

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Emlőtumorok kombinált terápiájának újabb lehetőségei

Zsebik Barbara

Témavezető: Dr. Vereb György



Készült a Debreceni Egyetem Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek doktori programja keretében

BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET

DEBRECEN, 2006

1. BEVEZETÉS

A tumorok hatékony kezelése a klinikum egyik kritikus problémája. Jelenleg számos módszer (kemo-, radio- és sebészeti terápia) áll rendelkezésre a daganatok gyógyítására, azonban önmagukban ritkán mutatnak kellő hatékonyságot, és mellékhatásaik is számottevőek lehetnek.

A tirozinkináz aktivitással bíró EGF receptorcsalád egyik tagja az ErbB2 fehérje, mely az epidermális eredetű emlőtumорок 30%-ában fokozott mértékben fejeződik ki a sejtek felszínén. Az ErbB2-t túlzott mértékben kifejező emlőtumорок prognózisa kifejezetten rossz, ugyanakkor az ektópiásan kifejezett ErbB2 fehérje molekuláris terápiaк kiváló célpontja lehet. Az egyik elterjedt, az ErbB2 ellen irányuló szer egy humanizált antitest, a trastuzumab (Herceptin). Sajnos, a jó klinikai eredmények ellenére gyakori vele szemben mind a primer, mind a másodlagosan kialakuló rezisztencia, melynek mechanizmusa(i) részleteiben nem ismertek. A trastuzumab-rezisztencia okainak tanulmányozására viszonylag rövid ideje áll rendelkezésre a JIMT-1 *in vitro* tenyésztethető rezisztens sejtvonал. Munkánk első részében ezen JIMT-1 sejtvonал, és a már ismert, trastuzumab-szenzitív SKBR-3 emlőtumor sejtvonал *in vitro* összehasonlítását végeztük, a trastuzumab rezisztencia hátterében álló molekuláris kölcsönhatásokat, valamint a Hsp90-dajkafehérje inhibitor 17-AAG-t (17-allilamino-17-dimetoxi-geldanamycin) lehetséges proliferációgátló szerepét vizsgálva. Ez utóbbi egy anzamicin származék, mely gátolja a receptor stabil konformációjának internalizáció utáni visszaalakulását, így elvileg potencírozhatja a trastuzumab hatását.

Az immun- és inhibitor terápiaк kívül a fényterápiaк is nagy hatékonysággal alkalmazzák az emlődaganatok kezelésében. A fotodinámiás terápia (PDT) egy olyan fényterápiaк eljárás, ahol a daganatos sejtekben felhalmozódott fotoérzékenyítőt specifikus hullámhosszúság tartományban (általában vörös, ill. infravörös) fénnel világítják meg. Az abszorbeált fotonoknak köszönhetően a fotoszenzitizáló molekulák gerjesztett állapotba kerülnek, ahol könnyen reakcióba lépnek oxigénnel, valamint különféle biomolekulákkal. A reakciókban képződött szinglett oxigén, illetve más szabadgyököк a daganatos sejtek pusztulását okozzák. A fotodinámiás terápia – tekintve, hogy a fotoszenzitizáló ágens feldúsulása a daganatsejtekben nem tökéletesen szelektív – mellékhatásokat okozhat, így célszerű olyan kiegészítő kezeléseket kipróbálni, melyek a PDT-vel szinergista hatásúak. Munkánk során egy patkány eredetű emlőtumort *in vivo* patkány modellben vizsgálva a fotodinámiás terápiaк cisztein proteínázokat gátló (CPI) cisztatinnal kombináltuk. A tojásfehérjéből izolált cisztatin az extracelluláris mátrix komponenseinek bontásában

résztevő katepszin B és L működését gátolja, így várhatóan a metasztázis képződés csökkentésével javítja a PDT hatását.

Az emlődaganatok sejtfelszínén kifejeződő ErbB2 receptor, mint terápiás target

A tirozinkináz aktivitással bíró EGF-receptor család egyik tagja az ErbB2 fehérje, mely az epidermális emlőtumrok 30 %-ában fokozott mértékben fejeződik ki a sejtek felszínén. Ez a 185 kDa tömegű molekula – a család többi tagjához (ErbB1, ErbB3 és ErbB4) hasonlóan – hajlamos a receptorcsaládhoz tartozó további fehérjékkel di-, ill. oligomereket képezni. A kölcsönhatásba került receptorok transzfoszforilálódnak, aktiválódnak, foszfortirozin oldalláncaikon jelátviteli kaszkádokat indítanak, s végeredményben a sejtek proliferációját, ill. túlélését segítik elő. Az ErbB2-t túlzott mértékben kifejező emlőtumrok sejteinek fokozott a proliferációs készsége, TNF α -val szembeni rezisztenciája, VEGF szekréciója, valamint motilitása, viszont adhéziós képességük csekély. Emiatt az ErbB2 pozitív emlőtumrok prognózisa kifejezetten rossz. Ugyanakkor, mivel az ErbB2 a felnőtt szervezet viszonylag kevés szövetében, és alacsony szinten fejeződik ki normális körülmények között, az ErbB2 fehérje molekuláris terápia kiváló célpontja.

Az első, szolid tumorok kezelésére kifejlesztett humanizált antitest is az ErbB2 ellen irányult: a trastuzumab (Herceptin) az egér eredetű 4D5 jelű antitest variábilis régiójának antigénkötő szekvenciáját tartalmazza. Bár a trastuzumab – különösen kemoterápiával (antraciklin, doxorubicin, vagy Paclitaxel) kombinálva jó klinikai eredményeket ad, gyakori a primer rezisztencia, és a kezdetben érzékeny tumorok kezelése során is sokszor megszűnik a trastuzumab hatékonysága. A rezisztencia mechanizmusa(i) részleteiben nem ismert(ek), mint ahogy szenzitív tumorok esetén a hatásmechanizmus sem, azonban feltételezhető, hogy a receptor aktiváció és internalizáció, ill. azok hiánya mindkét esetben fontos szereppel bír.

A jelátviteli folyamatokban internalizálódott ErbB2 receptorok recirkulációjában a stresszfehérjék csoportjába tartozó Hsp90 dajkafehérje aktívan részt vesz. A membránról lefűződő fehérjéhez kötődve segít a harmadlagos és negyedleges szerkezet visszaalakításában, minek köszönhetően a receptor ismét a sejtfelszínre jut. Ez a recirkulációs folyamat hozzájárul az ErbB2 receptorok magas sejtfelszíni koncentrációjához, ami fokozhatja az ErbB2 homodimerek, és más ErbB fehérjékkel alkotott heterodimerek arányát, általuk proliferációs és túlélési útvonalakat aktiválva.

A Hsp90-dajkafehérje gátlására általában egy *Streptomyces hygroscopicus*-ból izolált anzamicin antibiotikumot, az ún. geldanamicint alkalmazzák. Mivel ez a drog májkárosító

hatású és a sejtekműködések stabilitását is csökkenti, egyre gyakrabban helyettesítik egyik származékával, a 17-AAG-vel (17-allilamino-17-dimetoxi-geldanamicin). Ez az anzamicin származék szintén gátolja az ErbB2 receptor konformációjának internalizáció utáni visszaalakulását, s így elvileg potencírozhatja a trastuzumab hatását.

A nemrégiben izolált trastuzumab-rezisztens JIMT-1 sejtvonal

A trastuzumab-rezisztencia okának tanulmányozása *in vitro* körülmények között eddig nehézkes volt, ugyanis annak ellenére, hogy a klinikumban sok ErbB2-pozitív emlőtumor nem reagál trastuzumab kezelésre, nem állt rendelkezésre olyan *in vitro* tenyésztethető sejtvonal, mely hordozta volna ezen sajátságot. A közelmúltban izolált JIMT-1 nevű trastuzumab-rezisztens sejtvonal azonban ma már lehetővé teszi a rezisztencia *in vitro* vizsgálatát.

A JIMT-1 sejtvonal egy 62-éves emlődaganatos, trastuzumabra nem reagáló nőbeteg pleurális áttétjéből származik. Ezek a sejtek egyrétegben kitapadva nőnek és egérben xenograftumort képeznek. A JIMT-1 sejtvonal ösztrogén- és progeszteron-receptor deficiens, ugyanakkor immunhisztokémiai pozitivitást mutat citokeratin 5/14-re és 8/48-ra. A sejtek trastuzumab kezelésre *in vitro* és xenograftumorban egyaránt rezisztensek, ErbB2 génjük amplifikált, de azonosítható mutációt nem tartalmaz. A JIMT-1 sejtek felszínén az ErbB2 fehérje nagy mértékben kifejeződik, az ErbB1, ErbB3 és ErbB4 receptorok az általunk kontrollként használt trastuzumab szenzitív SKBR-3 sejtekéhez hasonlóan kisebb mértékben expresszálódnak. A kismolekulájú tirozinkináz inhibitorok, a Ci1033 és a ZD1839 kismértékben gátolják a JIMT-1 sejtek proliferációját.

