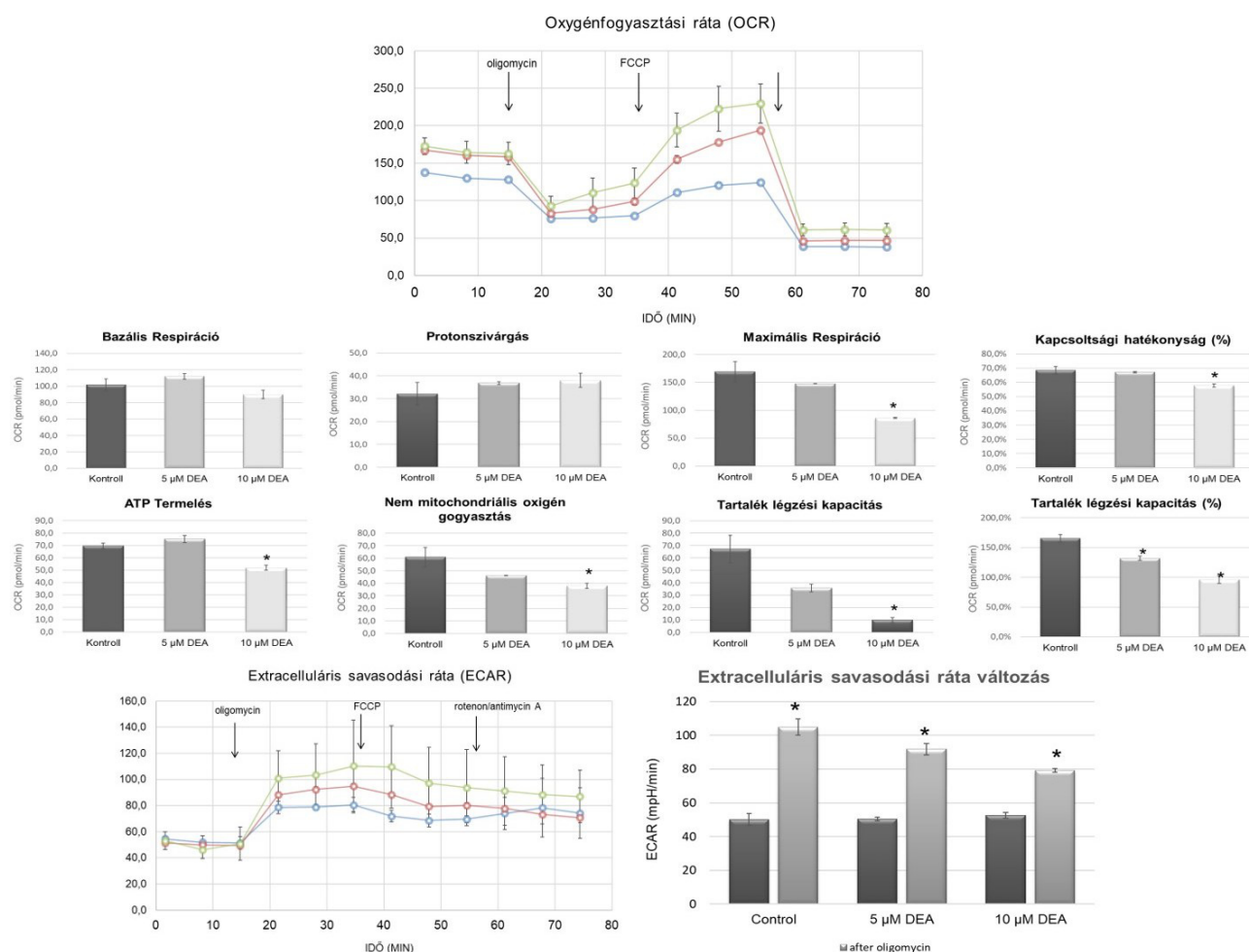
A mitokondriális hálózat dinamikája fontos szerepet játszik a mitokondriális biogenezisben, a sejtek energia- és anyagcsereigényének kielégítésében és a mitokondriális minőség ellenőrzésben. E feladatok ellátásához a mitokondriális fúziós és fissziós folyamatok egyensúlyban tartására van szükség, melyben főként az intracelluláris jelátviteli folyamatoknak van szerepe. Azonban a mitokondriális membránpotenciál is döntő szerepet játszik ennek az egyensúlynak a kialakításában, mivel egy bizonyos membránpotenciál küszöb alatt a fúziós folyamat nem jön létre, ennek megfelelően sok daganat közös

