

Ciklofoszfamid monoterápia mellékhatásainak, következményeinek vizsgálata állatkísérletes modellen DSC segítségével

PhD értekezés tézisei

Dr. Farkas Péter István

PTE KK Radiológiai Klinika

Doktori iskola:	Interdiszciplináris Orvostudományok (D93)
Doktori iskola vezetője:	Prof. Dr. Sümegi Balázs
Doktori program:	Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel (B-130)
Doktori Program vezetője:	Prof. Dr. Nyitrai Miklós DSc
Témacím:	A biológiai makromolekulák termikus analízissel történő vizsgálata
Témavezető:	Prof. Dr. Lőrinczy Dénes DSc

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Biofizika Intézet

2017

Bevezetés

A XXI. században a fejlett országokban a kardiovaszkuláris megbetegedések után a rosszindulatú daganatok állnak a második helyen a halálokok között. Azonban a Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint, amíg a szív- és érrendszeri megbetegedések az elhalálozás okaként minimális csökkenő tendenciát mutatnak, addig ezzel szemben a második leggyakoribb halálokok, a rosszindulatú daganatos megbetegedések előfordulása enyhén emelkedő tendenciát mutat.

A fenti tendenciákból is adódóan egyre nagyobb hangsúly helyeződik a daganatos megbetegedések gyógyítására illetve kezelésére. A rosszindulatú térfoglaló folyamatok túlnyomó többségében elsődleges cél az elváltozás in toto műtéti eltávolítása, azonban ez sok esetben nem lehetséges, így kulcsszerep hárul daganattípustól függően a besugárzásnak illetve a kemoterápiának. Mindkét lehetőség veszélyeket és akár igen súlyos mellékhatások lehetőségét rejti magában.

A kemoterápia alkalmazása során a dózis meghatározás kiforrott vagy sokszor csak alakulóban lévő nemzetközi ajánlások, standardok alapján történik, azonban betegre szabott individuális dózis beállítása nem lehetséges. Figyelembe véve, hogy a legtöbb gyógyszer, kemoterápiás szer farmakokinetikája részben genetikai alapon, részben a beteg szervezetének aktuális általános állapotától függően befolyásolt, ugyanazon dózis alkalmazása eltérő hatással lehet különböző kezeltek esetén.

Vizsgálatunkhoz a ciklofoszfamidot választottuk, melynek alapját az adja, hogy az onkoterápia mellett egyéb területeken több betegségcsoportban, elsősorban immunológiában is kiemelt szerepet játszik és széles körben, akár hosszantartó terápia részeként kerül alkalmazásra. Kisebbségi hangsúllyal, de szintén alkalmazzák többek között bőrgyógyászatban, pulmonológiában is. Ebből kifolyólag a mellékhatás profilja kiemelt szerepet kap és számos klinikai terület profitálhat kísérleteink eredményéből.

A ciklofoszfamid fontosságát jól mutatja, hogy az Egészségügyi Világszervezet (WHO) által 2015 áprilisában kiadott legfontosabb gyógyszerek listáján is szerepel.

Célkitűzések

A dolgozat célja a DSC (differential scanning calorimetry = differenciál pásztázó kalorimetria), mint esetleges klinikai diagnosztikai eszköz megítélése in vitro kísérleteinkre alapozva. Szeretnénk bizonyítani a módszer alkalmasságát a szisztémásan alkalmazott ciklofoszfamid terápia szövődményeinek előrejelzésében, várható mellékhatásainak becslésében.

Állatkísérleteinkben gyógyszeres kezelés hatásainak megítélésére humán dózissal ekvivalensen intraperitoneálisan alkalmazott ciklofoszfamid terápiát követően külön-külön vizsgálat alá vetettünk ideg-izom komplexet, szívizomzatot, vérplazmát és vvt (vörösvértest) szuszpenziót. Mindezek során szeretnénk megítélni:

- neuropátia, motilitási diszfunkció irányába mutató eltéréseket ideg-izom komplexen létrejövő módosulások által.
- a szívizomzatban kialakuló változásokat, melyek szerepet játszhatnak kardiomiopátia kiváltásában.
- a vér alakos elemein, vörösvérsejteken és vérplazmán detektálható eltéréseket, mely alapján lehetőség nyílhat indirekt úton történő gyógyszer szint monitorozásra és a tartós kezelés során létrejövő funkcionális módosulások becslésére.
- eredményeink alapján a dózis függvényében tapasztalt eltérések prediktív értékét a lehetséges következményeket illetően.

Kísérleteink és eredményei

Kutatásainkhoz kifejlett tengerimalacokat (*Cavia porcellus*) használtunk, mely során intraperitoneálisan injektáltunk ciklofoszfamidot. Az intraperitoneális gyógyszerbevitel kisemlősök esetében széles körben elfogadott módszer, mely emberekre vonatkoztatva egyenértékűnek tartható az intravénás alkalmazással. Vizsgálatainkhoz etikai engedélyt kértünk, engedélyszáma: BA02/2000-4/2012.

Kezdő vizsgálat

A DSC módszer alkalmazásának gondolata egy konkrét, igazságügyi orvosszakértői eset megoldásának kapcsán merült fel. Ennek megválaszolása érdekében a kísérletek során tengerimalacok intraperitoneálisan, az emberi terápiás dózis testtömeg kilogrammra arányosan számított mennyiségű (5 mg/kg) ciklofoszfamidot kaptak egymást követő 2-5 alkalommal, illetve több nap szünettel a humán protokollnak megfelelően. Kontrollként gyógyszert nem kapott állat szerepelt.

