

Antiangiogén receptor tirozinkináz-inhibitorok intratumorális eloszlása és hatékonysága

Doktori tézisek

Török Szilvia

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulensek:

Dr. Döme Balázs, MD, PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Marko-Varga György, PhD, professzor

Hivatalos bírálók:

Dr. Sebestyén Anna, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Horváth Zsolt, MD, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Matolcsy András, DSc, professzor

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szende Béla, DSc, professzor emeritus
Dr. Vellainé Takács Krisztina, PhD, egyetemi docens

Budapest
2016

1. BEVEZETÉS

Fiziológiás körülmények között az angiogenezis folyamata alacsony oxigén szintre adott válaszként aktiválódik. A folyamat fő irányítója a HIF (Hipoxia Indukálható Faktor) komplex. Alacsony oxigénszint mellett a HIF molekula α és β alegysége összeáll, és ko-aktivátorukhoz, a p300/CBP-hez (CREBB kötő fehérje) kapcsolódva célgénjeikhez kötődnek, mellyel befolyásolják azok átíródását. Ezen célgének közül számosan felelősek az angiogenezis előidézéséért annak érdekében, hogy a szövet oxigénellátottságát növeljék. Az endotélbimbózás legfontosabb hipoxiától-függő citokinje a VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor). Azonban ezen a molekulán kívül számos egyéb faktor képes pozitívan befolyásolni az angiogenezis folyamatát, úgy, mint a vérlemezke eredetű növekedési faktorok (PDGF-ek), a fibroblaszt növekedési faktorok (FGF-ek), a placentális növekedési faktor, az angiopoietinek, a Jagged, az epidermális növekedési faktor, a hepatocita növekedési faktor és az interleukin-8.

Ezen ligandok az endotélsejteken lévő receptoraikhoz kötődve autokrin vagy parakrin módon hatnak. A növekedési faktor kötődése olyan szignalizációs útvonalakat aktivál, melyek befolyásolják az endotélsejtek túlélését, osztódását, migrációját, így a meglévő erek fennmaradását és az új erek képződését.

Emellett ezen útvonalak további angiogenezist érintő folyamatokat szabályoznak, mint további növekedési faktorok szekréciója, angiogén receptorok kifejeződésének fokozása, sejt-sejt és sejt-mátrix interakciók megváltoztatása mátrix metalloproteinázok segítségével, valamint az endoteliális sejtadhéziós molekulák aktiválása.

Az egészséges szervezet az angiogenezis folyamatát a stimuláló és gátló ágensek egyensúlyban tartásával szabályozza. Az angiogenezist fokozó faktorok túlzott kifejeződésének hatására az érnövekedés rendkívül intenzívvé válik néhány patológiás kórképben, így a daganatos megbetegedésekben is. 1971-ben Judah Folkman vetette fel, hogy a daganatsejtek maguk szekretálnak olyan proangiogén faktorokat, melyek lehetővé teszik az 1-2 mm átmérő feletti tumorok

számára is, hogy saját érhálózatot fejlesztve növekedésükhöz szükséges mennyiségű oxigénhez és tápanyaghoz jussanak. Ráadásul a HIF kifejeződés és/vagy egyéb faktorok szabályozásával különböző onkogének jelenléte, vagy tumorszuppresszor gének funkciójának kiesése szintén serkentőleg hat a tumorindukált angiogenezis folyamatára.

Az érújdonképződés folyamatában legfontosabb szerepet játszó molekulák a receptor tirozinkinázok (RTK) közé tartoznak, úgy, mint a VEGFR-ek, PDGFR-ek, FGFR-ek és TIE receptorok. Az angiogén RTK-k mellett szerin-treonin kinázok szintén szabályozzák az angiogenezis folyamatát. Ezek az RTK-khoz hasonló módon hatnak. A szerin-treonin kinázok fő képviselői a TGF receptor család tagjai. Más receptorok nem a partner molekulák foszforilálásával, hanem lehetséges transzkripciós aktivátorok hatásának felerősítésével hatnak. Ezek közül a Notch receptorcsalád a fő képviselője az angiogén szignalizációnak.

A VEGF-VEGFR tengely által vezérelt endotélbimbózás mellett alternatív vaszkularizációs mechanizmusok jelenléte is bizonyított, amik nem feltétlenül befolyásolhatók a fő angiogén molekulákkal. Ezen mechanizmusok közé tartozik az intusszuszeptív angiogenezis, az érinkorporáció, a glomeruloid angiogenezis, a posztnatális vaszkulogenezis és a vaszkuláris mimikri.

A malignus szövetekben a proangiogén faktorok túlsúlya figyelhető meg, ezért a tumoros erek mind funkcióban, mind strukturálisan különböznek normális társaiktól.

