

A SZERVÁTÜLTETÉST KÖVETŐ ROSSZINDULATÚ
DAGANATOK PROBLÉMÁJA, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A
LYMPHOMÁBAN SZENVEDŐ, TRANSZPLANTÁLT
BETEGEKNÉL VÁLASZTANDÓ IMMUNSZUNSZUPRESSZÍV
KEZELÉSRE.
A MYCOPHENOLSAV, MINT LEHETŐSÉG.

Doktori tézisek

Dr. VÉGSŐ GYULA

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kopper László egyetemi tanár, az
orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Reusz György egyetemi tanár, az
orvostudományok doktora
Dr. Polgár Csaba Főorvos, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Faller József egyetemi tanár, az
orvostudományok doktora

Szigorlati bizottság tagjai: ifj. Dr. Sótonyi Péter egyetemi
adjunktus, PhD
Dr. Takácsi - Nagy Zoltán Főorvos,
PhD

Budapest
2008

Bevezetés

Ismert, hogy a rosszindulatú daganatok a szervtranszplantált betegek körében gyakoribbak, mint a lakosságban. A poszttranszplantációs daganatok összetétele eltér a populációra jellemző tumorokétól. Kialakulásuk kockázata 2-4-szerese, de bizonyos daganatok esetén akár 100-szorosa is lehet a népesség hasonló daganatainak. Létrejöttükben az egyik legfontosabb rizikótényező az immunszupprimált állapot, melynek idejével arányosan növekszik a daganatok kialakulásának a valószínűsége. A szervátültetést követően a 10 éves daganatos kumulatív incidencia 20%, a 20 éves 30-40%. A poszttranszplantációs tumorok az oncológiai kezelésre rosszabban reagálnak, és prognózisuk is rosszabb, mint a lakosság hasonló daganataié. A szervátültetést követő rosszindulatú daganatok növekvő gyakoriságuk és kedvezőtlen prognózisuk miatt a transzplantált betegek sorsának, túlélésének egyik legfontosabb meghatározó tényezőjévé kezdenek válni. A betegek halálozásában vezető szerepet játszó cardiovascularis tényezők mellé már több transzplantációs centrumban felzárkóztak a daganatok. A poszttranszplantációs tumorok tehát komoly problémát jelentenek, mellyel egyre gyakrabban kell nekünk is szembenézni. Ahogy a lakosság daganatai a világ különböző pontjain eltérő jellegzetességeket mutatnak, ugyanúgy vannak helyi sajátosságai a poszttranszplantációs tumoroknak is. Hatékonyan szembeszállni e problémával csak akkor tudunk, ha az irodalmi adatokon túl, ismerjük a reánk jellemző sajátosságait is.

A szervátültetést követő daganatok közül gyakorisága és rossz prognózisa miatt a legfontosabbnak a lymphomát kell tekintenünk. Felnőtt korban a bőrrák után a második, gyermekkorban a leggyakoribb daganat. Kialakulásának kockázata 20-120-szorosa a nem transzplantált lakosságénak. Döntően B-sejtes eredetű és Epstein-Barr vírus asszociált. A kezelésre rosszul reagál, az 5 éves túlélés 30%-os. Kezelési lehetőségei érdemben nem különböznek a nem transzplantált lakosság „hagyományos” lymphomáinak ellátásától. A terapia fontos kérdése, hogy mi történjék az immunszuppresszióval. A kezelés kezdetekor mindenképp ajánlott az adagját csökkenteni, vagy elhagyni. A kezelés eredményeként remissióba kerülő betegnél azonban a transzplantált szerv védelme

érdekében valamilyen immunszuppresszióra szükség van. Az ideális az olyan immunszuppresszív vegyület lenne, mely védelmet tud nyújtani a graft számára a kilökődési reakció ellen, ugyanakkor nem rontja az oncológiai kezelés eredményét, nem fokozza a relapsus kockázatát. Antiproliferatív hatása alapján az irodalom erre a célra a rapamycint ajánlja. A rapamycin sem elegendő azonban önmagában, annak is megvannak az ismert mellékhatásai, ellenjavallatai. Szükség van tehát egyéb, ebben a helyzetben is alkalmazható immunszuppresszív gyógyszerre. További szakmai ajánlás azonban egyelőre nincs, a lymphomában szenvedő szervtranszplantált betegek immunszuppressziójának kérdése tehát nem megoldott. A megoldást keresve került érdeklődésünk középpontjába a mycophenolsav, mely immunszuppresszív hatását az aktivált lymphocyták „de novo” purin nukleotid szintézisének gátlásával fejt ki. Sejtproliferáció gátló, antimetabolit vegyület. Ha igazolódna, hogy a lymphocytákban észlelt gátló hatása a lymphomasejtekben is érvényesül, akkor lymphoma ellenes tulajdonsága révén a siker reményében alkalmazhatnánk a lymphomában szenvedő transzplantált betegek, és tágabb értelemben véve is, a nem transzplantált lakosság „hagyományos” lymphomáinak kezelésében.