Az állatok aether ad narcosimmal telített kamrában exitáltak, és a hátsó végtagokból az ülőideg (*nervus ischiadicus*) és lábszárizom (*m. gastrocnemius*) kipreparálása történt, az idegekből egységesen 2 cm hosszú, az izmokból azonos anatómiai helyről 0,5 x 0,5 x 2 cm-es mintavétel történt, melyek a kalorimetriás feldolgozásig (a minta vételét követően 12 órán belül) steril fiziológiás konyhasóoldatban voltak tárolva 4 °C-on.

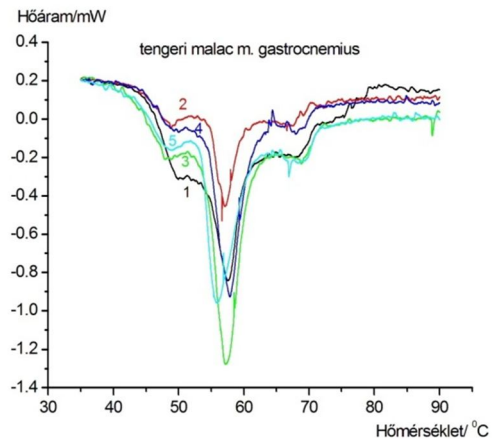
DSC mérések

A kalorimetriás vizsgálatokat megelőzően az állatokból kipreparált minták fiziológiás sóoldatban háromszor átmosásra kerültek a zavaró szennyeződések, szövetmaradékok eltávolítása érdekében.

A termikus analízis SETARAM Micro DSC-II kaloriméterrel történt 0 és 100 °C között 0,3 K/perc melegítési ütem mellett. A kísérletekben hagyományos Hastelloy-cellákban ($V=1$ mL) történt a denaturáció, melyekben átlagosan összesen (minta + puffer) 950 μ L mintatérfogat volt. A vizsgált szövetdarabok tömege 250-400 mg között volt. Referenciaként izotóniás sóoldat szerepelt. A referencia- és mintaedények tömege $\pm 0,1$ mg pontossággal megegyezett, így az edények hőkapacitása között nem volt szükséges korrekciót alkalmazni. A hőabszorpciós görbe alatti területből történt a kalorimetriás entalpia meghatározása kétpontos illesztésű SETARAM integrálás segítségével, majd a vizsgálati eredmények (a különböző minták maximális denaturációs hőmérsékletei (T_m , melynek számozása a több termikus doménra osztható szerkezetre utal), a kalkulált entalpia értékek (ΔH)) összehasonlítása történt.

A kontroll egészséges gastrocnemius izom denaturációja (1. ábra) az aktomiozin oldatok és a nyúl psoas izomrostok esetén mért három átalakulási hőmérsékletű hőabszorpciós görbékhez hasonlít. Ezek alapján az első denaturációs csúcs a miozin fej, a második a miozin rúd, míg a harmadik az aktin termikus denaturációjával hozható kapcsolatba. A citosztatikummal kezelt állatok mintáinak termikus denaturációja a DSC görbék alapján jó közelítéssel a kapott terápiás dózis függvényében változott (1. ábra).

A kapott adatok alapján a miozin fej (T_{m1}) tűnik a legérzékenyebbnek a kezelési dózissra. Az első dózis sok hatásként értelmezhető a kiugróan magas T_{m1} miatt, míg a további dózisok közel azonos mértékű változást eredményeztek. A miozin rúd (T_{m2} értékek) és az aktin (T_{m3} értékek) a második és negyedik adag citosztatikumra adott a kontrollhoz képest jelentősen eltérő eredményt. A kalorimetriás entalpia, amely a szerkezeti változásokat szintén jól monitorozza, hasonlóképp dóziszfüggést mutat. A mérések korlátozott száma (csak egy kezelési sorozat elvégzése történt a kontrollal együtt öt egyedből álló csoporton) miatt természetesen statisztikailag igazolt összefüggés nem volt kimutatható, de a tendencia jól látható. A kemoterápiás kezelésnek tehát lehet a mozgatórendszerre károsító hatása.



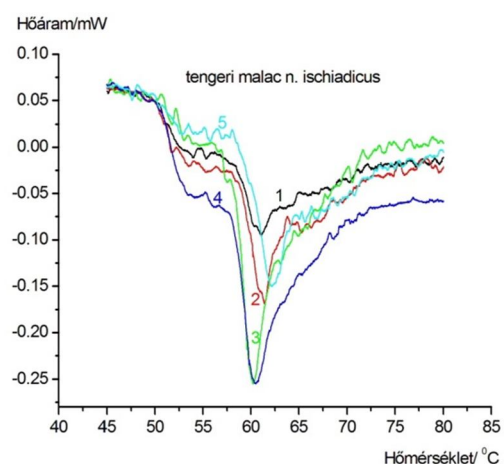
1. ábra: Különböző dózissal ciklofoszfammal kezelt tengerimalacok musculus gastrocnemius hődenaturációs görbéi. (1=kontrol, 2-5-ig a dózis növekszik)

Tekintettel arra, hogy a mozgató rendszer (izom) működése nem csak annak szerkezeti tulajdonságától, hanem a beidegzettségétől is függ, ezért az izom működtetéséért felelős ischiadicus idegen is történtek mérések.

A 2. ábra alapján az ideg denaturációs hőáram görbéje szintén dóziszfüggő lefutású.

