

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat az
individualizált daganatellenes kemoterápiában**

Dr. Márkász László

**Témavezető:
Prof. Dr. Oláh Éva
egyetemi tanár
MTA doktora**

**Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Gyermecklinika
2007**

Bevezetés

Az agresszív, kombinált kemoterápia, az irradiációs kezelés, a megfelelő indikáció alapján elvégzett csontvelőtraszplantáció, a javuló szupportív terápia ellenére az akut lymphoid leukémiás gyermekek egy jelentős csoportját ma is elveszítjük egyrészt a terápiára nem reagáló alapfolyamat, másrészt az agresszív kemoterápia okozta csontvelő depresszió, s a következményes cytopenia okozta infekciók és vérzések miatt. A korszerű daganatellenes terápia célja ezért a túlélők számának további növelése és a túlélők életminőségének javítása egy hatásosabb, de a mainál kevésbé toxikus kezelés alkalmazásával. A terápia hatásossága a kezelés agresszivitásának növelésével már nem fokozható. A megoldást a kockázathoz adaptált, differenciált, individuális kezelés lehetőségének megteremtése jelentheti. E cél eléréséhez két lehetőség kínálkozik:

1. A tumorsejtek gyógyszerérzékenységének meghatározása, hatásos citosztatikumok és citosztatikum-kombinációk kiválasztása. Ebben nyújt segítséget a tumorsejtek *in vitro* gyógyszerérzékenységének vizsgálata, amelynek eredményei prognosztikai faktorként használhatók.
2. A másik lehetőség a terápia alatt jelentkező cytopenia kivédése, vagy a cytopeniás fázis lerövidítése, azaz a csontvelői regeneráció elősegítése. E téren kedvező tapasztalatokat szereztünk a csontvelői növekedési faktorok (granulocyte-colony stimulating factor G-CSF, granulocyte-macrophage-colony stimulating factor GM-CSF) használatával, de a megfelelő betegségek körének kiválasztása, a növekedési faktorok adásának optimális ideje és dózisének pontos meghatározása még vizsgálatokat igényel.

A daganatsejtek biológiai jellemzői, genetikai eltérései alapvetően befolyásolják a daganatok citosztatikum érzékenységét. Az azonos fenotípusú daganatok esetében is jelentős különbségek lehetnek a daganatok biológiai, genetikai jellemzőiben, így gyógyszerérzékenységében is. Ez a differenciált kezelés bevezetésének fontosságát húzza alá. A végső célt a beteg adott daganatának egyedi tulajdonságai alapján összeállított, egyénileg megválasztott, individualizált terápia jelentheti.

A jelen tanulmány célja egy olyan új gyógyszerérzékenységi teszt kifejlesztése, amelynek segítségével nagyszámú citosztatikum vizsgálható egyszerre kevés sejt felhasználásával. Három *in vitro* modellt dolgoztunk ki annak tanulmányozására, hogy az *in vitro* gyógyszerérzékenységi eredmények mennyiben alkalmazhatók a klinikai gyakorlatban, a terápiás protokollok továbbfejlesztésében, vagy új protokollok megalkotásában.

1. *In vitro* modellként lymphoblastoid sejtvonalakat (lymphoblastoid cell line, LCL) vizsgáltunk az EBV asszociált lymphoproliferatív betegségek gyógyszerérzékenységének tanulmányozására.
2. Vizsgáltuk az NK (natural killer) sejtek ölképességét citosztatikumok jelenlétében annak megállapítására, mely citosztatikumok befolyásolják az NK sejt-alapú immunterápiát együttes alkalmazás esetén.
3. Harmadik modellként a KG-1 myeloid leukémiás sejtvonalon tanulmányoztuk a granulocita kolónia stimuláló faktor (G-CSF) hatását leukémiás sejtek citosztatikum érzékenységére.

A poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegség (PTLD) és kezelési lehetőségei

A transzplantációt követően jelentkező malignus B-sejtes lymphomák a graft túléléséhez szükséges immunszuppresszív kezelés mellékhatásaként fejlődhetnek ki. A poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegségben (posttransplant lymphoproliferative disorder; PTLD), és az AIDS-hez társuló immunoblasztos lymphomában (AIDS related immunoblastic lymphoma; ARL) az esetek 90%-ában igazolható az Epstein-Barr vírus (EBV) szerepe. A PTLD mortalitása gyakran eléri az 50 %-ot. Az EBV a herpesvírusok családjába tartozik, fertőzést követően az egyén egész élete során perzisztál. A vírus által kódolt vírus-transzformációval kapcsolt fehérjék vezetnek a B lymphoblastok proliferációjához. Az EBV által transzformált sejtek kilenc, latenciával kapcsolt vírusfehérjét expresszálnak: EBNA1-6, LMP-1, -2A és -2B. Ezt a latencia programot hívják III-as típusú latenciának. Ugyanez a latencia program működik az *in vitro* proliferáló lymphoblastoid sejtvonalakban (lymphoblastoid cell lines; LCLs), amelyeket humán B-lymphocyták EBV fertőzésével hoznak létre. *In vitro* fertőzést követően és *in vivo* a primer fertőzés alatt maga az EBV felelős a humán B lymphocyták proliferációjáért. Az EBV által kódolt látens fehérjék ellen azonban *in vivo* erős T-sejt-mediált immunválasz lép fel. Az EBV-asszociált lymphoproliferatív betegség így csak a citotoxikus T-sejtek kompetens immunválaszának hiányakor alakulhat ki. Az immunszupprimált egyénekben kifejlődő EBV-asszociált lymphomák, a kísérletesen SCID (severe combined immunodeficiency disease) egérben EBV szeropozitív donorok lymphocytáival létrehozott lymphomák és az *in vitro* körülmények között tenyésztett LCL-ek fenotípusa hasonló. Mindhárom típus ugyanazokat a felszíni markereket, B sejt aktivációs antigéneket és adhéziós molekulákat hordozza. Mindhárom normál kariotípussal rendelkezik és ugyanazt a vírus-génexpressziós mintázatot mutatja. A PTLD kialakulásának kockázata függ a transzplantált szerv típusától, az immunszuppresszív kezeléstől, a beteg korától és az

átültetési EBV státusztól. A PTLD kezelésével kapcsolatban nincsenek multicentrikus kontrollált tanulmányok. A betegség terápiájában a következő eljárásokat alkalmazzák: immunszuppresszió csökkentése, antivirális terápia és kemoterápia. A B-sejt ellenes monoklonális antitestek használata hatásosnak bizonyult PTLD-ben, a figyelem a CD20 ellenes humanizált monoklonális antitest, a rituximab felé fordult. A terápiás válasz a rituximabhoz szemben 65%, ugyanakkor a relapszus ráta 18%. Azokban az esetekben, ahol a beteg nem reagál a fenti kezelési módokra, a kemoterápiát alkalmazzák. A leggyakrabban használt kemoterápiás sémák az antraciklint tartalmazó CHOP (cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin és prednison), a VAPEC-B (doxorubicin, etopozid, cyclophosphamid, methotrexat, bleomycin és vincristin), VACOP-B (cyclophosphamid, vincristin, bleomycin, prednison, növekvő dózisu doxorubicinnal és etopoziddal) vagy DHAP (cisplatin, cytosin-arabinosid, dexamethason). Az antraciklin alapu kombinált kemoterápián átesett betegek 69%-a kerül remisszióba. A PTLD esetén végzett kemoterápiás kezelésben a betegek mortalitása azonban a kezelés során jelentkező toxicitások miatt nagy, mivel azok a graft túlélését is hátrányosan befolyásolják. Az alacsonyabb koncentrációban is hatásos gyógyszerek, várhatóan kevesebb mellékhatást okoznak és a graft túlélését is kevésbé csökkentik.