Célkitűzés

1. A veseátültetést követően kialakuló rosszindulatú daganatok „hazai” jellegzetességeinek megismerése, és a betegellátást segítő következtetések megfogalmazása a Budapesten 33 év alatt végzett, közel 2900 veseátültetés adatai alapján.
2. A lymphomában szenvedő szervtranszplantált betegek immunszuppresszív kezelésének problémája, és a mycophenolsav lymphocytá proliferaációt gátló hatása alapján, a mycophenolsav különböző humán, B-sejtes non-Hodgkin lymphomákra gyakorolt hatásának in vitro és állatkísérletes vizsgálata.

Módszerek

1. Betegek és módszerek a veseátültetések után észlelt rosszindulatú daganatok adatainak elemzésekor

A vizsgált időszak az első budapesti veseátültetés napjától, 1973. november 16.-tól 2006. december 31. terjed. A Semmelweis Egyetem transzplantációs munkacsoportja ezidő alatt 2852 veseátültetést végzett. 2535 beteg részesült először, 294 másodszor, 23 pedig harmadszor vesetranszplantációban.

A veseátültetést követően a betegeket az erre a célra kialakított ambulancián ellenőrizzük mindaddig, míg a betegek vesegraftja működik. Szövődmény esetén a betegeket saját, nephrologiai-transzplantációs osztályunkra tudjuk felvenni. A betegekkel kapcsolatos adatokat, beleértve a rosszindulatú daganatokra vonatkozóakat is, számítógépes adatbázisban rögzítjük. Retrospektív feldolgozásunk is erre az adatbázisra épül. Az ellenőrzött járóbetegek száma aktuálisan változó, 2007 januárjában 1300 beteget kontrolláltunk működő grafftal. Az összes vesetranszplantált beteg 2 %-a esett ki a követésből. A daganatos betegek esetén az átlagos követési idő 94,1 hónap volt.

188 betegben észleltük rosszindulatú daganat kialakulását. A férfi nő arány 2,19:1 (129/59) volt. A betegek átlagéletkora $53,1 \pm 10,1$ év nek bizonyult, a férfiak idősebbek voltak ($54,3 \pm 10,0$ év), mint a nők ($51,4 \pm 9,9$ év), a különbség szignifikáns ($p=0,017$). 170 beteg részesült először, 18 pedig másodszor veseátültetésben. A donor és recipiens közötti HLA eltérés átlagosan $2,83 \pm 0,6$ volt.

A veseátültetés utáni, és a magyar lakosság körében előforduló rosszindulatú daganatok incidenciáját a Magyar Nemzeti Rákregiszter adatai alapján hasonlítottuk össze.

A daganatos betegek az alkalmazott immunszpresszív kezelés alapján 4 csoportba oszthatók. I.csoport: Azathioprine+sztteroid ($n=16$), (8,5%), II.csoport: Cyclosporine+sztteroid ($n=111$), (59,0%), III.csoport: Cyclosporine+mycophenolate mofetil+sztteroid ($n=50$), (26,6%), IV.csoport. Tacrolimus+mycophenolate mofetil+sztteroid ($n=11$), (5,9%). A magyarországi vesetranszplantációs program 1973-ban indult. Az I.csoport betegek az úgynevezett konvencionális immunszpresszióban részesültek. Ezt váltotta fel a cyclosporine 1984.-ben (II.csoport), majd 1997.-ben egészült ki a cyclosporine+

szteroid kombináció a mycophenolate mofetil-lel (III.csoport). 2000.-től használjuk a vesetranszplantált betegek esetében is a tacrolimust (IV.csoport). Indukciós kezelést, immunoterápiát (OKT3, ATG, anti-CD25 monoklonális ellenanyagok) második veseátültetésben részesülő betegek esetében végeztünk.

Az adatok elemzéséhez leíró statisztikát (n, átlag, szórás/ \pm SD) alkalmaztunk. Az egyes csoportok adatainak összehasonlításához a Fischer t-tesztet, a variancia analízishez az egyszempontú ANOVA módszert használtuk. A szignifikanciát a Student *t*-teszt segítségével határoztuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0.05$ értéket tekintettük. A túlélésanalízis Kaplan-Meier módszerrel, a betegcsoportok túlélésének összehasonlítása a long-rank teszt segítségével történt. A statisztikai analízist a SAS version 8.2 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programcsomag felhasználásával végeztük.

2. Módszerek a mycophenolsav, mint immunszuppresszív szer humán, non-Hodgkin lymphomákra gyakorolt hatásának in vitro és állatkísérletes vizsgálatokor

Sejttenyésztés

A kísérletek során **HT58** (EBV -), **BL41** (EBV -), **BL41/95** (EBV +) humán, Burkitt-típusú, B-sejtes non-Hodgkin lymphoma sejtvonalakat, **MED-B1** humán, diffúz, nagy B-sejtes non-Hodgkin lymphoma (DLBCL) sejtvonalat, **U266** myeloma sejtvonalat használtunk. A sejteket RPMI-1640 médiumban (Sigma), 10% FCS (Sigma) és penicillin-streptomycin (100 U/ml-100 μ g/ml, Sigma, St Louis, MO, USA) jelenlétében tenyésztettük. A 0-72 órás, in vitro kezelésekhöz Mycophenolic acid (MPA) (Sigma, 500 mM, DMSO-ban oldva), valamint guanozin (Sigma, 4 mM – H₂O-ban oldva) törzsoldatokat használtunk, ezeket -20 °C-on tároltuk. Kísérleteink során az MPA (0,05-50 μ M) és a guanozin (0,1-100 μ M) koncentráció és időfüggő hatásait $1-2 \times 10^5$ sejt/ml induló sejtszám mellett 24-es sejttenyésztő tálcán és T25-ös tenyésztő flaskában vizsgáltuk. Minden esetben legalább három független kísérletsorozatot végeztünk, minimum 3 párhuzamos vizsgálattal.