A termikus adatok alapján az alkalmazott kemoterápiás dózisok többsége szerkezeti változást okozott (vagy a T_m vagy ΔH alapján).

Az ideg összességében nagyobb érzékenységet mutatott a kemoterápiás kezelésre, mint az általa beidegzett izom.



2. ábra: Különböző dózissal ciklofoszfammal kezelt tengerimalacok nervus ischiadicus hődenaturációs görbéi. (1=kontrol, 2-5-ig a dózis növekszik)

Megbeszélés

Számtalan endogén és exogén ok idézhet elő polineuropátiát. A malignus daganatos betegségek kapcsán kialakuló neuropátiák etiológiájaként sokszor paraneopláziás jelenség merül fel először, azonban bizonyítottan tekinthető, hogy túlnyomó részéért az alkalmazott kemoterápiás gyógyszeres kezelések lehetnek a felelősek, bár ezek direkt neurotoxikus hatása csak részben bizonyított. A kezdő vizsgálat alap gondolatát egy ovarium adenokarcinómából meggyógyultnak nyilvánított ciklofoszfamiddal kezelt fiatal nőbetegnél kialakult kevert típusú polineuropátia igazságügyi orvosszakértői véleményezése adta. Állatkísérlettel sikerült igazolni a ciklofoszfamid neuro- és miotoxikus hatását, mely során rosszindulatú tumoros betegeknél alkalmazott protokollal és dózissal ekvivalens ciklofoszfamidot kaptak a tengerimalacok. A kalorimetriás vizsgálat alkalmas a különböző típusú és mértékű izom károsodások igazolására a nemzetközi irodalomban közölt adatok alapján. Ezelőtt kalorimetriás méréseket még nem alkalmaztak perifériás idegek vizsgálatára.

Következtetés

Mivel a vizsgálat elsősorban egy célzott klinikai esetre próbált választ találni, így csak kisszámú mérés elvégzése történt, ezáltal önmagában ennek alapján szignifikáns eredmény nem prezentálható. Elmondható azonban, hogy a ciklofoszfamid hatására mind a perifériás idegekben, mind az izmokban kalorimetriával jól mérhető és igazolható szerkezeti változások jöttek létre. Emellett kijelenthető, hogy a változások mértéke függ az alkalmazott ciklofoszfamid dózisától. Ezen eredmények stabil alapot biztosítottak további vizsgálataink megtervezéséhez és kivitelezéséhez.

Az új vizsgálatok kivitelezése

A kis egyedszámú kezdő vizsgálat biztató eredményeire alapozva terveztük meg a kísérletsorozatunk folytatását, mely során az egyedszámot több mint tízszeresére emeltük és immár többfajta adagolási sémát alkalmaztunk. A kísérlet során használt tengerimalacok tömege között a két szélsőértéket tekintve (230 g és 1200 g) közel ötszörös az eltérés, de az állatok többségét nézve is relatíve nagy szórás volt tapasztalható, így a kezdő vizsgálattal megegyezően minden tengerimalacnak egyedi abszolút dózist, külön-külön testtömegre számolva 5 mg/testtömeg kilogramm ciklofoszfamidot adagoltunk intraperitoneálisan. A DSC méréseket a kezdő vizsgálattal megegyező körülmények és paraméterek mellett végeztük el.

A kísérletben 11 különálló csoporton – 5-5 egyeddel, $n=55$, $n=5$ /csoport - 11 különböző adagolási sémát állítottunk fel, melyek során 1-6 alkalommal ismételtük a gyógyszerbeadást részben egymást követő napokon, részben több nap szünettel. Megjegyzendő, hogy a 6 kezelést kapó csoportból 2 tengerimalac a kísérlet befejezése előtt, az ötödik kezelés után elpusztult, melynek oka nem tisztázott. Eredményeink értékeléséhez kontroll csoportot alkalmaztunk, mely során ciklofoszfamiddal nem kezelt tengerimalacok ($n=5$) vizsgálatát végeztük el ugyanolyan módszerrel és körülmények között.

Az állatok leölése altató éterrel telített kamrában történt, melyet követően több lokalizációból végeztünk mintavételt:

- kipreparálásra került anatómiailag ekvivalens helyekről mindkét oldali musculus gastrocnemiusból 0,5 x 0,5 x 2 cm-es, a nervus ischiadicusból 2 cm hosszú darab.
- eltávolításra került a szív bal kamra izomzatából 0,5 x 0,5 x 0,5 cm-es darab.
- EDTA tartalmú (1,5 mg/ml vér) vérmintavételi vákuumcső segítségével perifériás vért gyűjtöttünk, majd 15 percig centrifugáltuk (1600g) 4 °C-on elkülönítve a plazma frakciót és a sejtes elemeket (vvt).

Az ideg és izom mintákat 4 °C-on steril izotóniás sóoldatban tároltuk (max. 12 óra) a mérések elvégzéséig.

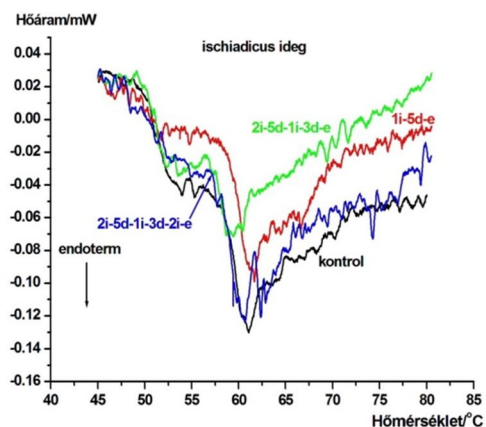
Ideg-izom komplex vizsgálata

A kezdő vizsgálat kiterjesztése annak eredményeit volt hivatott alátámasztani/megerősíteni, illetve finomítani az adagolási sémák számának növelésével.