NK sejtek alkalmazása citosztatikummal kombinált daganatellenes immunoterápiában

Az adjuváns immunterápia célja, hogy az effektor immunsejteket stimulálva, azok malignus sejteket pusztítsanak el, ezáltal javítva a gyógyulási esélyeket. Solid tumorokban az infiltráló gyulladásos sejtek jelenléte jól ismert jelenség. Több tanulmány is kimutatta, hogy a malignus tumorok NK sejt infiltrációja kedvezőbb betegségkimenettel társul. Az NK sejtek a szervezetben közvetlenül képesek elpusztítani a daganatsejteket és a vírussal fertőzött sejteket. Az NK sejt-célsejt közötti interakció kimenetelét a gátló és aktiváló szignálok finoman összehangolt egyensúlya határozza meg. Mivel az NK sejtek spontán módon képesek a tumor sejtek lízisére, a kutatók nagy erőfeszítéseket tettek azért, hogy az NK sejtek e hatását a daganat-ellenes terápiában hasznosíthassák. Az NK sejtek fejlődésének és működésének megismerése vezetett az NK sejtek ölképességén alapuló immunterápiás próbálkozásokhoz.. Ígéretesnek tűnt az az eljárás, amely során *in vitro* felszaporított allogén NK sejtklónok szuszpenzióját juttatták leukémiás betegekbe. Primer tüdő- és veserák terápiájában alkalmaztak magas vagy alacsony dózisu IL-2 kezelést magában vagy - a szervezeten kívül interleukin-2-vel (IL-2) aktivált, perifériás vérből szeparált - lymphocyttal és tisztított NK sejtekkel kombinálva. Solid tumoros és leukémiás betegekben kemoterápiával kombinálva

adtak alacsony dózisu IL-2-t NK sejtek aktiválására. A daganatellenes kemoterápia elnyomja az immunrendszer hatásos működését és szignifikánsan csökkenti az NK sejtek szintjét a vérben. Vannak olyan citosztatikumok, amelyek befolyásolják az NK sejtek aktivitását. A topoizoméráz gátlók esetében megfigyelték, hogy a targetsejteket e szerrel kezelve megnövekedett az NK sejt mediálta citotoxicitás. Ezzel szemben a mikrotubulus működése ellen ható szerek az NK sejtek aktivitását gátolhatják. Fontos ezért ismerni a kemoterápiás szerek NK sejtekre gyakorolt hatását minden olyan esetben, amikor a kemoterápiát és az NK sejt mediálta immunterápiát együttesen kívánjuk alkalmazni.

A G-CSF alkalmazása az akut leukémia adjuváns terápiájában

A gyermekkori malignus betegségek kb. 30%-át a leukémia adja. A gyermekkori leukémiák két legfontosabb típusa az akut lymphoid (ALL) és az akut myeloid leukémia (AML). A gyermekkori leukémia javuló gyógyulási eredményeihez az agresszív kemoterápia és a javuló szupportív terápia mellett a különböző biológiai modulátorok alkalmazása járult hozzá. Ugyanakkor az ALL-es betegek 20 %-át, az AML-es betegek 50%-át ma is elveszítjük a kialakult gyógyszerrezisztencia és/vagy az agresszív kemoterápia mellékhatásai miatt. A halálozás leggyakrabban a citopenia okozta vérzésekre és infekciókra vezethető vissza. A lázas neutropenia a jelenlegi kemoterápiás kezelés életveszélyes mellékhatása. Több tanulmány vizsgálta a kolónia stimuláló faktorok (CSF) hatását solid tumoros, ALL-es és egyes AML-es betegek neutropeniás időszakának lerövidítésére és a lázas időszak kivédésére, bizonyítani azonban nem sikerült, hogy a betegek teljes túlélését a növekedési faktorok kedvezően befolyásolnák. Napjainkban a hemopoetikus növekedési faktorokat, így a GM-CSF-et, az erythropoetint (Epo), és a G-CSF-et széleskörben alkalmazzák a klinikai gyakorlatban. A G-CSF a normál myeloid előalakok differenciálódását és proliferációját indukálja. Receptora a normál myeloid vonalakon expresszálódik, a megfelelő előalakok granulocytákkáérését serkenti, proliferációjukat indukálja és apoptózisukat gátolja. Az AML-es blasztok G-CSF-re adott in vitro válasza bizonyítást nyert, ezért a G-CSF használatát myeloid leukémiák kezelésében a gyermekonkológiában kontraindikáltnak tekintették. Kettős vak klinikai vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy a G-CSF adása nem indukálja a blasztok proliferációját AML-es betegekben. Ezekre az adatokra támaszkodva klinikai tanulmányokban alkalmazzák a G-CSF-et AML-ben neutropenia kivédésére és az úgynevezett „priming”-ra (a leukémiás sejtek szinkronizálása S-fázisban), hogy fokozzák a leukémiás sejtek S-fázis-specifikus gyógyszerek (cytarabin és fludarabin) iránti érzékenységet. Ugyanakkor leukémiás lymphoblastokon elméletileg nem várható a G-CSF stimuláló hatása,

mivel a lymphoid sejtek felszínén G-CSF receptor nem lévén, azok proliferációját és differenciálódását e citokin nem befolyásolja.

Jóllehet a növekedési faktorok hatása sejtszinten nem teljesen tisztázott, a G-CSF használata gyermekkori lymphoproliferatív betegségben a kemoterápia indukálta myelosuppressio kivédésére széles körben elterjedt. Néhány tanulmány arra világít rá, hogy egyes T- és B-sejtes ALL-es esetek, vagy bifenotípusos leukémia sejtek G-CSF receptorokat expresszálnak és reagálnak a külsőleg adott G-CSF-re. Ez alapján felmerül a kérdés, hogy a gyermekkori ALL lázas neutropeniájának szupportív kezelésében alkalmazott G-CSF kizárólag a normál myeloid sejtek szaporodásához vezet, vagy képes a leukémiás blasztsejtek szaporodásának indukciójára is. Az, hogy a G-CSF kezelés befolyásolja-e a blasztsejtek gyógyszerérzékenységét, ugyancsak megválaszolandó kérdés.

Célkitűzések

1. Új, nagyérzékenységű, automatizálható gyógyszerérzékenységi teszt kifejlesztése, amelynek segítségével nagyszámú citosztatikum hatását tudjuk egyszerre vizsgálni kevés sejt felhasználásával.
2. Vizsgálni kívántuk az Epstein-Barr vírus (EBV) által transzformált lymphoblastoid sejtek *in vitro* gyógyszerérzékenységét azzal a céllal, hogy a leggyakoribb, az EBV indukálta lymphoproliferatív betegségek kezelésére eddig még nem használt citosztatikumok közül kiválasszuk az *in vitro* hatásosnak bizonyuló gyógyszereket.
3. Vizsgálni kívántuk, hogyan befolyásolja a klinikumban leggyakrabban használt 29 citosztatikum az immunterápiában is alkalmazott NK (natural killer) sejtek ölképességét. Olyan szereket kerestünk, amelyek kemoterápiával kombinált NK sejtes immunterápia esetén is használhatóak, és a lehető legkisebb mértékben befolyásolják az NK sejtek ölképességét.
4. A G-CSF-citosztatikum kölcsönhatás tanulmányozására KG-1 myeloid leukémiás sejtvonalon vizsgáltuk, hogy befolyásolja-e, s ha igen, hogyan befolyásolja a leukémiás sejtek G-CSF előkezelése a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenységét. Az ALL és AML kezelésében széles körben használt daunorubicint apoptotikus hatása miatt választottuk a vizsgálatához.