Áramlási citometriai vizsgálatok: sejtciklus, apoptózis, mitochondrium membrán depolarizáció

Az apoptózis meghatározásához a sejteket $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 70%-os etanol-ban fixáltuk, majd lúgos extrakció ($200\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4, $1\text{ }\mu\text{g/ml RN-ázA}$ -Sigma) és ethidium-bromid festés ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$, Sigma) segítségével készítettük elő a mintákat a méréshez. Kísérleteinkben a sejtciklus változásait és az apoptózis mértékét áramlási citometriával (FACS) detektáltuk (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

A mitochondrium depolarizáció mértékének meghatározásakor 5×10^5 natív sejt DiOC6 (10 nM , Molecular Probes) és propidium iodide ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$) festését követően, a mérhető fluoreszcencia intenzitásbeli változás detektálását $530\text{-}620\text{ nm}$ -en, szintén flow cytometria segítségével végeztük el. Az eredmények kiértékelését WinList (Verity Software House, Topsman, ME, USA) programmal végeztük.

Kaspáz2 és kaspáz3 aktiváció vizsgálata

$0,5 \times 10^6$ sejtet kaspáz puffer oldatban (50 mM HEPES , 100 mM NaCl , $0,1\text{ }\%$ (w/v) CHAPS, $10\text{ }\%$ (w/v) sucrose + 10 mM DTT) vettük fel. A sejteket azonos térfogatú puffer ($0,2\text{ }\%$ Triton X-100) és pipettázás segítségével lizáltuk. A kaspáz2 aktivitást $0\text{-}200\text{-}1000\text{ nM zVAD-fmk}$ (Sigma) kaspáz inhibitor jelenlétében (gátolja a nem specifikus kaspáz aktivitások hatását a szubsztráton) Ac-VDVAD-afc ($50\text{ }\mu\text{M}$, Bachem) szubsztrát segítségével határoztuk meg. Ac-DEVD-amc, kaspáz3 szubsztrát ($50\text{ }\mu\text{M}$, Bachem Weil, Germany) hozzáadásával a kaspáz3 aktivitásokat mértük. A felszabaduló fluoreszcencia intenzitásokat fluorescence plate reader (Fluoroscan Ascent Fluorimeter, Thermo Electron Corp, Waltham, MA, USA) segítségével 15 és 20 perces inkubációs idővel $390/460\text{ nm}$ -en és $400/505\text{ nm}$ -en detektáltuk. Az eredmények és a kalibrációs görbe értékelése Microcal Origin Software segítségével történt. Pozitív kontroll vizsgálatként a staurosporin (6 h , $1\text{ }\mu\text{M}$, Sigma) HL60 sejtekben indukálta apoptózist, kaspáz aktivitás meghatározása szolgált.

Xenograft tumorok

Xenograft tumorokat immunhiányos SCID egerekben hoztunk létre. Röviden: 2×10^7 tumor sejtet $8\text{-}10$ hetes SCID egerek

(20-23 g) hátának bőre alá (subcutan - sc.) oltottuk be. A kontroll állatokban az oltást követő 10-13 napon váltak a tumorok tapinthatóvá. In vivo kísérleteinkben a kezeléshez mycophenolate mofetil-t (MMF) (Cellcept 250 mg capsule, Roche, Basel, Switzerland) alkalmaztunk, a korábban már leírt és alkalmazott 100 mg/testsúlykg, napi egyszeri adagban, per os, szonda segítségével, 200µl fiziológiás sóoldatban beadva. A kontroll állatok 200 µl fiziológiás sóoldatot kaptak szondán keresztül, naponta egyszer. A kontroll és MMF kezelt állatok száma kísérletenként 10-10 volt.

A növekvő tumorok térfogata a tumorok átmérői alapján, a következő képlet segítségével került kiszámolásra: $\pi/6 \times (2 \times \text{rövid átmérő} + \text{hosszú átmérő})/3)^3$. A kísérletek végén, az állatok túltálatása után, a tumorokat eltávolítottuk és tömegüket megmértük. Az MMF hatásának vizsgálata kétféle kezelési protokoll szerint történt.

a. A kezelést az oltást követően 24 órával kezdtük el és végeztük naponta, folyamatosan, a kísérlet végéig .

b. A kezelést a sc. tumorok tapinthatóvá válása után a 13. napon kezdtük el és végeztük naponta, folyamatosan, a kísérlet végéig.

Az állatokat, az állattartási és kísérleti törvényeknek megfelelően, légkondicionált állatházban tartottuk (55% relatív páratartalom, 25 °C, 12/12 órás sötét/világos ciklusok). Minden vizsgálatot az állatház hivatalos engedélyének megfelelően végeztünk (eng. szám: 399/003/2005).