jellemzője a túlzott mitokondriális hasadás [27]. Habár a mitokondriális hasadás nem feltétlenül vezet apoptotikus sejthalálhoz, a fragmentált mitokondriumok hajlamosabbak a sérülésekre és mitofágia általi elpusztulásra. Ez a folyamat a mitokondriumok DNS kópiaszámának csökkenéséhez vezethet, amit megfigyelhetünk különböző rosszindulatú daganatok, köztük asztrocitómák, prosztatarák, valamint emlő-, vastagbél- és hepatocelluláris karcinómák esetében [27]. Ennek megfelelően a DEA mitokondriális hasadást indukáló hatása (8. ábra) [28] hozzájárulhat citotoxikus tulajdonságaihoz (6. ábra). A fokozott mitokondriális fragmentáció a megnövekedett hasadás vagy a csökkent fúzió eredménye.

Tekintettel arra, hogy a fúzió megköveteli az intakt mitokondriális membránpotenciált [29] és a DEA azt károsította, valószínűnek tűnik, hogy a DEA mitokondriális hasadást okozó hatása a fúzió gátlásával magyarázható. Az Opa1 (optic atrophy 1) fehérje felelős a belső mitokondriális membrán (BMM) fúziójáért és a kriszták morfológiájának fenntartásában is részt vesz [29]. A fehérje rövid és hosszú izoformái általában egyensúlyban vannak és a BMM-hoz kapcsolódnak. Amikor viszont különböző hatások zavarják a mitokondriális membránpotenciált és/vagy permeabilizálják a külső mitokondriális membránt, ez az egyensúly felbomlik, és a fehérje kiszabadul a citoszolba [30]. A DEA 10 μM koncentrációban az Opa1 felszabadulását idézte elő a citoszolba, jelezve, hogy a mitokondriális fragmentációt indukáló hatásáért a mitokondriális fúzió gátlása és nem a pedig a fisszió indukálása felelős [28].

A rákos sejtek többnyire akkor is a szubsztrát szintű foszforiláción alapuló ATP-termelésre hagyatkoznak, ha a mitokondriális ATP-szintézishez elegendő mennyiségű oxigén áll a rendelkezésükre. Ez az ún. Warburg- effektus [31] az agresszív, citosztatikum rezisztens, metasztatizáló ráksejtek vagy a rák őssejtek nagyobb mértékben támaszkodnak a mitokondriális energiatermelésre [32, 33, 34]. Ezekben a sejtekben a metabolizmusnak egyszerre kell megfelelni azoknak a kihívásoknak, amelyeket a gyors osztódáshoz szükséges anyagmennyiség és energia egyidőben történő előállítása támaszt. Ennek érdekében a sejtek nagyon kiélezett módon alakítják át a metabolizmusukat, amely sebezhetővé teszi őket mitokondriális támadáspontú, a metabolizmusukat megzavaró vegyületekkel szemben. Eredményeink alapján a DEA kielégíti az ilyen típusú vegyületekkel szemben támasztott követelményeket, mivel csökkenti mind az oxidatív, mind a fermentatív energiatermelést (9. ábra) [28].

Az in vitro eredmények birtokában elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a DEA metasztázisképzésre gyakorolt hatását in vivo is, egy kísérletes egér tüdőmetasztázis-modell segítségével. Megállapítottuk, hogy a DEA kezelés csökkentette a tüdők felszínén kialakuló tumornodulusok számát, a tüdők tömegének növekedését és a készült metszetekben számolt tumoros tüdőterület százalékos arányát (10. ábra) [15].

