

Az anaemia gyakran előforduló jelenség daganatos betegekben. Csökkenti az életminőséget és a kezelés kedvezőtlen kimenetelét is okozhatja, ugyanis a kevésbé oxigenizált tumorszövetek kisebb mértékben érzékenyek a sugárkezelésre és a kemoterápiára, valamint a rosszabb oxigénellátottság növeli az áttétképzés valószínűségét. Az anaemia hátrányos következményeinek csökkentésére, a normális hemoglobinszint visszaállítása érdekében ma már rutinszerűen használják a rekombináns humán erythropoietineket (rHuEPO-k). A kísérletes és klinikai eredmények azonban ellentmondásosak, mivel számos daganatsejt esetében leírták, hogy azok expresszálják az EPO-receptort, ezért az exogén EPO-kezelés befolyásolhatja a daganatsejtek túlélését, proliferációját, differenciálódását és migrációs képességét is. A daganatsejtek mellett megfigyelték endothel sejtek EPO-receptor expresszióját is, ezért az EPO-kezelés hatást gyakorolhat a tumor érhálózatának kialakulására is. Korábbi irodalmi adatokból, valamint a saját kutatási eredményeinkből tudtuk, hogy az EPO a vaszkuláris endotheliális növekedési faktorhoz (VEGF) hasonló aktivitású angiogén citokin: az erek számát nem befolyásolja a tumorokban, viszont fokozza az endothel sejtek proliferációs aktivitását és ezáltal dilatált, nagyméretű erek képződnek intratumorálisan. A tüdődaganatok esetében is célul tűztük ki ezen folyamatok *in vivo* és *in vitro* vizsgálatait, illetve terveztük olyan új molekulák azonosítását, amelyek ezt a folyamatot befolyásolhatják.

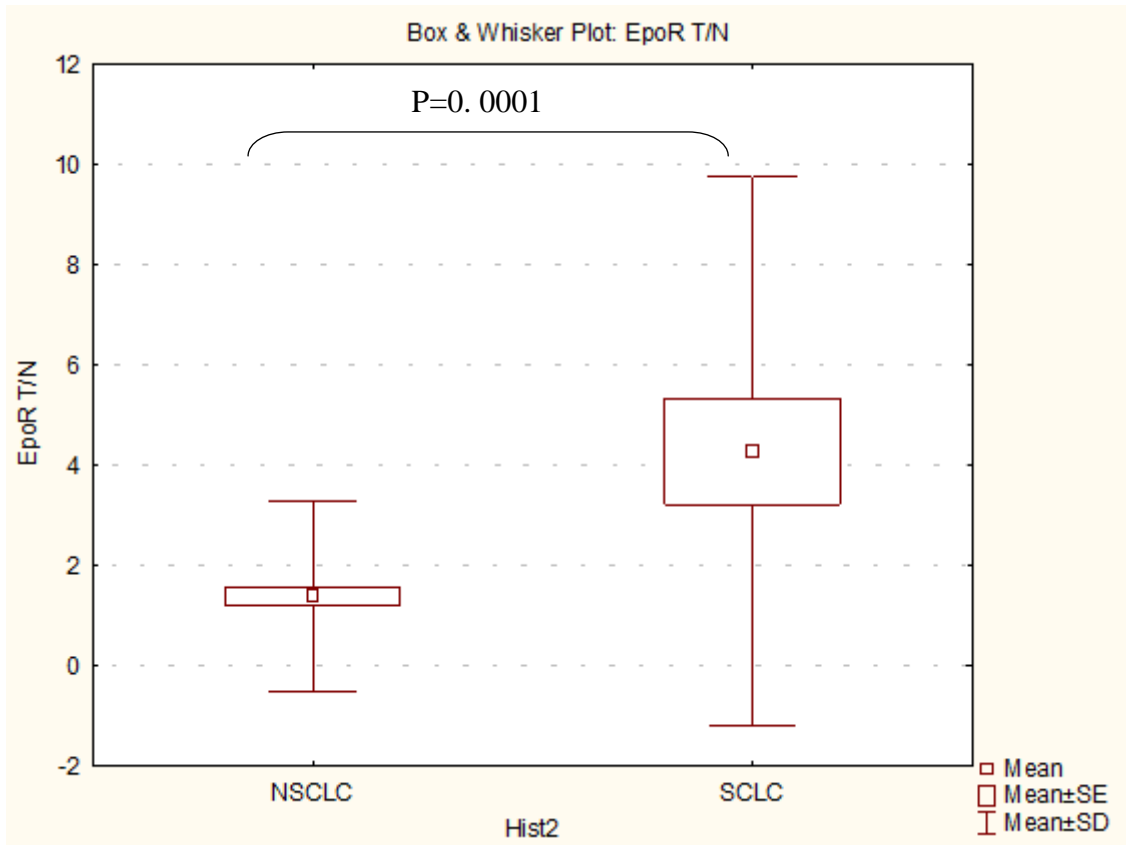
1. Az EPO-receptor expressziójának prognosztikai jelentősége SCLC és NSCLC tumorok esetében.