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A lymphomasejtek proliferációs és apoptotikus aktivitását a xenograft tumorokban is meghatároztuk. A kontroll és MMF kezelt állatokból eltávolított tumorokból formalin fixálás után paraffinos blokkokat készítettünk. A kontroll és MMF kezelt állatok egy részének hasüregébe 100 mg/testsúlykg bróm-dezoxiuridint (BrdU) (Sigma) fecskendeztünk a kísérlet befejezése előtt egy órával. Ezekből az állatokból az eltávolított tumorokat 60% ethanol + 10% formaldehide oldatban fixáltuk a paraffinba ágyazás előtt. Immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk monoklonális anti-Ki67 (Dako, Glostrup, Denmark), anti-cleaved caspase3 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) elsődleges ellenanyagok, és streptavidin-biotin peroxidase system (Dako) segítségével Ventana ES automatában (Ventana Medical Systems, Inc., Cedex, France). A metszeteken

monoklonális anti-BrdU ellenanyag (Becton-Dickinson), Vector Elite ABC kit festéseket végeztünk.

A mitotikus, proliferáló és apoptotikus sejtek arányát a Ki67, a BrdU és aktív kaszpáz3 (cleaved caspase3) pozitív tumorsejtek számolásával, és a H&E metszetek kiértékelésével (X400) határoztuk meg, metszetenként 1000-1000 sejten. Csak a tumorszövetek olyan részleteit vizsgáltuk, amelyekben stroma elemek és necroticus területek nem voltak. Az értékelést két független vizsgáló végezte.

Lymphomasejtek izolálása xenograf tumorokból és in vitro tenyésztésük

Az eltávolított kontroll és kezelt tumorok kézi macerálása után a mononukleáris sejtek szuszpenzióját Ficoll gradiens centrifugálással (Histopaque 1077, Sigma) tisztítottuk. A lymphomasejtekben feldúsult sejtuszpenziót anti-humán CD19-MACS microbeads (Miltenyi) ellenanyaggal jelöltük, majd ezt követően MACS Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) oszlopok segítségével elválasztottuk a nem lymphomasejtektől. A CD19 humán ellenanyag jelölt sejteket eluálásukat követően 2 hétig in vitro tenyésztettük, majd ezt követően teszteltük MPA érzékenységüket in vitro.

Statisztikai analízis

Az adatok elemzéséhez leíró statisztikát (n, átlag, szórás/±SD) alkalmaztunk. A szignifikanciát a Student *t*-teszt segítségével határoztuk meg. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0.05$ értéket tekintettük. A statisztikai analízist a SAS version 8.2 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) programcsomag felhasználásával végeztük.

Eredmények

1. Eredmények a veseátültetések után észlelt rosszindulatú daganatok adatainak elemzésekor

A veseátültetést követően észlelt rosszindulatú daganatok fajtái, incidenciája

Az 1973. november 16. és 2006. december 31. között veseátültetésben részesült 2535 betegből 188-ban észleltünk 193

rosszindulatú daganatot. A tumorok gyakorisága 7,6% volt. A leggyakoribb daganatok a következők voltak: bőrrák (n=51), veserák (n=26), tüdőrák (n=15), Kaposi sarcoma (n=12), emlőrák (n=12), non-Hodgkin lymphoma (n=10), májrák (n=7), pajzsmirigyrák (n=6), vastagbél-, végbélrák (n=6), melanoma malignum (n=6). A veseátültetés utáni első négy évben előforduló daganatok kumulatív incidenciáját a Nemzeti Rákregiszter 2001.-2004. évi adatai alapján összehasonlítottuk a magyarországi, nem transzplantált lakosság tumorainak gyakoriságával. Az adatokból kitűnik, hogy a magyar lakosságra jellemző, gyakori daganatok közül csak a bőr- és gyomorrák mutat magasabb arányt (2,58x, 1,61x) a vesetranszplantált betegek körében, ugyanakkor a tüdő-, a vastagbél-, a szájüregi- és prostatarák incidenciája alacsonyabb (>30%), mint a nem transzplantált populációban. A lymphomák gyakorisága csak alig volt magasabb a transzplantáltaknál, ami azzal magyarázható, hogy a lymphomák többsége több mint 5 évvel a veseátültetés után jelent meg. A Kaposi sarcoma gyakori volt a transzplantált betegek daganatai között (6,2%), a Nemzeti Rákregiszter azonban erről a daganatról nem közöl adatot. A veseátültetés után lényegesen magasabbnak bizonyult a máj-, vese-, pajzsmirigyrák incidenciája (3,25x, 6,77x, 8,95x) a magyar lakossághoz képest.

