

A pályázat alapvető célja az volt, hogy a daganatok sugárérzékenységét, illetve különböző kemoterápiás szerek elleni érzékenységét fokozzuk génterápiás eljárásokkal. Ezt az úgynevezett „gene-directed enzyme prodrug therapy” (GDEPT), vagyis gén-vezérelt enzim prodrug terápia segítségével kívántuk elérni. Az eljárás lényege, hogy a daganatsejtek érzékenységét szelektíven megnöveljük bizonyos kemoterápiás szerekkel szemben. Ehhez olyan kemoterápiás szert kell alkalmazni, amelyik alapállapotban inaktív (úgynevezett prodrug), metabolikus aktivációja sejten belül, specifikus enzim, vagy enzimek segítségével történik. Az eljárás során a daganatba bejuttatjuk a metabolizáló enzim génjét és ezzel egy fokozott génexpressziót, valamint enzim aktivációt hozunk létre. A kemoterápiás szer aktivációja fokozódik azokban a sejtekben, amelyek fokozottan termelik a metabolizáló enzimet. Ez egy tumorsejt-szelektív hatást tesz lehetővé.

Amennyiben a daganat sugárérzékenységét kívánjuk fokozni, az eljárás során olyan kemoterápiás prodrugot alkalmazunk, amelyiknek sugárérzékenyítő tulajdonságai is vannak. A klinikai gyakorlatban több, önmagában is széles körben alkalmazott kemoterápiás szerről kiderült, hogy több-kevesebb sugárérzékenyítő hatással rendelkezik. Ezek közül néhánynak a metabolikus aktivációja sejten belül meghatározott enzimhez, vagy enzimekhez köthető. Pályázatunkban három ilyen kemoterápiás szer vizsgálatával foglalkoztunk. Ez a három szer a gemcitabin, az 5-fluoro-uracil és a tirapazamin volt.

Gemcitabin sugárérzékenyítő hatásának fokozása

A gemcitabin egy viszonylag új, de már széles körben alkalmazott kemoterápiás szer, amely önmagában, vagy más kemoterápiás szerekkel kombinálva igen jó terápiás hatással rendelkezik. Ugyanakkor azt is megfigyelték, mind állatkísérletes rendszerekben, mind klinikai környezetben, hogy jelentős sugárérzékenyítő hatása is van. A gemcitabin egy citidin analóg, amely a DNS replikáció során a citidinnel kompetícióban áll, beépül a DNS láncba és gátolja annak replikációját. A gemcitabin önmagában inaktív, aktivációja sejten belül egy többlépcsős foszforiláció során megy végbe, és a trifoszfát származék épül be a DNS láncba. A metabolizáció kulcsenzime a gemcitabin-monofoszfát keletkezéséért felelős deoxicitidin kináz (továbbiakban dCK) enzim.

1. Humán dCK-t kódoló adenovírus vektor (huAd-dCK) előállítása

Kísérleteinkben első lépésként a humán dCK cDNS-t adenovírus vektorba klónoztuk. Az expressziós vektorban levő humán dCK cDNS-t PCR-el felszaporítottuk, olyan primereket használva, amelyek 5' vége EcoRI, illetve BamHI hasítóhely volt. A PCR terméket megemésztettük a megfelelő restrikciós enzimekkel, majd a Stratagene cég által forgalmazott AdEasy Kit megfelelő plazmidjába klónoztuk, egy CMV promoter mögé. Az így nyert plazmidot olyan módosított, szintén a kit részét képező 293 sejtekbe juttattuk be transzfekcióval, amelyben egy kozmid tartalmazta az adenovírus egyéb génjeit. A sejteket 0,33%-os agarose tartalmú DMEM-ben tartottuk, amíg a rekombináció a 293 sejtekben megtörtént és a citopatiás hatást jelző lítikus plakkok megjelentek (kb 8-10 nap után). A plakkokat izoláltuk, 293 sejtek fertőzésével felszaporítottuk őket és vizsgáltuk a felülúszóból izolált vírus DNS-ben a humán dCK jelenlétét PCR segítségével. A dCK pozitív plakkoknak meghatároztuk a titerét. A legmagasabb titerrel rendelkező plakkot nagy mennyiségben felszaporítottuk és CsCl grádiensen megtisztítottuk. Az így nyert tiszta vírusnak ismét meghatároztuk a titerét, amely 10^{10} pfu/ml nagyságrendű lett. A továbbiakban ezt a tiszta vírust használtuk a kísérleteinkhez.

2. Glioma sejtvonalak alap dCK aktivitása és gemcitabin érzékenysége

Első lépésként a sejtek alap dCK termelődése és gemcitabin iránti érzékenysége közötti kapcsolatot kívántuk tanulmányozni. Ezt az indokolta, hogy több irodalmi adat szerint a sejtek alap dCK szintje és a gemcitabin érzékenység között közvetlen összefüggés van, minél magasabb a sejtek alap dCK szintje, annál magasabb a sejtek gemcitabin érzékenysége is. Más adatok viszont cáfolják ezt a közvetlen összefüggést, azt állítva, hogy a sejtek gemcitabin rezisztenciáját (illetve érzékenységét) a dCK mellett egyéb, a gemcitabin metabolizmusában szerepet játszó enzimek is befolyásolják, mint például a ribonukleotid reduktáz, vagy a deoxicitidin deamináz. Kísérleteinkben négy glioma sejtvonalnak vizsgáltuk az alap dCK szintjét. A következő sejtvonalakat használtuk: eger GI261, humán U373, patkány 9L és C6. A dCK enzimaktivitás meghatározásához a sejtekből fehérje extraktumot készítettünk, majd mértük a ³H-mal jelzett deoxicitidin foszforilációjának mértékét. Mivel a deoxicitidint nem csak a dCK, hanem a timidin kináz is képes foszforilálni, a specifikus dCK aktivitás meghatározásához a reakcióelegyet túltelítettük timidinnel. Az eredményeket az 1. táblázat szemlélteti. Látható, hogy nagy különbségek vannak a sejtek alap dCK aktivitásában. A legmagasabb dCK aktivitás a GI261 sejtekben volt, az U373, 9L és C6 sejtekben az enzimaktivitás a GI261 enzimaktivitásának a 43%, 23%, illetve 14%-a volt. Valamennyi esetben a specifikus dCK aktivitás alacsonyabb volt, legalacsonyabb a C6-ban.

A továbbiakban meghatároztuk a sejtek gemcitabin érzékenységét. Exponenciális növekedési fázisban levő sejteket különböző koncentrációjú gemcitabinnal kezeltünk és 4 nappal később meghatároztuk a túlélő sejtek arányát. Az eredményeket az 1. ábra szemlélteti. Igen nagy különbségeket tapasztaltunk a sejtek gemcitabin érzékenységében. A GI261 és C6 sejtek voltak a legérzékenyebbek, itt 20 nM (GI261), illetve 75 nM (C6) már 10% alatti túlélési rátát eredményezett. Az U373 sejtek viszonylag rezisztensek voltak a gemcitabinnal szemben, hiszen 500 nM hatására csökkent a túlélési ráta 10%-ra. A 9L sejtek igen rezisztenseknek bizonyultak a gemcitabinnal szemben, hiszen 2 µM koncentrációban alkalmazva is 40%-os volt a túlélési ráta. A fenti eredmények csak log fázisban levő sejtekre volt igaz. Amennyiben konfluens sejteket kezeltünk gemcitabinnal, a gemcitabinra érzékeny sejtvonalak is sokkal rezisztensebbeknek bizonyultak.