A normális érhálózat felnőtt emberben általában nyugvó; a hosszú életidejű endotélsejtek jól definiált bazális membránon helyezkednek el, melyet simaizom- és pericyta-borítás stabilizál, az endotélcsövet pedig sejtkapcsoló struktúrák tartják össze. Az erek fennmaradását autokrin szignálok biztosítják, az oxigénszenzorok által indított jel pedig lehetővé teszi a megfelelő véráramlást. Ezzel szemben a tumoros erek esetében legtöbbször hiányos a pericyta- és simaizomsejt-borítás, a bazális membrán gyakran leépül, az endotélsejtek morfológiája megváltozik, a közöttük lévő sejt-sejt kapcsolatok gyengülnek, elvesznek. E változások hatására az erek kitágulnak, amely negatívan befolyásolja az adott érfelszín által ellátott daganatszövet arányát. A sejtkapcsolatok gyengülése az

oxigénszenzorok ezeken keresztül közvetített jelének elvesztéséhez vezet, amely abnormális áramlást eredményez a tumoros érhalózatban. A bazális membrán hiányosságai miatt nemcsak a metasztatizáló daganatsejtek jutnak be könnyebben az érbe, de az erek hiperpermeábilissá válásának következtében megnövekedett intersticiális nyomást a csökkent nyirokérzfunkció képtelen elvezetni. Mindezek hatására a tumorban rossz lesz az oxigénellátottság, mely nagy glikolitikus aktivitáshoz vezet annak érdekében, hogy a hiányos tápanyag-ellátottság és a viszonylag nagy tömegű daganat miatt kialakuló többlet energiaigényt fedezni lehessen. A daganat környezetében így kialakuló savas közeg hipoxia rezisztens tumorsejtekre szelektál, így tovább fokozza a tumorsejtek invazív és metasztatizáló képességét, egy ördögi kört alakítva ki. Ráadásul, a nagy nyomás miatt az antiangiogén szerekek esetlegesen kombinációban alkalmazott hagyományos terápiák nehezebben jutnak be a tumorba. Mindezen változások egyértelművé teszik, hogy a daganatos erek célzása jelentős hatással lehet a tumor fennmaradásának gátlására és metasztatizáló képességének korlátozására. Ezt megfontolva az elmúlt évtizedekben jelentősen megnőtt az angiogenezissel foglalkozó fejlesztések és kutatások száma.

Érnövekedést gátló hatással rendelkező molekulák a következők:

A hagyományos terápiás ágensek „mellékhatásként” rendelkeznek antiangiogén funkcióval. Az érroncsoló molekulák szelektíven támadják a tumoros ereket gyors és dinamikus hatást fejtve ki. A gyorsan osztódó endotélsejteket támadják a tubulin molekula kolhicin kötő helyét célozva (tubulin-kötő ágensek) vagy az érhalózat összeomlását váltva ki TNF- α hatásán keresztül (flavonoid típusú szerek). Hatásukra a vérellátás összeomlik, és az így kialakuló oxigén- és tápanyaghiány hatására elhalnak a szövetek.

A vazoaktív ágensek mind a már létező, mind az újonnan képződő ereket gátolják. Ráadásul nem csak a daganatok közepén elhelyezkedő nagy ereket célozzák, de a periférián lévő kisebbeket is az erek hiperabnormalizációját, hiperpermeabilizációját okozva. Ennek hatására a kemoterápiás szerek könnyebben eljutnak a tumorba. Mivel a szisztémás alkalmazás során nagyfokú toxicitás léphet fel,

így kis dózisu, helyi és más szerekkkel felváltva történő alkalmazásuk ajánlott.

Az angiogenezis inhibitorok gátolják az új erek képződését, kevésbé hatva a már létező érrendszerre. Főként a tumor széli kis erekben, és a daganatképződés, valamint a metszattízálódás kezdeti szakaszában tűnnek hatékonynak. Szelektív HIF gátó molekulák hiányában, valamint mivel sok faktor befolyásolja az angiogén citokinek szekrécióját, a legáltalánosabban alkalmazott módszer a HIF molekulától downstream elhelyezkedő endotélsejt (receptor)-sztróma (növekedési faktor) kommunikáció gátlása. A növekedési faktorokat monoklonális antitestekkel vagy szolubilis „csapda” receptorokkal gátolják. Emellett az endotélsejteken lévő receptorok extracelluláris részén szintén monoklonális antitestekkel akadályozzák a növekedési faktor bekötődését, vagy receptor tirozinkináz-inhibitorokkal blokkolják a fehérjék kináz doménjét, ami kötődési helyül szolgál az angiogén szignált közvetítő molekulák számára.

Mivel az antiangiogén RTKI-k a daganatsejteknél genetikailag stabilabb endotélsejteket célozzák, ezért kevésbé volt várható ezen molekulacsoporttal szembeni rezisztencia kialakulása. Ennek ellenére az antiangiogén ágensekkel kezelt betegeknel tapasztalt gyógyszerrezisztencia fontos klinikai probléma.

Mind primer (kezdeti válasz elmaradása), mind másodlagos (egy rövid regresszió utáni tumor növekedés) rezisztenciát dokumentáltak már.

Jelentős mennyiségű irodalom tárgyalja az antiangiogén RTKI terápiákkal szembeni potenciális rezisztencia mechanizmusokat, például a hipoxia vezérelte mechanizmusokat, a terápia hatására kompenzatórikusan más angiogén molekuláris útvonalra csatolást, a mieloid vagy endotél prekurzorsejtek mozgósítását, célreceptorok downregulációját, valamint alternatív beereződési mechanizmusok beindítását. Habár farmakokinetikai elégtelenségeket szintén leírtak már, eddig a legtöbb vizsgálat, ami a rezisztencia okát keresi antiangiogén terápiával szemben, az imént említett mechanizmusokra fókuszál.