A négy különböző immunszuppresszív kezelésben részesülő betegcsoport összehasonlítása az életkor és a daganatok megjelenési ideje szerint

Az ANOVA analízis alapján az egyes csoportok szignifikáns mértékben különböznek egymástól mind a betegek átlagéletkorát tekintve ($p < 0.003$), mind pedig a daganatok megjelenéséig eltelt átlagidő alapján ($p < 0.0001$). A betegek átlagéletkora a veseátültetés időpontjában és a daganatok felismerésekor, a kezdetektől (I.csoport) napjaink felé (IV.csoport) haladva növekszik. A magyarországi vesetranszplantációs program kezdetekor még fiatal betegeket transzplantáltunk (I.csoport átlagéletkora $37,1 \pm 7,4$ év). A 2000. év utáni betegeket reprezentáló IV.csoport átlagéletkora szignifikánsan magasabb, $56,0 \pm 8,3$ év. Másik megfigyelésünk, hogy az időben egymást követő négy különböző immunszuppressziós betegcsoportban a daganatok megjelenésének átlagideje egyre rövidül. A daganatok egyre korábbi megjelenése a betegek átlagéletkorának növekedésével, az

öregedéssel nem mutat szignifikáns összefüggést ($p < 0.14$), viszont statisztikailag szignifikáns a kapcsolata az immunszuppresszió változásával ($p < 0.0001$).

A veseátültetés és a daganatok felismerése között eltelt idő

A veseátültetés és a daganatok felismerése között átlagosan $58,5 \pm 44,8$ hónap telt el. Az összes daganatot figyelembe véve a tumorok 11,4%-a ($n=22$) a vesetranszplantációt követően 6 hónapon, 20,2%-a ($n=39$) 1 éven belül került felismerésre. A daganatok 35,2%-a ($n=68$) jelent meg 2 éven, 93,3%-a ($n=180$) 10 éven belül, 6,7%-a ($n=13$) pedig 10 év után. A gyakoribb daganatok közül a veserák 38,4%-a, a tüdőrák 20,0%-a, az emlőrák 33,4%-a, a Kaposi sarcoma 58,3%-a jelent meg a veseátültetés utáni első évben. Ugyanakkor lymphomát nem észleltünk ilyen rövid idő elteltével. A veseátültetést követő első évben megjelent daganatok aránya a különböző immunszuppresszió szerinti csoportokban: I. csoport 12,5% ($n=2/16$), II.csoport 18,9% ($n=21/111$), III.csoport 22,0% ($n=11/50$), IV.csoport pedig 45,5% ($n=5/11$).

A daganatos vesetranszplantált betegek halálozási adatai

A 188 daganatos betegből 92 halt meg a vizsgált időszakban (48,9%). Az elhunyt betegek átlagéletkora $54,8 \pm 10,4$ év, átlagos túlélési idejük a daganat felismerését követően $25,8 \pm 39,4$ hónap volt. 36,9%-uk ($n=34$) hunyt el a tumor diagnosztizálását követő 6 hónapon belül, 55,4%-uk ($n=51$) az első évben, 70,6%-uk ($n=65$) két éven belül, 84,7%-uk ($n=78$) pedig öt éven belül. A halálok a betegek 32,6%-ban ($n=30$) daganatos progresszió, 30,4%-nál ($n=28$) fertőzőes szövődmény (pneumonia, sepsis) volt. A többi 34 elhunyt beteg (37%) esetében cardialis, cerebrovascularis szövődmény, tüdőembolia, májcirrhosis, májelégtelenség, acut pancreatitis, tuberculosis volt a halál kiváltó oka. A vizsgált időszak végén életben lévő, 96 daganatos beteg átlagos követési ideje $65,7 \pm 46,6$ hónap.

A daganatos vesetranszplantált betegek túlélési adatai

Kaplan-Meier módszerrel meghatározva a 188 beteg túlélési arányait, az 1 éves túlélés 69,5%, a 2 éves 61,8%, a 3 éves 57,3%, az 5 éves túlélés pedig 52%. A túlélés a bőrrák esetében a legjobb, az 1 éves 90,2%, az 5 éves 75,9%. A többi daganat prognózisa összesítve

rosszabb, az 1 éves túlélés 59,2%, az 5 éves pedig 38%. A két nemet összehasonlítva, a férfiak 1 éves túlélése 63,8%, az 5 éves 46,3 %, míg ugyanez a nők esetében 81,3% és 60,4%. A nők túlélési aránya szignifikánsan magasabb, mint a férfiaké ($p=0.0138$).

2. Eredmények a mycophenolsav, mint immunszuppresszív szer humán, non-Hodgkin lymphomákra gyakorolt hatásának in vitro és állatkísérletes vizsgálatakor

A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében végeztük el.

Az in vitro vizsgálatok eredményei A mycophenolsav sejtproliferációt gátló és apoptózist indukáló hatása

A mycophenolsav az idő és a koncentráció függvényében, valamennyi vizsgált sejtvonal esetében gátolta a sejtproliferációt és apoptózist indukált. A Burkitt-lymphomasejtvonalak esetében a proliferációt gátló hatás a kezelést követően 24 órával már észlelhető volt, a sejtek a sejtciklus G1/S fázisának átmenetében halmozódtak fel. A ciklusban tovább lépő sejtek 64 óra elteltével az S/G2 fázis határán blokkolódtak. 72 óra után apoptotikus katasztrófa/sejtpusztulás volt megfigyelhető. A mycophenolsav iránti érzékenységben az EBV-pozitív és EBV-negatív Burkitt-lymphomák között nem volt különbség. A DLBCL lymphomasejtvonal esetében az MPA sejtproliferációt gátló hatása még kifejezettebb volt, a blokk a sejtciklus G2 fázisa előtt érvényesült, de az apoptózis indukációjához hosszabb kezelési időre volt szükség. 96 óra elteltével az apoptózis aránya a kontroll sejtekben $2 \pm 0,5\%$, az $5\mu\text{M}$ koncentrációjú MPA mellett pedig $21 \pm 1\%$ volt. A mycophenolsav a myeloma sejtvonal esetében is gátolta a sejtproliferációt. 72 óra kezelési idő után az apoptotikus sejtek aránya a kontroll sejtekben $9 \pm 2\%$, az MPA kezelés ($5\mu\text{M}$) mellett pedig $65 \pm 4\%$ volt.