Pályázatunk első két évében a munkatervünknek megfelelően megkezdtük a kissejtes (SCLC) és a nem-kissejtes (NSCLC) tüdődaganatos betegek bronchoszkópos mintáknak gyűjtését és feldolgozását molekuláris biológiai módszerekkel, a harmadik évben pedig a hosszabb távú klinikai megfigyeléshez a betegek adatainak gyűjtését, hogy meghatározhassuk az EPOR státusz és a klinikai prognózis közötti lehetséges kapcsolatokat. A kutatásba bevont betegektől a bronchoszkópiás vizsgálat során két mintát vettünk. Az egyik minta a daganatos részről (T-tumoros), míg a másik a daganattól mentes szövetből (N-normal) származott. A mintavételt követően a bronchoszkópiás kefével nyert anyagról citológiai vizsgálat során megállapították, hogy pontosan melyik daganattípushoz tartozik, majd Real-Time PCR technikával meghatároztuk a minták EPO-receptor expressziós szintjét. A kutatási program alatt 99 darab nem-kissejtes, illetve 27 darab kissejtes tüdődaganatos betegről gyűjtöttünk mintákat és végeztük el az EPO-receptor expressziós szintjének meghatározását.

Nem találtunk összefüggést a betegek klinikopatológiai adataik (nem, életkor, dohányzási szokás, TNM státusz, terápia) illetve az EPOR expresszió között sem SCLC, sem NSCLC betegek esetében. (Táblázat 1., 2.)

Megállapítottuk, hogy bár a különböző típusú (adenocarcinoma, planocellulare, macrocellulare) nem-kissejtes tüdőrákos betegek EPO-receptor expressziója között nincs számottevő különbség, a kissejtes tüdőrákos betegek mintájának EPOR expressziója (T/N) szignifikánsan magasabb, mint az NSCLC-s betegektől származó mintákban (1. Ábra).

1. Ábra. EPOR expresszió nem-kissejtes és kissejtes tüdődaganatos betegektől származó mintákban.



1. Táblázat. Az EPOR expresszió és a klinikopatológiai adatok összefüggései NSCLC betegek esetében (n=99)

	Betegek száma (%)	EPOR expresszió (tumor)		P érték	EPOR expresszió (normál)		P érték
		Alacsony (%) ^a	Magas (%) ^a		Alacsony (%) ^a	Magas (%) ^a	
Összes beteg	99 (100%)	54 (%)	45 (%)		52 (%)	47 (%)	
Életkor (év)^a							
61<	48 (48.5%)	27 (50%)	24 (53.3%)		27 (51.9%)	24 (51.1%)	
61≥	51 (51.5%)	27 (50%)	21 (46.7%)	0.741 ^b	25 (48.1%)	23 (48.9%)	0.932 ^b
Dohányzás (21 ismeretlen)							
Sohasem dohányzott	8 (8.1%)	5 (9.3%)	3 (6.7%)		6 (11.5%)	2 (4.3%)	
Valaha dohányzott	70 (70.7%)	40 (74.1%)	30 (66.7%)	1 ^c	36 (69.2%)	34 (72.3%)	0.275 ^c
Nem							
Férfi	60 (60.6%)	32 (59.3%)	28 (62.2%)		31 (59.6%)	29 (61.7%)	
Nő	39 (39.4%)	22 (40.7%)	17 (37.8%)	0.764 ^b	21 (40.4%)	18 (38.3%)	0.832 ^b
T stádium							
T1	8 (8.1%)	5 (9.3%)	3 (6.7%)		4 (7.7%)	4 (8.5%)	
T2	45 (45.5%)	23 (42.6%)	22 (48.9%)		24 (46.2%)	21 (44.7%)	
T3	31 (31.3%)	17 (31.4%)	14 (31.1%)		15 (28.8%)	16 (34%)	
T4	15 (15.1%)	9 (16.7%)	6 (13.3%)	0.897 ^b	9 (17.3%)	6 (12.8%)	0.9 ^b
N stádium							
N0	17 (17.2%)	8 (14.8%)	9 (20%)		8 (17.4%)	9 (17%)	
N1	23 (23.2%)	13 (24.1%)	10 (22.2%)		9 (19.6%)	14 (26.4%)	
N2	47 (47.5%)	27 (50%)	20 (44.5%)		25 (54.3%)	22 (41.5%)	
N3	12 (12.1%)	6 (48.1%)	6 (13.3%)	0.878 ^b	4 (8.7%)	8 (15.1%)	0.461 ^b
M stádium							
M0	54 (54.5%)	32 (59.3%)	22 (48.9%)		31 (55.4%)	23 (53.5%)	
M1	45 (45.5%)	22 (40.7%)	23 (51.1%)	0.302 ^b	25 (44.6%)	20 (46.5%)	0.199 ^b
Kezelés (9 ismeretlen)							
PBC	27 (27.3%)	12 (22.2%)	15 (33.3%)		13 (25%)	14 (29.8%)	
RCT	24 (24.2%)	15 (27.8%)	9 (20%)		14 (26.9%)	10 (21.3%)	
PT	17 (17.2%)	8 (14.8%)	9 (20%)		7 (13.5%)	10 (21.3%)	
S	12 (12.1%)	5 (9.3%)	7 (15.6%)		7 (13.5%)	5 (10.6%)	
S+Adj. CT és/vagy RT	10 (10.1%)	7 (13%)	3 (6.7%)	0.455 ^b	7 (13.5%)	3 (6.4%)	0.596 ^b