Anyagok és módszerek

Lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenységének vizsgálata

Sejtvonalak és tenyésztési körülmények

Ebben a kísérletsorozatban tizenhét LCL sejtvonalat használtunk. A 980215, 031016, 040113, 051018, JAK, LP, LSZ, MIN, AF, GK, FUR, HA, VMB sejtvonalakat egészséges donorok normál B sejtjeinek *in vitro* fertőzésével hoztuk létre EBV B95.8 vírustörzset használva. Az LS sejtvonal egy EBV hordozó egészséges donor szeparált B sejtjeiből spontán kialakult LCL volt. Az IARC171-et egy Burkitt lymphomás beteg normál B lymphocytáinak fertőzésével hozták létre ugyancsak B95.8 vírustörzset használva. A TR LCL egy, a SAP gén mutációját hordozó XLP-ben (X linked lymphoproliferative disorder) szenvedő beteg B lymphocytáiból származott. Az IB4 LCL integrált EBV genomot tartalmazott. A sejttenyészetek fenntartásához 10% borjúsavóval (fetal calf serum, FCS) kiegészített IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) tápoldatot használtunk. A gyógyszerérzékenységi vizsgálatok alatt az LCL sejtvonalakat 20% FCS-el kiegészített IMDM-ben tenyésztettük.

Gyógyszerek

Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi vizsgálat elvégzéséhez 28 gyógyszert használtunk. A gyógyszereket 50% dimethyl sulfoxiddal (DMSO) hígítottuk és 50 nL mennyiségben tettük a 384 lyukú lemezre HDRT (high density replicator tool) fejen elhelyezett rozsdamentes acéltűk segítségével Biomek 2000 robotot (Beckman) használva. Ugyanezt a robotot használtuk a triplikátumokat és a gyógyszerenként négy koncentrációt (1x, 4x, 16x, 64x) tartalmazó törzslamezek elkészítéséhez, egy- és nyolccsatornás pipettafejek alkalmazásával. A lemezen a legmagasabb gyógyszerkoncentrációkat a fizikokémiaiilag maximálisan elérhető gyógyszerkoncentrációk 600-szoros hígításai adták meg (50nL gyógyszeroldat 30μL kísérleti végtér fogatban).

Fluoreszcens in vitro gyógyszerérzékenységi teszt

Az LCL vonalak *in vitro* gyógyszerérzékenységének meghatározását 3 napos kultúrákon végeztük 384 lyukú lemezek felhasználásával. Huszonnyolc gyógyszert vizsgáltunk négy koncentrációban triplikátumokat alkalmazva. Minden lyuk 3000 sejtet tartalmazott 30μL térfogatban. Három napos inkubálást követően az élő és elpusztult sejtek megkülönböztetéséhez VitalDye fluoreszcens festéket használtunk. Az élő és elpusztult sejtek

pontos számának meghatározásához egy, a stockholmi Karolinska Intézetben egyedileg összeállított automatizált lézer fluoreszcens konfokális mikroszkópot alkalmaztunk. A képeket a QuantCapture 4.0 számítógépes program segítségével rögzítettük, a képeken az élő és elpusztult sejtek számát a QuantCount 3.0 számolóprogram segítségével határoztuk meg. Mindkét programot OpenLab programhátteret használva a Karolinska Intézetben fejlesztették ki. Tizenöt kontrollként használt lyuk csak sejteket tartalmazott tápfolyadékkal és 50nL DMSO-val, öt lyuk csak tápfolyadékot és sejteket DMSO nélkül. A kétféle kontrollt összehasonlítva, DMSO által okozott toxikus hatást nem tapasztaltunk. A százalékos túlélés átlagát a tizenhét LCL sejtvonal túlélési átlagából határoztuk meg (MCS, mean cell survival).

NK sejtek citotoxicitásának vizsgálata citosztatikumok jelenlétében

Humán poliklonális primer NK sejtek nyerése perifériás vérből, alkalmazott tenyésztési körülmények

A poliklonális NK sejteket egészséges donorok teljes véréből kivont fehérvérsejt szuszpenzióból nyertük. A mononukleáris sejteket Lymphoprep™-en történt centrifugálással választottuk el. Az NK sejteket a többi mononukleáris sejttől mágneses gyöngyök felhasználásával negatív szelekcióval különítettük el a gyártó leírása szerint. A tisztított NK sejtek több mint 95%-a CD3⁻CD56⁺ fenotípusú volt. Az NK sejteket egy éjszakán át vagy egy héten keresztül 10% humán szérumot és 100 U/mL IL-2-t tartalmazó IMDM tápfolyadékban tenyésztettük. A kísérletekben nyolc primer NK sejt-izolátumot vizsgáltunk. Öt NK sejt-izolátumot 3-4 naponta IL-2-vel újból stimuláltunk összesen egy hétig, három NK sejt-izolátumot csak egy alkalommal stimuláltunk IL-2-vel 24 óráig keresztül. A kísérlet előtt minden izolátumot teszteltünk a CD3⁻CD56⁺ fenotípusra nézve.

Target sejtek, és tenyésztési körülmények

Az *in vitro* citotoxicitási tesztben targetsejtként K562 sejtvonalat használtunk. A targetsejteket 10% borjúsérummal kiegészített IMDM-ben tenyésztettük.

In vitro citotoxicitás teszt (új fluoreszcensen jelölt citotoxicitás teszt)

Vizsgálataink során a hagyományos ⁵¹Cr izotópot alkalmazó citotoxicitás teszt helyett az általunk kifejlesztett fluoreszcens módszert alkalmaztuk. Huszonkilenc gyógyszer különböző NK sejtizolátumok *in vitro* citotoxicitására kifejtett hatását vizsgáltuk 384 lyukú lapos aljú

lemezek felhasználásával. A gyógyszerek négy koncentrációjával triplikátumokban végeztük a vizsgálatot. Minden lyukat 20µL sejtszuspenzióval töltöttünk meg, ami 15000 NK sejtet tartalmazott. Az NK sejteket 20 órán keresztül inkubáltuk a gyógyszerek jelenlétében. A target sejteket (K562) fluoreszcens festékkel (CMFDA, CellTracker green) jelöltük a gyártó utasításai szerint. Következő lépésként 20µL 3000 target sejtet tartalmazó szuszpenziót adtunk ugyanannak a lemeznek a lyukaihoz (effektor:target arány, E:T; 5:1 volt). Az NK sejtekkel együtt öt órán át történő inkubációt követően az elpusztult sejteket pirosra festettük etidium-bromiddal. A mérés és az értékelés a korábban leírtakhoz hasonló módon történt, annyi különbséggel, hogy a rögzített képeken az elpusztult és élő targetsejtek pontos számát a CytotoxCount 3.0. programmal határoztuk meg. A targetsejtet akkor tekintettük elpusztultnak, ha pirosan és zölden is festődött egyszerre. A lemezen nyolc lyuk csak NK sejteket és K562 sejteket tartalmazott, gyógyszereket nem, ezek szolgáltak kontrollként az alap citotoxikus aktivitás meghatározására. Egy másik kontrollba (hasonló körülmények között) csak NK sejteket tettünk. Ahhoz, hogy ellenőrizhessük a gyógyszerek lehetséges rövid távú hatását a targetsejteken, a targetsejteket a gyógyszerekkel magukban is inkubáltuk öt órán keresztül. Az NK sejtek ölképességét (killing effectiveness; KE) a következő képlet segítségével határoztuk meg:

[elpusztult targetsejtek száma (ha ugyanaz a sejt piros és zöld egyszerre) / a targetsejtek összesített száma (zöld sejtek)] x 100%.