Az állatokat 7 nagyobb csoportra osztottuk, mely során a kontroll csoport mellett a kezelések száma alapján (1-6) soroltuk be őket. Habár funkcionális egységet képeznek, de az eltérő szöveti tulajdonságok okán külön vizsgáltuk a nervus ischiadicust és a musculus gastrocnemius. Mivel minden tengerimalac esetén mindkét oldali ideg-izom komplex kipreparálásra került, így minden esetben dupla méréseket végeztünk, külön jelölve a jobb és bal oldali mintákat.

A ciklofoszfamid kezelés dózisfüggő hatásait a perifériás idegre a 3. ábra szemlélteti.

A hőáram maximum csökkenése együtt jár a denaturációs hőmérséklet alacsonyabb tartományba történő eltolódásával a dózis függvényében. A kapott értékekből kiolvasható egy meglepő nem várt eltérés is, mely alapján a kezelés jól kimutathatóan jobban érintette a bal oldali ideget. Ezt a jelenséget nem tudjuk egyértelműen magyarázni – megjegyzendő, hogy az injektlás konzekvensen minden esetben a has bal oldalán történt, de ezzel önmagában nem indokolható az oldalkülönbség.



3. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok nervus ischiadicus hődenaturációs görbéi (i=injektálás, d=eltelt napok száma)

A jobb oldali idegek esetében a T_{m3} – mal jellemezhető termikus domén és a teljes kalorimetriás entalpia mutatja a kezelés dózis függését, míg a T_{m1} és T_{m2} változásaiban csak enyhe, mérsékelt tendencia figyelhető meg injektlások számának és a kezelések után eltelt idő függvényében, az is csak 1-2 injektlás során. Két kezelésig az injektlózás között eltelt idő is szignifikáns hatású (csökken). Ezt

követően csak az általunk végzett legtöbb, 6-szori injektálás után figyelhető meg szignifikáns dózis dependencia T_{m1} -ben. Ezzel szemben ugyanezek az adatok a bal oldali idegek esetén azt mutatják, hogy a termikusan elkülöníthető szerkezeti domének termikus stabilitásának erős dózis függését T_{m1} és T_{m3} is csak két injekcióig követi. A kontroll vizsgálatokhoz képest a kalorimetriás entalpia dózis függése gyakorlatilag minden esetben egyértelmű, de a második és harmadik injekció hatása az előzőekhez képest nő.

A PTE ÁOK Biofizika Intézetben korábban már több aspektusból történt harántcsíkt izomzat DSC-vel történő vizsgálat, ezáltal már jelentős előnyt adó tapasztalatokkal rendelkezünk a musculus gastrocnemius vizsgálata során kapott mérési adatok kiértékelésében.

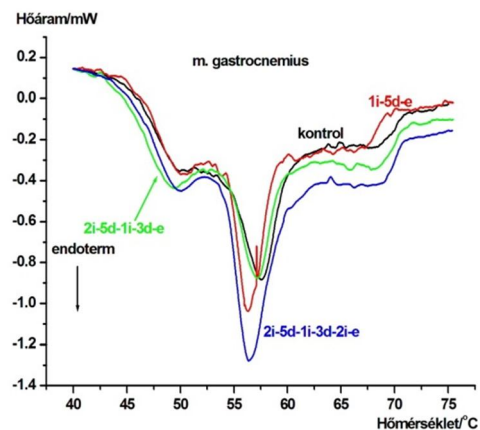
Az állatokból kiperarált musculus gastrocnemius hődenaturációs görbéi a 4. ábrán láthatóak:

A denaturációs hőáram görbéje 3 jól elkülöníthető szakaszra osztható. A korábbi vizsgálatok alapján a középső szakasz megfelel a miozin rúd, az alacsonyabb denaturációs csúcs a miozin fej, míg a legmagasabb az aktin és aktin-miozin komplex termikus denaturációjának. A hődenaturációs görbék jól demonstrálják a ciklofoszfamid kezelés okozta változásokat a dózis függvényében. A termikus paraméterek a nervus ischiadicushoz hasonlóan a károsodás bal oldali dominanciáját mutatják.

A kemoterápia által kiváltott szerkezeti eltéréseket denaturációs hőmérsékleti pontok (T_m) és kalorimetriás entalpiák (ΔH_c) módosulásának tendenciája szemlélteti, mely alapján a jobb izomban minden kezelés során elsősorban az aktin filamentumok érintettsége rajzolódik ki hasonló jellegű entalpiaváltozás mellett. A bal oldali izmok esetén már a miozin fej is érintett szignifikánsabb entalpia dóziszfüggés mellett. Mindez fiziológiailag az aktomiozin komplex romló funkcióját okozza, mely végül rosszabb mozgási képességet eredményez.