Annak ellenére, hogy a gyógyszerek felszívódása, eloszlása, metabolizációja és eliminációja (ADME) alapjaiban befolyásolja a azok terápiás hatékonyságát, mindeddig a széleskörű ADME

vizsgálatok a gyógyszerfejlesztés késői szakaszában kerültek kivitelezésre, leginkább a Fázis I klinikai vizsgálatokban. Ez egy fő oka lehet az alacsony, 11%-os aránynak, amivel az emberben is tesztelt gyógyszerek klinikai regisztrációra kerültek az 1990-es években. Ez az arány különösen rossz, 5% körüli az onkológiai gyógyszerek körében.

A tömegspektrometria egy olyan technika, amely lehetővé teszi a jelöletlen gyógyszerek és metabolitjaik meghatározását különböző szöveti környezetben, így lehetőséget ad a kutatóknak, hogy tanulmányozzák az eredeti gyógyszermolekula és annak aktív/toxikus metabolitjának felszívódását, eloszlását és kiválasztódását.

Habár a VEGF molekula és receptorának szerepe a kolorektális daganatok növekedésében, beereződésében és metasztatizálásában már az 1990-es évektől ismert, és számos antiangiogén molekula törzskönyvezett ezen daganatcsoport kezelésére, a klasszikus antiangiogén RTKI-k nem bizonyultak hatékonyak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az antiangiogén RTKI-kkal szerzett klinikai tapasztalatok a várt érnövekedést gátló és normalizáló hatásuk ellenére ellentmondásosak. Idáig egyetlen biomarkert sem kapcsoltak össze az ezen gyógyszerekre adott tumorválasszal. Figyelembe véve, hogy az ADME alapjaiban képes befolyásolni különböző gyógyszerek terápiás hatékonyságát, a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Egy, az antiangiogén RTKI-k és metabolitjaik különböző szövetekben való detektálására alkalmas módszer kidolgozása
2. Különböző antiangiogén RTKI-k intratumorális szintjének és disztribúciójának vizsgálata MALDI tömegspektrometriai képalkotással-vel szubkután növé egér kolon tumorokban
3. A lehetséges összefüggések vizsgálata az intratumorális antiangiogén gyógyszer szintek és –eloszlások és a következő paraméterek közt: 3.1./ tumornövekedés gátlás; 3.2./ érendzítés és –terület; 3.3./ érintegritás (alaphátya, pericita és α -simaizom aktin (SMA) borítás); 3.4./ intratumorális hipoxiás

területek mérete és lokalizációja; 3.5./ az RTKI-k által célzott receptorok kifejeződése és eloszlása

3. MÓDSZEREK

Tumor modellek

Kísérleteinkhez két különböző egér vastagbél adenokarcinóma modellt (C26 és C38) használtunk.

A C26 sejtvonalat RPMI 1640 mediumban tenyésztettük, melyhez 10% borjúsérumot és 1% penicillin-streptomycint adtunk, és a sejteket 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett nedves kamrában tartottuk. Csoportonként hat nőstény Balb/C egeret oltottunk szubkután 2x10⁶ C26 sejttel.

A C38 tumorok 5×5×5 mm-es tumor darabok sorozatos átültetésével voltak fenntartva, majd a nőstény C57Bl/6 kísérleti egerekbe ültetve.

Gyógyszerek

A C26 tumort hordozó egerek gyógyszeres kezeléséhez öt különböző antiangiogén RTKI-t választottunk ki, melyek vagy mind az FDA, mind az EMEA által elfogadottak (pazopanib, sorafenib, sunitinib) vagy Fázis III-as vizsgálatokban tesztelés alatt állnak (motesanib, vatalanib). A C38-as modellben két csoportot alakítottunk ki, a vatalanibbal kezelt és a kontroll csoportot. Mindegyik RTKI ismert és jelentős IC50 értékkel rendelkezik a fő angiogén receptorok, a VEGFR2, a PDGF- és FGF receptorokkal szemben.

A gyógyszereket 2% karboximetil-cellulózban oldottuk 2 mg/mL metil 4-hidroxibenzoáttal. A kontroll egereket csak az oldószerrel kezeltük.

Kezelések

Az RTKI kezelés a C26 tumorok esetében 2 héttel a tumorsejtek beinjektálása után kezdődött, míg C38 tumorok esetén 9 nappal a beültetés után. A gyógyszereket 100 mg/kg dózisban orálisan adtuk két héten keresztül heti ötször.

A tumorméretet heti háromszor mértük kaliper segítségével, és a tumor térfogatának kifejezéséhez egy elnyújtott ellipszoid térfogatát

számoltuk ki a következő képlet segítségével: hosszúság x szélesség² x $\pi/6$.

Az intratumorális hipoxia méréséhez az egerek 60 mg/kg pimonidazolt kaptak intraperitoneálisan, majd két órával az utolsó RTKI kezelés után a szemzughból vért vettünk és az egereket termináltuk. A tumorokat eltávolítottuk, és gyorsfagyasztottuk.