Ahhoz, hogy összehasonlíthatóvá tehessük egymással az egyes NK sejtek mérési értékeit, a következő képletet alkalmaztuk:

(KE gyógyszer jelenlétében / a kontroll lyukak KE értékének átlaga) x 100%.

Az átlagos ölképességet (mean killing efficacy; MKE) az összes NK vonal ölési képességének átlagából határoztuk meg. Azokat a sejteket, amelyek pirosra festődtek, de nem voltak zöldek, elpusztult NK sejteknek értékeltük. A gyógyszerek NK sejteken megfigyelhető citotoxikus hatásának mértékét (cytotoxic effect; CE) a következő képlettel számoltuk ki: **(elpusztult NK sejtek száma a gyógyszert is tartalmazó lyukban / a kontrollként használt lyukakban elpusztult NK sejtek számának átlaga) x 100%.**

Gyógyszerek

Az *in vitro* citotoxicitási tesztünkben 29 gyógyszert használtunk. A gyógyszerek közül 28-at rendszeresen használnak a humán gyógyászatban. A gyógyszeres lemezek a fentiekben bemutatott módon készültek. Az alkalmazott gyógyszerkoncentrációk a betegekben elérhető koncentrációknak megfelelő tartományban voltak. A hígítási sorok (1x, 5x, 25x, 125x) kezdő

koncentrációit a gyógyszerek oldhatósága határozta meg. A gyógyszeres lemezeket nagyszámú tumorvonalon teszteltük, annak bizonyítására, hogy minden gyógyszer hatásosan működik-e. Az egyes gyógyszerek AUC (area under the curve) értékeit *in vitro* és *in vivo* használt gyógyszerkoncentrációk összehasonlításához használhatjuk. Az erre a célra létrehozott RAUC (ratio of area under the curve) értéket az *in vitro* és *in vivo* AUC értékek hányadosaiból kaptuk meg:

$$\text{in vitro használt koncentráció } (\mu\text{g/mL}) \times 20 \text{ h} / \text{AUC } (\mu\text{g} \times \text{h/mL}) \text{ in vivo.}$$

Az egynél nagyobb RAUC érték azt jelzi, hogy az *in vitro* alkalmazott gyógyszerdózis magasabb, mint amit a klinikai gyakorlatban használnak. Ha a RAUC érték egy, az *in vitro* dózis megfelel az *in vivo* gyógyszerdózisnak.

G-CSF előkezelés hatása leukémiás sejtek daunorubicin érzékenységére

Sejtvonal és tenyésztési körülmények

Az AML-es és ALL-es sejtekkel *ex vivo* végzett kísérletek nehezen ismételhetőek meg ugyanabból a mintából. Léteznek ugyan ALL-es sejtvonalak, de ezek többségében myeloid markerek nem jelennek meg a sejtfelszínen, s nem ismert, hogy expresszálnak-e G-CSF receptort (G-CSFR). Mivel a KG-1 leukémiás sejtvonal myeloid markereket és G-CSFR-t is expresszál, jó *in vitro* modellként szolgálhat az AML-es és a G-CSF receptort expresszáló ALL-es blasztsejtek G-CSFR funkciójának tanulmányozására. Ezért vizsgáltuk ezen a sejtvonalon, a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenységének változását G-CSF előkezelést követően. A KG-1 sejtvonalat 20% FCS-el kiegészített IMDM-ben tenyésztettük.

Flow cytometria

A kísérletek alatt AIMV szérummentes lymphocytá tápfolyadékot használtunk IMDM helyett. A tápfolyadék váltásra a növekedési faktorok konstans szintjének biztosítása érdekében volt szükség. Miután a KG-1 sejteket 16 órán keresztül AIMV tápfolyadékban tartottuk (a 16 órás tenyésztést AIMV-ben a sejtek G-CSF iránti érzékenyítésére használtuk), 10ng/mL koncentrációban G-CSF-el stimuláltuk 48 órán keresztül, vagy a 48 órás G-CSF előkezelést követően hat óráig daunorubicinnel (2μg/mL) kezeltük. A kontroll mintákat 64 óráig tenyésztettük AIMV-ben. A sejteket két alkalommal mostuk fiziológiás sóoldattal, majd 0.5% BSA-val és 0.05% nátrium-aziddal kiegészített PBS-ben reszuszpendáltuk. A sejteket (3×10^5 /mL) fluoreszcens monoklonális antitest konjugátumokkal jelöltük, amelyek az alábbi

felszíni markerekre voltak specifikusak: CD11a, CD11c, CD34, CD58, CD86, HLA-DR, CD11b, CD114 (G-CSF-R), MDR-1. A kontroll mintákat ugyanazzal a fluorochrommal jelölt, izotípusukban egyező antitestekkel jelöltük. A felszíni markerek expressziójának szintjét direkt vagy indirekt immunfluoreszcens jelölést követően FACS Calibur flow cytométerrel mértük.

Immunoblot analízis

A KG-1 sejteket 16 órás AIMV-ben történt tenyésztést követően 3, 6 és 12 órán keresztül 10ng/mL G-CSF-el újra stimuláltuk. A kontroll mintákat 16 órán keresztül éhezettük AIMV-ben. Az inkubációkat követően a sejteket 4°C -os PBS-sel mostuk és 100µL RIPA pufferben lizáltuk jégen, majd szonikáltuk.

A sejtlyázátumok egészét felhasználtuk a Western blot analízisekhez. A sejtlyázátumok fehérjekoncentrációit BCA módszerrel határoztuk meg ELISA readert használva 540nm-en BSA standard alapján. Ahhoz, hogy a fehérjekoncentrációkat mg/mL-ben meghatározhassuk, az adatokat GraphPad Prism programmal analizáltuk lineáris regressziót használva. A fehérjéket nátrium dodecil sulfate-polyacrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el egymástól BioRad MiniProtean 10% vagy 12% acrilamidot tartalmazó géleken. A Western blot analízishez a mintákat RIPA pufferben oldottuk fel és 5x SDS mintapuffer hozzáadása után felforraltuk. A fehérjeminták Western blot analíziséhez a gélre sávonként 70µg fehérjét tettünk. A gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membrán blokkolására 5% zsírszegény tejpport és 0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS-t használtunk. A blokkolást követően a membránokat az első antitestekkel (anti- p44/p42 és anti-P-p44/42) együtt inkubáltuk 90 percig szobahőmérsékleten vagy 4°C-on egy éjszakán át, majd ezt követően a HRP-vel (horseradish preoxidase) konjugált második antitestekkel azonosítottuk az immunreakciókat. Az immunreakciókat felerősített kemiluminescenciával detektáltuk.

Metil-tiazol tetrazolium (MTT) teszt

A KG-1 sejtek gyógyszerrezisztenciáját MTT tesztel mértük. A KG-1 sejteket AIMV-ben tenyésztettük 16 órán keresztül, majd 96 lyukú lemezre tettük ki (80µL/lyuk, sejt koncentráció 5×10^5 /mL) és 10, 100 vagy 1000ng/mL G-CSF-el magában, daunorubicinnel magában vagy a kettőt együtt kombinálva 48 óráig inkubáltuk. A daunorubicint hat koncentrációban (0,002-2µg/mL) 6x hígítási lépésekben duplikátumokban használtuk. A kontroll mintákat 64 órán keresztül éhezettük AIMV-ben. A kontroll sejt túlélés meghatározásához hat lyuk csak

tápfolyadékot, a másik hat lyuk csak sejteket tartalmazott tápfolyadékban. A lyukakhoz 48 órát követően MTT-t adtunk, amit az élő sejtek színes formazánná alakítottak. A színintenzitást spektrofotométerrel 562nm-en mértük. Az optikai denzitás (OD) mértéke egyenesen arányos az élő sejtek számával. A citotoxicitást a lyukak háttér OD korrekciója után minden egyes gyógyszerkoncentrációban az alábbi képlet alapján határoztuk meg:

$(OD \text{ kezelt lyuk} / a \text{ kontroll lyuk átlag OD értéke}) \times 100 \%$.