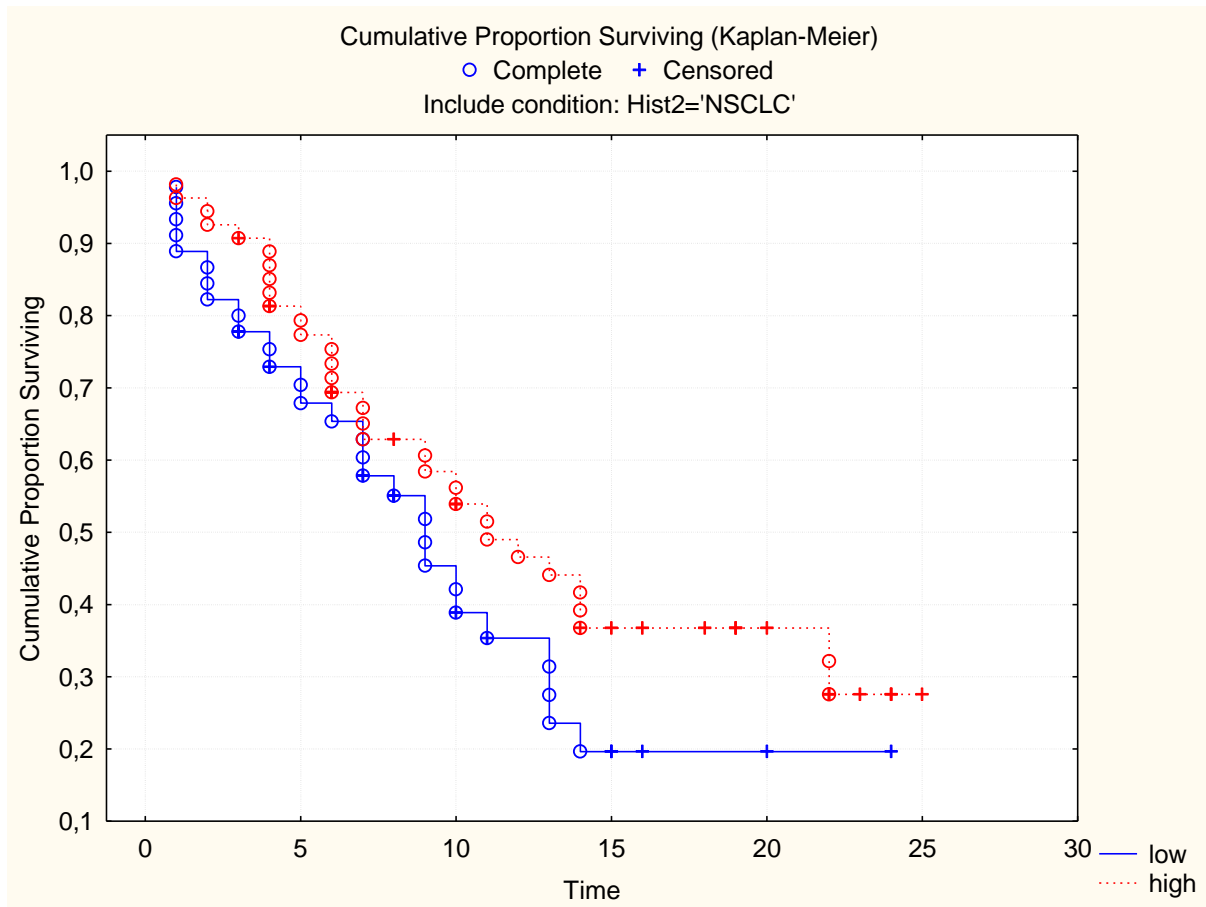
^a Cut-off érték megegyezik a median értékkel; ^b Chi-square teszt; ^c Fisher's exact teszt; AC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; LCC, large cell carcinoma; PBC, Platinum-Based chemotherapy; RCT, Radiochemotherapy; PT, Palliative therapy; S, Surgery; S+Adj.CT és/vagy RT, Surgery + Adjuvant Chemotherapy és/vagy Radiotherapy