Az MPA lymphoma sejtvonalakra gyakorolt hatását guanozin jelenlétében is vizsgáltuk. A guanozin $0,1-100\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva nem függesztette fel a mycophenolsav ($5\mu\text{M}$) lymphomasejtekre gyakorolt antiproliferatív és apoptotikus hatását.

A mycophenolsav indukálta apoptózis mechanizmusának vizsgálata

Az MPA indukálta apoptózis mechanizmusának vizsgálatokor a mitochondrium membrán depolarizációt, a kaszpáz2 és kaszpáz3 enzimek aktiválódását, és a bcl-2, bax fehérje szintjének változását mértük. A mitochondriális depolarizáció megjelenése időben egybe esett az apoptózis indukálódásával, majd maximumát 48 óra elteltével érte el. Az apoptózis aktiválódásában a mitochondriális út szerepe mellett szól az anti-apoptotikus hatású, bcl-2 fehérje szintjének egyidejű csökkenése is. Az apoptózist iniciáló kaszpáz enzimek közül a kaszpáz2 aktiválódása, szemben az irodalomban olvasható, más sejtvonalra vonatkozó közléssel, nem volt kimutatható. Az apoptózist végrehajtó, effektor kaszpázok közé tartozó kaszpáz3 enzim aktiválódását, a mitochondriális indukció után, a MPA kezelés 40. órájában észleltük.

A mycophenolsav lymphoma xenograftok növekedését gátló hatása

Az oltást követő első naptól alkalmazott MMF kezelés eredményeként a tumor növekedés a HT58, BL41, BL41/95 lymphomák esetében egyaránt, jelentősen elmaradt a kontrollokhoz képest. A kísérletek végén eltávolított, MMF kezelt tumorok átlagsúlya szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll tumoroké, azok 15-24%-a. Hasonlóan szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll és az MMF kezelt tumorok idő függvényében meghatározott, kalkulált térfogatai között. Az oltást követő 25. nap után a tumortérfogatok drámai növekedését észleltük a kontroll állatokban, ami az MMF kezelt csoportban nem volt megfigyelhető. Az MMF tumornövekedést gátló hatását észleltük akkor is, amikor a kezelést a lymphomasejtek oltását követően csak később, a tumorok tapinthatóvá válása utáni 13. naptól kezdtük alkalmazni. A kísérletek végén meghatározva az eltávolított tumorok súlyainak és térfogatainak átlagát, az MMF kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb értékeket kaptunk.

A kontroll és MMF kezelt xenograft tumorokat a kísérletek végén eltávolítottuk. A fixálás és paraffinba történt beágyazást követően készített szövettani metszeteken a sejtproliferáció aktivitásának és az apoptózis mértékének meghatározásához hematoxilin-eosin festést és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A sejtproliferációs aktivitást a BrdU és Ki67 pozitív sejtek arányával, az apoptózis mértékét pedig az aktív kaszpáz3

pozitív (a hematoxinilín-eosin festés alapján apoptotikus morfológiát mutató) sejtek arányával jellemeztük. Az MMF kezelt tumorokban szignifikánsan alacsonyabb proliferációs és szignifikánsan magasabb apoptotikus aktivitást észleltünk.

28 napos MMF kezelést követően a s.c. Burkitt lymphoma xenograft tumorokból több lépcsős izolálási eljárás révén a lymphomasejteket in vitro tenyésztetbe vittük vissza. Az így nyert „új” sejtvonalakat tovább tenyésztettük, majd mycophenolsavval kezeltük. Arra kerestük a választ, hogy az in vivo MMF kezelés mellett túlélő lymphomasejtek elvesztették-e a mycophenolsav iránti érzékenységüket. 72 órás MPA (5 μ M) kezelés után a mycophenolsav sejtproliferációt gátló és apoptózist indukáló hatását észleltük mind a három „új” sejtvonal esetében. Az apoptotikus sejtek aránya 45-60% közötti volt. A lymphomasejtek in vitro vizsgálva, megőrizték a mycophenolsav iránti érzékenységüket az in vivo MMF kezelést követően.

Következtetések

1. A veseátültetést követően észlelt rosszindulatú daganatok adatainak elemzéséből levonható következtetések, megállapítások

1. Igazoltuk, hogy veseátültetett betegek körében a magyarországi, nem transzplantált lakossághoz képest, a rosszindulatú daganatok gyakrabban fordulnak elő. Eredményeink az irodalmi adatokat tükrözik.