Eredmények

A lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenysége

A különböző LCL sejtvonalak gyógyszerérzékenységi mintázata

A tizenhét tesztelt, LCL sejtvonal eltérő eredetű sejteket tartalmazott. Vizsgáltunk olyan sejtvonalakat, amelyeket már több éve folyamatosan *in vitro* kultúrában tartottak, valamint olyan transzformálódott B-sejt kultúrákat is, amelyeket *három héttel* a kísérlet előtt hoztak létre *in vitro* EBV fertőzéssel. A fertőzés a sejtvonalak nagy részében a B95.8 EBV törzzsel történt, néhány azonban spontán kinőtt vonal volt a donor saját vírusát hordozva. A sejtvonalak nagy része egészséges donorok normál B sejtjeiből származott, de használtuk egy XLP-ben szenvedő és egy Burkitt lymphomás beteg B-sejtjeiből transzformálódott LCL-t is. A különböző eredetű LCL-ek nagyon hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutattak.

A hatástalan és kifejezetten hatásos gyógyszerek kiválasztása

A gyógyszerek hígítási sorainak legmagasabb koncentrációit azok oldhatósága határozta meg. Az *in vitro* gyógyszerérzékenységi adatok összehasonlíthatóvá tételéhez a gyógyszerek terápiás $C_{\max}$ értékeit összehasonlítottuk az *in vitro* gyógyszerkoncentrációkkal. Kigyűjtöttük gyógyszerenként az irodalomban hozzáférhető maximálisan elérhető plazmakoncentrációkat ($C_{\max}$). A hígítási sorok gyógyszerkoncentrációit elosztva az adott gyógyszer $C_{\max}$ értékével a maximálisan elérhető plazmakoncentráció hányadosát kaptuk meg (ratio of maximum achieved plasma concentration, RMAPC). A sejtvonalak túlélési görbéinek átlagát az RMAPC értékek függvényében ábrázolva lehetővé vált az egyes gyógyszerek hatásosságának összehasonlítása. Hatásosságuk alapján az LCL-eken vizsgált gyógyszereket három csoportba osztottuk:

- 1. csoport:** Kifejezetten hatásosnak ítéltük a gyógyszert, ha az MCS 30% alatt, az RMAPC érték 0,3 vagy ez alatt volt. ($MCS < 30\%$, $RMAPC \leq 0,3$)

2. **csoport:** A gyógyszer részlegesen volt hatásos, ha az MCS 60% alatt volt és az RMAPC érték 0,3 és egy közé esett. (MCS < 60%, RMAPC: 0,3-1)
3. **csoport:** A gyógyszert hatástalannak tartottuk, vagyis az LCL-ek rezisztensek voltak a szerre, ha az MCS 60% fölé esett és az RMAPC érték nagyobb volt mint egy. (MCS > 60%, RMAPC > 1)

Vizsgálataink szerint az LCL-ek kifejezetten érzékenyek bizonyultak: **vincristinnel, paclitaxellel, methotrexattal, epirubicinnel** szemben (1. csoport).

A gemcitabint, cytosin-arabinosidot, doxorubicint, fluorouracilt, dactinomycint, docetaxelt, daunorubicint, etopozidot, vinorelbint csak részlegesen hatásosnak találtuk (2. csoport). A legtöbb LCL rezisztens volt cyclophosphamidra, aszparaginázra, topotecanra, oxaliplatinra, bleomycinre, 6-mercaptopurinra, hydroxyureára, cladribinre, chlorambucilra, carboplatinra, bortezomibra, cytarabinra, prednisolonra és vinblastinra (3. csoport). Ugyan a 3. csoportba tartozó gyógyszerek nem tűntek hatásosnak LCL-eken, más sejtvonalakon és primer tumorokon esetünkben dóziszfüggő növekedésgátlást észleltünk. Streptozotocin esetében nem tudtunk meghatározni RMAPC értéket, mivel nem találtunk C_{max} értéket meghatározó farmakokinetikai tanulmányt. A streptozotocin - a kísérletekben alkalmazott koncentrációban - nem befolyásolta a sejtek túlélését. RMAPC ugyancsak nem volt meghatározható MG132 esetében, mivel ezt a szert nem használják a klinikai gyakorlatban. Míg az MG132 a legmagasabb koncentrációkban hatásosan csökkentette a sejtek túlélését, a hasonló hatásmechanizmusú és klinikailag használt bortezomib nem bizonyult hatásosnak.

Citosztatikumok hatása NK sejtek citotoxikus működésére

A gyógyszerek hatása a különböző NK vonalak ölképességére

Nyolc egészséges donortól származó poliklonális NK sejt preparátumot és négy NK tumorvonalat vizsgáltunk az új fluoreszcens módszer segítségével. Az egyes sejtvonalak különböző eredetűek voltak és eltérő korú *in vitro* kultúrákból származtak. A vizsgálat egészséges donoroktól származó IL-2-vel stimulált *egy hetes in vitro* kultúraidejű NK vonalakat és frissen szeparált csak 24 órás kultúraidejű NK vonalakat is tartalmazott.

A különböző eredetű NK sejtek ölképessége gyógyszerenként nagyon hasonlóan változott meg. Az öt órás inkubációs időt követően a vizsgált gyógyszerek egyike sem befolyásolta a K562 targetsejtek életképességét. Az elpusztult NK sejtek száma magasabb volt azokban a gyógyszerkezelt kultúrákban, amelyeket *egy napig* tartottunk IL-2-vel kezelve, mint azokban amelyeket *egy hétig* kezeltünk IL-2-vel. Egyik NK sejt populáció sem mutatott az elpusztult sejtek számában dóziszfüggő növekedést. Ebből következik, hogy gyógyszerenként az NK

sejtek ölképességének dózisfüggő csökkenése nem magyarázható az NK sejtek gyógyszer indukálta pusztulásával.

A hatástalan és kifejezetten hatásos gyógyszerek meghatározása

Vizsgálataink alapján az NK-mediált citotoxicitást legkifejezettebben a következő gyógyszerek gátolták: chlorambucil, MG-132, docetaxel, cladribin, paclitaxel, bortezomib, gemcitabin, vinblastin. Az oxaliplatin, dactinomycin, cytarabin, daunorubicin, vincristin, topotecan kevésbé bizonyult hatásosnak. A legtöbb NK vonal ölképességét nem befolyásolták a következő szerek: bevacizumab, bleomycin, doxorubicin, epirubicin, vinorelbin, carboplatin, methotrexat, ifosfamid, etopozid, hydroxyure, azparagináz, fluorouracil, 6-mercaptopurin, streptozotocin, cyclophosphamid.