Egy gyenge korelláció a sejtek alap dCK aktivitása és azok gemcitabin érzékenysége között kimutatható volt a GI261, U373 és 9L sejtek esetében, de nem a C6 sejteknél. A fenti kísérletekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az alap dCK aktivitás és a sejtek gemcitabin érzékenysége közötti összefüggés sejttípustól függ, egyéb, a gemcitabin metabolizációjában szerepet játszó enzimek valószínűleg eltérő súllyal vesznek részt a sejtek gemcitabin érzékenységének a kialakításában. Feltehetőleg egy sejttípus gemcitabin érzékenységének a meghatározásánál több enzim együttes szintjét kell értékelni.

3. A huAd-dCK transzdukció hatása különböző glioma sejtvonalakra in vitro

Először az adenovírus transzdukció hatékonyságát vizsgáltuk a négy glioma sejtvonalban. Egy, a bakteriális LacZ gént kódoló adenovírus vektort (Adex1CALacZ) juttattunk az in vitro növekvő sejtekbe különböző fertőzési arányt használva és nyomon követtük a LacZ aktivitást. A fertőzési arányt a fertőzéshez használt vírus/sejt arányban fejeztük ki (angol terminológia szerint MOI, vagyis „multiplicity of infection”). A transzdukció a GI261 sejtekben volt a leghatékonyabb, ahol 20 vírus/sejt arány nyomán a sejtek 70%-a tartalmazta a vírust, míg 100 vírus/sejt arány nyomán valamennyi sejten jelen volt a vírus. Ugyancsak magas, de a GI261-hez képest némileg alacsonyabb transzdukciós hatékonyságot figyeltünk meg az U373 sejtekben is (100 vírus/sejt arány esetén a sejtek 75%-a tartalmazta a vírust). A két patkány glioma sejtvonalnak lényegesen alacsonyabb volt a transzdukciós hatékonysága (40% vagy az alatt 100 vírus/sejt arány esetében). A vírus/sejt arány további növelése csak kis mértékben változtatta meg a 9L sejtek vírustartalmát: 100 vírus/sejt aránynál tapasztalt 25%-hoz képest a 300 vírus/sejt arány 40%-ra növelte a fertőzött sejtek arányát. A C6 sejtekben ez valamivel

jobb volt, mivel a 100 vírus/sejt aránynál tapasztalt 40%-os transzdukciós hatékonyságot 300 vírus/sejt aránynál 65%-ra sikerült megnövelni. Az Adex1CAlacZ vírusvektor még 300 vírus/sejt arányban történő fertőzés nyomán sem volt toxikus a vizsgált négy sejtvonal egyikére sem.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a dCK túltermelésnek van-e toxikus hatása a vizsgált sejtvonalakra. A huAd-dCK vírusvektort az in vitro növekvő sejtekbe juttattuk különböző vírus/sejt arányban és nyomon követtük a sejtek túlélését. Ha a G1261 sejteket 20 vírus/sejt arányban fertőztük a dCK-t kódoló vírus vektorral a sejtek 65%-a elpusztult, 100 vírus/sejt aránynál pedig több mint 80%-os volt a pusztulás. A fokozott dCK termelés sz U373 sejtekre is toxikus volt, 20 vírus/sejt aránynál 35%-os, míg 100 vírus/sejt aránynál 45%-os volt a sejtpusztulás. Ezzel szemben a két patkány glioma sejtvonal a magas vírus/sejt arányokat is jól tolerálta, 300 vírus/sejt aránynál a sejtpusztulás jelentéktelen volt.

4. Glioma sejtek dCK enzimaktivitása huAd-dCK-val való transzdukció nyomán

Nyomon követtük a dCK túltermelés hatását a négy glioma sejtvonal dCK aktivitására. Eredményeinket az 1. táblázatban tüntettük fel. Az enzim aktivitásokat valamennyi sejtvonalban növelni tudtuk a fertőzéshez használt vírus/sejt arányok növelésével. A legmagasabb enzim aktivitásokat 10 vírus/sejt fertőzési rátánál a G1261, illetve az U373 sejtekben találtuk, ahol az enzimaktivitások egymáshoz nagyon közeli értéket mutattak (8,03, illetve 8,16 nmol/óra/mg fehérje) valószínűleg mivel a két sejtvonal transzdukciós hatékonysága 100 vírus/sejt aránynál megközelítette a 100%-t, valamint ebben a két sejtvonalban volt a legmagasabb az alap dCK aktivitás is. A G1261 sejtekben 100 vírus/sejt aránynál magasabb transzdukciós arányt a jelentkező toxikus hatás miatt nem állt módunkban vizsgálni. Az U373 sejtekben viszont a 100 vírus/sejtnél elért enzim aktivitást nem tudtuk tovább növelni ha a vírus/sejt arányt tovább emeltük 200, vagy akár 300-ra. Ez a sejteknek a dCK enzimmel való valamilyen fajta telítődésére utal. A dCK aktivitásban a legdrámaibb változást a C6 sejtekben tapasztaltuk. Mindazonáltal, hasonlóan az U373 sejtekhez, úgy tűnik, hogy a dCK szintet itt sem lehetett a 8 nmol/óra/mg fehérje körüli érték fölé emelni. A 9L sejtekben 200 vírus/sejt alatti fertőzési rátánál a dCK aktivitás csak mérsékelten változott, feltehetően az igen alacsony transzdukciós hatékonyság miatt. Mindazonáltal 300 vírus/sejt fertőzési aránynál, (amikor a sejtek 40%-a tartalmazta a vírust) az enzimaktivitás utolérte (sőt enyhén túl is haladta) az U373-ban és C6-ban mért maximális aktivitásokat. A fenti adatok azt mutatják, hogy a négy vizsgált sejtvonalban, az alap dCK aktivitástól, illetve a transzdukciós hatékonyságtól függetlenül a dCK aktivitás 8-9 nmol/óra/mg fehérje körüli értéken tetőződik, amelyet a fertőzési ráta emelésével nem lehet tovább fokozni. Az adatok azt is mutatják, hogy a dCK termelési ráta nem arányos sem a sejtek alap dCK aktivitásával, sem a vírussal fertőzött sejtek számával. Például a G1261 sejtvonal esetében, amelyeknek a legmagasabb volt az alap dCK aktivitása és a fertőzési hatékonysága is, 100 vírus/sejt fertőzési aránynál a dCK aktivitás az alapaktivitás 8,5-szörösére emelkedett. Az U373 sejtvonalnál 100 vírus/sejt fertőzési aránynál a dCK aktivitás az alapaktivitás 26,5-szörösére nőtt. A C6 sejtekben 300 vírus/sejt fertőzési aránynál, ahol a sejtek 65%-a tartalmazta a vírust, az enzimaktivitás az alapaktivitás 143-szörösére emelkedett.