Vaszkuláris paraméterek és célreceptorok analízise

Az RTKI eloszlás, a vaszkuláris paraméterek és a célreceptorok vizsgálatához 10 egymás melletti metszetet vágunk a fagyasztott tumorokból. Az 5. és a 7. metszeten az adott antiangiogén RTKI eloszlását és mennyiségét vizsgáltuk MALDI tömegspektrometriai képalkotással, majd ezt követően HE festést hajtottunk végre rajtuk.

Az első négy metszeten anti-FGFR1, anti-PDGFR α , anti-PDGFR β és anti-VEGFR2 antitesteket alkalmazva az RTKI-k célreceptorainak eloszlását vizsgáltuk. A hipoxiás területek megjelenítésére a 6. metszetet jelöltük a Hypoxyprobe-1 Plus Kit segítségével. A 8-10. metszeten az erek struktúráját vizsgáltuk anti-laminin, anti-dezmin és anti- α SMA antitesttel, így jelölve rendre az endotélsejteket körülvevő bazális membránt, pericitákat és simizomsejteket. Valamennyi immunhisztokémiai analízisre szánt metszetet a fenti paraméterek mellett anti-egér CD31 antitesttel, valamint Hoechst 33342-vel is jelöltünk, majd üveglemez alatt ProlongGold Antifade Reagenssel fedtük.

A metszeteket beszkeneltük TissueFAXS, majd analizáltuk ImageJ és TissueGnostics 4.0.0140 szoftverek segítségével.

Az érdenzitás és -terület számítására az ereket vagy a CD31 pozitív pixeleket számoltuk meg tumoronként 10 darab élő szövetet tartalmazó látótéren. Az erek szerkezetében bekövetkező változásokat azon erek %-os arányával fejeztük ki, amelyek laminin, dezmin vagy α SMA pozitívak voltak ugyancsak 10 látótéren.

A hipoxiás területek, illetve a célreceptorok (PDGFR α , PDGFR β , FGFR1) kifejeződését a teljes metszet területének arányában fejeztük ki. A VEGFR2 jelsűrűséget a VEGFR2 pozitív tumor- és endotélsejtek számolásával, míg a VEGFR2 területet ezen sejtek által elfoglalt pixelek számával kaptuk 10 élő szövetről készült intratumorális látótéren.

Gyógyszerek karakterizálása

A molekulák karakterizálásához a gyógyszereket 0,5 mg/mL koncentrációban oldottuk fel 50%-os metanolban. A mátrix, 7,5 mg/mL α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav volt, ami 50%-os acetonitrilben és 0,1%-os trifluor-ecetsavban (TFA) volt oldva. A gyógyszer-molekulák oldatának 1 μ L-ét 1 μ L mátrix oldattal borítva cseppentettük MALDI mintatartó lemezre. MALDI LTQ Orbitrap XL tömegspektrométer segítségével pozitív polaritást használva 20 ún. survey módban mért mérésből, 60000-es felbontás mellett teljes tömegspektrumot kaptunk. A nitrogén lézer 10 μ J-on üzemelt. A detektált prekursor iont 40%-os normalizált ütközési energiát (NCE) alkalmazva 30 ms aktiválási idő és 0,25 aktiválási feszültség mellett fragmentáltuk, majd izoláltuk az ionokat 2.0 m/z szélességben, és normál letapogatási sebességgel centroid módot alkalmazva MS/MS spektrumot kaptunk.

Antiangiogén RTKI-k szöveti képkalkító elemzése

Fagyasztott szövetből cryotommal 10 μ m vastag metszeteket vágunk és üveg tárgylemezre helyeztük őket. A metszet száradása után 0,5 mL mátrix oldatot vittünk fel a metszetre stabil helyzetben álló festékszóróval lépésenként, elkerülve a minta elázását. A teljes spektrumot Orbitrap analizátorral nyertük 60000-es felbontásnál (400-as m/z arány mellett). A mintákat 150-800 Da közötti tartományban vizsgáltuk, aktivált automatikus erősítésszabályozást és 100 μ m-es mintavételi távolságot alkalmazva.

A fragmensionok detektálásához az antiangiogén gyógyszer megfigyelt prekursor ion csúcsait 2,0 m/z szélességű izolációs ablakkal fragmentáltuk, 40%-os NCE-t használva 30 ms aktiválási idővel és 0,25 aktiválási feszültséggel. Az MS/MS spektrum generálásához minimálisan 500 mért jelre volt szükség. A fragmensionokat a lineáris ioncsapdában analizáltuk normál letapogatási sebességgel. A spektrumok értékelését Xcalibur v 2.0.7. szoftverrel végeztük, míg a prekursor molekulák, a metabolitok és fragmensionok vizualizálása ImageQuest™ szoftverrel történt.