Megbeszélés

A ciklofoszfamid relatíve súlyos mellékhatás spektrummal rendelkezik, melyek közül komoly hosszú távú következményekkel járhat a perifériás ideg- és izomkárosodás, a polineuropátia kialakulása. Habár a kemoterapeutikumok neurotoxikus hatása csak részben bizonyított, a ciklofoszfamid esetén ennek lehetőségét már korábban is felvetették. Az általunk alkalmazott DSC vizsgálati módszer igazoltan alkalmas izomkárosodás kimutatására,



4. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok musculus gastrocnemius hődenaturációs görbéi (i=injektálás, d=eltelt napok száma)

míg maga az ideg károsodásának a kimutatására is történtek már vizsgálatok kisebb esetszámban kísérletes jelleggel.

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a termikus paraméterekben megmutatkozó eltérések egyértelműen igazolják a ciklofoszfamid károsító hatását perifériás ideg és némileg kisebb mértékben harántcsíkolt izom esetén. Az eltérés a szöveti érzékenység különbségével magyarázható elsősorban, de végeredményben mindkettő funkcionális károsodáshoz vezet, hatásuk a gyakorlatban összeadódnak, melynek a mértéke az általunk alkalmazott dózis függvényében változik.

Érdekes, hogy a vizsgálataink során egyértelmű oldalkülönbséget észleltünk, mely a bal oldali ideg és izom fokozottabb érintettségét igazolta. Ennek a hátterét jelenleg nem tudjuk magyarázni, de érdemes ezt az aspektust is vizsgálni, mivel ha a későbbiekben a kezelt humán betegpopulációban is hasonló predominancia igazolható, akkor ezt a kivizsgálás, illetve kontroll eredmények értékelése során célszerű figyelembe venni.

Következtetés

A munkánkat elindító kezdő vizsgálat eredményét megerősítve és alátámasztva a nagyobb számú (n=55) állatkísérletünkben differenciál pásztázó kalorimetria segítségével detektált szignifikáns termokémiai változások alapján egyértelműen igazolható a ciklofoszfamid dózisfüggő perifériás ideg- és izomkárosító hatása. Mindezek alapján a ciklofoszfamid egyéb területeken kifejtett negatív hatása szintén felmerül, melyek felderítése további vizsgálatokat indokol. Az oldalkülönbség szintén további kérdéseket vet fel.

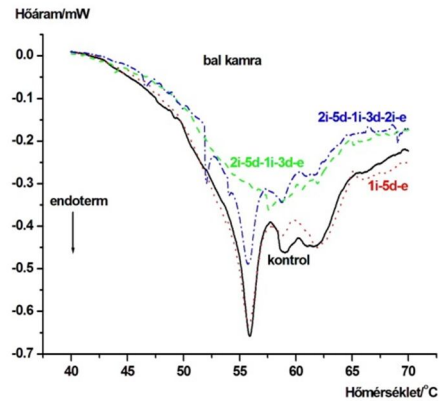
Szívizom vizsgálata

A kísérleteink tervezésénél a szívizom vizsgálatát egyértelműen az alapozta meg, hogy a ciklofoszfamid illetve számos más citosztatikus szer egyik legsúlyosabb, olykor fatális kimenetelű mellékhatása a kardiotoxicitás. A folyamat patofiziológiája relatíve jól ismert, azonban a kiváltó dózisérték, prediktív jelek nem tisztázottak, így figyelembe véve a lehetséges következmények súlyát, vizsgálata indokolt.

A vizsgált egyedek – azonosak az ideg/izom vizsgálat kísérleti állataival – bal kamrájából vettük a mintát, mivel ez van kitéve a legnagyobb igénybe vételnek.

A ciklofoszfamid dózisfüggő hatása, a denaturációs hőmérsékletek eltolódása és az entalpia csökkenése jól megfigyelhető a bal kamra hődenaturációs görbéin (5. ábra).

Az eredményeink elemzéséhez itt is felhasználtuk a korábbi, vázizomzat vizsgálata során szerzett tapasztalatokat és következtetéseket. Akárcsak a harántcsíkolt vázizom esetében a szívizomzatnál is 3 szakaszra bontható a denaturációs görbe. Tapasztalataink alapján az 58 °C körüli olvadási pont (kontrollnál a középső csúcs) a miozin rúd, az alacsonyabb átmenet a miozin fej, míg a legmagasabb, 62 °C feletti csúcs az aktin ill. aktomiozin komplex denaturációjának felel meg. Mindezek módosulása a beadott ciklofoszfamid mennyiség tekintetében a görbék lefutásával (alakjával) és a hőáram maximumok elmozdulásával jellemezhető.



5. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok bal kamra szívizomzat hődenaturációs görbéi (i=injektálás, d=eltelt napok száma)

A mért értékekből kiolvasható, hogy 1-2 ciklofoszfamid kezelés már befolyásolja a T_{m1} -t, T_{m3} -t és a kalorimetriás entalpiát, mely alapján megállapítható, hogy miozin fej és az aktin érzékenyebb a kezelésre. A kalorimetriás entalpia azonban jobban függ a dózistól és a kezeléseket között eltelt időtől. A nagyobb számú, 3 vagy több kezelés során a T_{m2} , T_{m3} és a kalorimetriás entalpia változása képes monitorozni a kifejtett hatást, mely során főként a miozin rúd és az aktin érintett. A teljes folyamatot tekintve kijelenthető, hogy elsősorban a miozin fejek és az aktin filamentumok szenvednek változást (T_{m1} , T_{m3}), ami rosszabb aktomiozin komplex funkciót okoz, ezáltal végeredményben a szív pumpa funkciója csökken.