5. Gemcitabin sugárérzékenyítő hatása dCK-t túltermelő glioma sejtvonalakban in vitro

Vizsgáltuk a dCK túltermelés és gemcitabin kezelés kombinált hatását a sejtek sugárérzékenységre. A sejteket huAd-dCK adenovírus vektorral fertőztük, majd 24 órával a fertőzést követően gemcitabinnal kezeltük. A besugárzás a gemcitabin kezelést követően szintén 24 órával történt. A sejtek túlélését a besugárzást követő ötödik napon határoztuk meg. Mivel az adenovírus transzdukciós hatékonyság és az alap dCK szint a négy különböző sejtvonalban igen eltérő volt a fertőzéshez használt vírus/sejt arány is sejtvonalanként

változott: 20vírus/sejt a G1261 sejtvonal esetében, 100 vírus/sejt az U373, és 300 vírus/sejt a 9L és C6 sejtvonalaknál. A cél az volt, hogy a lehető legmagasabb dCK enzimaktivitás értékeket érjünk el úgy, hogy a sejtek minél nagyobb hányada tartalmazza a vírust. A fent alkalmazott vírus/sejt arányoknál a sejtek 40-75%-a tartalmazta a vírust. A dCK enzimaktivitás növekedés (az alapértékekhez képest) 4,2-szeres volt a G1261-nél, 26,5-szörös az U373-nál, 52-szeres a 9L-nél és 143-szoros a C6-nál. A dCK enzimaktivitások abszolút értéke sokkal szűkebb tartományban mozgott: a G1261 sejtekben 3,9; az U373 sejtekben 8,2; a 9L sejtekben 9,3 és a C6 sejtekben 8,3 nmol/óra/mg fehérje. Az alkalmazott gemcitabin koncentrációk ugyancsak különbözőek voltak a sejtek igen eltérő gemcitabin érzékenysége miatt: a G1261 sejteket 5 nM-al, a C6 sejteket 25 nM-al, az U373 sejteket 250 nM-al, míg a 9L sejteket 750 nM-al kezeltük. A fenti koncentrációknál a túlélési ráta 48% és 78% között mozgott. A G1261, C6 és U373 sejtek túlélési rátája 4 Gy besugárzás hatására 35% és 58% között mozgott, jelezve, hogy a három sejtvonal sugárérzékenysége közel áll egymáshoz. Ezzel szemben a 9L sejtek túlélési rátája 6 Gy besugárzás hatására 62% volt, jelezve, hogy ez a sejtvonal sugárrezisztensebb, mint a többi. A dCK túltermelés nem, vagy csak kissé módosította a 9L és C6 sejtek túlélését, ezzel szemben mérsékelten toxikus volt a G1261 és U373 sejtekre. A fokozott dCK aktivitásnak önmagában nem volt sugárérzékenyítő hatása. A gemcitabinnak önmagában csak a G1261 sejtek esetében volt egy szignifikáns sugárérzékenyítő hatása. A többi sejtvonal esetében a gemcitabin kezelés és besugárzás kombinációjának csak additív hatása volt. A dCK túltermelés és gemcitabin kezelés kombinációja mind a négy sejtvonal esetében supraadditív, vagyis szinergista hatással rendelkezett. Mindazonáltal a szinergizmus mértéke sejtvonalanként eltérő volt. A legenyhébb szinergista hatás a G1261 sejteknél volt (1,3-szoros fokozódás a gemcitabin toxicitásában a csak additív hatáshoz viszonyítva), ezt követte a 9L sejtvonal (1,5-szörös szinergizmus), majd a C6 és U373 sejtek (2-szeres, illetve 3-szoros szinergizmus). A dCK enzimaktivitás fokozása jelentősen javította a gemcitabin sugárérzékenyítő hatását valamennyi sejtvonalban. A szinergizmus mértéke itt is eltérő volt a négy sejtvonalban, gyakorlatilag ugyanolyan sorrendben változott, mint az előbb: a leggyengébb a G1261 és 9L sejteknél volt (1,25-szörös, illetve 1,8-szoros), és a legkifejezettebb a C6 és U373 sejteknél (2,3-szoros, illetve 2,4-szeres) (2 ábra).

A fenti kísérletek azt igazolják, hogy a fokozott dCK aktivációval sikerül javítani mind a gemcitabin toxikus, mind annak sugárérzékenyítő hatásán, de a hatás mértéke nagyban függ a sejtvonaltól. Nem igazán találtunk összefüggést viszont a tapasztalt szinergista hatás mértéke és a sejtek alap dCK szintje, vagy azok gemcitabin érzékenysége között. Ugyancsak érdekes kísérleti eredmény volt az is, hogy a dCK aktivitást csak egy bizonyos mértékig lehetett fokozni, és ez valamennyi sejtvonal esetében egy viszonylag szűk tartományban mozgott.

6. A dCK túltermelés, gemcitabin kezelés és lokális besugárzás kombinált hatásai in vivo

A dCK túltermelés in vivo hatásait két állatkísérletes modellen tanulmányoztuk: a G1261 egér és a C6 patkány modellen. Hím C57BL/6 egereket, illetve Wistar patkányokat használtunk kísérleteinkhez. Azért esett a választás erre a két modellre, mivel az in vitro sugárérzékenyítési kísérletek azt mutatták, hogy a fokozott dCK enzimaktivitás mindkét sejtvonalban növelte a gemcitabin toxikus és sugárérzékenyítő hatását, de igen eltérő mértékben. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk milyen mértékben tudjuk az in vitro eredményeket in vivo körülmények között is megerősíteni. Az állatokban intrakraniális tumort indukáltunk a daganatsejtek sztereotaxiás módon történő oltásával. Az állatokat vagy a vad típusú G1261, illetve C6 daganatsejtekkel oltottuk, vagy pedig olyan daganatsejtekkel, amelyekbe előzőleg in vitro bejuttattuk a dCK-t kódoló adenovírus vektort és így dCK túltermelődést indítottunk el bennük. A G1261 sejteket 20 vírus/sejt arányban, a C6 sejteket 300 vírus/sejt arányban fertőztük az Ad-dCK vektorral az állatba való transzplantáció előtt

egy nappal. Az állatokat intraperitoneálisan adott gemcitabinnal (30 mg/testsúly kg) kezeltük a tumor transzplantációt követő harmadik napon, majd 24 órával később az állatok fejét besugaraztuk 4 Gy Röntgen sugárzással. Nyomon követtük az állatok túlélését, a terminális állapotban levő állatokat túltattuk és felboncoltuk.

Először a G1261 modellben vizsgáltuk a fokozott dCK enzimaktivitás hatását a gemcitabin toxicitásra és sugárérzékenyítésre. A dCK-t túltermelő G1261 sejtekkel transzplantált állatok túlélése a kontroll, kezeletlen csoportéval megegyező volt. A gemcitabin kezelés ugyancsak nem változtatta meg a túlélést sem a vad típusú, sem a dCK-t túltermelő G1261 sejtekkel transzplantált állat csoportokban. A besugárzás önmagában egy állatot gyógyított meg, de kis mértékben késleltette a csoport elhullását. Ha a besugárzást gemcitabin kezeléssel kombináltuk az állatok 23%-a meggyógyult. Hasonló gyógyulási arányt tapasztaltunk akkor is, ha a dCK-t túltermelő G1261 sejtekkel oltott állatokat lokálisan besugaraztuk, vagy a besugárzást gemcitabin kezeléssel kombináltuk. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az in vitro adatokhoz hasonlóan a gemcitabinnak van egy enyhe sugárérzékenyítő hatása a G1261 sejtekben, de az in vitro adatokkal ellentétben ez a sugárérzékenyítő hatás dCK túltermeléssel tovább nem fokozható. Érdekes eredmény volt ugyanakkor a fokozott dCK aktivitás enyhe sugárérzékenyítő hatása (3 ábra). Összefoglalásképpen elmondható, hogy a G1261 modellben a dCK aktivitás fokozódás csak igen mérsékelten javítja a gemcitabin terápiás hatásait, és az in vitro tapasztalatok csak részben igazolhatóak állatkísérletekben is.