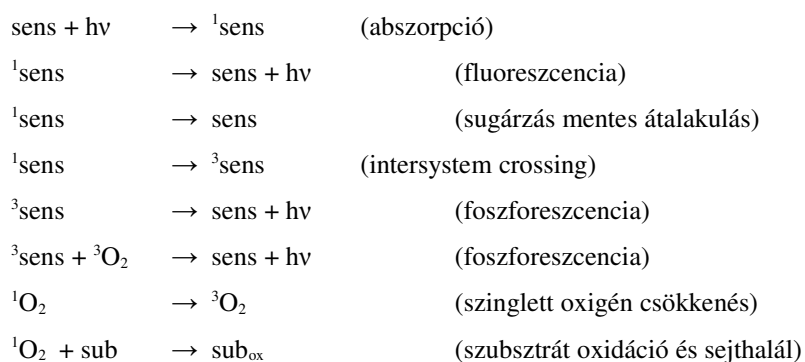
A cisztein proteinázok és inhibitoraik szerepe daganatokban

A tumorsejtek cisztein proteinázai kritikus szerepet játszanak az extracelluláris mátrix elemeinek (laminin, kollagén és elasztin) proteolitikus kaszkádon keresztül történő bontásában. Számos tumorsejtben a cisztein proteináz családba tartozó katepszin enzim aktivitása megemelkedik, ami neovaszkularizációt eredményez. Az angiogenezis során képződött véregek a szolid tumorok növekedése mellett a metasztázis képződését is elősegítik. Magát a folyamatot a hipoxia is stimulálja, minek hatására a daganatos sejtek egyre nagyobb mennyiségben termelik az angiogénikus faktorokat, úgymint a TNF-t, FGF-t valamint a VEGF-t.

A cisztein proteináz enzimek aktivitásának gátlására a szervezet által is termelt cisztein proteináz inhibitorok (CPI) képesek; ezek hatására a daganat fejlődése mérséklődik. A klinikai tapasztalatok szerint tumoros páciensek CPI termelése sok esetben igen alacsony, így ezen inhibitor pótlása indokolt lehet. A cisztein proteinázok és inhibitoraik aktivitása közötti egyensúly a tumorsejtek agresszivitását jelentős mértékben befolyásolja. Normál szövetekben az extracelluláris proteolízist az endogén inhibitorok szabályozzák, míg patológias folyamatokban a proteinázok és inhibitoraik közötti megzavart egyensúly válik uralkodóvá. Az inhibitorokat általában humán placentából izolálják, az általunk használt cisztatin azonban egy olyan 120 aminosav és két diszulfid-híd tartalmú inhibitor, amit először tojásfehérjéből nyertek. Jelentős cisztein proteináz aktivitást csökkentő hatásuk miatt ezen CPI-kat az inhibitor terápia új irányvonalának tekinthetjük.

A fotodinámiás terápia

Az immun- és inhibitor terápián kívül a fényterápiát is nagy hatékonysággal alkalmazzák az emlődaganatok kezelésében. A fotodinámiás terápia (PDT) egy olyan fényterápiás eljárás, ahol a daganatos sejtekben felhalmozódott fotoszenzitiváló ágens egy specifikus hullámhosszal (általában IR tartomány) világítják meg. A fotoszenzitiváló molekulák gerjesztett állapotba kerülnek, és könnyen reakcióba lépnek alapállapotú oxigénnel, valamint biomolekulákkal (**1. ábra**). A reakcióban képződött szinglett oxigén illetve szabadgyökök a daganatos sejtek pusztulását okozzák.



1. ábra PDT által előidézett fotokémiai reakciók

(sens: alapállapotú fotoérzékeny anyag, $^1\text{sens}$: gerjesztett tripllett állapotú fotoérzékeny anyag,

$^3\text{O}_2$: alapállapotú oxigén, $^1\text{O}_2$: gerjesztett szinglett állapotú oxigén)

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a klinikai gyakorlatban már alkalmazott trastuzumab kezelést és fotodinámiás terápiát kombináltuk kismolekulájú inhibitorokkal, és vizsgáltuk hatékonyságukat emlőkarcinómák kezelésében.

Kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- A 17-AAG-vel gátolt Hsp90 dajkafehérje megváltoztatja-e az ErbB2 fehérje aktivációs folyamatát, és ez hatással lehet-e a tumorsejtek proliferációjára?
- *In vitro* körülmények között a trastuzumab hatását lehet-e potenciózni 17-AAG hozzáadásával trastuzumab szenzitív és rezisztens sejtvonalak esetén?
- Implantált szolid emlőkarcinóma kezelésére *in vivo* alkalmazott fotodinámiás terápia hatását lehet-e fokozni az extracelluláris mátrix bontásában aktívan résztvevő cisztein proteináz enzimek gátlásával?
- Amennyiben a fotodinámiás és az inhibitor terápia együttes alkalmazása szinergisztikusnak bizonyul, melyek a kombináció optimális feltételei, és állhat-e a háttérben a VEGF szintet csökkentő hatás?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtkultúrák és állatmodellek

In vitro kísérleteinkben az ErbB2 molekulákat jelentős mértékben kifejező trastuzumab-rezisztens JIMT-1 és szenzitív SKBR-3 sejtvonalakat alkalmaztuk.

In vivo tanulmányaink során ErbB2-negatív szolid emlő adenokarcinómát implantáltunk Wistar patkányokba.

Felhasznált antitestek és vegyületek

In vitro hetero- és homodimerizációs kísérleteinkben az ErbB2 sejtfelszíni receptor jelölésére a 2C4 jelű antitestet alkalmaztuk. Az ErbB1 fehérje jelölését hibridóma felülúszóból izolált 528 jelű antitesttel végeztük. Az antitesteket Cy3 és Cy5 szulfoindocianin festékekkel, ill. AlexaFluor 488-cal konjugáltuk. A foszforilált ErbB2 jelölésére Ab18 antitestet használtunk AlexaFluor 488-cal konjugálva vagy indirekt immunfluoreszcenciában.

A sejtek stimulálását egér eredetű EGF-el végeztük, kezelését pedig trastuzumabbal (Herceptin) valamint 17-AAG-vel, amit DMSO alapú 10 mM-os törzsoldatban -20 °C-on tároltunk.

In vivo kísérleteinkben tojásfehérjéből izolált cisztein proteináz inhibitor (CPI), azaz cisztatint alkalmaztunk. A fotodinamias terápia (PDT) során fotoszenzitizerként (PS) hematoporfirin származékot (HpD) és klorin e6-ot (Ce6) használtunk. Mindkét fotoszenzitizert 0.05 M NaOH tartalmú fiziológiás sóoldatban oldottuk, majd ebből 0.5-0.5 ml-nyi oldatot injektáltunk a Wistar patkányokba intraperitoneálisan 10, illetve 20 mg/testtömeg-kg koncentrációban. A 24 óra alatt akkumulálódott fotoszenzitizert Penta (Teclas) lámpával világítottuk meg maszk nélkül, 7 percen át. A megvilágító fény hullámhosszát Ce6 esetében 654 ± 20 nm-es, míg HpD esetében 630 ± 20 nm-es sávszűrővel állítottuk be. Az alkalmazott fényintenzitás 230 mW/cm^2 volt, a teljes fénydózis pedig 90 J/cm^2 .

Kezelés 17-AAG-vel, trastuzumabbal valamint a két szer kombinációjával

A 17-AAG, a trastuzumab és a kettő együttes hatásának vizsgálatához a sejteket 8×10^4 sejt/cm² sűrűségben passzáltuk, majd a letapadást követően az egyes mintákat 0, 2, 10, 40, 100 és 200 µg/ml dózisú trastuzumabbal, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5 és 1.7 µM koncentrációjú 17-AAG-vel, valamint a 17-AAG összes dózisát a klinikumban alkalmazott 40 µg/ml koncentrációjú trastuzumabbal kombinálva kezeltük.