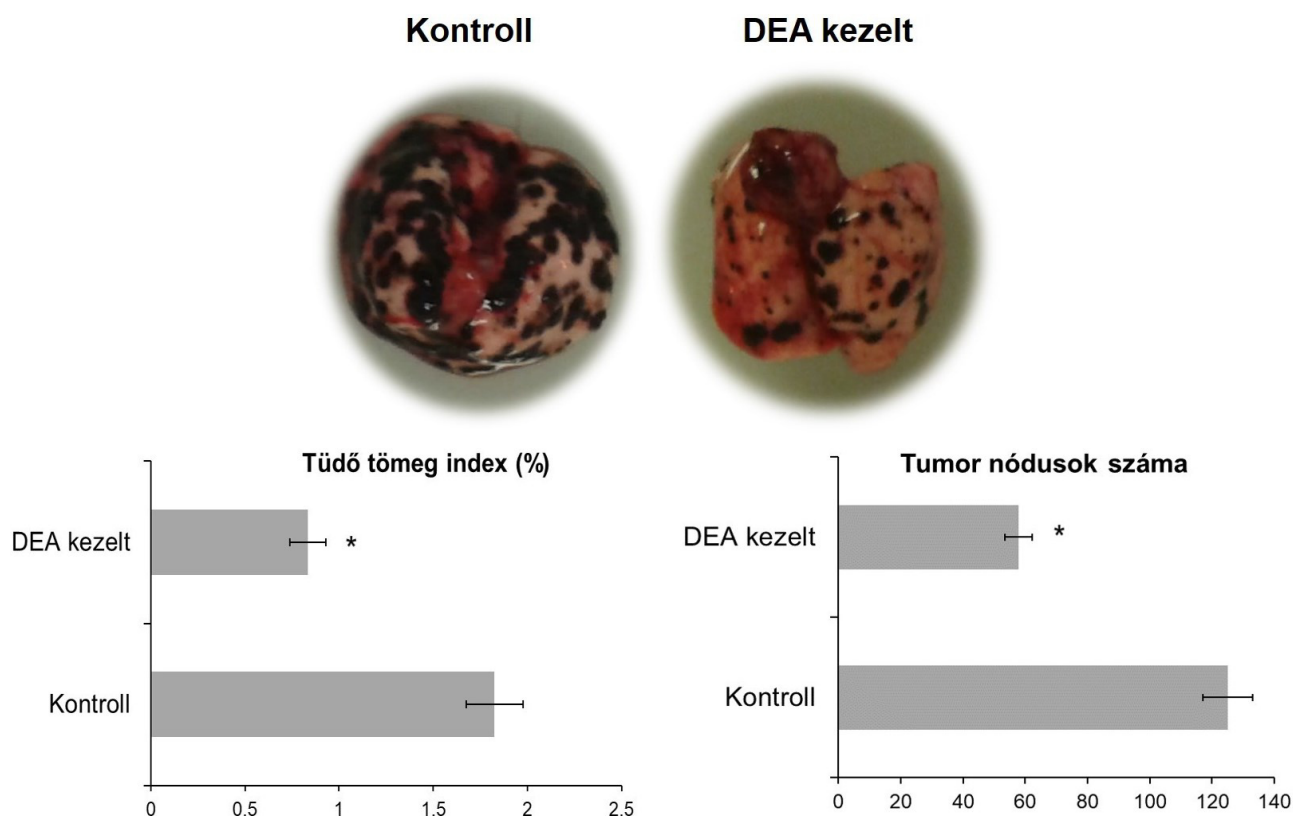


9. ábra. DEA hatása B16F10 melanóma sejtek energia-metabolizmusára. A sejteket 5 vagy 10 µM DEA-val kezeltük 3 órán át, majd az OCR -t és az ECAR -t 75 percig monitoroztuk Agilent Seahorse XFp Analyzer segítségével. A bazális respiráció, protonszivárgás, kapcsoltsági hatékonyság, maximális respiráció, ATP-termelés, nem-mitokondriális oxigénfogyasztás és tartalék légzési kapacitás értékek változását oszlopdiagramok segítségével mutatjuk be. Az eredmények az átlag ± SEM-ként vannak feltüntetve, három független kísérlet alapján. *: $p < 0,05$. [28] cikk alapján átszerkesztve.