2. Táblázat. Az EPOR expresszió és a klinikopatológiai adatok összefüggései SCLC betegek esetében (n=27)

	Betegek száma (%)	EPOR expresszió (tumor)		P érték	EPOR expresszió (normál)		P érték
		Alacsony (%) ^a	Magas (%) ^a		Alacsony (%) ^a	Magas (%) ^a	
Összes beteg	27 (100%)	9 (33.3%)	18 (66.7%)		12 (44.4%)	15 (56.6%)	
Életkor (év)^a							
61<	15 (55.6%)	6 (66.7%)	9 (50%)		8 (66.7%)	7 (46.7%)	
61≥	12 (44.4%)	3 (33.3%)	9 (50%)	0.683 ^c	4 (33.3%)	8 (53.3%)	0.441 ^c
Dohányzás (3 ismeretlen)							
Sohasem dohányzott	1 (3.7%)	0 (0%)	1 (5.6%)		0 (0%)	1 (6.7%)	
Valaha dohányzott	23 (85.2%)	9 (100%)	14 (7.78%)	1 ^c	11 (91.7%)	12 (80%)	1 ^c
Nem							
Férfi	18 (66.7%)	8 (88.9%)	10 (55.6%)		10 (83.3%)	8 (53.3%)	
Nő	9 (33.3%)	1 (11.1%)	8 (44.4%)	0.193 ^c	2 (16.7%)	7 (46.7%)	0.217 ^c
T stádium							
T1	1 (xx%)	0 (0%)	1 (5.6%)		0 (0%)	1 (6.7%)	
T2	13 (xx%)	6 (66.7%)	7 (38.9%)		7 (58.3%)	6 (40%)	
T3	9 (xx%)	1 (11.1%)	8 (44.4%)		2 (16.7%)	7 (46.6%)	
T4	4 (xx%)	2 (22.2%)	2 (11.1%)	0.266 ^b	3 (25%)	1 (6.7%)	0.205 ^b
N stádium							
N0	6 (xx%)	2 (22.2%)	4 (22.2%)		2 (16.7%)	4 (26.6%)	
N1	2 (xx%)	1 (11.1%)	1 (5.6%)		1 (8.3%)	1 (6.7%)	
N2	14 (xx%)	3 (33.3%)	11 (61.1%)		5 (41.7%)	9 (60%)	
N3	5 (xx%)	3 (33.3%)	2 (11.1%)	0.433 ^b	4 (33.3%)	1 (6.7%)	0.345 ^b
M stádium							
M0	15 (xx%)	3 (33.3%)	12 (66.7%)		6 (50%)	9 (60%)	
M1	12 (xx%)	6 (66.7%)	6 (33.3%)	0.127 ^c	6 (50%)	6 (40%)	0.603 ^b
Klinikopatológiai stádium							
LD	14 (51.9%)	3 (33.3%)	11 (61.1%)		5 (41.7%)	9 (60%)	
ED	13 (48.1%)	6 (66.7%)	7 (38.9%)	0.237 ^c	7 (58.3%)	6 (40%)	0.343 ^b
Kemoterápiás kezelés (2 ismeretlen)							
EP	19 (70.4%)	8 (88.9%)	11 (61.1%)		9 (75%)	10 (66.7%)	
EP+CEV	6 (22.2%)	1 (11.1%)	5 (27.8%)	0.364 ^c	2 (16.7%)	4 (26.7%)	0.661 ^c

^a Cut-off érték megegyezik a median értékkel; ^b Chi-square teszt; ^c Fisher's exact teszt; LD, limited disease; ED, extensive disease; EP, cisplatin vagy carboplatin és etoposide; CEV, cyclophosphamide, epirubicin és vincristine

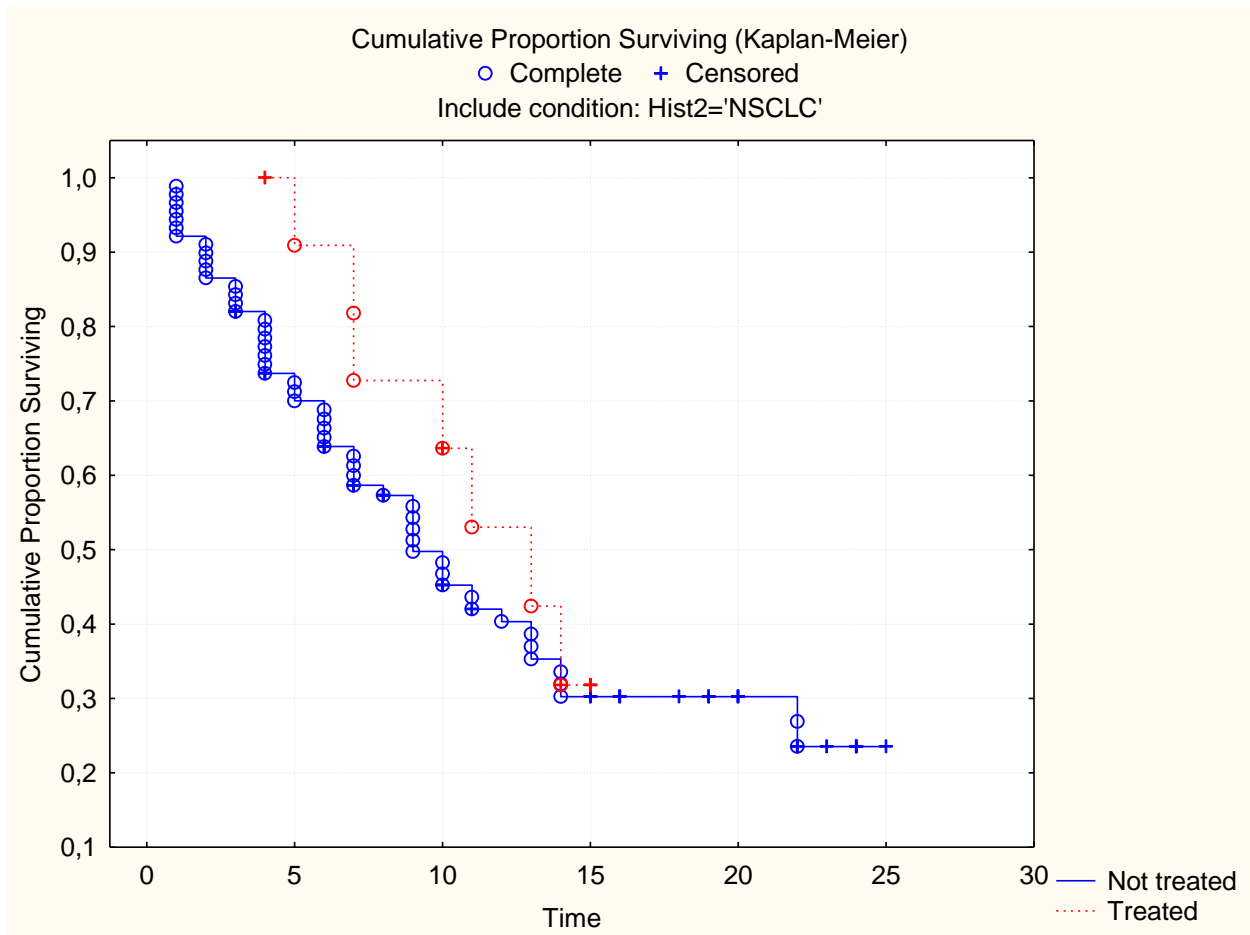
A vizsgálatba bevont betegek progressziómentes, illetve teljes túlélését sem befolyásolta az EPO-receptor státuszuk sem kissejtes, sem nem-kissejtes tüdődaganatos betegek esetében (Ábra 2.).