Az ErbB- expresszió valamint -foszforiláció áramlási citometriás meghatározása

A feltripszinezett sejtek extracelluláris ErbB2 fehérjét 20 μ M Cy5-2C4-el jelöltük 10 percig 4°C-on, majd HBS (Hepes pufferelt sóoldat) mosást követően 1% formaldehidben fixáltuk. Az intracelluláris jelöléshez a sejtek membránját permeabilizáltuk valamint foszfatáz enzimjét gátoltuk 1% tejport, 0.1% szaponint és 1 mM nátrium-orto-vanadátot tartalmazó HBS-sel, majd 10 μ M AlexaFluor 488 konjugált Ab18 antitesttel (1% tejpor és 0.1% szaponin tartalmú HBS-ben) jelöltük 40 percen át szobahőn. Az FL1, és FL4 csatornák fluoreszcenciáját FACSCalibur áramlási citométerben log módban vettük fel, mintánként 10,000 sejtről. Az ErbB2 expressziót az SKBR-3 sejtek ismert expressziós szintjére vonatkoztattuk, amelyet előzetesen 800,000-nek határoztunk meg QIFIKIT-tel (DakoCytomation).

Jelölés akceptor-fotoelhalványításos FRET méréshez

A sejteket 80 %-os konfluenciáig 12 mm átmérőjű fedőlemezekre növesztettük, majd nedveskamrában 40 μ g/ml trastuzumab teljes antitesttel, 50 nM EGF-ral, illetve 2, 5 és 10 percen át 0.5 μ M 17-AAG-vel kezeltük. Fixálást és mosást követően a sejtek ErbB2-ErbB2 homodimerjeit 20 μ g/ml Cy3-2C4 donor-jelölt és 20 μ g/ml Cy5-2C4 akceptor-jelölt antitest elegyével jelöltük 10 percen át 4 °C-on. Az ErbB1-ErbB2 heterodimer jelölését hasonló körülmények között végeztük, azonban donor antitestként Cy3-528-at alkalmaztunk. A mintákat mostuk és Mowiolal fedtük le. A FRET meghatározásához pozitív kontrollként az ErbB2 két különböző epitópját jelöltük Cy3-2C4 és Cy5-4D5 antitesttel.

A FRET hatásfokot LSM 510 típusú konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal mértük. A Cy3-at 543 nm-en, a Cy5-öt 633 nm-en HeNe lézer segítségével gerjesztettük, az előbbi 560-605 nm sávszűrőn, míg az utóbbit 650 nm hosszúáteresztő szűrőn keresztül detektáltuk. 512x512 pixeles képeket vettünk fel multi-track üzemmódban, maximális apertúra mellett. A pixelenkénti FRET hatásfokot SCIL Image programkörnyezetben megírt kiértékelő program segítségével határoztuk meg.

Az fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) meghatározása akceptor-fotoelhalványításos módszerrel

A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer során egy gerjesztett állapotú fluoreszkáló molekula energiája (donor), foton kibocsátása nélkül egy másik, molekuláris közelségben lévő fluoreszkáló molekulának (akceptor) adódik át. Az energiatranszfer hatékonysága a

donor és akceptor távolságától függ; azaz a távolság hatodik hatványával meredeken csökken 1 – 10 nm távolságon belül, így a molekuláris asszociációk könnyen megbecsülhetők vele.

A FRET hatásfok mérését akceptor fotoelhalványításos módszer segítségével határoztuk meg. A módszer lényege, hogy a donor emissziója lecsökken az akceptor fluorofór molekuláris közelsége miatt, s így az akceptor fotoelhalványítása felszabadítja a donort a kioltás alól, minek következtében a donor fluoreszcencia intenzitása megnő. A FRET hatásfok, azaz az E a mikroszkópos kép minden egyes pixelére kiszámítható az alábbi képlet segítségével:

$$E_{(i,j)} = 1 - \frac{F_{D(i,j)}^I}{\gamma \cdot F_{D(i,j)}^{II}}, \quad (1)$$

ahol $F_{D(i,j)}^I$ és $F_{D(i,j)}^{II}$ az akceptor elhalványítás előtti (I) és utáni (II) teljes kép ij -dik pixelének háttér korrigált donor fluoreszcencia értéke. A nevezőben megjelenő γ egy olyan korrekciós faktor, amely figyelembe veszi a donor elhalványulását a kiégetési procedura során.

Értékét a

$$\gamma = \left\langle F_{D(i,j)}^{ref,I} \right\rangle / \left\langle F_{D(i,j)}^{ref,II} \right\rangle \quad (2)$$

képlettel lehet megadni, ahol az $\left\langle F_{D(i,j)}^{ref,I} \right\rangle$ és az $\left\langle F_{D(i,j)}^{ref,II} \right\rangle$ a háttér-korrigált ij pixelenkénti donor intenzitás középértéke elhalványítás előtt (I) és után (II) egy olyan referencia minta küszöbérték feletti pixeleiben, melyet csak donorral jelöltünk és melyen azonos műszer beállításokkal az akceptor elhalványítási procedurát végigfuttattuk.

A sejtproliferáció meghatározása

96-lyukú kamrába lyukanként 200-200 μ l színtelen médiumba tettük a JIMT-1 és SKBR-3 sejteket 4000 sejt/lyuk koncentrációban. A mintákat 4 napon át naponta kezeltük a fentiekben leírt trastuzumab és 17-AAG koncentrációkkal, triplikátumban. A kezelés 5. napján tetrazólium alapú tesztet (EZ4U, Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co KG, Wien, Austria) alkalmazva meghatároztuk a proliferáció mértékét. Ehhez lyukanként 20-20 μ l hígított szubsztrát oldatot alkalmaztunk, ami a sejtek metabolikus aktivitásától függően az SKBR-3 sejteken 6 órán át, míg a JIMT-1 sejteken 4 órán át maradt 37 °C-os hőmérsékleten. Az abszorbanciát ELISA reader segítségével 450 és 620 nm-en mértük, a sejtszám pontos meghatározásához kalibrációs görbét vettünk fel és kiszámítottuk az optikai denzitás értékeket.

Apoptózis vizsgálat

Az apoptózis vizsgálatát Annexin V-FITC festéssel végeztük. 8-lyukú Nunc kamrába lyukanként 10^4 sejtet tettünk, majd a sejtek letapadását követően a mintákat 0; 0.005; 0.05 és 0.5 μM 17-AAG-vel kezeltük 4 egymást követő napon. A kezelés 5. napján 100 mM HEPES/NaOH, 1.4 M NaCl és 25 mM CaCl_2 , pH 7.5 pufferben 0.2 μM Annexin V-FITC-et és 0.8 μM propídium jodidot adtunk a sejtekhez. 10 perces szobahőn történő inkubáció után az egyes mintákról három-három 1 mm^2 -es területet vettünk fel LSM 510 lézer pásztázó mikroszkóppal. A gerjesztést 488 és 543 nm-en végeztük, az emissziót pedig 505-555 és 560-605 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. Az apoptotikus (Annexin-V pozitív) és a nekrotikus (csak PI pozitív) sejteket megszámláltuk, majd a transzmissziós képből megállapított teljes sejtszámra és területre normalizáltuk.

A cisztatin(CPI) és a fotodinamiás terápia (PDT) kombinációjának vizsgálata

Wistar patkányokba implantált szolid emlő adenokarcinómán

Három eltérő kísérleti protokoll szerint végeztük kombinációs kísérleteinket. Az I. módszer 0. napján az egerenkénti 1 ml homogenizált tumort 0.5 ml fiziológiás sóoldattal elegyítettük - mely oldat 500 μg CPI-t tartalmazott -, majd a patkányok hasának baloldali régiójába szubkután implantáltuk. Még ugyanezen a napon 10 vagy 20 mg/testtömeg-kg koncentrációban HpD-t injektáltunk intraperitoneálisan. Az 1. napon a normál és a tumoros szövet közé történő 500 μg CPI adását követően a tumort besugároztuk. Az elkövetkezendő 6 napos periódus mindenegyik napján CPI-t kaptak az állatok a fentiekben leírt módon. A 8. napon az elaltatott patkányok tumorát eltávolítottuk, majd kardiális punkcióval 200-200 μl -nyi vért gyűjtöttünk, és a szérumot -70°C -on tároltuk a VEGF-szint meghatározásáig. Az eltávolított, formaldehid-fixált, paraffinba-ágyazott tumorokat 4 μm -es szeletekre vágtuk, majd hematoxilin-eozinnal megfestettük. Az I-höz képest a II. protokoll abban tért el, hogy a HpD-t egy nappal később injektáltuk, azaz az 1. napon, a besugárzást pedig a 2. napon végeztük. A III. protokollnál a kezelést 1 héttel a tumor implantációt követően kezdtük el.