Ezen felül a kontroll csoporthoz képest befolyásolta a tumorsejtek megoszlását is a tüdőben [15]. Ezen tulajdonságok arra utalnak, hogy a DEA gátolta a metasztázisképzés folyamatát, ami nagy jelentőséggel bír egy potenciális tumorellenes szer esetén, hiszen a gyógyszerek e csoportjának (különösen a késői stádiumú esetekben) a daganatsejtek elpusztítása mellett egyik legfon-

tosabb feladata az áttétképződés gátlása, lassítása, megakadályozása.

Összefoglalva, a DEA több úton keresztül indukálja a tumorsejtek apoptózist, a sejtciklus leállítását, az AIF nukleáris transzlokációját, a PARP-1 hasítást, a Bax/Bcl-2 arány emelkedését, a kaszpáz-3 hasítást és az ERK és Akt citoprotektív utak gátlását.



10. ábra. DEA hatása B16F10 melanóma sejtvonal tüdő áttét képzésére. Tüdőáttétek kialakulását C57BL/6 egerek laterális farokvénájába injektált B16F10 sejtek segítségével vizsgáltuk. 24 órával a B16F10 sejtek beadása után, az állatokat minden 3. napon, 16 napon át, intraperitoneálisan 25 mg/kg DEA -val kezeltük (6 egér/csoport). A reprezentatív fotók mellett az ábrán a tüdő tömeg index-et (%) és a tüdőfelszínen található tumor nódusok számát mutatjuk be oszlopdiagramok segítségével. Az eredmények az átlag $\pm$ SD-ként vannak feltüntetve *: $p < 0,001$ a kontrollhoz képest. [15] cikk alapján átszerkesztve.

Továbbá, mitokondriális hatásai következtében hatékonyan korlátozhatja metastatizáló sejtek proliferációját és áttétképző képességét. In vitro hatékony koncentráció-tartománya alapján az AM kezelés terápiás dózisában eredményes lehet citosztatikum-rezisztens tumorok klinikai kezelésében, amely esetben az engedélyezést megelőző biztonsági vizsgálatok feleslegessé válhatnak, vagy jelentősen lerövidülhetnek.

Irodalomjegyzék

[1] Herold, G. és mtsai. (2017) Belgyógyászat. (Medicina Könyvkiadó Zrt.,

Budapest).