Végül vizsgáltuk a fokozott dCK enzimaktivitás hatását a gemcitabin toxicitásra és sugárérzékenyítésre a C6 patkány modellen. A kísérleti protokoll a G1261 modellel azonos volt. A tumor megtapadási arány a Wistar patkányokban 150000 sejt intrakraniális oltása nyomán 80%-os volt. A gemcitabin kezelés sem a vad típusú, sem a dCK-t túltermelő C6-al oltott állatcsoportokban nem befolyásolta az állatok túlélését. A G1261 modellhez hasonlóan a dCK túltermelésnek önmagában volt egy enyhe sugárérzékenyítő hatása (45%-os túlélés). Amikor az állatokat gemcitabinnal és lokális besugárzással kezeltük, a túlélés ismét a kontroll csoporthoz hasonlóan alakult, jelezve, hogy a gemcitabin önmagában nem rendelkezik sugárérzékenyítő hatással. Ha viszont a gemcitabin kezelés és a lokális besugárzás kombinációját a dCK-t túltermelő C6 sejtekkel oltott állatoknál alkalmaztuk, 75%-os gyógyulási arányt figyeltünk meg, ami jelentős szinergista hatásra utal, alátámasztva az in vitro adatokat (4. ábra).

7. Összefoglalás

A fenti kísérletek alapvető célja a gemcitabin terápiás, és ezen belül is elsősorban sugárérzékenyítő hatásának a fokozása volt. Ezt úgy kívántuk elérni, hogy a daganatsejtekben lokálisan megnöveltük a gemcitabin metabolizmusában kulcsszerepet játszó dCK enzim aktivációját. Kísérleteinket különböző glioma sejtvonalakban végeztük. Eredményeinket röviden az alábbi pontokban tudnánk összefoglalni:

- Nem tudtunk igazolni egy közvetlen összefüggést a sejtek gemcitabin érzékenysége és a sejtek alap dCK aktivitása között. Ez valószínűsíti, hogy a gemcitabin metabolizmusában és a nukleotid raktár egyensúlyának fenntartásában szerepet játszó egyéb enzimeknek (pl. ribonukleotid redukáz, deoxicitidin deamináz) is fontos szerepük lehet a gemcitabinnal szembeni érzékenység meghatározásában.
- A dCK enzim génjének a daganatsejtekbe való bejuttatása jelentős mértékben emelte valamennyi vizsgált sejtvonalban a dCK aktivitást. Az aktivitás fokozódás mértéke viszont jelentősen eltért a négy vizsgált sejtvonalban. Meglepő módon az enzim aktivitásokat csak egy bizonyos szintig lehetett fokozni és az abszolút enzim aktivitások a négy sejtvonalban igen közel álltak egymáshoz.
- A fokozott dCK aktiváció képes volt javítani mind a gemcitabin toxikus, mind annak sugárérzékenyítő hatásán mind in vitro, mind in vivo. A hatás mértéke azonban

jelentősen függött az alkalmazott tumor modelltől. Ismereteink szerint a nemzetközi irodalomban nincs olyan közlemény, amely a gemcitabin sugárérzékenyítő hatásának génterápiás módszerekkel való fokozásával foglalkozna.

A fenti eredményekről egy kézirat készült el, amelyet publikálásra elküldtünk egy referált angol nyelvű folyóirathoz.

Sugárterápia és 5-fluorouracil kombinált hatása GI261 modellen

Az 5-fluorouracil (5-FU) széles körben alkalmazott kemoterápiás szer, különösen a gasztro-intesztinális rendszer tumorainak kezelésére. Az 5-FU-ról kiderült, hogy sugárérzékenyítő hatásokkal is rendelkezik. Az 5-FU intracelluláris aktivációja egy többlépcsős foszforilációs folyamat révén történik, amelynek a végső terméke, a fluoro-deoxi-uridin monofoszfát (FdUMP) a timidilát szintáz enzimet gátolja, és így közvetve, a dTMP szintézisének gátlása révén, a DNS replikációt is gátolja. Sajnos, a klinikai gyakorlatban igen gyakran tapasztalható, hogy a daganatsejtek rezisztensek az 5-FU-val szemben. Az 5-FU rezisztencia kivédésének egyik módja, hogy az *E. Coli* uracil foszforiboziltranszferáz (UPRT) génjét lokálisan a daganatsejtbe juttassuk. Az UPRT az 5-FU-t közvetlenül és igen hatékonyan FUMP-vé alakítja, amely tovább alakul majd FdUMP-vé. A daganatsejtek fokozott 5-FU metabolizációja révén nem csak a rezisztens sejtek válhatnak ismét érzékennyé a gyógyszerrel szemben, hanem az érzékeny sejtek is jobban reagálnak akár kisebb 5-FU koncentrációkra is. Sugárterápiával kombinálva kihasználható az 5-FU sugárérzékenyítő tulajdonsága is, és így szinergista hatás érhető el.

Kísérleteinkben a GI261 egér tumor modellt alkalmaztuk. Egy olyan adenovírus vektort használtunk, amely az *E. coli* UPRT génjét, valamint a ganciklovir metabolikus aktivációjáért felelős timidin kináz (TK) génjét tartalmazta (továbbiakban Adex-CAUPTK). Ezt a vektort előbb *in vitro* bejuttattuk a GI261 sejtekre és nyomon követtük, hogy a sejtek hogyan reagálnak a különböző koncentrációjú 5-FU és ganciklovir kezelésre. Eredményeink azt mutatták, hogy az 5-FU önmagában is toxikus a GI261 sejtekre (10 μ M-nál valamennyi sejt elpusztul), de az UPRT jelenlétében százszor kisebb koncentrációjú 5-FU is elég azonos sejtpusztító hatás kifejtéséhez. A ganciklovir önmagában nem, csak a TK gén jelenlétében vált toxikussá. Ha az 5-FU és ganciklovir kezelést az Adex-CAUPTK vektor jelenlétében lokális besugárással kombináltuk, jelentős szinergista hatást tudtunk kimutatni, a sejtek teljes pusztulásához 0,01 μ M 5-FU is elég volt.

Fenti eredményeinket *in vivo* modellen is igazolni tudtuk. Egereket intrakraniálisan transzplantáltunk vad típusú vagy Adex-CAUPTK-val fertőzött GI261 sejtekkel. Ezt követően az állatokat 5-FU-val és ganciklovirral kezeltük, valamint az állatok fejét lokálisan besugaraztuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a CAUPTK kombinációja 5-FU-val és ganciklovirral akkor hatásos, ha az intrakraniális transzplantációhoz alacsony sejtszámú GI261 sejtet használunk ($1 \cdot 10^4$). Ekkor 80%-os túlélést kaptunk. Ha a tumor transzplantációhoz kellően nagy számú daganatsejtet használtunk ($1 \cdot 10^5$), akkor ez a terápia önmagában már nem volt hatásos, és egy állat sem gyógyult meg. Ez utóbbi esetben viszont, ha lokális besugárást is alkalmaztunk, a túlélési arány drámai módon megemelkedett, és gyakorlatilag valamennyi egér meggyógyult. Ez egy igen jelentős szinergista hatásra utal.

Kísérleteink egy másik fontos eredménye, hogy egy igen jelentős bystander hatást is sikerült kimutatni. A fent említett gyógyulási arányt úgy értük el, hogy a transzplantáció során valamennyi daganatsejt tartalmazta a CAUPTK-t kódoló vírusvektort. Kísérleteinket úgy is elvégeztük, hogy a transzplantációhoz különböző arányban kevertük a vad típusú és a vírus vektorral fertőzött GI261 sejteket, ez utóbbiakat 4-szeres, illetve 9-szeres túlsúlyban

alkalmazva. A 4-szeres túlsúly esetében is jelentős túlélést figyeltünk meg (70%), 9-szeres túlélésnél pedig az állatok 40%-a gyógyult meg.