Hisztológiai metszetek elemzése

A nekrozis mértékét mintánként 3-3 teljes, 4 μm -es paraffinba ágyazott, hematoxilin-eozinnal festett metszetben határoztuk meg a szokásos patológiai kritériumoknak megfelelően. A vérerek látóterenkénti számát 10x-es nagyítás mellett szintén megszámláltuk, majd átlagoltuk.

Patkány szérumban VEGF tartalmának meghatározása

A VEGF szintet a Quantikine kittel (R & D Systems) a gyártó leírása alapján határoztuk meg. A VEGF-re specifikus poliklonális antitesttel bevont 96-lyukú mikrotiter lemezre vittük fel mintáinkat és a kalibrációs sort, majd mosás után peroxidáz-konjugált anti-VEGF antitestet adtunk, és a tetrametilbenzidin színreakciót 30 perc után ELISA olvasóval 450 nm-en mértük.

Statisztikai értékelés

Az adatok statisztikai értékeléséhez az SPSS programot (v.11.0) használtuk. A csoportok közötti összehasonlítást variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet páronkénti t-próba követett. A normális eloszlást nem követő adatokat rang szerinti, egy- ill. kétszemponyú variancia analízissel elemeztük, melyet a kontrolltól való eltérések megállapítására páronkénti Wilcoxon rang szerinti összevetés követett (Holm-Sidak módszer). Az egyes paraméterek közötti korrelációt Pearson féle korrelációs koefficienssel jellemeztük. A dózis hatásgörbék illesztését Sigmaplot programmal végeztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A trastuzumab, a 17-AAG és kombinációjuk hatása az ErbB2 dimerizációjára, aktivációjára, valamint a trastuzumab szenzitív és rezisztens sejtek proliferációjára

Tekintve, hogy a receptor tirozinkinázok aktivációja a receptorok dimerizációját, ill. oligomerizációját követően jön létre, vizsgálatainkat az ErbB2 homo- és heterodimerek tanulmányozásával kezdtük. Immunfluoreszcens jelölést követően a dimerek közötti fluoreszcencia rezonancia energiatranszfert az akceptor elhalványításos FRET mikroszkópos változatával határoztuk meg. A JIMT-1 sejteknél az ErbB2-ErbB2 homoasszociáció nagyon alacsony, és 50nM EGF, illetve 40µg/ml trastuzumab kezelésre sem változik.

Ezzel ellentétben az SKBR-3 sejtek ErbB2 homoasszociációja jelentős, melyet mind EGF mind pedig trastuzumab adással fokozni lehet. Az ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció szintén nagyfokú a trastuzumab szenzitív sejteken, mértéke a rezisztens sejtvonalon a homodimerizáció mértékével egyezik meg. A trastuzumabnak egyik sejtvonal ErbB1-ErbB2 heterodimerjére sincs hatása, ami koherens azon legújabb felfedezéssel, miszerint trastuzumab-konjugált paramágneses mikrogyöngyökkel történő lokális stimuláció sem serkenti – az ErbB1 foszforiláció mértékéből ítélve – az ErbB1-ErbB2 heterodimer kialakulását. Áramlási citometriás méréseink szerint a JIMT-1 sejtek alacsony ErbB2 dimerizációs szintje párhuzamos ugyanezen receptor foszforilációjának alacsony szintjével, mely foszforilációs szint csak csekély mértékben növekszik 40 µg/ml trastuzumab adására. Az SKBR-3 ErbB2 specifikus tirozin foszforilációja jelentősebb, trastuzumab kezelés hatására pedig háromszorosára emelkedik. In situ immunfluoreszcens jelölést követő áramlási citometriás méréseink foszforilációra vonatkozó adatai jól korrelálnak a Western blot mérésekkel.

A következő lépésben azt szerettük volna eldönteni, hogy a Hsp90 gátlása 17-AAG-vel megváltoztatja-e a JIMT-1 sejtek alacsony ErbB2 dimerizációs és aktivációs állapotát. 0.5 µM 17-AAG mindkét sejtvonal esetében hasonlóan, időfüggő módon növeli az ErbB2 homoasszociációt: 5 perces kezelésnél éri el a maximális FRET hatásfokot, ami 10 perces kezelést követően már alig változik. Munkacsoportunk eredményei szerint a rezisztens sejtvonal esetében a trastuzumab csökkent hatékonyságának oka lehet az ErbB2 trastuzumab-kötő extracelluláris epitópjának maszkírozása, azonban az ErbB2 teljes mértékben működőképes és a sztérikus gátlás leküzdésével aktiválható. Ennek megfelelően az

intracellulárisan ható 17-AAG képes az ErbB2 dimerizációját a sztérikus viszonyoktól függetlenül megindítani mind a rezisztens, mind a szenzitív sejtvonal esetén.

A hatásmechanizmust illetően azok a korábbi eredmények iránymutatóak, miszerint a Hsp90 nemcsak az ErbB2 helyes konformációjának kialakításában és fenntartásában játszik szerepet, de egyszersmind az ErbB2-höz kötődve azt inaktív állapotban tartja. Emiatt valószínűsíthető, hogy a Hsp90 17-AAG általi gátlása az ErbB2 felszabadulásához vezet, ami a receptor dimerizációs készségének és aktivációjának fokozódását eredményezi. A tény, hogy a 17-AAG előmozdítja az ErbB2 aktivációját és internalizációját mind az SKBR-3, mind pedig a trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejteknél, arra a lehetőségre irányítja a figyelmet, hogy a Hsp90 gátlás segítségével az ErbB2 mindkét sejtben leszabályozható lehet, ami eredményezheti a sejtproliferáció gátlását.

A fentiek fényében a továbbiakban a két sejtvonal proliferációját vizsgáltuk: Dózis-hatásgörbét készítettünk trastuzumab, 17-AAG, illetve kombinációs kezelést követően. A trastuzumabot 2-200 µg/ml, míg a 17-AAG-t 0.0005-1.7 µM koncentrációban naponta adtuk a sejtekhez 4 egymást követő napon át. Az SKBR-3 sejteknél kevesebb, mint 40 µg/ml koncentrációjú trastuzumab és kevesebb, mint 0.05 µM 17-AAG is elegendő ahhoz, hogy a sejt proliferációját már a 3. naptól kezdve gátolja. Az SKBR-3 sejtek kombinációs kezelésénél csak a kisebb 17-AAG koncentrációk (0.0005 és 0.005 µM) hatását növelte a 40 µg/ml-es trastuzumab, a nagyobb dózisokra nem volt jelentősebb befolyással.

Várakozásainknak megfelelően a 40 µg/ml koncentrációjú trastuzumabnak elhanyagolható hatása van a JIMT-1 sejtvonalra; az SKBR-3-mal összehasonlítva még a 200 µg/ml-es dózis is kevésbé befolyásolja a sejtek proliferációját. A 0.05 µM 17-AAG azonban erősebben gátolja a JIMT-1 sejtek növekedését, mint az SKBR-3 sejteket. Ennek alapján felvethető, hogy a 17-AAG valószínűleg sikerrel alkalmazható önmagában az ErbB2-pozitív, de trastuzumab-rezisztens emlőtumороk kezelésére. A kezelés 40 µg/ml trastuzumabbal történő kiegészítése nem változtatott jelentősen a 17-AAG proliferációt gátló hatásán.

A 17-AAG által kifejtett antiproliferatív hatás hátterének tisztázására az előidézett nekrozis, illetve apoptózis mértékét az Annexin-V és propidium-jodid (PI)-pozitív sejtek arányából határoztuk meg 0.005; 0.05 és 0.5 µM 17-AAG-vel történő 4 napos kezelést követően. A PI-pozitivitástól függetlenül a membránjukban Annexin-V-tel jelölődött sejteket apoptotikusnak, míg a csak PI-dal megfestődötteket nekrotikusnak tekintettük. A 17-AAG dózisfüggően növeli az apoptózis, illetve a nekrozis mértékét, melyek közül mindkét sejtvonal esetében az apoptózis dominál.