2. **Ábra.** NSCLC Kaplan-Meier túlélési analízis: alacsony vs magas EpoR expressziós szint összefüggése a túléléssel P=0.129

2. rHuEPO kezelés hatása EPOR-pozitív vagy negatív anémiás SCLC és NSCLC betegek progressziójára.

A tervezett program teljes ideje alatt zajlott a NSCLC és az SCLC betegeket monitorozása, akik rHuEPO kezelésben részesültek. Nem-kissejtes tüdődaganatos betegek közül 16-an lettek anaemiásak és ebből 13-an kaptak rHuEPO kezelést. Kissejtes tüdődaganatos betegek közül pedig mind a 6 anaemiás beteg kapott rHuEPO kezelést. Összehasonlítva az rHuEPO kezelt és kezeletlen betegek túlélését, illetve ezeket magas és alacsony EPOR expresszió függvényében, egyik esetben sem befolyásolták a betegek túlélését. (3. Ábra.) Szeretnénk hozzátenni, hogy a kevés kissejtes tüdődaganatos beteg mintaszáma miatt érdemes lenne a minták gyűjtését és elemzését tovább folytatni.



3. Ábra. Kaplan-Meier túlélési analízis: rHuEPO kezelés összefüggésének vizsgálata nem-kissejtes tüdődaganatos betegek túlélésével P=0.354

3. rHuEPO hatásának vizsgálata EPOR-pozitív humán tüdőrák xenograftokon.