Kvantifikáció

Az intratumorális gyógyszerkoncentráció kvantifikálásához minden gyógyszer esetében kalibrációs egyeneseket készítettünk kontroll C26 és C38 tumormetszeteken. A gyógyszereket 50% metanolban oldottuk 0,001-0,5 $\mu\text{mol/mL}$ -es koncentrációban és minden koncentrációból 0,5 μL -t csepegtettünk a tumorszövetre. A mátrix felvitele és a mérési beállítások a gyógyszerrel kezelt tumorok szöveti képződésével megegyező módon történtek. Az egyes felvitt koncentrációk átlagosan mért szignálintenzitását a teljes ionáramra normalizáltuk az Xcalibur v 2.0.7. és az ImageQuest™ programok segítségével. A különböző koncentrációkhoz tartozó átlagos normalizált jelintenzitások alapján kalibrációs egyeneseket készítettünk, és ennek megfelelően számítottuk ki az *in vivo* kezelt tumorok metszeteiben a szöveti gyógyszerkoncentrációt.

A gyógyszermolekulák vérben való detektálása

A molekulák felszívódását azok vérből való kimutatásával vizsgáltuk. A plazma minta 20 μL -ét eltávolítottuk, és acetonitrilrel csapadékot képeztünk az alakos elemekből. Vortexelés után 15000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltuk. A felülúszót lepipettáztuk, vákuumos szárítás után 20 μL 0,1%-os víz-TFA elegyben oldatba vittük. Pierce C18 pipettahegyeket használtunk a gyógyszermolekulák koncentrálásához és a koncentrátum kromatográfiás tisztításához, a gyártó utasításai szerint. A minta 1 μL -éhez 1 μL mátrixot kevertünk a MALDI mintatartó lemezen, majd azonos beállításokat használva, mint a vegyületek karakterizációjánál, elvégeztük a tömegspektrometriai mérést.

A tömegspektrometriai mérések során mindvégig azokat a gyógyszereket tekintettük azonosítottak, amelyek esetén a prekursor ion mellett legalább egy fragmensionit is sikerült detektálnunk.

Statisztikai analízis

Több csoport közötti parametrikus-, illetve nem parametrikus változók közötti eltérések mérésére Dunnett posthoc teszttel kombinált ANOVA, illetve Dunn teszttel kombinált Kruskal-Wallis próbát használtunk. Két csoport összevetése során t-próbát vagy

Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. A különbségeket $p < 0.05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Kiértékeléseinket a GraphPad Prism 5.0 program segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK

Tumornövekedés gátlás

Szignifikáns különbség mutatkozott a relatív tumornövekedés gátló hatás tekintetében a különböző gyógyszerek közt két hétnyi RTKI kezelés után a C26 modell esetében. A sunitinib volt az egyetlen gyógyszer, ami hatással volt a tumornövekedésre. A C38 modell esetében két hétnyi vatalanib kezelés szignifikánsan csökkent tumorméretet eredményezett a kontrollhoz képest.

Immunhisztokémiai analízis

A szubkután egértumorok növekedése angiogenezis-függő. Ezért további vizsgálatainkban azt teszteltük, hogy a tumornövekedésben tapasztalt különbségek összhangban vannak-e a gyógyszerek vaszkuláris paraméterekre és célreceptorok kifejeződésére gyakorolt hatásával. Ezért a tumormetszeteket immunhisztokémiai jelölésnek vetettük alá.

Az antiangiogén RTK-k kifejeződése jelentősen befolyásolja a kezelésre adott választ és a sikeres terápia szintén hat a célreceptorok elhelyezkedésére és funkciójára. A C26 modellben PDGFR α , - β és FGFR1 kifejeződést tapasztaltunk mind a tumorsejteken, mind az endotélsejtek mentén, és expressziójuk nem változott egyik gyógyszerrel való kezelés hatására sem. A C38 tumorok esetében a tumorsejtek ugyan nem expresszálták a receptorokat, de a falis sejtek határozott PDGFR α , - β és FGFR1 kifejeződést mutattak. Kezelés hatására, csakúgy, mint a C26 modell esetében, nem mutatkozott változás a receptorok expressziójában.

A VEGFR2 receptor mind a tumor-, mind az endotélsejteken megtalálható volt a C26 modellben, és mind a VEGFR2 szignálok számában, mind területében különbség mutatkozott, de kizárólag a sunitinibbel kezelt csoportban.

A C38 tumorok esetében a CD31+ endotélsejteken gyenge VEGFR2 kifejeződést láttunk, de a tumorsejtek nem expresszálták ezt a

receptort. Ebben a modellben nem tapasztaltunk különbséget a VEGFR2 kifejeződésében a kezelt és kezeletlen csoport között.

Szignifikáns, különbség mutatkozott az érdenzitásban és érterületben a C26 modell esetén, mely a sunitinib és a motesanib esetén jelentősebb, míg érdenzitást vizsgálva minimálisan a vatalanibbal, érterületet tekintve pedig kevésbé jelentősen a sorafenibbel kezelt csoportban volt megfigyelhető. A C38 modellben az érdenzitásban nem, míg az érterületben szignifikáns különbség volt detektálható a két csoport között. Fontos megemlíteni, hogy jelentős különbségeket tapasztaltunk az erek struktúrájában a két modellben. Míg a C26 tumorok nagyszámú, de kis méretű erekkel voltak jellemezhetőek, a C38 tumorokban kevés, de komplex vaszkuláris struktúra volt megfigyelhető.