2. Hazánkban elsőként végeztük el a veseátültetés utáni, és a magyarországi, nem transzplantált lakosság körében előforduló, gyakoribb rosszindulatú daganatok incidenciájának meghatározását, azok összehasonlítását és az eredmények nemzetközi közlését.

3. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a magyar lakosság gyakori tumorai közül a veseátültetés után csak a bőrrák és a gyomorrák mutatott - mérsékelten - magasabb előfordulási arányt, a tüdő-, vastagbél-, végbél-, emlő-, szájüregi és prosztaták incidenciája ugyanakkor alacsonyabb volt.

4. Az eltérő összetételű immunszuppresszív kezelésben részesült, kronológiailag egymást követő betegcsoportokban a

daganatok megjelenésének átlagideje egyre rövidült. Ennek magyarázata lehet az immunszuppresszió különbözősége, az eltérő esetszám és betegkövetési idő miatt azonban egyértelmű megállapítás még nem tehető.

5. A veseátültetést követő első évben észleltük a daganatok közel 20%-át. Ennek azért kell jelentőséget tulajdonítanunk, mert a korai időszakban megjelenő daganatokról feltételezhető, hogy vagy még fel nem ismerhetően, vagy fel nem ismerten, de már a transzplantáció időpontjában jelen vannak a betegekben.

6. Betegeink átlagéletkora a veseátültetés időpontjában és a daganatok felismerésekor, 1973.-tól napjainkig követve, egyaránt, folyamatosan növekszik. A vesebetegek öregedése növeli a daganatok kialakulásának kockázatát.

7. Hazánkban elsőként határoztuk meg és közöltük nemzetközi folyóiratban a veseátültetett daganatos betegek összesített és tumorspecifikus, 1 és 5 éves túlélési eredményeit. Ezek alapján a bőr-, és pajzsmirigyrák bizonyult a legkedvezőbb prognózisúnak, a Kaposi sarcoma, tüdő-, májrák és a non-Hodgkin lymphoma pedig a legrosszabbnak. A nők jobb túlélési eredményeit azzal magyarázhatjuk, hogy körükben a rossz prognózisú daganatok ritkábban fordultak elő.

8. A chronicus veseelégtelenség és a vesebetegek öregedése miatt fokozódó daganatos kockázat, valamint a veseátültetés után észlelt korai tumorok aránya alapján úgy ítéljük meg, hogy a daganattal történő veseátültetés elkerülése érdekében, a vesetranszplantációs várólistán lévő recipiens jelöltek rendszeres oncológiai ellenőrzése szükséges.

9. Javaslatot dolgoztunk ki a veseátültetésre váró, és a már vesetranszplantált betegek rendszeres oncológiai ellenőrzésének módjára, melyet előadásokban, hazai és nemzetközi közleményekben tettünk közzé.

10. Eredményeink alapján határoztuk meg a szervátültetést követő rosszindulatú daganatok kockázatának csökkentését szolgáló feladatainkat. Kiemelkedő fontosságúnak tartjuk a karcinogén hatások elkerülését célzó beteg tájékoztatást, a rendszeres, oncológiai jellegű vizsgálatokat a rákelőtti állapotok és a daganatok korai

felismerése és kezelése érdekében, valamint a chronicus immunszuppresszió okozta rizikó mérséklését a graft védelmét még biztosító, de alacsony gyógyszeradagok és az oncológiai szempontból kedvezőbb hatású vegyületek alkalmazásával.

2. A mycophenolsav, mint immunszuppresszív szer humán, non-Hodgkin lymphomákra gyakorolt hatásának vizsgálati eredményei alapján levonható következtetések, megállapítások

1. Elsőként igazoltuk és közöltük, hogy a mycophenolsav in vitro gátolja az általunk vizsgált lymphomasejtek proliferációját.
2. Elsőként igazoltuk és közöltük, hogy a mycophenolsav in vitro a lymphomasejtekben apoptózist indukál.
3. Elsőként igazoltuk és közöltük, hogy a mycophenolsav a lymphomasejtekben az apoptózist az intrinsic (mitochondriális) útvonal aktiválásával indukálja.
4. Igazoltuk és közöltük, hogy a guanozin jelenléte nem függeszti fel a mycophenolsav proliferációt gátló és apoptózist indukáló hatását a lymphomasejtekben, a guanin nukleotid képzésben a salvage mechanizmus a lymphocytákhoz hasonlóan, a lymphomasejtekben sem működik.
5. Elsőként igazoltuk és közöltük, hogy a mycophenolsav in vivo, szignifikáns mértékben gátolja az általunk vizsgált lymphomák növekedést. Hatása akkor is érvényesül, ha a kezelést a már kialakult tumorok esetében kezdjük el.
6. Elsőként igazoltuk és közöltük, hogy a mycophenolsav in vivo is apoptózist indukál a lymphomasejtekben.
7. Elsőként igazoltuk és közöltük, hogy az in vivo tumorokból in vitro tenyészetbe visszavitt lymphomasejtekben nem alakult ki rezisztencia a mycophenolsavval szemben.
8. A mycophenolsavat az általunk igazolt, humán, B-sejtes non-Hodgkin lymphomákra gyakorolt, sejtproliferációt gátló és apoptózist indukáló hatása alapján ajánlhatjuk a nem transzplantált lakosság „hagyományos” lymphomáinak kezelésében és a

szervátültetés után kialakult lymphomák esetén, a betegek terápiájának és immunszuppressziójuk megválasztásakor.