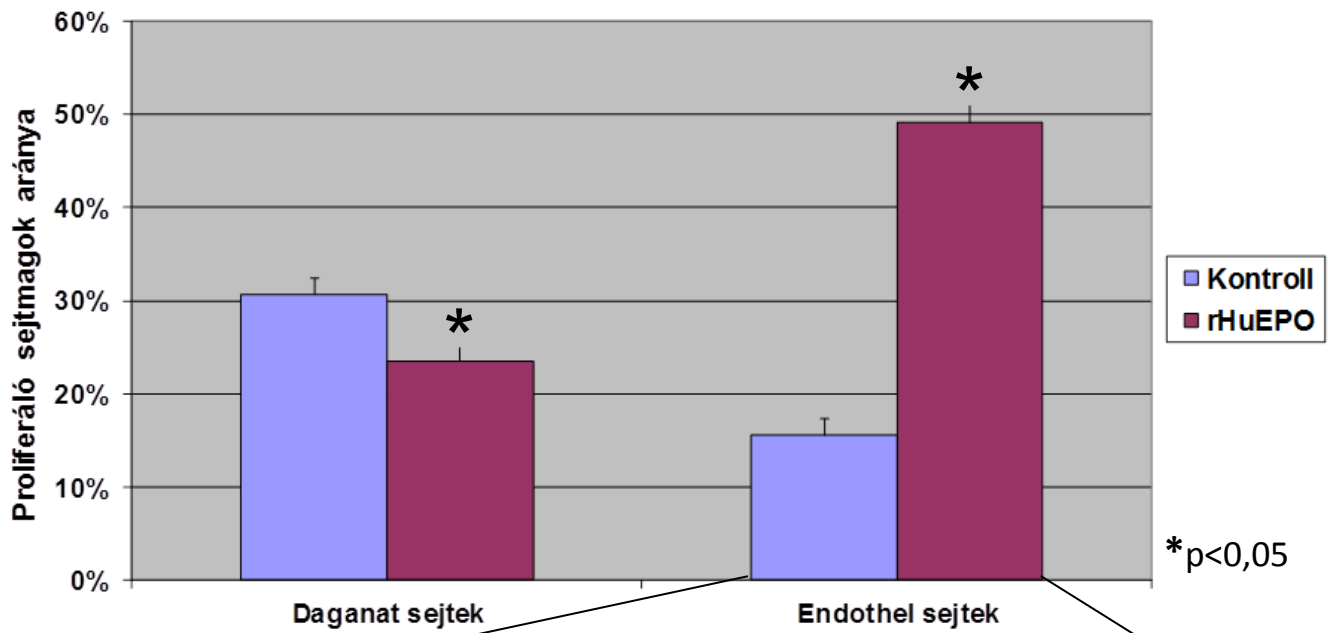
Korábbi vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy laphámrák és colon carcinoma modellek esetében az rHuEPO-alfa kezelésnek minimum kettős hatása van a tumorokra: csökkenti a tumorszövet hypoxiáját, amely egy jól ismert negatív prognosztikus marker, valamint fokozza az endotheliális sejtek proliferációját, amely javítja az erek sugárérzékenységét és növeli a tumorszövet perfúzióját. Kísérletes munkánkban humán nem-kissejtes tüdőrák (H1975, H358, H1650, HCC15) sejtvonalakon, valamint xenograft modelleken tanulmányoztuk az rHuEPO és gemcitabin együttes hatását a sejtek proliferációjára és tüdőkolonizációjára. Az EPOR kimutatását áramlási citométerrel, illetve kvantitatív Real Time PCR analízissel végeztünk. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a különböző eredetű tüdőrák sejtvonalak eltérő mértékben ugyan (10-57%), de valamennyien expresszálják az EPOR-t. A daganatsejtek *in vitro* proliferációs képességét MTT teszttel vizsgáltuk. Bár az irodalmi adatok ellentmondásosak, kísérleteinkben az *in vitro* rHuEPO kezelés nem befolyásolta az EPO receptort expresszáló NSCLC sejtek proliferációját. Az *in vivo* humán dózisonak megfelelő koncentráció az 1 IU/ml, de még ennek a 10-szerese sem okozott változást a sejtek szaporodási képességében. A humán dózisonak megfelelő gemcitabin kezelés hatására a sejtek proliferációja szignifikánsan lecsökkent és ezt a kombinációban adott rHuEPO nem befolyásolta.

In vivo kísérletünkben 10^6 db H1975 tumorsejtet oltottunk SCID egerekbe subcutan, és a tumoroltással egyidejűleg megkezdtük az rHuEPO kezelést a humán protokollnak megfelelően: heti 3 alkalommal 150IU/kg dózisban. A tumorokat, miután elérték a 50 mm^3 -es nagyságrendet (14 nappal az oltás után) elkezdtük gemcitabinnal kezelni (a humán dózisonak megfelelően, heti egy alkalommal). Az eredményekből megállapítható, hogy az rHuEPO kezelés nem hogy nem fokozta, még csökkentette is az EPOR+ tumorok növekedését. Bár a tumorsejtek *in vivo* proliferációjára nem volt hatással a kezelés, fokozta az intratumorális endothelsejtek proliferációját (4. Ábra). A gemcitabinnal történt kombinációs kezelés érdemben nem befolyásolta ennek hatását, mivel a gemcitabin magában is igen jelentős tumornövekedést gátló hatást mutatott.