Összefoglalás:

- A GI261 sejtek 5-FU és ganciklovir iránti érzékenysége jelentős mértékben fokozódik, ha a daganatsejtekben lokálisan megnöveljük a két szer metabolizációjáért felelős enzimek aktivitását, mind in vitro, mind in vivo. A hatás mindazonáltal függ a tumor nagyságától a kezelés pillanatában. A terápia kis tumorok esetében hatásosabb, nagyobb tumorok esetében viszont nem.
- Amennyiben a fentieket lokális besugárzással is kombináltuk, igen jelentős terápiás hatásokat értünk el viszonylag nagy tumoroknál is, amikor a kombinált gén és kemoterápiának nem volt hatása. Ez a kombinált kezelés igen jelentős szinergista hatását bizonyítja.
- A kombinált gén-, kemo- és sugárterápia esetében jelentős bystander hatást sikerült kimutatni. Ennek azért van jelentősége, mert igazolja, hogy a terápia akkor is hatásos, ha a génterápia során a vírusvektor nem jut el valamennyi daganatsejtbe. Ez klinikai szempontból egy igen lényeges kérdés, mert gyakorlati génterápia egyik legnagyobb kihívása olyan vírusvektorok, vagy módszerek alkalmazása, amellyel minél nagyobb számú daganatsejtbe bejuttatható a vírus.

Fenti eredményeinkből egy megjelent publikáció született.

Hipoxiás citotoxinok hatásának fokozása

A tirapazamin (továbbiakban TPZ) egy olyan bioreduktív szer, amely hatását szinte kizárólag csak hipoxiás körülmények között fejti ki. Vagyis egy olyan daganatsejt populációt céloz meg, amely a hagyományos sugárterápia során a leginkább sugárrezisztensnek bizonyult. A TPZ önmagában inaktív, metabolikus aktivációját a citokróm P450 reduktáz (citP450red), valamint nitrogén oxid szintáz (NOS) végzi.

A klinikai kísérletek során megfigyelték, hogy a TPZ-nek sokkal jobb terápiás hatása van, ha azt a ciszplatinnal kombinálva alkalmazzák. Irodalmi adatok beszámoltak arról, hogy ha génterápiás módszerekkel, vagyis a daganatsejtekben lokálisan fokozták a citP450red aktivitását, az jelentősen javította a TPZ daganatellenes hatásait állatkísérletes módszerekben. Semmilyen irodalmi adat nem áll viszont a rendelkezésünkre, amely a TPZ és ciszplatin kombinált alkalmazásának a hatásmechanizmusát vizagálná. Így például arra sincs információ, hogy akár a NOS, akár a citP450red aktivitás fokozása befolyásolja-e bármi módon a ciszplatin hatását.

A fent elmondottak miatt kísérleteinkben a ciszplatin és a NOS közötti kapcsolatot vizsgáltuk a GI261 egér tumor modellen. Egy plazmid expressziós vektorban levő humán NOS gén cDNS-t adenovírus vektorba klónoztuk. A klónozás ugyanazon módszerrel történt, mint a dCK gén esetében, ugyancsak a Stratagene AdEasy kitjét felhasználva. Teszteltük a fokozott NOS termelés hatását a GI261 sejtekre. Alacsony vírus/sejt (100 vagy alatta) arányban alkalmazva a vírus csak enyhén volt toxikus, viszont 200 vírus/sejt aránynál a vírus a sejtek 70%-t elpusztította. A 10 µg/ml koncentrációban alkalmazott ciszplatin gyakorlatilag még nem volt toxikus a GI261 sejtekre. Ötvenöt µg/ml koncentrációban a sejtek 50%-a, míg 100 µg/ml-nél a sejtek 65%-a pusztult el. A NOS enzim aktiváció fokozása érzékenyítette a sejteket a ciszplatin hatására, de az érzékenyítés csak csekély mértékű volt és a nagyobb (20 és 50) vírus/sejt arányoknál jelentkezett (5. ábra). Ha a sejteket besugarztuk, jelentős sugárérzékenyítő hatást figyeltünk meg azoknál a ciszplatinnal kezelt sejteknél, amelyek

NOS-t kódoló adenovírus vektorral lettek fertőzve. Az érzékenyítés a 20 és 50 vírus/sejt fertőzés esetében volt a legnyilvánvalóbb (6. ábra). Vagyis a fokozott NOS aktivációnak már önmagában volt egy sugárérzékenyítő hatása.

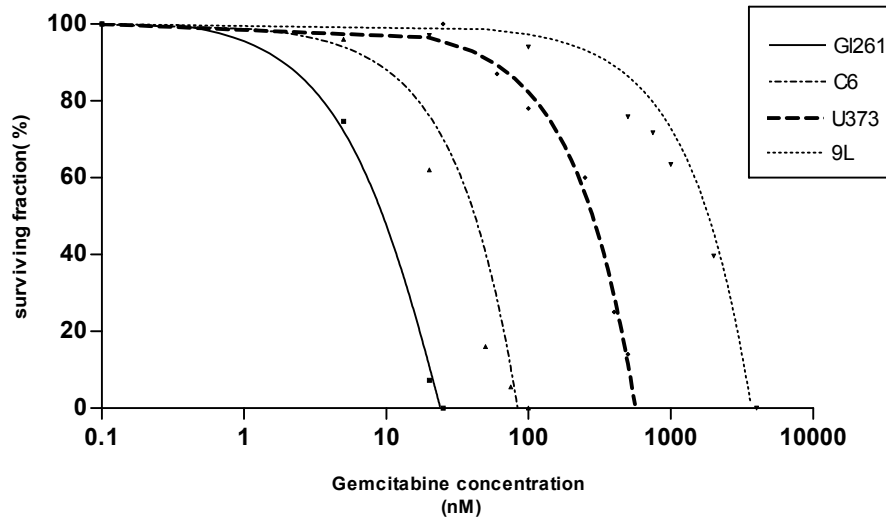
A továbbiakban állatkísérletekben vizsgáltuk a NOS túltermelődés, ciszplatin kezelés és lokális besugárzás kombinált hatását. Egerekben intrakraniális transzplantációval gliómákat oltottunk. Az oltáshoz vagy vad típusú GI261 sejteket használtunk, vagy pedig olyan GI261 sejteket, amelyekbe előzőleg bejuttattuk a NOS gént, és így ezek a sejtek fokozott NOS aktivitással rendelkeztek. Ezt követően az egereket 5 mg/kg ciszplatinnal kezeltük, majd az állatok fejét lokálisan besugarztuk. A kontroll, illetve a csak ciszplatinnal kezelt állatok túlélése között nem volt különbség sem a NOS-t túltermelő, sem a vad típusú tumorsejtekkel oltott csoportban. A besugárzás önmagában, vagy ciszplatinnal kombinációban az állatok 10%, illetve 20%-át meggyógyította. A NOS-t túltermelő GI261 sejtekkel oltott csoportban a besugarazott állatok 33%-a, míg a ciszplatin és besugárzás kombinációjával kezelt állatok 45%-a meggyógyult (7. ábra). A fenti kísérletek azt mutatják, hogy a NOS túltermelésnek in vivo is van egy jól kimutatható sugárérzékenyítő hatása, amelyet a ciszplatin kezelés kis mértékben fokozni is képes.