Az érdenzítés összefüggést mutatott a tumor oxigénellátottságával. A hipoxiás területek a tumor kevésbé vaszkularizált részein voltak megfigyelhetőek. Ennek megfelelően az intratumorális hipoxiás területek méretében jelentős növekedés volt megfigyelhető a C26 modellben a sunitinibbel kezelt csoportban, míg nem különbözött a C38 tumorok esetében.

Az endotélsejtek osztódásának gátlása mellett a multi-target RTKI-k a PDGFR és FGFR pozitív periciták és simaizomsejtek tumoros erekhez való toborzására is hatással vannak. Ennek következtében ezen receptorok blokkolása nem pusztán kevesebb érszámhoz és a következményesen kialakuló csökkent véráramláshoz vezethet, hanem elősegítheti a daganatsejtek metasztatizálódását is. Az érrendszer strukturális változásainak nyomon követésére vizsgáltuk a tumormetszetekben a laminin, dezmin és α SMA kifejeződést. Míg valamennyi ér határozott laminin- és α SMA réteggel volt burkolva, a dezmin expresszió lecsökkent a sunitinib és a motesanib kezelés hatására a C26 modellben. Ezen vizsgált paraméterek egyikében sem mutatkozott változás a C38 modell esetén.

Tömegspektrometriai vizsgálatok

Molekulák karakterizálása

Annak meghatározásához, hogy ezen különbségek a gyógyszerek hatékonyságában az intratumorális gyógyszerkoncentrációkban

tapasztható eltérésekből származnak-e, kidolgoztunk egy módszert az antiangiogén RTKI-k szövetmintában való jellemzésére.

Először mindegyik molekula protonált molekulaionját és fragmentálódási mintázatát határoztuk meg rozsdamentes acél mintatartó lemezen.

A motesanib protonált molekulaionját 374,199 m/z értéknél detektáltuk. Fragmentálás során 212,1; 189,1 és 163,1 m/z értéknél keletkeztek ionok.

A pazopanib 438,17 m/z értéknél volt detektálható. A prekursor ion fragmentálódása során 421,1; 357,1 és 342,1 m/z értéknél jelentkeztek csúcsok.

A sorafenib protonált molekulaionját 465,093, míg fragmensionjait 447,1; 425,1; 270,2 és 252,2 m/z értéknél detektáltuk.

A sunitinib 399,218 m/z értéknél adott jelet, míg a prekursor ion fragmentálása 326,1 és 283,1 m/z értéknél eredményezett ionokat.

A prekursor vatalanib molekula 347,105 m/z értéknél volt azonosítható, míg fragmensionjait 320,2; 311,2; 294,2; 268,1; 254,1 és 220,2 m/z -nél detektáltuk.

A gyógyszer-molekulák hasonló ionizációs és fragmentálódási mintázatot mutattak a rozsdamentes acél lemezen, mint szövetfelszínen.

Prekursor molekula és metabolitok detektálása vérben

A molekulák felszívódását a perifériás vérből vizsgáltuk, melyet közvetlenül az egerek feláldozása előtt vettünk. Mindkét modellben minden alkalmazott molekula esetében jelentős jelintenzitást figyeltünk meg a vérben, melyből arra következtettünk, hogy a gyógyszerek sikeresen felszívódtak. Emellett a gyógyszerek különböző metabolitjait is sikerült kimutatnunk a vérmintákban. Nem mutatkozott különbség a vatalanibbal kezelt Balb/C és C57black/6 egerek vérmintáiban detektált gyógyszer szignálintenzitásában, vagy metabolizációs mintázatában.

Antiangiogén RTKI-k szöveti képpalkotó analízise

A gyógyszer-molekulák kalibrációja lineáris összefüggést mutatott a koncentráció és az átlagos normalizált szignál intenzitás között minden molekula esetében a vizsgált koncentráció tartományban.

A kalibrációs egyenesek alapján a tumormintákban mért átlagos jelintenzitást átszámítottuk gyógyszer koncentrációvá ($\mu\text{mol/mL}$) és összehasonlítottuk a kontroll metszetekben mért nem specifikus gyógyszer-csúcsokkal. Ez alapján, míg az intratumorális sorafenib és vatalanib koncentráció nem különbözött a kezelt és a kontroll C26 tumorokban, addig a motesanib, a pazopanib és a sunitinib szintje emelkedett volt a kontroll tumorokhoz képest. A legmagasabb gyógyszerkoncentráció a sunitinibbel kezelt egerek esetében volt tapasztalható.

Fontos megjegyezni, hogy a fent említett koncentrációk a teljes tumormetszet területére vonatkoznak, és jelentős eloszlásbeli különbségek voltak tapasztalhatók a C26 tumorok esetében. A sunitinibbel kezelt tumorokban a gyógyszer mindig viszonylag homogén eloszlást mutatott a tumorok élő területén, míg az apoptotikus területek jelentősen kisebb szignálintenzitást mutattak.

Ezzel szemben, a motesanibbal és pazopanibbal kezelt tumorok nagyobb heterogenitást mutattak, és a legmagasabb jelintenzitás az apoptotikus területekre volt jellemző. A sorafenib és a vatalanib csupán nyomokban volt megtalálható a C26 tumorokban.