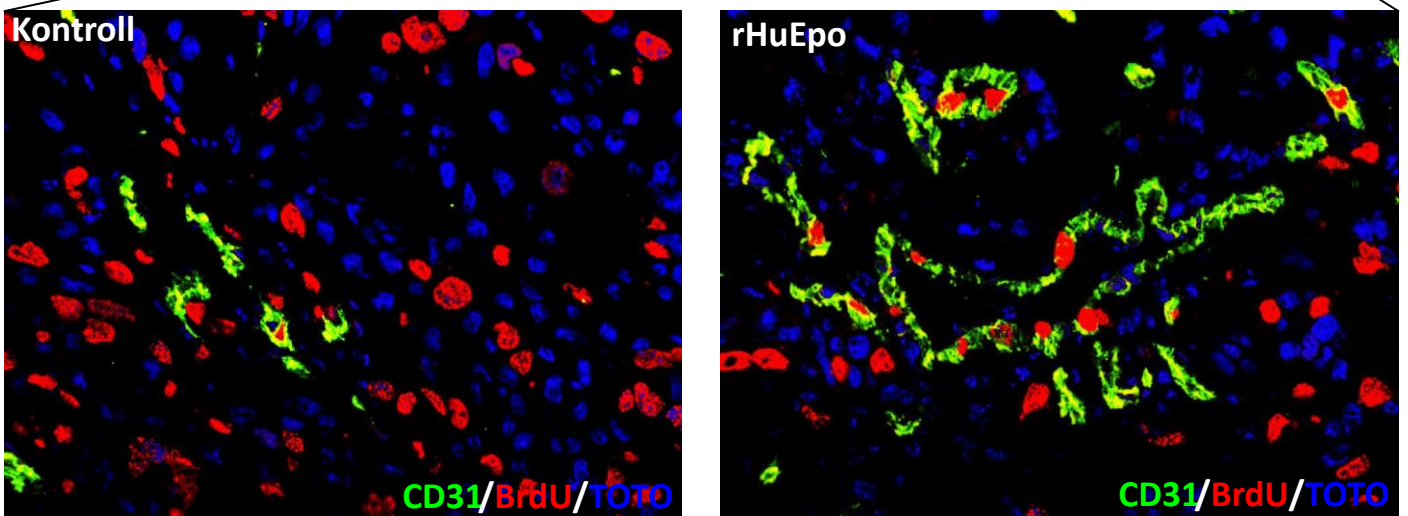
Ezt követően egy új oltással kísérleteztünk, amely a tüdődaganatok vizsgálatára egy jobb modell lehet: H358 daganatsejteket farokvénába juttattuk, és a kialakult tüdőkoloníákat vizsgáltuk. Ebben a kísérleti rendszerben megállapítottuk, hogy az rHuEPO fokozta a gemcitabin daganatellenes hatását (5. Ábra).

Összességében elmondhatjuk, hogy bár további vizsgálatok szükségesek az EPO kezelés hatásának teljes feltérképezéséhez, az EPO hatására nőtt az intratumorális endothelsejtek proliferációja ezzel javítva a tumorok vérellátását, aminek hatására a tumor hipoxiája lecsökkenhet, így javítva a tumorelles terápia hatékonyságát.

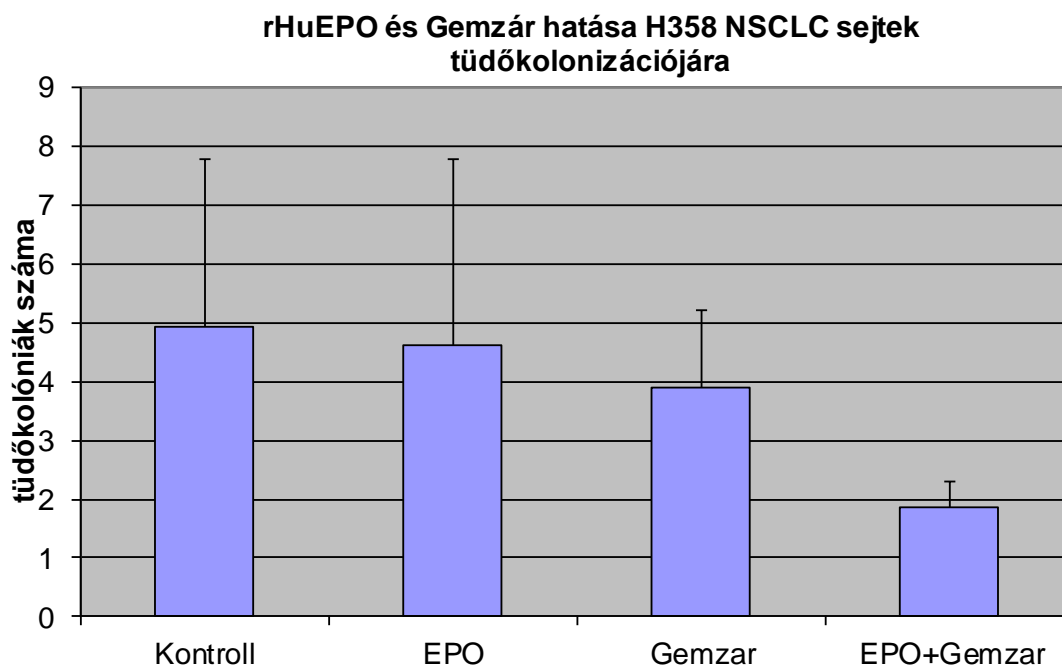
A



B



4. Ábra. **A** - rHuEPO kezelés hatása tumorsejtek illetve endothel sejek proliferációjára H1975 xenograftban, **B** – Immunhisztokémiai elemzése rHuEPO kezelt H1975 xenograftoknak: CD31 – endothel marker, BrdU – proliferáló sejtmag, TOTO – sejtmag.