- [2] Gyires, K., Fürst, Zs., Ferdinandy P. (2017) Farmakológia és klinikai farmakológia. (*Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest*).
- [3] Soyama, A., Hanioka, N., Saito, Y., Murayama, N., Ando, M., Ozawa, S., Sawada, J. (2002) Amiodarone N-deethylation by CYP2C8 and its variants, CYP2C8*3 and CYP2C8 P404A. *Pharmacol Toxicol*, **91**: (4) 174-8.
- [4] Zahno, A., Brecht, K., Morand, R., Maseneni, S., Torok, M., Lindinger, P.W., Krahenbuhl, S. (2011) The role of CYP3A4 in amiodarone-associated toxicity on HepG2 cells. *Biochem Pharmacol*, **81**: (3) 432-41.
- [5] Ghovanloo, M.R., Abdelsayed, M., Ruben, P.C. (2016) Effects of Amiodarone and N-desethylamiodarone on Cardiac Voltage-Gated Sodium Channels. *Front Pharmacol*, **7**: 39.
- [6] Pallandi, R.T., Campbell, T.J. (1987) Resting, and rate-dependent depression of Vmax of guinea-pig ventricular action potentials by amiodarone and desethylamiodarone. *Br J Pharmacol*, **92**: (1) 97-103.
- [7] Kashima, A., Funahashi, M., Fukumoto, K., Komamura, K., Kamakura, S., Kitakaze, M., Ueno, K. (2005) Pharmacokinetic characteristics of amiodarone in long-term oral therapy in Japanese population. *Biol Pharm Bull*, **28**: (10) 1934-8.
- [8] Adams, P.C., Holt, D.W., Storey, G.C., Morley, A.R., Callaghan, J., Campbell, R.W. (1985) Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation*, **72**: (5) 1064-75.
- [9] Brien, J.F., Jimmo, S., Brennan, F.J., Ford, S.E., Armstrong, P.W. (1987) Distribution of Amiodarone and Its Metabolite, Desethylamiodarone, in Human-Tissues. *Can J Physiol Pharm*, **65**: (3) 360-364.
- [10] Kim, J., Akbani, R., Creighton, C.J., Lerner, S.P., Weinstein, J.N., Getz, G., Kwiatkowski, D.J. (2015) Invasive Bladder Cancer: Genomic Insights and Therapeutic Promise. *Clin Cancer Res*, **21**: (20) 4514-24.
- [11] Maverakis, E., Cornelius, L.A., Bowen, G.M., Phan, T., Patel, F.B., Fitzmaurice, S., He, Y., Burrall, B., Duong, C., Kloxin, A.M., Sultani, H., Wilken, R., Martinez, S.R., Patel, F. (2015) Metastatic Melanoma - A Review of Current and Future Treatment Options. *Acta Derm-Venereol*, **95**: (5) 516-524.
- [12] Gross, S.A., Bandyopadhyay, S., Klaunig, J.E., Somani, P. (1989) Amiodarone and Desethylamiodarone Toxicity in Isolated Hepatocytes in Culture. *P Soc Exp Biol Med*, **190**: (2) 163-169.
- [13] Roth, F.C., Mulder, J.E., Brien, J.F., Takahashi, T., Massey, T.E. (2013)

- Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells. *Chem-Biol Interact*, **204: (3)** 135-139.
- [14] Varbiro, G., Toth, A., Tapodi, A., Bognar, Z., Veres, B., Sumegi, B., Gallyas, F., Jr. (2003) Protective effect of amiodarone but not N-desethylamiodarone on postischemic hearts through the inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther*, **307: (2)** 615-25.
- [15] Bognar, Z., Cseh, A.M., Fekete, K., Antus, C., Bognar, R., Tapodi, A., Ramadan, F.H.J., Sumegi, B., Gallyas, F., Jr. (2020) Amiodarone's major metabolite, desethylamiodarone inhibits proliferation of B16-F10 melanoma cells and limits lung metastasis formation in an in vivo experimental model. *PLoS One*, **15: (9)** e0239088.
- [16] Bognar, Z., Fekete, K., Antus, C., Hocsak, E., Bognar, R., Tapodi, A., Boronkai, A., Farkas, N., Gallyas, F., Jr., Sumegi, B., Szanto, A. (2017) Desethylamiodarone-A metabolite of amiodarone-Induces apoptosis on T24 human bladder cancer cells via multiple pathways. *PLoS One*, **12: (12)** e0189470.
- [17] Bognar, Z., Fekete, K., Bognar, R., Szabo, A., Vass, R.A., Sumegi, B. (2018) Amiodarone's major metabolite, desethylamiodarone, induces apoptosis in human cervical cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol*, **96: (10)** 1004-1011.
- [18] Himmel, H.M., Dobrev, D., Grossmann, M., Ravens, U. (2000) N-desethylamiodarone modulates intracellular calcium concentration in endothelial cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **362: (6)** 489-96.
- [19] Monni, L., Ghezzi, F., Corsini, S., Nistri, A. (2017) Neurotoxicity of propofol on rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Neurosci Lett*, **655:** 95-100.
- [20] Knowles, M.A., Hurst, C.D. (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, **15: (1)** 25-41.
- [21] Samatar, A.A., Poulikakos, P.I. (2014) Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, **13: (12)** 928-42.
- [22] Costa, C., Pereira, S., Lima, L., Peixoto, A., Fernandes, E., Neves, D., Neves, M., Gaiteiro, C., Tavares, A., Gil da Costa, R.M., Cruz, R., Amaro, T., Oliveira, P.A., Ferreira, J.A., Santos, L.L. (2015) Abnormal Protein Glycosylation and Activated PI3K/Akt/mTOR Pathway: Role in Bladder Cancer Prognosis and Targeted Therapeutics. *PLoS One*, **10: (11)** e0141253.

