

Válasz Szende Béla professzor bírálatára

Mindenekelőtt nagyon köszönöm, hogy Professor Úr elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Nagy megtiszteltetés számomra, hogy a Schally Intézet hajdani kutatójaként, „elődként” vizsgálta meg eredményeinket.

Professor Úr elsőként a kísérletes munkában alkalmazott peptid hormon analógok további sorsáról kérdez. A citotoxikus analóg AN-156 (zoptarelin doxorubicin, a doxorubicin és a [D-Lys(6)LHRH] konjugátuma) jelenleg AEZS108 kódnéven (AEterna Zentaris) szerepel klinikai vizsgálatban. Fázis I vizsgálatok szerint az AEZS-108 biztonságosan, relatíve kevés mellékhatással, és eredményesen adható 3 hetente 6 ciklusban nőgyógyászati daganatokban, és rezisztens hólyag illetve prosztatatarákban. Különösen figyelemre méltó a kardiotoxicitás és hypophysis toxicitás hiánya. Fázis I vizsgálatot követően fázis II vizsgálatban 43 előrehaladott endometrium rákban szenvedő betegnél vizsgálták. Az esetek negyedénél daganat regresszió, felénél betegség stabilizáció alakult ki, jóval kisebb toxicitás árán, mint a hagyományos kezelés esetében. Negyvenkét előrehaladott, platina-rezisztens ovarium tumoros esetben alkalmazva, mintegy 12%-ban remisszió jelentkezett, míg betegség stabilizáció 26%-ban. Jelenleg fázis II vizsgálatban kasztráció-rezisztens prosztatatarák másodvonalas kezelésére tesztelik, és további fázis II vizsgálat várható pancreas és hólyagrákban, illetve pivotális fázis III vizsgálat endometrium rákban. A BN/GRP antagonisták klinikai alkalmazása adagolási problémákat vetett fel, és szerény eredményeket hozott, fejlesztése egyelőre nem tűnik perspektivikusnak (Schwartzmann G. et al. Invest New Drugs 2006; 24:403-12). A GHRH antagonisták klinikai kipróbálása még nem kezdődött meg. Természetesen örömmel vennénk részt akár az AEZS-108, akár a többi molekula klinikai kipróbálásában, melyhez egyetemünkön minden feltétel adott.

Opponens Úr következő kérdése, miért nem történt szövettani vizsgálat a citotoxikus peptid hormon analógok illetve a BN/GRP antagonisták alkalmazása során annak eldöntésére, hogy ezek a molekulák a sejthalált nekrozis vagy apoptózis útján okozzák. Éppen Szende Professor Úr volt, aki elsőként írta le, hogy az LHRH és SMS analógok pancreas, illetve emlő rákok esetében a tumorgátló hatást apoptózis útján idézik elő. Az Intézetben Szende Professor Úr által is jól ismert Szepesházi Károly együttműködésével számos esetben vizsgálták a citotoxikus analógok hatásmechanizmusát morfológiai illetve biokémiai módszerrel. Humán májrák (SK-Hep1) modellben citotoxikus LHRH (AN-207), SMS (AN-238) és BN/GRP (AN-215) analógok hatását vizsgálva szövettani feldolgozásokat és apoptózis értékelést végeztek. Az eredmények szerint a citotoxikus LHRH-analóg AN-238 esetében az apoptózis fokozódása észlelhető, míg a proliferációt tükröző mitózis index illetve az AgNOR granulumok száma mindhárom esetben jelentősen csökken, a tumor növekedés ütemének csökkenésével együtt. Különböző humán colorectalis rák modellekben az AN-238, AN-207 és AN-152 hatását vizsgálva a daganatgátlás hátterében a mitotikus index csökkenése, az apoptózis index emelkedése volt észlelhető (Szepeshazi K. et al. Int J Oncol 2007; 30:1485-92). További adalékot szolgáltat két humán prosztatatarák modellben az AN-207 alkalmazása. A proliferáció csökkenése mellett Western blottal mindkét esetben a bcl-2 protein expresszió csökkenése volt észlelhető, míg a bax protein expresszió nem változott; a