A pályázat keretében elsősorban a GI261 egér tumor modellt és az abból létrehozott sejtvonalat használtuk fel a különböző génterápiás protokollokhoz. A fenti pályázat keretében végzett munka során számos olyan kísérleti eredményre szert tettünk, amelyek elengedhetetlenül szükségesek egy génterápiás protokoll megtervezéséhez. Ilyenek például az adenovírus transzdukciós hatékonysága a GI261 sejtekben, az adenovírus által kódolt terápiás gén expressziójának az időkinetikája a transzdukciót követően, a GI261 sejtek megtapadásának hatékonysága a C57BL/6 egerekben, az oltáshoz használt különböző sejtszám mennyi idő alatt pusztítja el az állatokat, a lokális besugárzásnak önmagában milyen terápiás hatása van a GI261 sejtekkel intrakraniálisan oltott egerekre. Ezen eredmények összefoglalásából egy elfogadott publikáció született.

Egy további cikk kézírata készült el és lett elküldve publikálásra, amely egy összefoglaló cikk és amelyik egy, a GDEPT eljárást alkalmazó génterápiák során megfigyelt igen fontos jelenség, a bystander hatások mechanizmusával foglalkozik.

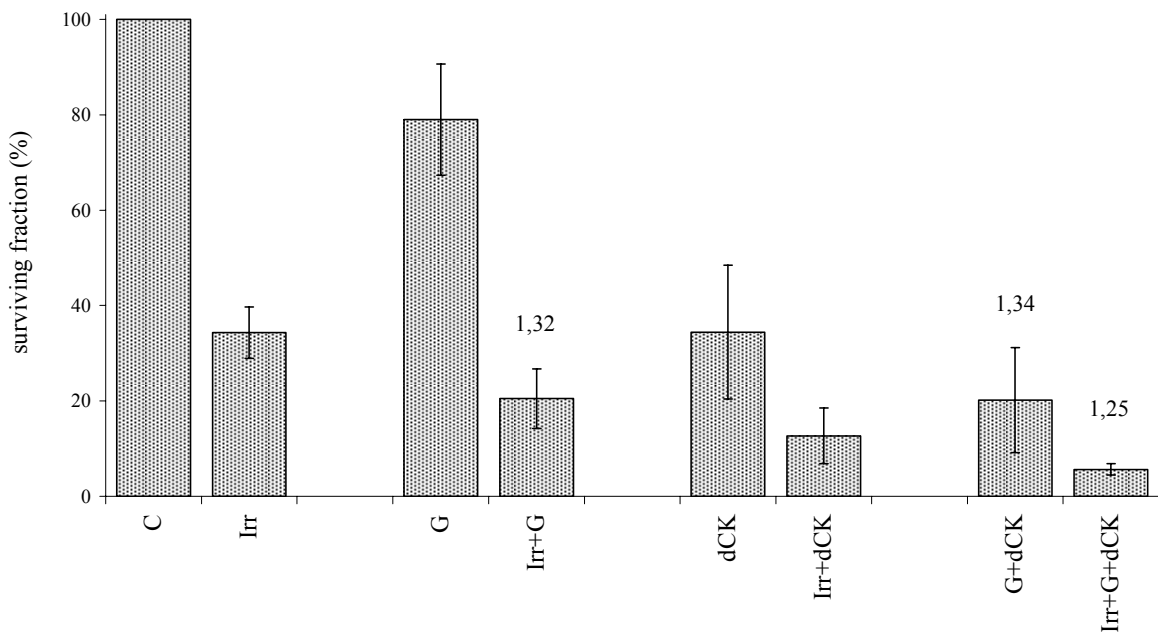
1. táblázat. Hu-Ad-dCK-val fertőzött glioma sejtvonalak specifikus dCK aktivitása

Cell lines	Transduction rates (MOI)				
	0	20	100	200	300
GI261	0,931	3,886±1,895	8,028±0,595	nd	nd
U373	0,308	6,01±0,148	8,165±0,508	8,284±0,479	8,501±0,442
9L	0,179	0,384±0,019	2,208±1,575	6,32±1,341	9,337±1,449
C6	0,058	0,839±0,113	5,312±0,734	8,066±0,148	8,313±0,241