Megbeszélés

A ciklofoszfamid okozta szívizom-károsodás, hemorrágiás szívizomgyulladás az irodalomban ismert, de a mechanizmusa csak részben tisztázott és mértékadó dózis-határ értéket eddig nem sikerült megállapítani. Figyelembe véve a gyógyszer széleskörű használatát és a lehetséges szövődmények adott esetben fatális kimenetelét, a folyamat pontosabb megismerése fontos szerepet játszik. A ciklofoszfamid hatását a szívizomra eddig DSC vizsgálattal nem tanulmányozták, melyet a kutatócsoportunk kísérletes körülmények között tengerimalacokon végzett el onkológiai indikációval adott testsúlykilogrammmra vonatkoztatott dózissal és protokollal.

A korábbi vizsgálataink során szerzett tapasztalatokat is felhasználva eredményeink alapján elmondható, hogy a többszöri ciklofoszfamid adás először a miozin fejet és az aktint károsítja, majd a dózist növelve végül a teljes aktomiozin komplex károsodást szenved, mely valószínűleg jelentős szerepet játszik a kialakuló klinikai képben.

Emellett az is kijelenthető, hogy az egyszeri ciklofoszfamid számottevő szívizomkárosító-hatást nem produkált, mely további egyértelmű bizonyítéka a dózis dependenciának, annak ellenére, hogy a korábbi vizsgálatokban kumulatív jelleget nem mutattak ki.

Következtetés

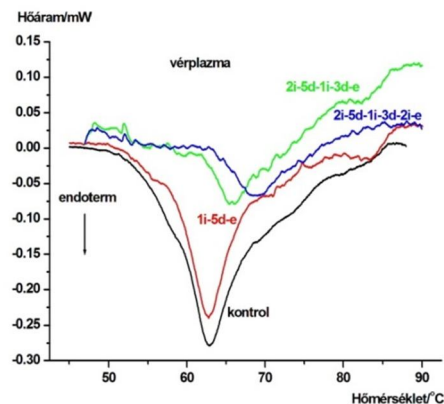
Vizsgálatunkkal és eredményeinkkel remélhetőleg egy lépéssel közelebb kerültünk a ciklofoszfamid indukálta kardiomiopátia patofiziológiai megértéséhez és tisztázásához, emellett sikerült egy újabb támpontot adni a becsült dózis-határ érték felállításához.

Plazma és vörösvértest vizsgálata

A vér vizsgálatát azért tartottuk indokoltnak, mert jól tükrözi az egész szervezetet ért hatásokat, de talán még ennél is fontosabb, hogy a napi klinikai rutinban az egyik legjobban és legegyszerűbben vizsgálható biológiai minta, mely információt nyújthat a beteg szervezetéről. A vér DSC-vel történő vizsgálatára egyre bővülő irodalom áll rendelkezésre számos különböző patológiai eltérés esetén. Amennyiben sikerül szignifikáns eltéréseket találnunk, kiváltképp, ha azok az alkalmazott dózissal korrelálnak, kezünkbe kaphatjuk egy új módszer lehetőségét, mely képes monitorozni, esetlegesen előre jelezni a szervezet egyéb területein zajló folyamatokat, illetve súlyosságukat. Ha ez sikerül, esély nyílik megelőzni vagy mérsékelni a gyógyszer indukálta mellékhatásokat és súlyos következményeket.

A vérmintákat ugyanazon állatokból nyertük, mint a korábbi ideg, izom és szívizom mintákat, ezáltal az adagolási séma és csoportosítás is megegyező.

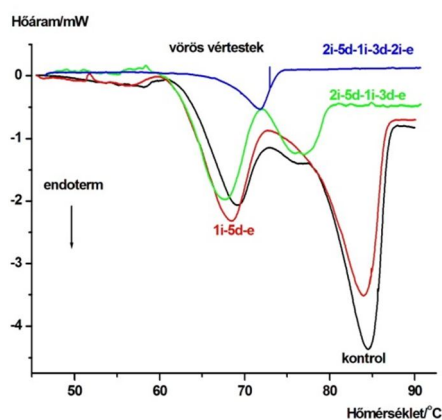
A ciklofoszfamid vérplazmán okozott hatásait hődenaturációs görbék szemléltetik a dózis függvényében (6. ábra) – a könnyebb átláthatóság érdekében a kontroll mellett csak 3 különböző (1,3 és 5 kezelés utáni) denaturációs görbét ábrázoltunk, melyekből az egész folyamat trendje kiolvasható. A T_{m1} (amely az irodalom szerint a fibrinogén denaturációjának felel meg valamint T_{m3} (globulinok denaturációja) esetében az első kezelés kivételével a denaturációs hőmérsékleti pontok az alacsonyabb tartományba tolódtak, míg a maximális hőáram csökkenő tendenciát mutatott minden kezelésre. A T_{m2} -vel jellemezhető denaturáció, amely a plazma albumin komponensétől származik minden kezelés után szignifikánsan magasabb a kontrollnál. A vizsgált vérplazma mintákban, általánosságban feltételezhetjük, hogy minden esetben legalább 3 különböző termikus szerkezeti egység van jelen (dekonvolúció nélkül). A ciklofoszfamid kezelés által erősebben befolyásolt domének a T_{m2} és T_{m3} értékeinek eltolódásával jellemezhetők. A ciklofoszfamid terápia elkezdésére, az első injektálás után kifejezett, szignifikáns emelkedés tapasztalható a denaturációs hőmérsékleti maximumokban (T_m), melyeket a kezelés után eltelt idő és a kezeléseket száma döntően



6. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamiddal kezelt tengerimalacok vérplazma hődenaturációs görbéi (i=injektálás, d=eltelt napok száma)

befolyásol. A kalorimetriás entalpia csökkenése csak a második kezelést követően válik szignifikáns mértékűvé. A harmadik injektálástól viszont már a T_{m1} , a T_{m3} és a ΔH_c termikus paraméterekben szignifikáns csökkenés jelenik meg.