peptidhormon analóghoz nem kötött AN-201 molekula hasonló hatást nem okozott (Stangelberger A. et al. *Prostate* 2006; 66:200-10). Hasonlóan, intraossealisan növesztett humán androgen independens C4-2 prosztatarák esetében AN-152 kezelés után a tumorgátlás hátterében az apoptózis index emelkedését és a mitózis index csökkenését igazolták (Letsch M. et al. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4505-13). Kétféle humán gyomorrák modellben is igazolták a tumorgátlás mellett a mitózis index csökkenését, az apoptózis index emelkedését AN-238 és AN-152 kezelés után (Szepeshazi K. et al. *Cancer* 2003; 98:1401-10). Az AN-152 humán ovarium rák modellben szignifikánsan emelte az apoptózist mutató sejtek arányát (Miyazaki M. et al. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1803-9). Chatzistamou és munkatársai humán MDA-MB-435 emlőrák modellben az AN-207 hatását tanulmányozták. Érdekes módon a szer aktivitása mellett szövettani vizsgálattal a kontrollhoz képest kiterjedt nekrozist, és proliferáció csökkenést észleltek, míg az apoptózis index emelkedése nem volt statisztikailag szignifikáns (Chatzistamou I. et al. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:4158-65). Szepesházi ösztrogén-független egér MXT emlőrák modellben AN-152 és AN-207 alkalmazása után ugyancsak észlelt nekrozist, és az osztódó sejtek száma csökkent, az apoptózist mutató sejtek száma emelkedett (Szepeshazi K. et al. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56:267-76 és *Anticancer Drugs* 1997; 8:974-87).

A BN/GRP antagonisták vizsgálatát illetően kevesebb, és ellentmondásosabb adat áll rendelkezésre. Az RC-3940-II hatékonyan gátolta humán PC-3 androgén-independens prosztatarák növekedését, de szövettani metszetekben az apoptotikus sejtek arányának növekedését nem sikerült kimutatni, ellenben csökkent az osztódó sejtek aránya (Jungwirth A. et al. *Prostate* 1997; 32:164-72). Humán MDA-MB-435 emlőrák modellben az általunk is vizsgált két BN/GRP antagonista tumorgátló hatása mellett változást az apoptózis indexben nem észleltek (Bajo A.M. et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:3836-41). Humán glioblastoma modellben alkalmazott kétféle BN/GRP antagonista kezelés után az apoptózist jelző bcl-2/bax hányados csökkenésével apoptózis fokozódást mutattak ki (Kanashiro C. et al. *Anticancer Drugs* 2005; 16:159-65).

Magam arra következtetek az előbb ismertetett irodalmi adatokból, hogy a tárgyalt két citotoxikus peptid hormon analóg hatásmechanizmusa összetett: a carrier molekula specifikus receptor gátló hatásaként a proliferáció csökken, az apoptózis fokozódik. A célpontba juttatott citosztatikum internalizálása után (és részben a konjugátumból eszteráz enzim hatásra felszabaduló szabad citosztatikum direkt hatásaként) főképp a sejtciklusban lévő, kisebb részt a nyugvó sejtek apoptózist mutatnak, és nem specifikus hatásként (pl. angiogenesis gátlás, stromális sejtek károsodása) nekrozis alakulhat ki. A BN/GRP antagonisták az osztódó sejtek proliferációját és a nyugvó sejtek sejtciklusba lépését egyaránt stimuláló autokrin, parakrin és endokrin tényezők gátlásával hatnak. Eredő hatásként proliferáció csökkenés és az apoptózis útvonal felerősödése észlelhető.

Szende Professor Úr következő kérdése: a máj és szív tömegének csökkenése a GHRH antagonisták adagolása nyomán milyen szövettani elváltozáson alapulva jött létre? A GHRH antagonista JV-1-36 krónikus alkalmazása után az állatok szíve és mája szignifikánsan kisebb súlyú volt, mint a kontroll csoportban, vagy az MZ-5-156 GHRH antagonistával kezelt csoportban. Sajnos szövettani vizsgálat nem történt a szóban forgó szervekből. Magunk a változást a krónikus GHRH antagonista kezelés lokális (szöveti) és általános (endokrin) hatásával magyarázzuk. Az elmúlt években a GHRH és a GHRH/SV1 receptor univerzális,