Kutatócsoportunk tagjai egy korábbi vizsgálatukban azt találták, hogy a vatalanib kezelés C57balck/6 egerekben szignifikánsan csökkenti a C38 tumorok méretét. Annak meghatározására, hogy vajon a C26 tumorok azért reagálnak-e kevésbé a vatalanibbal való kezelésre, mert tumor-modell specifikus különbségek vannak a gyógyszer daganatba való bejutásában és intratumorális eloszlásában szintén MALDI tömegspektrometriai képalkotással vizsgáltuk ezen paramétereket. Azt találtuk, hogy a C26 modellel ellentétben a C38 tumorokban a vatalanib jól eloszlott és jelentős jelintenzitást mutatott. Ennek megfelelően, a vatalanibbal kezelt C38 tumorokban az intratumorális gyógyszerkoncentráció szignifikánsan magasabb volt, mint a C38 kontroll csoportban, és mint a vatalanibbal kezelt C26 tumorokban.

Nem találtunk összefüggést a vérben mért jelintenzitások és a hozzájuk tartozó tumorban detektált gyógyszerkoncentrációk között. Intratumorálisan a sunitinibnek, a motesanibnak és a vatalanibnak detektáltuk különböző metabolitjait azokban a tumorokban, ahol a prekursor molekula is megtalálható volt.

A prekursor molekula, ennek fragmensionjai és az összes detektált metabolit a tumormetszeten belül átfedő mintázatot mutatott. A fragmensionok eloszlásának ezen egyezése molekuláris ujjlenyomatnak tekinthető, amely alátámasztja az RTKI-k identitását.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Eredményeink elsőként bizonyítják, hogy a MALDI tömegspektrometria alkalmas ADME vizsgálatok végzésére kis molekulású antiangiogén gyógyszerek esetében
2. Az angiogenezis inhibitorok elleni elsődleges rezisztenciához hozzájárul a tumorszövetbe való csökkent behatolásuk
3. A tumor élő részében detektált gyógyszerkoncentráció összefügg azok tumornövekedés-gátló és antiangiogén hatásával
4. Az antiangiogén RTKI-k hatása tumormodell-függő
5. A hatékony kezelés csak a C26 tumor esetében járt együtt csökkent VEGFR2 és dezmin kifejeződéssel, valamint az intratumorális hipoxia növekedésével

6. PUBLIKÁCIÓK

A témához kapcsolódó publikációk:

Connell JJ, Sugihara Y, Torok S, Dome B, Tovari J, Fehniger TE, Marko-Varga G, Vegvari A. Localization of sunitinib in in vivo animal and in vitro experimental models by MALDI mass spectrometry imaging. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY* 407:(8) pp. 2245-2253. (2015)

Kwon HJ, Kim Y, Sugihara Y, Baldetorp B, Welinder C, Watanabe K, Nishimura T, Malm J, Torok S, Dome B, Vegvari A, Gustavsson L, Fehniger TE, Marko-Varga G. Drug compound characterization by mass spectrometry imaging in cancer tissue. *ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH* 38:(9) pp. 1718-1727. (2015)

Torok S, Vegvari A, Rezeli M, Fehniger TE, Tovari J, Paku S, Laszlo V, Hegedus B, Rozsas A, Dome B, Marko-Varga G. Localization of sunitinib, its metabolites and its target receptors in tumour bearing mice: a MALDI mass spectrometry imaging study. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY* 172:(4) pp. 1148-1163. (2015)

Torok S, Dome B. A tumor-indukált angiogenezis gátlásának lehetőségei: eredmények multi-target tirozin kináz gátlókkal *MAGYAR ONKOLÓGIA* 56: pp. 3-15. (2012)

Torok S, Cserepes T M, Renyi-Vamos F, Dome B. Nintedanib (BIBF 1120) a szolid daganatok kezelésében: biológia és klinikai tapasztalatok áttekintése. *MAGYAR ONKOLÓGIA* 56:(3) pp. 199-208. (2012)

A témához nem kapcsolódó publikációk:

Hoda MA, Rozsas A, Lang E, Klikovits T, Lohinai Z, Torok S, Berta J, Bendek M, Berger W, Hegedus B, Klepetko W, Renyi-Vamos F, Grusch M, Dome B, Laszlo V. High circulating activin A level is

associated with tumor progression and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *ONCOTARGET* 7:(12) pp. 13388-13399. (2016)

Berta J, Hoda MA, Laszlo V, Rozsas A, Garay T, Torok S, Grusch M, Berger W, Paku S, Renyi-Vamos F, Masri B, Tovari J, Groger M, Klepetko W, Hegedus B, Dome B. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *ONCOTARGET* 5:(12) pp. :4426-:4437. (2014)

Sarosi V, Losonczy G, Francovszky E, Tolnay E, Torok S, Galffy G, Hegedus B, Dome B, Ostoros G. Effectiveness of erlotinib treatment in advanced KRAS mutation-negative lung adenocarcinoma patients: Results of a multicenter observational cohort study (MOTIVATE). *LUNG CANCER* 86:(1) pp. 54-58. (2014)