A sejtek proliferációjának, ErbB2 szintjének és ErbB2 foszforilációjának 17-AAG hatására bekövetkező dóziszfüggő változása és korrelációja

A 17-AAG proliferációt gátló félhatásos dózisének (IC_{50}) meghatározásához a sejteket 4 napon át kezeltük 0.0005-1.7 μ M koncentrációjú 17-AAG-vel önmagában, illetve 40 μ g/ml trastuzumabbal kombinálva. Az 5. napon a sejt számot tetrazólium alapú kolorimetriás teszt segítségével határoztuk meg, míg a sejtek felszínén kifejeződő ErbB2 és foszfo-ErbB2 molekulák mennyiségét áramlási citométerben mértük. A mért paraméterek dózis-hatásgörbéje tipikus szigmoid lefutású, melyből a Hill-egyenlet alkalmazásával az IC_{50} értéke meghatározható (**1. táblázat**).

IC_{50}	proliferáció		ErbB2 szint		P-ErbB2 szint	
	<u>SKBR-3</u>	<u>JIMT-1</u>	<u>SKBR-3</u>	<u>JIMT-1</u>	<u>SKBR-3</u>	<u>JIMT-1</u>
	0.069 \pm	0.011 \pm	0.029 \pm	0.028 \pm	0.044 \pm	0.036 \pm
17-AAG, μ M	0.011	0.003	0.001	0.002	0.007	0.009
17-AAG, μ M	0.086 \pm	0.018 \pm	0.022 \pm	0.08 \pm	0.331 \pm	0.031 \pm
(+TR)	0.063	0.004	0.002	0.013	0.090	0.008

1. táblázat A 17-AAG félhatásos dózisa (IC_{50}) önmagában, és trastuzumabbal kombinációban: A Hill-egyenlettel illesztett dózis-hatásgörbék IC_{50} értékei (3 független mérés átlaga \pm S.D.), $R^2 > 0.995$. +TR jelöli a 40 μ g/ml trastuzumab adását.

A trastuzumab önmagában nem befolyásolja a JIMT-1 sejtek proliferációját, ahogyan azt a klinikai tapasztalatoknak megfelelően várjuk, de az SKBR-3 sejtek növekedését 2-200 μ g/ml koncentrációs tartományban gátolja. 17-AAG kezelésre azonban a JIMT-1 sejtek még az SKBR-3-nál is érzékenyebbek, amit a félhatásos dózis 0.011 μ M-os értéke jelez az SKBR-3 0.069 μ M-os IC_{50} értékéhez képest. A 17-AAG antiproliferatív hatása 0,005 és 0,05 μ M között erősödik legkifejezettebben, 0,5 μ M fölött pedig már nem fokozódik tovább. Az 17-AAG 40 μ g/ml trastuzumabbal történő kiegészítése JIMT-1 esetén csekély mértékű IC_{50} növekedést idézett elő. Az SKBR-3 proliferációját tekintve a 17-AAG félhatásos dózisa nem változik jelentős mértékben trastuzumab adására, alacsony 17-AAG koncentrációnál azonban – ahol a chaperon inhibitor hatása még kicsi – a 40 μ g/ml trastuzumab nagyfokú csökkenést idéz elő a proliferációban az önmagában alkalmazott 17-AAG kezeléshez viszonyítva.

A két sejtvonalnál az ErbB2 sejtfelszíni mennyisége egyforma mértékben csökken a 17-AAG növekvő koncentrációjával, az IC_{50} értéke mindkét esetben ~ 0.03 μ M. Az is kitűnik,

hogy a kezeletlen JIMT-1 sejtek ErbB2 molekuláinak száma kb. fele az SKBR-3 sejtekének. Az SKBR-3 esetében a 40 µg/ml trastuzumab elhanyagolható hatással van a 17-AAG IC₅₀ értékére, a JIMT-1-nél azonban több mint kétszeresére nő a félhatásos dózis értéke. Megállapítható, hogy a JIMT-1 esetén a trastuzumab az ErbB2 leszabályozásában is mérsékli a 17-AAG hatását, tehát trastuzumab-rezisztens sejtek esetén nem javasolható a 17-AAG kezelés kiegészítése trastuzumabbal. A jelenség hátterében vélhetően az áll, hogy a kombinált kezelés során kialakuló eltérő foszforilációs mintázat az ErbB2 sejtmembránba történő visszakerülést elősegíti, s az azonnali degradáció mértékét csökkenti – ilyen jelenséget trastuzumab hatás során már megfigyeltek korábban. Ha a trastuzumab önmagában kerül alkalmazásra, az csökkenti az ErbB2 sejtfelszíni mennyiségét nemcsak az SKBR-3, hanem érdekes módon a JIMT-1 sejteken is, de ez utóbbi esetben a hosszútávú leszabályozás nem jár együtt proliferáció gátlással.

A trastuzumab szenzitív SKBR-3 sejteknél a trastuzumab önmagában történő adagolása a foszfo-ErbB2 szint dózistól független enyhe mértékű csökkenését okozza. A 17-AAG által előidézett jelentős mértékű ErbB2 downreguláció mellett az egyre nagyobb 17-AAG dózisok adásával a foszforilált ErbB2 szint mind az SKBR-3, mind pedig a JIMT-1 sejteknél fokozódik, ami alátámasztja azt az elképzelést, miszerint a Hsp90 általi gátlás alól felszabaduló ErbB2 aktiválódik, majd internalizálódik. A félhatásos dózis értéke hasonló a két sejtvonalnál, azaz ~ 0.04 µM. 17-AAG kezelés kiegészítése 40 µg/ml trastuzumabbal JIMT-1 sejtek foszfo-ErbB2 szintjét a 17-AAG által kiváltott hatáshoz képest nem változtatja meg. Ugyanakkor az SKBR-3 sejteknél nagyfokú foszforiláció csökkenést idéz elő, főként az alacsonyabb, azaz a 0.0005 és 0.005 µM 17-AAG dózisoknál. Eszerint trastuzumab hatására a 17-AAG ErbB2-foszforilációt elősegítő képessége trastuzumab szenzitív sejtekben csökken, amit a 17-AAG félhatásos dózisának nagyságrendnyi növekedése is mutat.

Érdekes az a megfigyelésünk, hogy bár a JIMT-1 sejtek proliferációjára nincs jelentősebb hatással a trastuzumab, az ErbB2 sejtfelszíni expresszióját lecsökkenti, foszforilációját pedig kismértékben növeli a dózis emelésével. A megfigyelés magyarázata feltehetően az, hogy a JIMT-1 sejteknek van egy olyan alpopulációja, melynek trastuzumab-kötő kapacitása jóval nagyobb az átlagosnál, és ezekben a sejtekből trastuzumab kezelés hatására az ErbB2 sokkal hatékonyabban eliminálódik a sejt felszínéről, ami az ErbB2 és P-ErbB2 szint mintaátlagát befolyásolja, de a teljes populáció proliferációjára nincs jelentős hatással.

A továbbiakban a kezelések 5. napján meghatározott antiproliferatív hatás (kontrollra normalizált sejtszám csökkenés), a kontroll szintjére normalizált ErbB2 expresszió-csökkenés,

valamint foszfo-ErbB2 szint emelkedés közötti korrelációt vizsgáltuk. Mindkét sejtvonalnál a membrán ErbB2 szintjének csökkenése szignifikáns pozitív korrelációt ($R^2 > 0.8$, $p < 0.05$) mutat a 17-AAG antiproliferatív hatásával, függetlenül a trastuzumab jelenlététől, tehát elmondható, hogy *in vitro* a sejtmembránban található ErbB2 mennyisége a proliferáció fontos tényezője. A trastuzumab önmagában a várakozásnak megfelelően gátolja az SKBR-3 sejtek proliferációját, s ezzel párhuzamosan ~ 40%-ra csökkenti az ErbB2 szintet. Ezzel összhangban a 17-AAG-vel kezelt SKBR-3 sejtekhez adott trastuzumab eltolja az antiproliferatív hatás függvényében ábrázolt ErbB2 szintcsökkenést a nagyobb kezdő értékek felé, azonban a függvény meredekségét nem változtatja meg. Annak ellenére, hogy a trastuzumab terápiás koncentrációban alig gátolja a JIMT-1 sejtek proliferációját, az SKBR-3 sejtekhez hasonlóan ErbB2 szintcsökkenést idéz elő. Ezzel összhangban, amikor 40 µg/ml trastuzumabot adunk a 17-AAG-vel kezelt JIMT-1 sejtekhez, az antiproliferatív hatás – ErbB2-csökkenés függvény kezdőpontja a jobban leszabályzott ErbB2 értékek irányába tolódik, de a sejtszámban bekövetkező relatív csökkenés szempontjából nem változik.