A vörösvértetek esetében egy érdekes különbséget tapasztaltunk, még hozzá a kontroll csoport hődenaturációs görbéjében, mely alapján 4 lépésre elkülöníthető denaturáció lép fel (7. ábra). A várt tartományban 3 endoterm reakció (69, 76 és 84 °C-on) zajlott. Ezek az átalakulások a kezelések számának növekedésével alacsonyabb hőmérsékletre tolnak, míg a ötödik kezelés után gyakorlatilag már csak egy endoterm reakció játszódik le a rendszerben.



7. ábra: Különböző dózisu ciklofoszfamidval kezelt tengerimalacok vvt hődenaturációs görbéi (i=injektálás, d=eltelt napok száma)

Ez a felismerés fontos szerepet játszhat az orvosi kezelések megtervezése során, a klinikumban, és humán felhasználáskor szoros kontrollt tesz szükségessé. Az első csoportban (injektálást követő napon terminálás) a magasabb hőmérsékletű két endoterm reakció T_m -je szignifikánsan csökkent. Ezzel szemben a két kezeléssel átesett csoportokban csak a T_{m3} csökkent szignifikánsan, míg a T_{m1} és T_{m2} értékeiben ingadozás volt tapasztalható. A 3 és 4 dózis ciklofoszfamidot kapott csoportokban az összes olvadási hőmérséklet (kivéve a hatodik kezelést) szignifikánsan csökkent. A kalorimetriás entalpiák az első és negyedik injektálást követően szignifikáns növekedést, a többiben csökkenést mutatnak, melyben jóval egyértelműbb szerepe van a terminálás előtt eltelt időnek.

Megbeszélés

Kutatásunkban a széles körben használt ciklofoszfamid okozta hatásokat vizsgáltuk a vérplazma összetevőin és a vörösvértetekken. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy az állatmodellünkön humán protokollal ekvivalensen alkalmazott ciklofoszfamid kezelés hatására mind a vörösvértetekken, mind a vérplazmában DSC-vel detektálható változások figyelhetők meg. A kimutatott eltérések feltételezhetően részben a ciklofoszfamid plazma koncentrációjával állnak összefüggésben, részben a szer által a plazma összetevőkön (az irodalmi adatok alapján elsősorban a fibrinogéneken, albuminon és globulinokon) és vörösvérsejteken kiváltott biológiai hatásaival, melyek a biológiai törvényszerűségek alapján nagy valószínűséggel működésbeli következményekkel is járnak. Ezen módosulások a különböző mellékhatásokban feltételezhetően szerepet játszanak, így az eltérés mértéke prediktív értékű annak súlyosságát és lefolyását illetően.

Figyelembe véve, hogy a ciklofoszfamid plazma szintjének relatíve gyors és informatív meghatározása a napi gyakorlatban nehézkes, a módszer ez irányú alkalmazása új lehetőségekkel kecsegtet. Mindemellett a ciklofoszfamid ismert és nem kívánt, olykor fatális

mellékhatásainak pontosabb előrejelzése szintén fontos, mely feltételezéseink szerint a vér összetevőin kiváltott hatások mértékével, illetve minőségével várhatóan korrelálhat. Ennek pontosabb megítélése még további vizsgálatok tárgyát képezheti, főleg annak tükrében, hogy a módszerünk (DSC) klinikai alkalmazhatóságának megvalósítása egyéb területeken már folyamatban van és a publikációk száma egyre növekszik.

Következtetés

Vizsgálatainkkal egyértelműen bizonyítható a ciklofoszfamid indukálta változások detektálhatósága DSC segítségével a vörösvértesteken és a plazma elemein, mely új lehetőséget teremt a várt hatások és nem kívánt mellékhatások megítélésében, valamint előrejelzésében. A DSC klinikai alkalmazásának folyamata ígéretes, így további kutatások révén újabb hasznos és értékes információt nyerhetünk ezzel a vizsgáló eljárással.

Kísérletsorozatunk értékelése

Vizsgálatainkban ciklofoszfamid okozta hatásokat, általa kiváltott változásokat igyekeztünk kimutatni egy már ismert, de még nem elterjedt módszerrel, a differenciáló pásztázó kalorimetriával.

A ciklofoszfamid perifériás idegre (nervus ischiadicus) kifejtett hatását a kezdeti, kis egyedszámú vizsgálat már előrevetítette, amit kiterjesztett vizsgálataink megerősítettek. Habár a T_{m1} és T_{m2} denaturációs hőmérsékleti maximumok mutattak kismértékű eltéréseket, ami a bal oldali T_{m1} esetén tendenciózusnak bizonyult, de egyértelmű igazolással a T_{m3} - mal jellemzett termikus domén szolgált szignifikáns emelkedésével. A perifériás ideg esetén az igazán meggyőző eredményt a kalorimetriás entalpia számítása hozta a hődenaturációs görbéből, mely markáns dózis dependencia mellett egyértelmű szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll csoporthoz viszonyítva. A relatíve nagymértékű entalpiaváltozás erős strukturális változásra utal, mely figyelembe véve az idegszövet kifejezett érzékenységét megalapozottan magyarázza a funkcióbeli károsodást.