Schelch K, Hoda MA, Klikovits T, Munzker J, Ghanim B, Wagner C, Garay T, Laszlo V, Setinek U, Dome B, Filipits M, Pirker C, Heffeter P, Selzer E, Tovari J, Torok S, Kenessey I, Holzmann K, Grasl-Kraupp B, Marian B, Klepetko W, Berger W, Hegedus B, Grusch M. Fibroblast growth factor receptor inhibition is active against mesothelioma and synergizes with radio- and chemotherapy. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE* 190:(7) pp. 763-772. (2014)

Rozsas A, Berta J, Rojko L, Horvath LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, Laszlo V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Torok S, Klepetko W, Renyi-Vamos F, Hegedus B, Dome B, Tovari J. Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *PLOS ONE* 8:(10) p. e77459. (2013)

Török Sz, Hegedús B, Döme B, Ostoros Gy. Az epidermális növekedési faktor-receptor tirozinkináz-inhibitorok elleni rezisztencia okai és a potenciális terápiás lehetőségek. *MEDICINA THORACALIS* 66:(4) pp. 178-188. (2013)

Hoda MA, Munzker J, Ghanim B, Schelch K, Klikovits T, Laszlo V, Sahin E, Bedeir A, Lackner A, Dome B, Setinek U, Filipits M, Eisenbauer M, Kenessey I, Torok S, Garay T, Hegedus B, Catania A, Taghavi S, Klepetko W, Berger W, Grusch M. Suppression of activin A signals inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells.. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 107:(12) pp. 1978-1986. (2012)

Torok S, Hegedus B, Laszlo V, Hoda MA, Ghanim B, Berger W, Klepetko W, Dome B, Ostoros G. Lung cancer in never smokers. *FUTURE ONCOLOGY* 7:(10) pp. 1195-1211. (2011)

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segítségemre volt PhD munkám végzése során:

- témavezetőimnek, Dr. Döme Balázsnak azért, hogy alkalmazott, hogy egy izgalmas témába engedett bekapcsolódnom, a folyamatos zaklatásokért, hogy dolgozzak többet, azért, hogy a nehéz pillanatokban is elviselt és néha még értékelte is, amit csinálok; valamint Dr. Marko-Varga Györgynek a lehetőségért, hogy megismerhettem Svédországot, a svéd kultúrát és embereket, valamint a tömegspektrometriát és a MALDI képzést;
- Dr. Barta Imre opponenseknek a doktori dolgozatom kritikai áttanulmányozásáért és hasznos tanácsaiért;
- az OKTPI Tumorbiológiai Osztályának valamennyi volt és jelenlegi alkalmazottjának, különösen Horváth-Rózsás Anitának, Dr. Berta Juditnak, Dr. Kelemen Olgának, Keszthelyi Magdolnának, Gönczi-Pető Krisztinának, Korolovszkiné Kovács Ildikónak és Schlegl Erzsébetnek barátságukért és szakmai segítségükért;
- Dr. Tóvári Józsefnek az egerekért, akiket a kísérleteimhez rendelkezésemre bocsátott, és az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai osztályának alkalmazottainak az egerek gondos ápolásáért. Külön köszönöm Bodrogi-Mayer Irénnek és Hidvégi Anitának hogy megtanítottak az állatkísérletek rejtelmére, valamint Kovaljovné Hegedűs Mónikának, hogy a rosszabb időszakokban is mindig volt egy biztató szava hozzám;
- az Országos Onkológiai Intézet Tumorprogressziós Osztályának alkalmazottainak, hogy segítettek a náluk elvégezendő munkámban;
- a kollégáknak a Lundi Egyetemen, hogy szeretettel fogadtak, igazi multi-kulturális légkörrel vettek körül, és különösen Dr. Végvári Ákosnak és Dr. Rezeli Melindának magyar szavaikért, és töretlen lelkesedésükért, hogy kiderítsék, miért és hogyan működik, vagy éppen miért nem a MALDI tömegspektrométer;
- Dr. Hegedűs Balázsnak és a Bécsi Orvostudományi Egyetem Mellkassebészeti Klinikáján és a Transzlációs Onkológiai Kutatólaboratóriumában dolgozó kollégáknak, amiért támogatták a kísérleteimet és az életemet Ausztriában;

- Dr. Paku Sándornak hasznos tanácsaiért és útmutatásaiért a személyes beszélgetések alkalmával;
 - Tisza Annának és Márton Tímeának a közös munkáért, azért, hogy időről-időre tesztelték a tudásom és hogy elfogadtak olyannak, amilyen vagyok;
 - végül, de nem utolsó sorban köszönöm a férjemnek, a családomnak és minden barátomnak, hogy mellettem álltak az elmúlt években.
- Külön köszönöm Török Dánielnek a helyesírásom és nyelvtanom folyamatos ellenőrzését, valamint Somogyi Balázsnak, Dr. Martinek Péternek és Mravik Csabának a valódi tudományos kérdéseket vagy válaszokat, és a valós metodológiai problémák megoldását.
- Nagyon köszönöm a lányomnak, hogy biztosította a dolgozat időben való elkészülését.