KG-1 sejt vonal daunorubicin érzékenységének változása G-CSF előkezelést követően

A G-CSF receptor jelenléte és aktiválódása a KG-1 sejteken

Flow cytometria segítségével igazolni tudtuk a G-CSF receptor jelenlétét a KG-1 myeloid sejteken. Ismert, hogy a G-CSF az ERK/MAP kináz útvonal aktiválódását idézi elő, amelyre a ERK/MAP kinázok izoformáinak foszforiláltságából következtethetünk. Azt, hogy a KG-1 sejteken található G-CSF receptorokat a G-CSF aktiválja-e, az ERK-1 (p44/p42 MAP kináz) foszforiláltsági szintje változásának követésével -Western blot analízissel- ítéltük meg. G-CSF kezelést követően az ERK-1 össz mennyisége csökkent. A kezeltetlen mintában foszforilált ERK-1 nem volt detektálható, de *három óras* G-CSF kezelést követően a foszforilált ERK-1 (P-ERK-1) megjelent. *Hat óras* G-CSF kezelést követően a P-ERK-1 szintje tovább növekedett és a megnövekedett foszforiláltsági állapot 12 órát követően is megmaradt.

A daunorubicin és G-CSF hatása a KG-1 sejtekre

A G-CSF önmagában egyik koncentrációban (10, 100, 1000ng/mL) sem változtatta meg a KG-1 sejtek túlélését, a sejtek viszont érzékenyek bizonyultak a daunorubicin alkalmazott koncentrációival szemben. Az AIMV vagy az IMDM tápfolyadékok használatakor nem észleltünk különbséget az érzékenységi mintázatban. A sejteket G-CSF-el és daunorubicinnel együtt kezelve dózisfüggő jelenséget észleltünk: a KG-1 sejtek G-CSF-el történt előkezelését követően túlélés-növekedést figyeltünk meg a legmagasabb daunorubicin koncentráció esetében (2µg/mL). Érdekes, hogy a túlélés-növekedés a legalacsonyabb koncentrációjú G-CSF előkezelést (10ng/mL) követően sokkal kifejezettebb volt. A sejtek G-CSF előkezelését

követően az alacsony koncentrációjú daunorubicin kezelés következményeként az élő sejtek száma kb. 20%-al több volt a kontrollhoz képest.

A felszíni markerek expressziójának változása G-CSF és daunorubicin kezelést követően

Flow cytometriával vizsgáltuk a különböző felszíni markerek expressziójának változását annak eldöntésére, hogy a G-CSF jelenlétében megfigyelhető daunorubicin rezisztencia magyarázható-e a leukémiás sejtek differenciálódásával. A hatásos G-CSF koncentráció (10ng/mL) önmagában egyik vizsgált marker expressziójának szintjét sem változtatta meg. A magas koncentrációjú daunorubicin (2µg/mL) kezelés azonban minden vizsgált marker expresszióját lecsökkentette. G-CSF előkezelést követően a daunorubicin hatására a CD11a expressziójának szintje a többinél sokkal kifejezettebben csökkent.

Megbeszélés

Az epirubicin és paclitaxel hatásos gyógyszerek lehetnek a PTLD és egyéb EBV indukálta lymphoproliferatív betegségek kezelésében

Eredményeink azt mutatják, hogy az EBV-transzformált lymphoblastoid sejtvonalak gyógyszerérzékenységi mintázata a sejtek eredetétől függetlenül megegyezik. Ez a mintázat nem változik az eltérő korú sejtvonalak esetében sem. Úgy tűnik, hogy az EBV nemcsak *szükséges* hanem *elegendő* etiológiai tényező ahhoz, hogy immunszupprimált egyénekben a malignus immunoblastos B-sejtes lymphoproliferatív betegség megjelenjen. Ezen esetek mindegyikében az EBV által kódolt latencia-asszociált vírusfehérjék irányítják a sejtprolifерációt anélkül, hogy egyéb nyilvánvaló genetikai változás szükséges lenne. Ezeknek a daganatoknak a fenotípusa nagyon hasonlít az *in vitro* növekvő LCL-ekéhez, és azokhoz a kísérletesen létrehozott tumorokhoz amelyeket LCL-ek SCID egerekbe történő intraperitoneális inokulációjával kapunk. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a PTLD-k, az AIDS-hez társuló központi idegrendszeri lymphomák és az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségek hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutathatnak az általunk vizsgált nagyszámú és különféle LCL-ekkel. Vizsgálataink szerint az LCL-ek különösen érzékenyek a mikrotubulus ellenes szerekre és az antraciklinekre. Noha mindkét említett csoport gyógyszerei mindegyik LCL-en dóziszfüggő sejtpusztulást okoztak, csak a vincristin, a paclitaxel, az epirubicin illetve a doxorubicin bizonyult hatásosnak, ha az *in vitro* használt gyógyszerkoncentrációkat a legmagasabb elérhető plazmakoncentráció értékekkel (RMAPC) hasonlítottuk össze.

Kísérletünkben az alkiláló szerek, mint a cyclophosphamid és ifosphamid nem okoztak sejtpusztulást az LCL-eken. Ez azzal a ténnyel magyarázható, hogy önmagában egyik gyógyszer sem aktív és mindkét gyógyszert a máj konvertálja aktív metabolittá. A prednisolon okozott ugyan sejtpusztulást, de csak igen magas koncentrációkban. A vincristin és a methotrexat szerepelnek a gyakran használt CHOP és VAPEC protokollokban, de nincs irodalmi adat az epirubicin és a paclitaxel PTLD-ben vagy egyéb EBV indukálta lymphoproliferatív betegségben való alkalmazásáról. Eredményeink alapján *feltételezzük, hogy hasznos lenne az epirubicin és a paclitaxel beépítése a PTLD kezelésére használt protokollokba.*

Az NK sejt alapú immunterápiával kombinálható citosztatikumok

Korábbi tanulmányokban az NK mediált citotoxicitás mértékét targetsejtek citosztatikummal történt előkezelését követően tanulmányozták vagy az NK sejteket kemoterápiás szerekkel kezelve vizsgálták azok tumorsejtölő képességét. Nem végeztek azonban nagyszámú citosztatikumra kiterjedő vizsgálatot. Munkánk során különböző citosztatikumok jelenlétében vizsgáltuk az NK sejtek ölökéességét. Az IL-2-vel aktivált NK sejteket 20 órán keresztül előkezeltük a gyógyszerekkel, annak érdekében, hogy a citosztatikumok hatását csak az NK sejteken teszteljük. Ezt követően az NK sejteket a targetsejtekkel inkubáltuk öt órán keresztül. A targetsejtek túlélését a gyógyszeres előkezelés nem befolyásolta, de az NK sejt targetsejteken bekövetkező ölökéességére gyakorolt hatás nem zárható ki. A kísérleti eredményeink azt igazolják, hogy az IL-2-vel aktivált NK sejtvonalak azonos gyógyszerérzékenységi profilt mutatnak. Ez a mintázat nem változik az *in vitro* IL-2 kezelés tartamának változtatásával sem. A topotecan, a 6-mercaptopurin és a bleomycin nem gátolták hatásosan az NK sejtek ölökéességét még nagyon magas AUC értékeknél sem. Carboplatin, methotrexat és dactinomycin esetében nem észleltünk hatást, aminek az lehet a magyarázata, hogy a sejtkultúrák viszonylag alacsony RAUC értékű kezelésnek voltak kitéve. A chlorambucil viszont hatásosan gátolta az NK sejtek ölökéességét, ugyanakkor más alkiláló szer esetében (cyclophosphamid, ifosphamid) ez a hatás nem volt megfigyelhető. Ez azzal függhet össze, hogy az utóbbi két szer önmagában inaktív, *in vivo* a májenzimek alakítják át őket aktív metabolittá. A chlorambucil hatásosságát magyarázhatják a magas RAUC értékek. A többi hatásos gyógyszer *in vitro* dózisa (*in vitro* AUC értékek) megközelítette a klinikailag alkalmazott dózisokat. A cladribin volt kísérletünkben az egyetlen a bázisanalogok közül, amely szignifikánsan csökkentette az IL-2-aktivált NK sejtek ölökéességét. Sikerült