- [23] Ye, Q., Cai, W., Zheng, Y., Evers, B.M., She, Q.B. (2014) ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer. *Oncogene*, **33**: (14) 1828-39.
- [24] Garcia-Sanchez, A., Miranda-Diaz, A.G., Cardona-Munoz, E.G. (2020) The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, **2020**: 2082145.
- [25] Chinopoulos, C. (2020) Acute sources of mitochondrial NAD(+) during respiratory chain dysfunction. *Exp Neurol*, **327**: 113218.
- [26] Chinopoulos, C., Seyfried, T.N. (2018) Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN Neuro*, **10**: 1759091418818261.
- [27] Srinivasan, S., Guha, M., Kashina, A., Avadhani, N.G. (2017) Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1858**: (8) 602-614.
- [28] Ramadan, F.H.J., Szabo, A., Kovacs, D., Takatsy, A., Bognar, R., Gallyas, F., Jr., Bognar, Z. (2020) Involvement of Mitochondrial Mechanisms in the Cytostatic Effect of Desethylamiodarone in B16F10 Melanoma Cells. *Int J Mol Sci*, **21**: (19).
- [29] Panek, T., Elias, M., Vancova, M., Lukes, J., Hashimi, H. (2020) Returning to the Fold for Lessons in Mitochondrial Crista Diversity and Evolution. *Curr Biol*, **30**: (10) R575-R588.
- [30] Szabo, A., Sumegi, K., Fekete, K., Hocsak, E., Debreceni, B., Setalo, G., Jr., Kovacs, K., Deres, L., Kengyel, A., Kovacs, D., Mandl, J., Nyitrai, M., Febbraio, M.A., Gallyas, F., Jr., Sumegi, B. (2018) Activation of mitochondrial fusion provides a new treatment for mitochondria-related diseases. *Biochem Pharmacol*, **150**: 86-9
- [31] Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956, 124, 269–270.
- [32] LeBleu, V.S.; O'Connell, J.T.; Gonzalez Herrera, K.N.; Wikman, H.; Pantel, K.; Haigis, M.C.; de Carvalho, F.M.; Damascena, A.; Domingos Chinen, L.T.; Rocha, R.M.; Asara J.M.; Kalluri R. PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 2014, 16, 992–1003
- [33] Lin, C.S.; Liu, L.T.; Ou, L.H.; Pan, S.C.; Lin, C.I.; Wei, Y.H. Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* 2018, 39, 316–330.
- [34] Ashton, T. M.; McKenna, W. G.; Kunz-Schughart, L. A.; Higgins, G. S.,

Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. Clin Cancer Res 2018, 24, (11), 2482-2490.



Bognár Zita 1977-ben született Pécsen. 2002 óta dolgozik a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében, jelenleg egyetemi docens. Általános orvosi és MBA diplomákkal rendelkezik, PhD fokozatát 2007-ben szerezte, 2019-ben habilitált. PhD hallgatóként kezdett el foglalkozni az amiodaron és metabolitja biokémiai hatásaival, leírta direkt mitokondriális, valamint iszkémia-reperfúzió modellben mutatott hatásaikat. Jelenleg a dezetil-amiodaron tumor ellenes hatásának vizsgálatával foglalkozik, mely témában több Q1-es cikkel, valamint USA és EU szabadalommal rendelkezik.