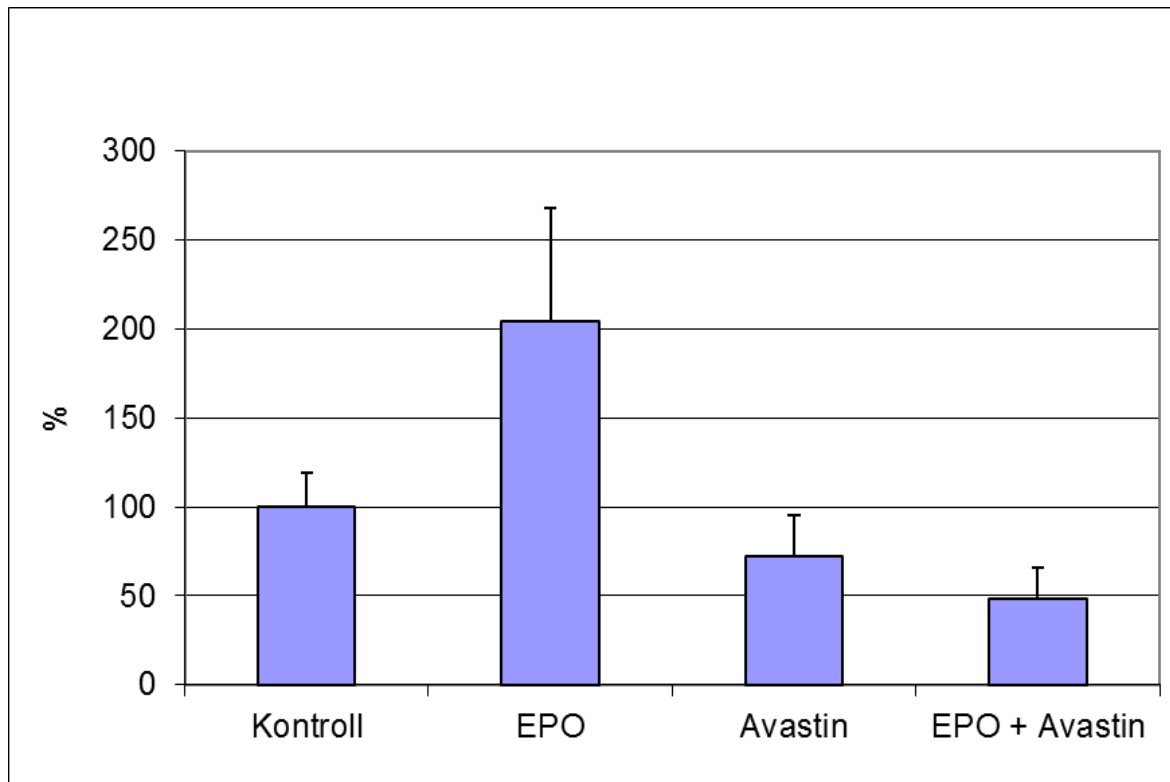


5. Ábra. In vivo rHuEPO és gemcitabin kezelés hatása H358 sejtek tüdőkolonizációjára

4. rHuEPO és az anti-angiogén bevacizumab (Avastin) kombinációjának hatása tüdőrák xenograftok növekedésére és angiogenezisére.

Az anti-angiogén bevacizumab hatásának rHuEPO kombinációs kezelésben *in vivo* subcutan növekvő NSCLC daganatokon vizsgáltuk. A bevacizumab egy anti-VEGF antitest, amely ma már a klinikai protokoll része a tüdőrákos betegek kezelésében. Azonban a bevacizumab és az erek endothel sejtjeire szintén ható rHuEPO együttes hatásáról nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok.

In vitro vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a bevacizumabnak nincs direkt tumorsejt-ellenes hatása. Az *in vivo* subcutan oltott daganatok növekedését azonban szignifikánsan gátolta a bevacizumab, és ezt a hatást az exogén rHuEPO nem befolyásolta. SPECT-CT segítségével meghatároztuk az intratumorális erekben a véráramlást, és azt tapasztaltuk, hogy az rHuEPO kezelt daganatokban az kétszerese a kezeletlen kontrollhoz képest, ugyanakkor a várakozásoknak megfelelően ez szignifikánsan kisebb a bevacizumabbal kezelt daganatokban. (6. Ábra).



Ábra 6. *In vivo* rHuEPO és bevacizumab kezelés hatása az intratumorális erek véráramlására

További, az eredeti tervekben nem szereplő vizsgálataink során megállapítottuk, hogy egy újonnan leírt angiogén molekula, az apelin fokozza a kísérletes tüdődaganatok *in vivo* növekedését és az intratumorális erek számát és nagyságát, valamint fokozott expressziója rosszabb túléléssel társul humán minták esetében.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az angiogenezis folyamata befolyásolja a tumorok növekedését, de nem egyértelmű, hogy egy angiogenezist serkentő molekula receptorának jelenléte a tumorsejteken rosszabb prognózissal társul. A mi vizsgálatainkban egyértelműen bebizonyosodott, hogy az EPO receptora nem befolyásolja a tumorsejtek növekedését, vagy a daganatok progresszióját. Ugyanakkor az intratumorális erek proliferációs képességének fokozásán keresztül más típusú erek formálódnak a daganatokban, amelyek a daganatellenes terápiák hatékonyságát növelhetik. Ez az eredmény megerősíti korábbi megfigyeléseinket, amelyeket nem tüdődaganatos modelleken tapasztaltunk.

Eredményeinkről számos hazai és nemzetközi konferencián számoltunk be, a támogatott munka témájában megjelent két nemzetközi közlemény, valamint két újabb kézirat elbírálás alatt áll.