kimutatnunk, hogy az NK sejtek kifejezetten érzékenyek a mikrotubulusokra ható szerekre és a proteaszóma gátlókra. Az NK sejt-mediált citotoxicitás mikrotubulus hálózattól függése jól ismert. Kimutattuk, hogy a különböző típusú mikrotubulus gátlók különböző mértékben gátolják az NK sejtek ölképességét. A vinorelbinnek és a vincristinnek sokkal kisebb volt a hatása az NK sejtek közvetítette sejtölésre, mint a vinblastinnak, docetaxelnek vagy paclitaxelnek. Az NK sejtek proteaszómáinak kimotripszin aktivitása szerepet játszhat a sejt-mediált citotoxicitásukban. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a proteaszóma inhibitorok még apoptózis indukció hiányában is képesek hatásosan gátolni az NK sejtek ölképességét. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy *azok a kemoterápiás protokollok, amelyek proteaszóma inhibitorokat vagy mikrotubulus gátló szereket tartalmaznak, egyidejű alkalmazás esetén csökkenthetik az NK sejt immunterápia hatásosságát.* Mivel az aszparagináz, bevacizumab, bleomycin, doxorubicin, epirubicin, etopozid, 5-fluorouracil, hydroxyurea, streptozotocin és 6-mercaptopurin esetében még magas RAUC értékek mellett sem észleltünk az NK mediált ölképességre kifejtett kifejezett hatást, véleményünk szerint ezek kombinálhatók hatásosan NK sejt adjuváns terápiával. Eredményeink a jövőben felhasználhatóak lehetnek az NK sejt alapú adjuváns immunterápiás protokollok megtervezéséhez.

G-CSF csökkentheti a myeloid markereket hordozó leukémiasejtek daunorubicin érzékenységét

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a G-CSF sejtuszuppenzióban a KG-1 leukémia sejt citosztatikum-érzékenységét. Azok az akut lymphoblastos leukémia sejtek, amelyek G-CSF receptort hordoznak a felszínükön, gyakran myeloid markereket is expresszálnak. Ezért a KG-1 myeloid leukémiás sejtvonal jó in vitro modellnek tűnt, nemcsak AML, hanem a fent említett speciális típusú ALL esetében is a G-CSF hatásának tanulmányozására. Kísérletünkben a KG-1 sejtek G-CSF és viszonylag magas koncentrációjú daunorubicin kombinált kezelését követően a KG-1 sejtek túlélés-növekedését figyeltük meg. A G-CSF önmagában nem változtatta meg a leukémiás sejtek túlélését, azonban alacsony koncentrációjú daunorubicin jelenlétében azonban a sejtek észlelhető túlélését okozta. Kísérletünkben a daunorubicin az MDR-1 (multidrug resistance protein-1) jelentős sejt felszíni csökkenését okozta, ami azt sugallja, hogy a gyógyszerrezisztencia nem magyarázható ezen gyógyszer efflux-pumpa hatásával. A G-CSF molekula G-CSF receptorhoz kötődése granulocita irányú differenciálódást okoz és az ERK-1/2 enzimek gyors és tartós aktiválódását eredményezi. KG-1 sejtekben G-CSF kezelését követően a foszforilált ERK-1/2 szint emelkedését figyeltük meg, amely a G-CSF receptorok aktiválódását bizonyította.

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a G-CSF kezelés eredményeképpen létrejövő feltételezett sejt differenciálódást, a KG-1 sejteken néhány más felszíni marker expresszióját is vizsgáltuk. Azoknak a molekuláknak az expressziója, amelyeket a KG-1 myeloid sejtek felszínén vizsgáltunk, bizonyítottan a monocyták makrofággá történő differenciálódása alatt változnak. A daunorubicin önmagában minden vizsgált marker expresszióját csökkentette. A sejteket G-CSF-el és daunorubicinnel együttesen kezelve a CD11a expressziós szintjének még kifejezettebb csökkenését mértük. A CD11a lymphocita funkcióhoz kötött antigén-1 α -nak felel meg (lymphocyte function-associated antigen-1 α ; LFA-1 α vagy CD11a), az egyetlen integrin, amely mindegyik leukocita vonalon expresszálódik. Kulcsfontosságú adhéziós molekulaként az immun és gyulladásos folyamatokban vesz részt, és egyben jelátvivő molekulaként is működik. Az LFA-1 expresszió és funkció a sejtaktiválódás és a differenciálódás stádiumától függ. Ismert, hogy a c-myc onkogén B lymphoblastoid sejteken az LFA-1 transzkripció és poszttranszkripció faktor downregulálódását okozza. Monocyták makrofágokká differenciálódása a CD11a molekula expressziójának csökkenésével jár. Azt is kimutatták, hogy a G-CSF túlélési szignálokat biztosít a sejt számára az apoptotikus útvonalak szuppressziójával a p21ras/MAP kináz szignalizációs útvonalon keresztül és a BCL-2 antiapoptotikus fehérje szintjének emelésével. Eredményeink azt mutatják, hogy a G-CSF és a daunorubicin együtt szinergista módon csökkenthetik a CD11a szintjét. A fentiek alapján elképzelhető, hogy a *daunorubicin által okozott differenciálódási hatás a G-CSF által előidézett antiapoptotikus szignállal párosulva a sejtek túlélését és gyógyszerrezisztenciáját fokozhatja*. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a G-CSF alkalmazása potenciális veszélyt jelenthet lázas neutropeniás ALL-es betegek azon eseteiben, amikor az ALL-es blasztok myeloid markereket és G-CSFR-t is hordoznak felszínükön, és a beteget párhuzamosan daunorubicinnel kezelik. A fentiekben leírtak értelmében a G-CSF klinikai alkalmazása ALL-ben individuális megítélést tesz szükségessé. Másrésről (annak ellenére, hogy az indukciós terápiát követően adott G-CSF AML-es betegekben nem okoz blaszt proliferációt) nem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy az AML-es betegek adjuváns terápiájában alkalmazott G-CSF daunorubicinnel szembeni rezisztenciát okozhat.

Legfontosabb eredmények és megállapítások:

1. Új in vitro gyógyszerérzékenységi tesztet fejlesztettünk ki, amely nagyszámú gyógyszer együttes vizsgálatára ad lehetőséget kevés sejt felhasználásával.
2. Megfigyelésünk alapján, miszerint az epirubicin és a paclitaxel hatásos szernek bizonyultak lymphoproliferatív sejtvonalakon, javasoljuk e szerek alkalmazását a PTLD kezelésére használt kemoterápiás protokollokban.
3. Kísérleti rendszerünkben az aszparagináz, bevacizumab, bleomycin, doxorubicin, epirubicin, etopozid, 5-fluorouracil, hydroxyurea, streptozotocin és 6-mercaptopurin nem befolyásolja jelentősen az NK sejtek ölképességét, így ezek a gyógyszerek hatásosan kombinálhatóak lehetnek NK sejt alapú immunterápiával.
4. A G-CSF használata kockázatos lehet azokban a daunorubicinnel kezelt ALL-es betegekben, akiknek leukémiás sejtjei myeloid markereket és G-CSFR-t hordoznak a felszínükön.
5. AML-es betegekben a lázas neutropenia megelőzésére, vagy „priming” céljából használt G-CSF a blasztsejtek daunorubicinnal szembeni rezisztenciáját okozhatja.