Saját publikációk jegyzéke

A Doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények

1. **Végső G**, Sebestyén A, Paku S, Barna G, Hajdu M, Tóth M, Járay J, Kopper L.: Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Res* 2007. 31:1003-1008.

IF: 2,483

2. **Végső G**, Tóth M, Hídvégi M, Toronyi É, Langer RM, Dinya E, Tóth A, Perner F, Járay J.: Malignancies after renal transplantation during 33 years at a single center. *Pathol Oncol Res* 2007. 13:63-69.

IF: 1,241

3. Langer RM, Járay J, Tóth A, Hídvégi M, **Végső G** and Perner F.: De novo tumors after kidney transplantation: The Budapest experience. *Transplant Proc* 2003. 35:1396-1398.

IF: 0,588

4. **Végső Gy**, Járay J. A veseátültetést követően kialakuló rosszindulatú daganatok. *Orv Hetil* 2007. 148:2115-2113.

5. **Végső Gy**, Sebestyén A, Járay J, Kopper L.: Rosszindulatú daganatok a szervátültetést követő immunszupprimált állapotban. *Orvosképzés* 2006. 3.:137-244.

6. **Végső Gy**, Németh Zs, Péter A, Perner F, Barabás J, Szabó Gy.: Rosszindulatú szájüregi daganat megjelenése 19 évvel veseátültetést követően. *Magy Onkol* 1997. 41:180-183.

A Doktori értekezéstől független közlemények

1. Tóth M, Drabant S, Varga B, **Végső G**, Cseh A, Szentpéteri I, Klebovich I. Tofisopam inhibits the pharmacokinetics of CYP3A substrate midazolam. *Eur J Clin Pharmacol* 2008. 64:93-94.

IF: 2,029

2. **Végső G**, Máthé Z, Péter A, Perner F, Járay J and Langer RM.: Improving results of renal transplantation with use of elderly donors: The Budapest experience. *Transplant Proc* 2005. 37:4225-4227.

IF: 0,799

3. Szende B, Farid P, **Végső G**, Perner F, Kopper L.: Apoptosis and P53, Bcl-2 and Bax gene expression in parathyroid glands of patients with hyperparathyroidism. *Pathol Oncol Res* 2004. 10:98-103.
4. **Végső Gy**, Máthé Z, Péter A, Perner F, Járay J.: Az idős donorokból történt veseátültetés javuló eredményei Budapesten. *Hypertonia és Nephrológiai* 2004. 8:186-192.
5. **Végső Gy**. Évszemle 2000. Sebészet:Daganatsebészet., Endocrin sebészet– mellékpajzsmirigy. *Magyar Orvos* 2001. 9:37.
6. **Végső Gy**, Tóth M, Péter A, Járay J, Perner F.: A vesetranszplantáció eredménye 60 év feletti donorokból átültetett graftok esetén. *Hypertonia és Nephrológia* 2000. 4:89-92.
7. **Végső Gy**, Péter A, Dabasi G, Görög D, Tóth M, Máthé Z, Földes K, Kovács J.:Az endocrinológia sebészi vonatkozásai: hyperparathyreosis miatt operált betegeink. *Magyar Sebészet* 1997. 50:325-329.
8. **Végső Gy**, Péter A, Árkosy M, Kovács J, Nemes B. :Splenectomia,mint a gastrointestinalis vérzés ritka műtéti megoldása. *Magyar Sebészet* 1997. 50:393-395.
9. Péter A, **Végső Gy**, Máthé Z, Alföldy F.: Az Algopyrin helye a mindennapi gyógyításban. *Medicus Universalis* 1997. 30:171-175.
10. Péter A, **Végső Gy**, Alföldy F, Görög D, Gáti Z, Langer R, Kóbori L.: Vesedaganat miatt végzett műtéteink. *Magyar Sebészet* 1997. 50:315-318.
11. Hutás G, Sármán B, Pusztai P, **Végső Gy**, Somogyi A.: Diabeteszes mastopathia 1-es típusú, hosszú ideje fennálló diabetes mellitusban. *Diabetologia Hungarica* 2000. 8:177-182.
12. Szende B, Árvai K, Peták I, Nagy K, **Végső G**, Perner F.: Génexpresszió-változások a mellékpajzsmirigy proliferatív folyamata során. *Magyar Onkológia* 2006. 50:137-140.
13. Máthé Z, Görög D, Alföldy F, Járay J, **Végső Gy**, Péter A, Dabasi G, Weszelits V. Gláz E.: Az endocrinológia sebészi vonatkozásai: mellékvesedaganat miatt kezelt betegeink. *Magyar Sebészet* 1997. 50:315-318.
14. Nemes B, Alföldy F, Péter A, Görög D, Árkosy M, **Végső G**.:Benefits of cell saver during the operation of gastric haemorrhage following repeated pancreatitis. *Acta Chirurgica Hungarica* 1997. 36:254-255.