Mindkét sejtvonalnál pozitív korreláció ($R^2 > 0.85$, $p < 0.05$) áll fenn a foszfo-ErbB2 szintnövekedés és a 17-AAG antiproliferatív hatása között, függetlenül a trastuzumab jelenlététől. Az ErbB2 szintcsökkenés és az ErbB2-foszforiláció növekedés szintén pozitívan korrelál mindkét sejtvonal esetében ($R^2 > 0.8$, $p < 0.05$). A trastuzumab önmagában enyhén fokozza a JIMT-1 sejtek ErbB2 foszforilációját a növekvő dózisok irányába, de a sejtszám csökkenés függvényében ábrázolt foszfo-ErbB2 szintnövekedés korrelációs egyenesét nem változtatja meg. Az SKBR-3 sejtek foszfo-ErbB2 szintjére a trastuzumab – dózisértől függetlenül – csekély mértékű csökkentő hatást gyakorol. A 0.0005 és 0.005 µM 17-AAG-vel kezelt sejtekhez adott 40 µg/ml trastuzumab a 17-AAG önálló alkalmazásához képest jelentős csökkenést idéz elő az ErbB2 foszforilációjában, és az ettől nagyobb 17-AAG dózisonál is észlelhető ez a hatás.

A pozitív korrelációk egyfelől alátámasztják, hogy az ErbB2 szint csökkentése antiproliferatív hatású, és azt is, hogy a fokozott ErbB2 foszforiláció serkenti az internalizációt. Ugyanakkor az a tény, miszerint a 17-AAG félhatásos dózisa az ErbB2 és P-ErbB2 szabályozásában a JIMT-1 és SKBR-3 sejtek esetén közel azonos, míg az antiproliferatív hatás szempontjából a magasabb ErbB2 expressziójú SKBR-3-nál magasabb, arra utal, hogy valószínűleg kettős hatással állunk szemben. Részben, a Hsp90-et gátolva, és ezzel az ErbB2 fehérje felszabadulását elősegítve az ErbB2 protein aktiválódik, majd leszabályozódik, részben pedig az aktivált ErbB2 olyan túlélési és proliferációs szignálokat indít be, melyek feltehetőleg a PI3K/Akt és MAP kináz útvonalakon keresztül játszódnak le.

Ilyen tumoroknál a trastuzumabbal történő kombináció hatásos lehet a 17-AAG által kiváltott ErbB2 foszforiláció gátlásában, valamint az alacsony dózisu 17-AAG növekedést gátló hatásának fokozásában.

A fotodinámiás terápia (PDT) és a cisztatin (CPI) kombinációja nekrozist idéző patkány emlőkarcinómában in vivo

Állatkísérleteinkben a fotodinámiás és cisztein proteináz inhibitor terápia kombinációjának Wistar patkányokba implantálható szolid emlő adenokarcinómára kifejtett hatását vizsgáltuk. A daganatos betegek vérének megemelkedett VEGF szintje indokoltá teszi ezen faktor koncentrációjának redukálását, mivel a VEGF fontos szerepet játszik a neovaszkularizáció és angiogenezis folyamatában. Az ErbB2 fokozott mértékű kifejeződése a VEGF szint növekedéséhez vezet, amit a trastuzumab – ErbB2-t leszabályozó szerepéből kifolyólag – mérsékelni képes. Az általunk vizsgált emlőkarcinóma azonban csak csekély mértékben ErbB2-pozitív, így a kombinációs kezeléshez egy tojásfehérjéből izolált cisztein proteináz inhibitor, a cisztatint választottuk.

A különböző kezelési protokollok közül a legígéretesebb eredményeket az egy héten át, naponta adott CPI-vel kombinált 20 mg/kg HpD-PDT terápiával (I. kísérleti protokoll) értük el. Ez a protokoll a kontroll ~28%-os nekrozisával szemben akár 90%-os tumor elhalást is eredményez. A CPI és a PS-PDT monoterápiák csekélyebb hatással voltak a nekrozis mértékére, 35-40%-os hatást értek el.

A tumor nekrozis kvantitatív elemzése azt mutatja, hogy az I. kísérleti protokoll a legeredményesebb, ahol a tumor implantációval egyidőben történt a HpD és a CPI adása, majd 24 óra múlva a tumor besugárzása és 1 héten át naponta a CPI injektálása. A többi kísérleti protokoll kisebb mértékű nekrozishoz vezetett: úgy tűnik, a tumor gyors növekedése miatt leghatékonyabb az implantációval egyidőben történő CPI infiltráció. A II. kísérleti protokoll alkalmazásakor a kombinált kezelés, amely CPI tartalmú tumor-szuszpenzió implantációjából, majd 24 óra múlva HpD injektálásból, és további 24 óra múlva besugárzásból állt, a tumort kisebb mértékben roncsolta, mint az I. protokoll szerint végrehajtott kombinált kezelés. A III. protokoll, ahol a tumor implantáció után 1 héttel később kezdődött a kombinált kezelés, a tumorszövetet az I. protokollhoz képest szintén csekélyebb mértékben roncsolta ($p < 0.05$), noha a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb mértékű elhalást okozott ($p < 0.001$). Ez a megfigyelés klinikai jelentőséggel bírhat, ugyanis a tumor eltávolítást közvetlenül követő CPI infiltráció PDT-val együtt alkalmazva (I. protokoll) a

műtét során visszamaradt, vagy szórodott tumorsejtekben hatékonyabban fokozhatja a PDT nekrozist elősegítő hatását a később kezdett inhibitor injektáláshoz képest, ami a lokális recidívák és metasztázisok képződésének megakadályozását előmozdíthatja.

Mind a kisebb, mind pedig a nagyobb dózisú PS-PDT CPI-vel kombinált terápia jelentős mértékben nekrotizálta a tumoros szövetet ($p < 0.001$) a kezeletlen mintákhoz képest. A kombinációs terápiában a magasabb dózisú fotoszenzitivizáló kismértékben fokozta a tumor nekrozist az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel összehasonlítva ($p = 0.06$). A PS-PDT és CPI monoterápiák esetében azonban a 10 mg/kg PS dózissal nem volt jelentősebb hatása ($p = 0.58$), míg a 20 mg/kg dózis, a CPI-hez hasonlóan, mérhető nekrozis növekedést idézett elő ($p = 0.01$ és $p = 0.06$). Mindazonáltal bármelyik monoterápia hatékonysága lényegesen alacsonyabb akár a kisebb ($0.03 < p < 0.1$) akár a nagyobb ($p = 0.001$) dózisú fotoszenzitivizálóval történő kombináció hatékonyságánál. Mindkét PS dózisú PS-PDT CPI-vel kombinált terápia szinergisztikus volt. A kisebb dózisú 429, a nagyobb dózisú 200%-kal növelte a nekrozis mértékét a kombináció részeit képező monoterápiák által elért összegzett hatáshoz képest.

Mivel a tumorok méretének változása különböző terápiák alkalmazásakor alapvető prediktív faktor, a kezelések 8-adik napján eltávolított szövetminták térfogatát is mértük. A jelentős tumornekrozist előidéző nagyobb dózisú PS-PDT és CPI kombinációja a tumor térfogatát mindhárom kísérleti protokoll esetén szignifikánsan csökkentette $\sim 2.5 \text{ cm}^3$ -re ($p < 0.001$) a kontroll mintákban mért $4.5\text{-}6 \text{ cm}^3$ térfogatokhoz képest. Az alacsonyabb dózisú PS-PDT-CPI terápia szintén szignifikánsan befolyásolta ($p = 0.003$) a tumor méretét, $\sim 3.5 \text{ cm}^3$ -re redukálva azt. A PS-PDT monoterápia enyhébb, de még mindig jelentős hatást fejtett ki a tumor térfogatának csökkentésére, átlagosan $\sim 4.5 \text{ cm}^3$ -t eredményezve ($p = 0.03$ az alacsonyabb és $p = 0.04$ a nagyobb dózisú terápia esetén). A CPI önálló alkalmazása okozta a legkisebb mértékű tumorméret változást ($p = 0.19$). A kombinációs terápia mindkét koncentrációjú fotoszenzitivizáló alkalmazása mellett hatékonyabb volt a monoterápiáknál ($0.003 < p < 0.06$ az alacsonyabb és $0.001 < p < 0.003$ a nagyobb dózis esetén), mely hatékonyság közel azonos mértékűnek bizonyult ($p = 0.41$). Nemcsak a nekrozis fokozásánál, hanem a tumorméret-csökkentő hatásnál is szinergisztikusnak mondható mind az alacsonyabb, mind pedig a magasabb dózisú fotoszenzitivizálóval kombinált CPI terápia, mivel a monoterápiák összegénél rendre 118, illetve 33%-kal jobb hatás érhető el alkalmazásukkal. A nekrozisra kifejtett terápiás hatás nagyfokú korrelációt mutatott a csökkent tumor térfogattal. A nagyobb dózisú, azaz a 20 mg/kg PS-PDT-CPI kombináció azonban sokkal hatékonyabb volt a nekrozis mértékének növelésében, mint a tumornövekedés lassításában.