így májbeli szöveti expresszióját is sikerült igazolni, és úgy tűnik, a GHRH rendszer az ép és daganatos sejtek és szövetek növekedésében és megújulásában egyaránt fontos szabályozó szerepet játszik (Havt A. et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:17424-9; Barabutis N. et al. Int J Oncol 2010; 36:1285-9). E mechanizmus, GHRH analógonként eltérő erőteljes gátlása lehetett az egyik oka az észlelésnek. Más részről a keringő GH stimuláló hatásának csökkenése, kiesése is szerepet játszhatott a máj és a szív változásában. A hypothetizált endokrin mechanizmus jelentőségét támogatja az a közlés, mely szerint a különböző GHRH antagonisták GH szekréción gátló hatása eltérő (Kovács M. et al. Peptides 2010; 31:1839-46). Az endokrin hatást megkérdőjelezheti, hogy annak ellenére volt különbség a két csoport szív és a máj súlyában, hogy a szérumban IGF-I szint a két GHRH antagonistával kezelt csoportban hasonló volt (bár a dekapitáláskor történt mérést számos nem specifikus hatás is befolyásolhatta). A tumor progressziója, általános hatása nem jön szóba magyarázatként, hiszen mindkét analóg esetében szinte teljes tumorgátlást észleltünk. A máj tömegének növekedését csakis a peptidhormon analóggal nem konjugált citosztatikum kezelés alkalmával figyeltünk meg, mely legvalószínűbben az antraciklinek jól ismert toxikus hatásának megnyilvánulása lehetett (a klinikumban is jól ismert hatás), de nem zárható ki a háttérben a kezelés ineffektivitása miatt kialakuló előrehaladott tumoros állapot hatása sem. Ami az értekezés alapjául szolgáló 7. számú hivatkozásban jelzett AN-238 további *in vivo* vizsgálatok és szövettani vizsgálatok eredményét illeti, a témában az előzőekben már citált közleményeken kívül számos publikáció megjelent, melyek eredményeit több review is ismerteti (Schally A.V. et al. Curr Drug Deliv 2011; 8:11-25; Engel J. et al. Mol Pharm 2007; 4:652-8; Nagy A. et al. Curr Pharm Des 2005; 11:1167-80).

Opponens Úr kérdezi, mi magyarázza azt a körülményt, hogy az AN-201 + (D-Lys5)LHRH kombináció a kontrollal szemben is növelte a daganatok térfogatát? A szóban forgó munkában szignifikáns különbséget a daganatok térfogatában vagy tömegében nem észleltünk az AN-201 és LHRH analóg keverékével kezelt állatok, és akár a kontroll, akár a többi kísérleti csoport között.

Szende Professzor Úr elnézését is kérem az értekezés ábra és táblázat anyagával kapcsolatos szerkesztésből és angol nyelvű feliratozásból származó nehézségek miatt. Elfogadom, hogy helyesebb a meztelen egér kifejezés helyett a szőrtelen vagy nude egér kifejezés, a specimen helyett a minta szó használata. Szende Professzor Úr kéri a TMA-t értékelő két patológus nevesítését, ezt pótlólag megteszem: Kaizer László és Csörgő Erika kollégák végezték a vizsgálatot. A kifogásolt 21. oldal utolsó mondatába hiba folytán egy felesleges szó került, a mondat helyesen:

„Egyrészt összehasonlítottuk a betegek hason és háton fekvő pozícióban készített radioterápiás tervét (61 beteg), másrészt vizsgáltuk a kezelés kivitelezhetőségét, a repozicionálás pontosságát és a toxicitást 41 beteg randomizáltan hason és háton fekvő pozícióban végzett sugárkezelése során (2. ábra).”

Sajnálom, hogy Professzor Úr hiányolta más szerzők eredményeinek ismertetését, illetve a hiányosság megnevezését munkájában. Tudatában vagyok annak, hogy a „rövid értekezés” műfaj valamennyi opponens úr számára többlet terhet jelentett, és ezúton is kérem szíves elnézésüket, illetve köszönöm erőfeszítéseiket.

Még egyszer, nagy megtiszteltetés, hogy Professor Úr elvállalta doktori értekezésem bírálatát, és kérem, fogadja el kérdéseire adott válaszomat.

Szeged, 2012. október 28.



Dr. Kahán Zsuzsanna