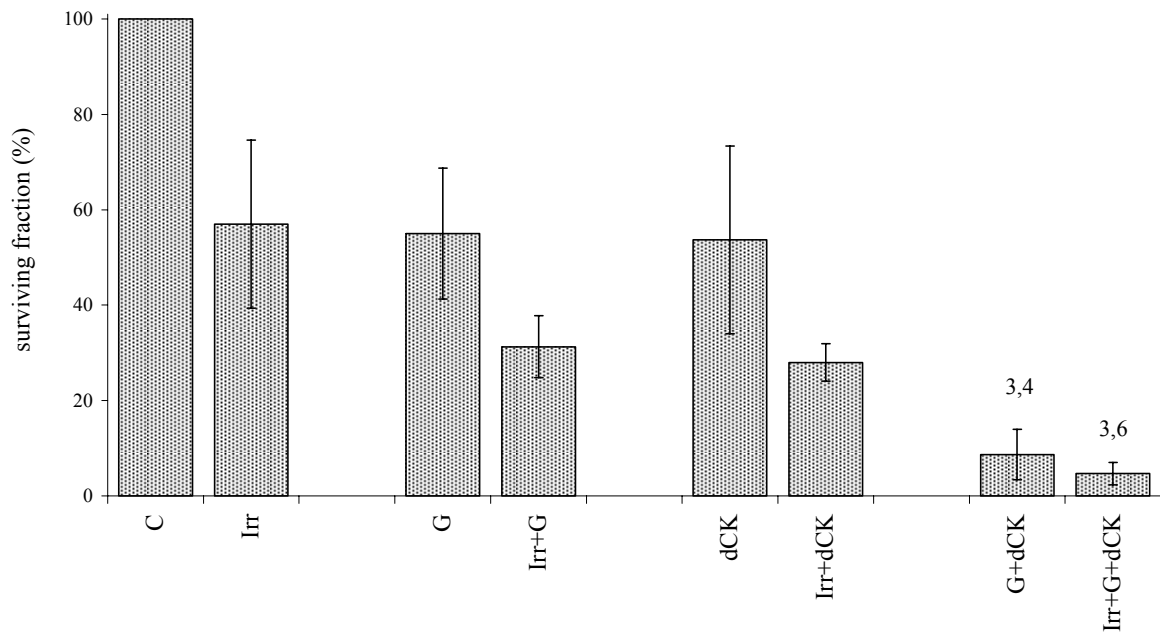
1. ábra: Sejtek gemcitabin érzékenysége

GI261



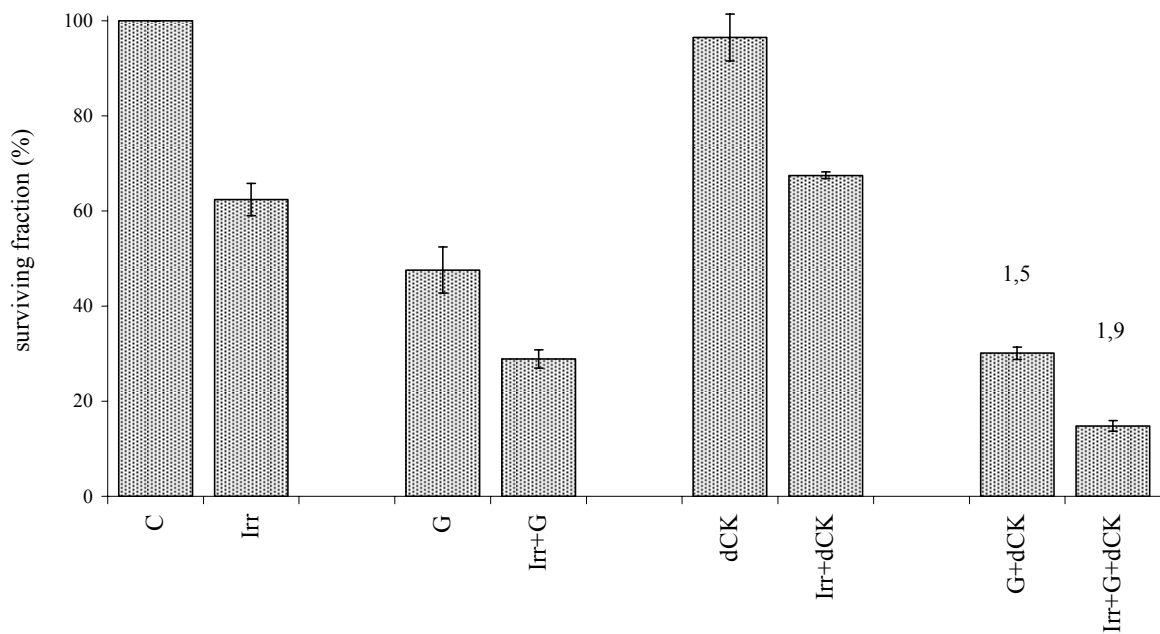
2A ábra: dCK túltermelés, gemcitabin kezelés és besugárzás kombinált hatásának vizsgálata GI261 sejtekben in vitro

U373



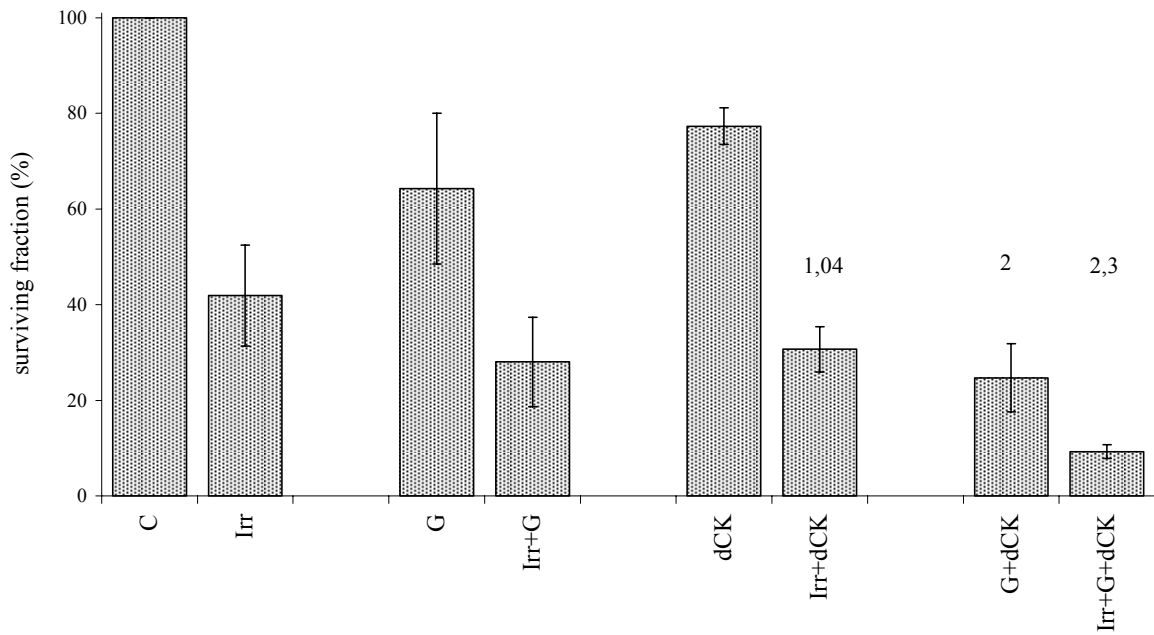
2B ábra: dCK túltermelés, gemcitabin kezelés és besugárzás kombinált hatásának vizsgálata U373 sejtekben in vitro

9L

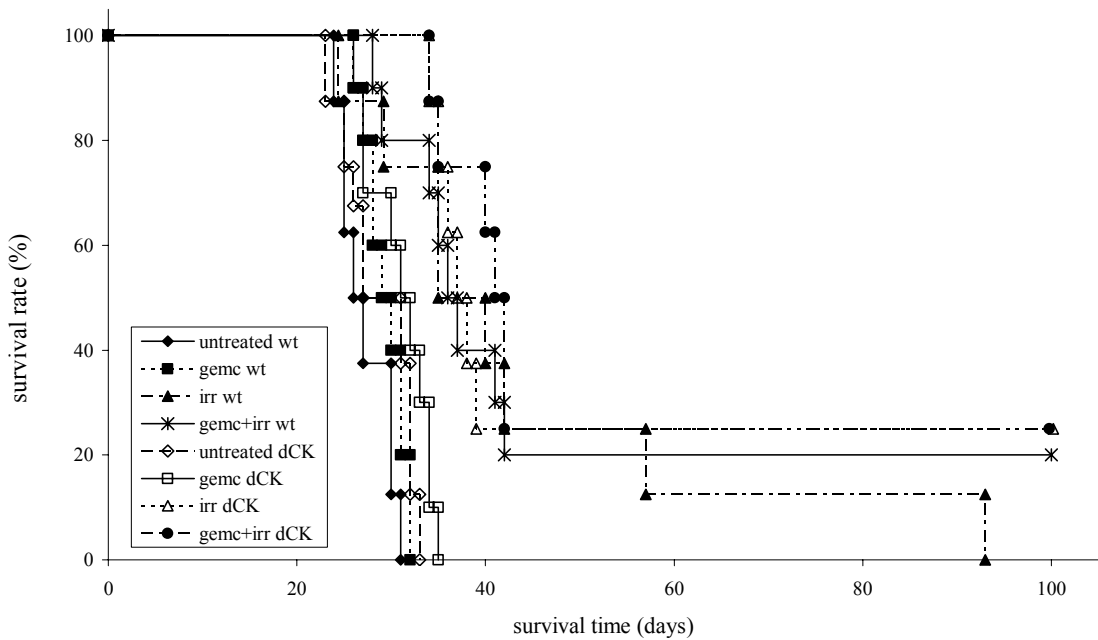


2C ábra: dCK túltermelés, gemcitabin kezelés és besugárzás kombinált hatásának vizsgálata 9L sejtekben in vitro