A PS-PDT és a CPI szimultán terápiájának hatékonysága a HpD fényindukált aktivációjával, valamint a CPI által lecsökkentett katepszin, legumain és calpain aktivitással magyarázható. A fotoszenzitivizáló lizoszómákban dúsulnak fel, és megfelelő fényforrással történő megvilágítást követően aktívan roncsolják a lizoszómát. Ez a folyamat mitokondriális sejthalálhoz vezet a Bid, a prokaspáz-9 és-3 aktivációján keresztül. A cisztein proteázok aktivitásának CPI általi gátlása ezzel a hatással szinergisztikus lehet. Amennyiben a katepszin és legumain aktivitását CPI-vel redukáljuk, a peritumor sztrómába történő sejtinvázió gátlódik. A calpain gátlása szintén a migrációt csökkenti. Az invázió és a vesejáró vaszkularizáció hiánya valószínűleg előmozdítja a tumoros szövetben a sejtek elhalását, ami a PDT hatását tovább fokozza.

PDT és a CPI kombinációja hatékonyan csökkenti a szérumban a VEGF szintet és a tumor vaszkularizációt

Kísérleteinkben az egészséges, tumor nélküli patkányok VEGF szintje alacsonyabb (106.5 ± 7.2 pg/ml) volt, mint a daganatos állatoké, ahol ezen faktor $134-170$ pg/ml koncentrációtartományban ingadozott. PS-PDT monoterápiát követően a szérumban a VEGF koncentrációja a kezeletlen kontrollhoz képest enyhe mértékben csökkent ($p > 0.15$). A CPI egyedüli injektálása viszont gyengén megemelte ezen faktor szintjét ($p = 0.02$), ami valószínűleg a tumor csökkent invázióra és neovaszkularizációra adott feedback válaszával köszönhető. A VEGF mennyisége 20 mg/kg PS-PDT és CPI együttes alkalmazásával volt a legalacsonyabb, de a kisebb fotoszenzitivizáló dózisú kombinált terápia is elég hatásosnak bizonyult a kezeletlen kontroll mintákhoz képest ($p < 0.001$ mindkét esetben).

Összességében a kombinációs kezelések sokkal hatékonyabbak voltak, mint a monoterápiák ($p < 0.001$). A 20 mg/kg PS-PDT-CPI esetén a monoterápiák hatásának összegéből számolt 23% -os nettó emelkedéshez képest 86% -os drasztikus csökkenést értünk el, míg az alacsonyabb dózisú fotoszenzitivizálóval kombinált terápiánál a 17% -os nettó növekedéshez képest 56% -os csökkenést tapasztaltunk. A magasabb fotoszenzitivizáló dózisú kombinált terápia jelentősebb VEGF csökkenést okozott, mint a kisebb PS-dózisú kombináció ($p = 0.001$).

A tumor erezésének mértékét hematoxilin-eozin festett mintákban határoztuk meg. A vérerek látóterenkénti átlagos száma – ahogyan a csökkent VEGF szintnek megfelelően is várható – a kombinált kezelésekre hatására csökkent le a legnagyobb mértékben ($p < 0.001$ mindkét PS koncentráció esetén). A többi mért paraméterrel ellentétben itt a monoterápiáknak

is jelentős redukáló hatásuk volt ($p=0.001$). Ezzel együtt mindkét koncentrációjú fotoszenzitizálóval kombinált terápia meghaladta a megfelelő PS-dózisú monoterápiák hatását ($0.02 < p < 0.1$ az alacsonyabb és $0.001 < p < 0.02$ a magasabb dózis esetén), ugyanakkor egymástól csak kismértékben különböztek ($p=0.08$).

A csökkent tumor neoangiogenezis oka feltehetőleg CPI PS-PDT-vel együtt kifejtett szinergisztikus hatásának köszönhető, mely egyrészt csökkentette a szérumban a VEGF koncentrációját, másrészt gátolta a lokális inváziót, végeredményben a tumor növekedését is gátolva. A **2. táblázat**ban bemutatott korrelációs koefficiensek alátámasztják, hogy a csökkent VEGF szint pozitívan korrelál a csökkent vaszkularizációval. A fentiekkel összhangban mind a VEGF szint, mind a vaszkularizáció mértéke pozitív korrelációt mutat a tumor növekedésével, ugyanakkor negatívan korrelál a tumor nekrozisával.

	Tumortérfogat	VEGF szint	Erek száma
Nekrózis mértéke	-0,661	-0,691	-0,625
Tumortérfogat		0,713	0,734
Erek száma			0,568

2. táblázat A vizsgált paraméterek korrelációja: A tumor mérete, a nekrozis mértéke és vaszkularizációja, valamint a szérumban a VEGF szintje közötti korreláció $p < 0.0001$ szignifikancia szinten jelentős.

A CPI és a PS-PDT közötti szinergizmus további lehetséges mechanizmusa, hogy a CPI gátlás egyik fő célpontja, a katepszin B, lizoszómális lokalizációjú, s mivel a fotoszenzitizálók szintén lizoszómákban akumulálódnak, a besugárzás hatására roncsolódott lizoszómák katepszin B szintje és aktivitása is lecsökken. Mivel a tumorokban megemelkedett katepszin B aktivitás fokozott neoangiogenezissel és tumor invazivitással társul, ennek az aktivitásnak CPI és PS-PDT együttes alkalmazásával történő hatékony gátlása a tumornövekedés megelőzésének fontos faktora lehet.

A PS-PDT monoterápiák alkalmazásakor lecsökkent vaszkularizáció mértéke meghaladja a VEGF szint csökkenésének mértékét. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a fotodinámiás terápia roncsoló hatása nemcsak a daganatos sejtekben manifesztálódik, hanem az új vérereket képző endotél és mezenhimális sejtekben is. Továbbá az is lehetséges, hogy a

PS-PDT a VEGF-on kívül más, az erek kialakulásáért felelős faktorok mennyiségét is megváltoztatja.

A CPI önmagában is jelentősen redukálja a vaszkularizáció mértékét, viszont nem csökkenti a VEGF szintet. Ennek lehetséges oka, hogy a cisztein proteínázok gátlása CPI-vel a VEGF termelődését visszacsatolósos szabályozással fokozza, ugyanakkor a CPI a tumorsejtek nekrozisával párhuzamosan a tumor vaszkulaturát is ronsolja. A tumor térfogatok pozitív korrelációja a vér VEGF szintjével alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a szérumban VEGF tartalmának egy része a tumorból ered. A kezelések VEGF szintre és vaszkularizációra kifejtett részben eltérő hatása azonban megmagyarázza, hogy e két paraméter korrelációs koefficiense miért olyan alacsony (**2. táblázat**). Itt érdemes megjegyezni, hogy a CPI által lecsökkentett neovaszkularizáció önmagában is képes rontani a PDT hatékonyságát, és ezért a CPI tumor sejtekre közvetlenül kifejtett egyéb hatásai fontos szerepet játszhatnak a CPI és PDT szinergizmusában. Például, a CPI TGF β -val együtt kifejtett antagonistikus hatása az emlőkarcinóma sejtek proliferációját mérsékelheti.