Összefoglalás

A malignus betegségben szenvedők kezelési eredményeinek további javítása a jövőben a terápia agresszivitásának növelése helyett egyre inkább az egyénre szabott, individualizált terápiától várható. A daganatos betegségek ugyanis sokkal heterogénebbek annál, ahogy azt a jelenlegi terápiás besorolásuk tükrözi. Az in vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálatok segítségével meghatározott hatásos citosztatikumok alkalmazása javíthatja a betegség kimenetelét. Az EBV által indukált lymphoproliferatív betegségek kemoterápiájára leggyakrabban non-Hodgkin lymphoma protokollokat alkalmaznak és nincsenek erre a betegségcsoportra specifikusan kiválasztott citosztatikumok. A lymphoblastoid sejtvonalak (LCL) a poszttranszplantációs lymphoproliferatív betegség (PTLD) jó in vitro modelljéül szolgálnak, ezért munkánk során tizenhét LCL sejtvonal in vitro gyógyszerérzékenységét vizsgáltuk. Az élő és elpusztult sejtek pontos számát automatizált lézer konfokális fluoreszcens mikroszkóp segítségével határoztuk meg. Az LCL-ek eredetüktől függetlenül nagyon hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot mutattak a huszonkilenc klinikumban gyakran használt citosztatikummal szemben. Az LCL-ek kifejezetten érzékenyek bizonyultak vincristinnel, methotrexattal, epirubicinnel és paclitaxellel szemben. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a PTLD kezelésére használt kemoterápiás protokollokban az epirubicin és paclitaxel alkalmazása indokolt lehet. Meghatároztuk huszonnyolc gyakran alkalmazott citosztatikumnak az NK sejtek ölőképességére kifejtett hatását. Eredményeink azt mutatták, hogy a következő citosztatikumok csökkentették az NK sejtek tumorsejt ölőképességét azok életképességének csökkenése nélkül: vinblastin, paclitaxel, docetaxel, cladribin, chlorambucil, bortezomib, MG-132. Más gyógyszerek viszont az in vivo maximálisan elérhető gyógyszerdózisnál magasabb értékek esetén sem befolyásolták az NK sejtek ölőképességét. Eredményeink arra utalnak, hogy az aszparagináz, a bevacizumab, a bleomycin, a doxorubicin, az epirubicin, az etopozid, az 5-fluorouracil, a hydroxyurea, a streptozocin és a 6-mercaptopurin hatásosan kombinálhatók az NK sejt-alapú adjuváns immunterápiával.. MTT tesztet alkalmazva vizsgáltuk a G-CSF hatását a leukémiás sejtek daunorubicin érzékenysége. A KG-1 myeloid leukémiás sejtek a daunorubicinnel szembeni rezisztenciája kifejezett növekedést mutatott G-CSF előkezelését követően. Ez az AML és a gyermekkori ALL adjuváns terápiájaként alkalmazott G-CSF használatának kockázatára hívja fel a figyelmet. Értekezésemben az in vitro gyógyszerérzékenységi teszt klinikai alkalmazásának néhány módját kívántam bemutatni. A ritka malignus betegségekben és az előrehaladott tumoros megbetegedésekben - az esetek kis száma miatt – nem állnak rendelkezésünkre multicentrikus randomizált tanulmányokkal alátámasztott hatásos

kemoterápiás protokollok. Az in vitro gyógyszerérzékenységi teszt alkalmazása ezen daganatos betegségek esetében új citosztatikum megválasztásában, hatásos protokollok kifejlesztésében nyújthat segítséget.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Oláh Éva professzor asszonynak aki bevezetett a kutatómunka izgalmas világába, köszönöm a Karolinska Intézet professzorának Dr. Székely Lászlónak, aki a stockholmi munkám közvetlen irányítójaként segített. Mindketten nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a munkaterv, a kéziratok és a Ph.D dolgozat megszületésében, Hálás vagyok Dr. Erdődi Ferenc, Dr. Rajnavölgyi Éva, Dr. Szöllősi János profeszoroknak, akik javaslataikkal, érdemi megjegyzéseikkel sokban hozzájárultak munkám sikeréhez. Köszönöm Dr. Kiss Csongor professzor úrnak, hogy Ph.D munkám kezdetén a DE OEC Gyermekklinika Hematológia Osztályán nyújtott segítségét. Továbbá köszönetet mondok szerzőtársaimnak, különösen Dr. Stuber Györgynek, Skribek Henriettenek, Emilie Flabergnek, a Gyermekklinika és a Genetika Laboratórium minden munkatársának, kiemelten Dr. Balogh Erzsébetnek, Dr. Ujfalusi Anikónak és Bessenyei Beátának, akik mindig támogattak kutatómunkámban. Végül köszönöm a kitartást feleségemnek, családomnak, akik a háttérrel biztosították munkám alatt.

Közleménylista

Az értekezést megalapozó közlemények jegyzéke (IF az ISI 2005 alapján)

Márkász L, Stuber G, Flaberg E, Gustafsson Jernberg A, Eksborg S, Oláh É, Skribek H,

Székely L: Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B cells. *BMC Cancer* 2006, 6(1):265. **IF: 1,99**

Márkász L, Stuber G, Vanherberghen B, Flaberg E, Oláh É, Carbone E, Eksborg S, Klein E, Skribek H, Székely L: Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007, 6:644-654. **IF: 5,17**

Márkász L, Hajas G, Kiss A, Lontay B, Rajnavölgyi É, Erdődi F, Oláh É: Granulocyte Colony Stimulating Factor increases drug resistance to daunorubicin and induces

proliferation of leukaemic blast cells. *Pathology and Oncology Research* 2007, (elfogadva). **IF: 1,16**

Az értekezés témájában tartott előadások

Márkász L, Hajas Gy, Bessenyei B, Balogh E, Rajnavölgyi É, Oláh É: Citokinek és citosztatikumok interakciójának meghatározására szolgáló in vitro módszer. *Magyar Gyermekorvosok Társasága Nagygyűlése*, Szeged, 2003.

Márkász L, Hajas Gy, Rajnavölgyi É, Oláh É: Citosztatikum-G-CSF kombináció stimuláló és/vagy gátló hatásának vizsgálata myeloid sejtvonalon és ALL-es blasztokon. *Fiatal Gyermekgyógyászok Országos Találkozója*, Szeged, 2004.

Márkász L, Stuber Gy, Flaberg E, Skribek H, Oláh É, Székely L: In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat alkalmazása az individualizált daganatellenes terápiában. *Fiatal Gyermekgyógyászok VII. Konferenciája*, Miskolc 2007.

Márkász L, Stuber Gy, Flaberg E, Skribek H, Oláh É, Székely L: In vitro gyógyszerérzékenységi vizsgálat alkalmazása az individualizált daganatellenes terápiában. *Magyar Gyermekorvosok Társasága országos Nagygyűlése*, Székesfehérvár 2007.

Az értekezés témájában bemutatott poszterek

Márkász L, Jakab Zs, Kiss Cs, Balogh E, Hajas Gy, Rajnavölgyi É, Oláh É: Examination of stimulating and/or inhibiting effect of G-CSF on daunorubicin-sensitivity of KG-1 myeloid cell line. *6th International Symposium and Expert Workshops on Leukemia and Lymphoma*, Amsterdam, 2005.

Márkász L, Stuber Gy, Flaberg E, Gustafsson Jernberg A, Eksborg S, Oláh É, Skribek H, Székely L: Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B-cells measured by automated laser confocal microscopy. *GTCbio's Assay Development & High Throughput Screening conference*, San Francisco, 2006.