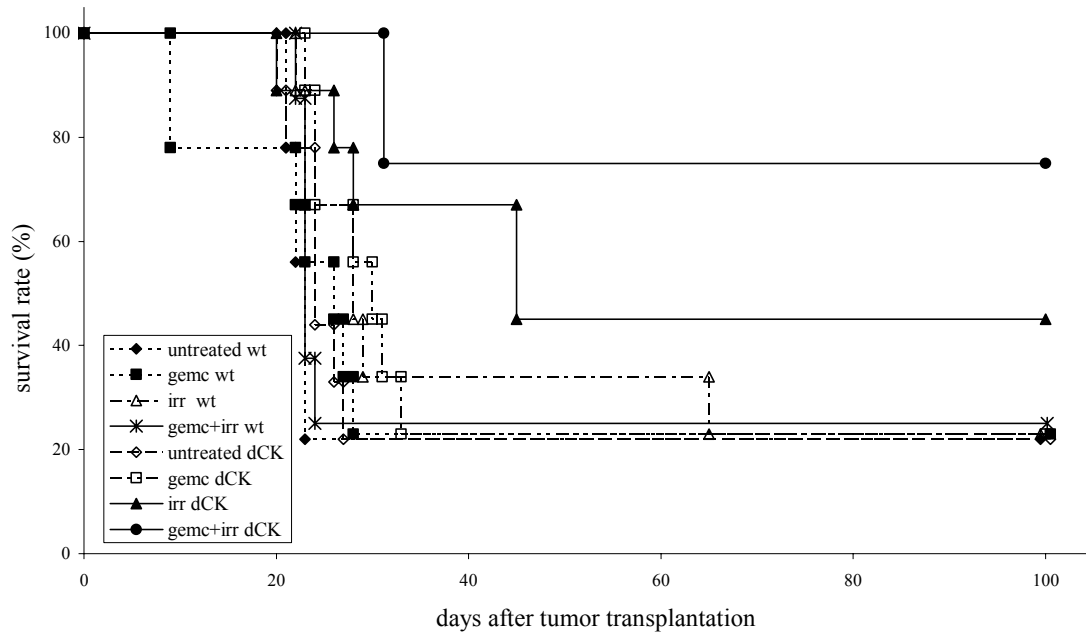
C6



2D ábra: CK túltermelés, gemcitabin kezelés és besugárzás kombinált hatásának vizsgálata C6 sejtekben in vitro

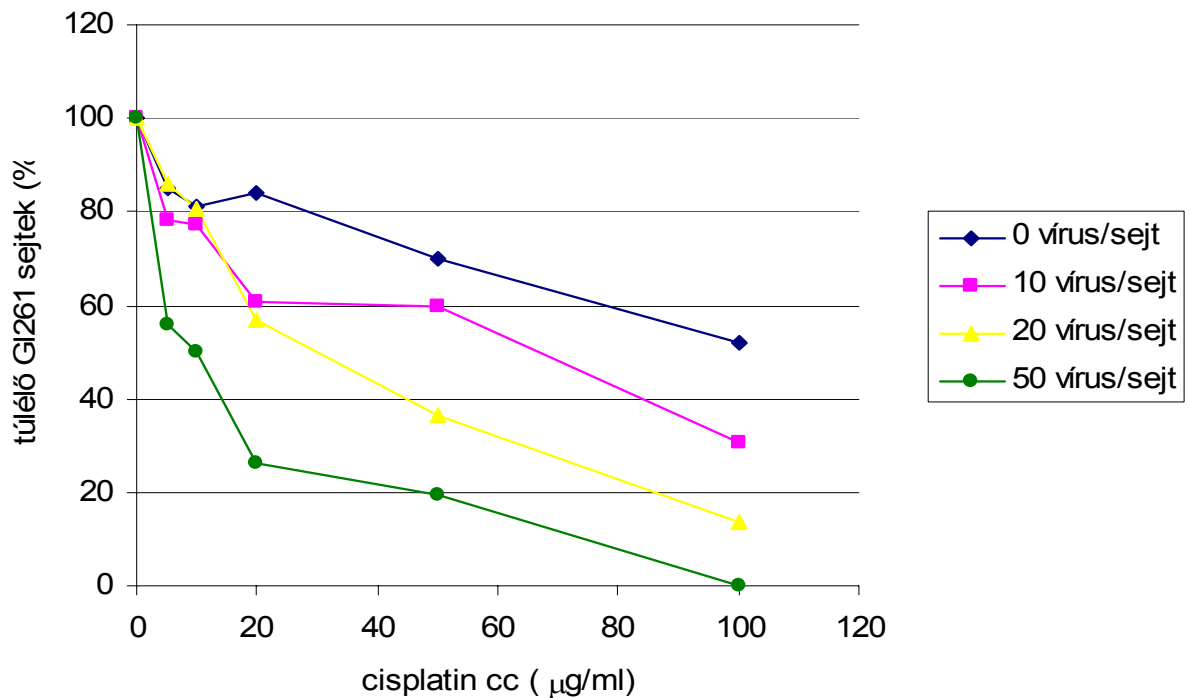


3 ábra: G1261-el oltott egerek túlélése fokozott dCK termelődés, gemcitabin kezelés és lokális besugárzás hatására



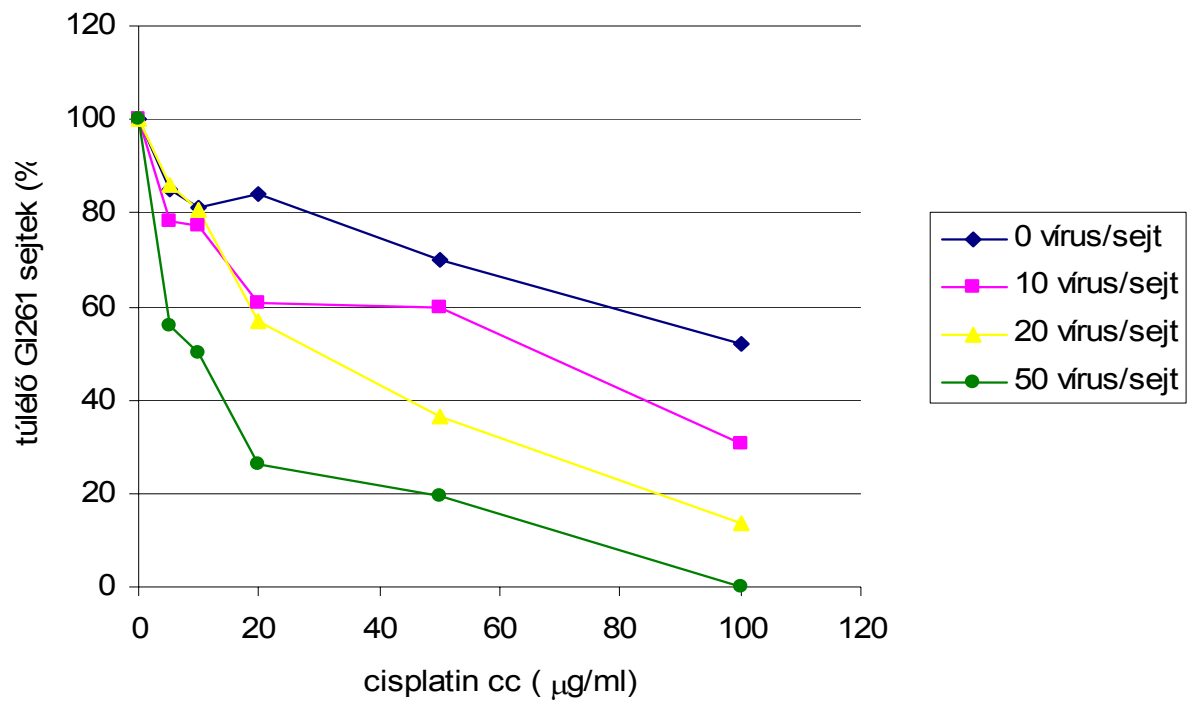
4 ábra: C6-al oltott patkányok túlélése fokozott dCK termelődés, gemcitabin kezelés és lokális besugárzás hatására

5 ábra: Cisplatinhatás (1,5h) sugárkezelte GI261 sejteken normoxiás környezetben



6 ábra:

Cisplatinhatás (1,5h) sugárkezelt GI261 sejteken normoxiás környezetben



6 ábra:

GI261 sejtekkel intrakraniálisan transzplantált egerek túlélése