Eredményeink azt mutatják, hogy a PDT által előidézett sejtkárosodás, valamint a CPI-nek köszönhető tumor invázió gátlás nemcsak közvetlenül, hanem a szérumban csökkenő VEGF koncentrációján keresztül is akadályozhatja a tumor angiogenezisét. Mivel a PDT és a CPI együttes alkalmazása szinergisztikusnak bizonyult a tumor nekrozisának, valamint térfogatának és a szérumban VEGF szintjének befolyásolásában – ahol egyébként a monoterápiáknak alig vagy egyáltalán nem volt hatásuk –, a módszer klinikai alkalmazására javasolható különös tekintettel arra, hogy a kezelések során nem lépett fel mellékhatás. A fotodinámiás terápiát már a klinikai gyakorlatban is használják, a CPI alkalmazhatósága azonban a biztató eredmények ellenére sem teljes mértékben tisztázott. Cegnar és munkatársai cisztatin-kötött nanorészecskék alkalmazásával optimalizálták a célsejtek cisztatin felvételét, minek köszönhetően effektíven lehetett gátolni a katepszin B aktivitását. Paramágneses részecskék ilyen célra történő felhasználása a CPI célzott lokális felhalmozódását is elősegítheti mágneses tér gradiens alkalmazása mellett. Felvetődött annak a lehetősége is, hogy a CPI kifejeződését génterápiával fokozzák; az adenovirus-mediált ektópiás cisztatin C expresszió egerekben megakadályozta a xenograft fibroszarkóma tüdő metasztázisainak képződését. Nem hagyható azonban figyelmen kívül az a tény, miszerint a cisztatinnak és más CPI-nak nemcsak antiproliferatív hanem proliferációt serkentő hatása is lehet, attól függően, hogy milyen rendszert vizsgálunk.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink fő célkitűzése az volt, hogy az emlődaganatok kezelésében már a klinikumban is alkalmazott terápiák hatását egy másik, kipróbálási fázisban lévő ágens bevonásával fokozzuk. Eredményeinket a következőkben foglaljuk össze:

- *In vitro* kísérleteink eredményeiből megállapíthatjuk, hogy a 17-AAG az ErbB2 homodimerizációt és foszforilációt fokozza mind trastuzumab szenzitív, mind rezisztens emlőtumor sejteken, és hosszútávon a receptor leszabályozását és a sejtproliferáció gátlását idézi elő, melynek háttérében elsősorban apoptózis, nagyobb dózisoknál részben nekrozis áll. Ennek alapján a 17-AAG alkalmas lehet a trastuzumab-rezisztens, ErbB2-pozitív tumorok kezelésére.
- Az ErbB2-t nagymértékben expresszáló trastuzumab szenzitív daganatsejtek esetén a 17-AAG proliferációt gátló hatása a nagyszámú ErbB2 receptor aktivációja miatt alacsonyabb. Ilyen tumoroknál a trastuzumabbal történő kombináció hatásos lehet a 17-AAG által kiváltott ErbB2 foszforiláció gátlásában, valamint az alacsony dózisu 17-AAG növekedést gátló hatásának fokozásában.
- *In vivo* tanulmányainkban a cisztein proteináz inhibitor (CPI) fotodinamias terápiahoz (PDT) társítva szinergisztikusan gátolja a patkányokba implantált szolid emlőkarcinóma növekedését, fokozza a tumornekrozist, s ennek háttérében legalábbis részben a szinergista módon csökkentett szérum VEGF szint, ill. a következményes nagyfokú neovaszkularizáció-gátlás áll.
- A PDT és CPI kombinációja a Wistar patkányokba implantált szolid emlőkarcinóma progresszióját 20 mg/kg HpD, 500 µg/állat CPI és 90 J/cm² fotondózisú besugárzás mellett képes leghatékonyabban gátolni. A legjobb eredményeket az inokulációval egyidőben elkezdett terápia adja, ami arra utal, hogy a kombinációs kezelés különösen hatékony lehet a szóródott, ill. reziduális daganatsejtek elpusztításában.

6. GYAKORLATI JELENTŐSÉG

In vitro eredményeink gyakorlati jelentősége kettős: egyrészt igazolja a 17-AAG monoterápia hatékonyságát trastuzumab-rezisztens, de ErbB2-pozitív emlőtumорок esetén, másrészt felhívja a figyelmet arra, hogy magas ErbB2 szintű emlőtumорок 17-AAG terápiáját érdemes lehet az adverz hatásként jelentkező ErbB2 foszforiláció csökkentése érdekében trastuzumabbal kombinálni. Ennek a megfigyelésnek külön apropót ad, hogy a jelenlegi egyetlen klinikai kipróbálásból, ahol 17-AAG-t alkalmaznak, a korábbi vagy fennálló trastuzumab kezelés kizáró ok. Olyan 17-AAG-trastuzumab konjugátum létrehozásával azonban már kísérleteztek, amit az ErbB2-t túlzott mértékben kifejező tumorokhoz adva egyfajta specifikus chaperon terápiát teremtene. Egy ilyen konjugátum alkalmazása azonban megköveteli annak pontos ismeretét, hogy milyen hatása van a 17-AAG és a trastuzumab együttes adásának a különböző expressziós szintű és eltérő trastuzumab-rezisztencia fokú tumorokban.

In vivo eredményeink azt mutatják, hogy a PDT által előidézett sejtkárosodás valamint a CPI-nek köszönhető tumor invázió gátlás nemcsak közvetlenül, hanem a szérumban csökkenő VEGF koncentrációján keresztül is akadályozhatja a tumor neoangiogenezisét. Mivel a PDT és a CPI együttes alkalmazása szinergisztikusnak bizonyult a tumor nekrózisának valamint térfogatának és a szérumban VEGF szintjének befolyásolásában, és mellékhatásokat sem tapasztaltunk, a módszer további preklinikai tesztelése javasolható.

7. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Zsebik B., Citri A., Isola J., Yarden Y., Szöllősi J., Vereb Gy.: Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1 *Immunology Letters* (2006) 104(1-2):146-55
IF: 2,301 (2005)

Zsebik B., Symonowicz K., Saleh Y., Ziolkowski P., Bronowicz A., Vereb Gy.: Photodynamic therapy combined with a cysteine protease inhibitor synergistically decrease VEGF production and promote tumour necrosis in a rat mammary carcinoma *Cell Proliferation* (2006) in press
IF: 4,462 (2005)

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek és előadások:

Zsebik Barbara, Fazekas Zsolt, Petrás Miklós, Szöllősi János, Vereb György (poszter) ErbB2 receptorok homoasszociációja és tirozin foszforilációja humán emlőtumor sejtekben
XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. május 20-23.

Zsebik Barbara, Fazekas Zsolt, Petrás Miklós, Szöllősi János, Vereb György (poszter) Az ErbB2 receptorok molekuláris kölcsönhatásai és foszforilációja Herceptin szenzitív és rezisztens emlőtumor sejtekben eltérőek
A Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003. augusztus 24-27.

Barbara **Zsebik**, Miklós Petrás, János Szöllősi, György Vereb (poster)
Possible use of Hsp inhibitor 17-AAG for treating Herceptin resistant breast tumors
International School of Biophysics, Timisu de Sus-Predeal, Romania, 7-12 October, 2003

Zsebik Barbara, Horváth Gábor, Petrás Miklós, Szöllősi János és Vereb György (poszter) Herceptin rezisztens emlőtumorok adjuváns terápiájának lehetőségei Herceptin és 17-AAG kombinációjával
IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2004. május 6-8.

Barbara **Zsebik**, Miklós Petrás, Jorma Isola, János Szöllősi, György Vereb (outstanding poster award)
ErbB2 homodimerization and activation in Herceptin resistant and sensitive cell lines
International Biophysics Congress, Montpellier, France, 22-27 May, 2004

Zsebik Barbara, Horváth Gábor, Petrás Miklós, Szöllősi János és Vereb György (poszter) Herceptin rezisztens emlőtumorok adjuváns terápiájának lehetőségei Herceptin és 17-AAG kombinációjával
XXXIV. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2004. június 1-4.

Barbara **Zsebik**, Krzysztof Symonowicz, Yousif Saleh, Piotr Ziolkowski, Andrzej Bronowicz, György Vereb (poszter)

Photodynamic therapy combined with a cystein protease inhibitor synergistically decreases VEGF production and promotes tumour necrosis in a rat mammary carcinoma

14th Annual Conference of the German Society for Cytometry, Leipzig, October 19-22, 2005

Zsebik Barbara (előadás)

ErbB2 receptorok homoasszociációja és tirozin foszforilációja humán emlőtumor sejtekben

DE OEC Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen, 2003. február 24-28.

Zsebik Barbara (előadás)

Herceptin rezisztens emlőtumorok adjuváns terápiájának lehetőségei

DE OEC Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen, 2004. április 5-9.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó poszter:

Ujlaky-Nagy László, Petrás Miklós, Zsebik Barbara, Szöllősi János, Vereb György (poszter)

A PDGF-receptor- β működése A172 glioblasztóma sejteken a lipid tutajokhoz kötött

III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2002. május 16-18.