A harántcsíkolt izomzat (musculus gastrocnemius) értékeléséhez jelentős tapasztalati eredmények álltak rendelkezésre. A ciklofoszfamid károsító hatását az entalpia változása mellett elsősorban T_{m1} és T_{m3} értékek változásai mutatják, mely a perifériás ideghez viszonyítva mérsékeltebbek, de egy irányú csökkenő tendenciát mutatnak. Az eredmények a miozin fejek és az aktin filamentumok érintettségét támasztják alá, összességében az aktomiozin komplex funkciókárosodásával. Fontos kiemelni, hogy funkcionális egységként kell kezelnünk a vizsgált aktomiozin komplexet és az azt beidegző nervus ischiadicust, ami a károsodásuk okozta funkciócsökkenés hatványozódásával jár.

Megjegyzendő, hogy a perifériás ideg és izom vizsgálata során bemutatott oldalkülönbség jelenleg megalapozottan nem magyarázható, amennyiben további vizsgálatok és humán klinikai esetek is mutatnak ilyen jellegű diszkrpanciát további, ez irányba érzékenyített vizsgálat szükséges a háttérének kimutatására.

A szívizomzat denaturációs görbéje nagyban megegyezik a harántcsíkolt izoméval, így hasonlóan értékes alapinformációkkal rendelkezünk a vizsgálata során. Az eredmények alapján a harántcsíkolt izommal összehasonlítva a szívizom már kisebb dózisú kezelésre (1-2) is érzékeny, szignifikánsabb eltérést mutat T_{m1} és T_{m3} denaturációs hőmérsékleti maximumokban, míg a dózis emelésével (3-4) T_{m2} és T_{m3} mutat jól detektálható változást. A T_{m2} csökkenése a miozin rudak károsodását jeleníti meg. A kalorimetriás entalpia a dózis emelésével fokozódó csökkenést mutat, demonstrálva ezzel a szerkezeti károsodásokat. A teljes vizsgálatot tekintve ebben az esetben is dominánsan a miozin fejek és az aktin filamentumok sérülnek, de a miozin rudak sem maradnak intaktak. Összességében az aktomiozin komplex funkciója, ezáltal a pumpa funkció számottevően csökken. A

kalorimetriás entalpia jelezte szerkezeti módosulások feltehetően aktívan hozzájárulnak a szívizom-károsodás, adott esetben a hemorrágiás szívizomgyulladás kialakulásához.

A ciklofoszfamid kis mennyiségű, egyszeri alkalmazásának a hatása legszembetűnőbb a vérplazma alkotóelemein, ahol az első kezelést követően egyértelmű növekedés tapasztalható a denaturációs hőmérsékleti maximumokban. Egyszeri kezelést követően az idő múlásával az eltérés fennmarad, ami egyértelműen a ciklofoszfamid tartós hatásáról tanúskodik, vagyis a kezelés leállításától nem várható gyors regeneráció. Újabb kezelésekre a hőmérsékleti maximumok szignifikáns csökkenést mutatnak, mely a biológiai funkciók károsodását feltételezi. A fibrinogén denaturációjának megfeleltethető T_{m1} eltérések feltételezik a fibrinogén diszfunkcióját, vagy csökkent funkcióját, ezáltal a véralvadási rendszer károsodását demonstrálja. Ez a klinikai gyakorlatban a vérzéses, illetve trombembóliás szövődmények lehetőségét vetíti előre. A T_{m2} szemben a T_{m1} és T_{m3} –mal a kontroll csoporthoz viszonyítva, a kezeléseket alatt csaknem végig szignifikánsan emelkedett, mely eltérés az albumin funkciózavarára utal, ami befolyásolhatja többek között a plazma kolloid ozmotikus nyomását, a vér kötő- és szállító funkcióját, csökkentheti az antioxidáns hatást és a szervezet aminosav tartalmát.

A funkcióbeli károsodásokat erősíti meg a kétszeri injektálástól a többszöri kezelése során az egyre nagyobb mértékű kalorimetriás entalpia csökkenés, ami a szerkezeti átalakulások, módosulások egyre kifejezettebb mértékét demonstrálja.

A vörösvértetek esetében az eredmények nem mutatnak ilyen mértékű egyirányú tendenciát, mind a denaturációs hőmérsékleti maximumokban (T_m), mind a kalorimetriás entalpia eltérésekben ingadozás figyelhető meg, a különbségek számos esetben szignifikáns mértékűek, de irányuk változó. Kiemelhető azonban, hogy nagyobb számú kezelés (5-6) hatására az endoterm reakciók száma egyre csökken. Ez alapján itt is felvethető a funkciókárosodás, ami elsősorban a vér oxigén szállítási kapacitását érintheti, ez azonban az eredmények alapján kevésbé megalapozott. Igazolására a humán klinikai gyakorlatban hosszabb távú ciklofoszfamid kezelést kapó betegek ez irányú célzott vizsgálata javasolható.

Általánosságban megállapítható és az eredményeink alapján alátámasztható a ciklofoszfamid indukálta károsodások dózis dependenciája, mely azonban az érintett szöveti típustól függően változó mértékű és hatású. A vérplazma alkotóelemein és a szívizom markáns eltérések bizonyítottak, így várhatóan ehhez kapcsolódóan várhatóak a legkomolyabb funkcionális eltérések is. A perifériás idegen és izmon is egyértelmű a károsító hatás, de itt elsősorban hosszabb távon válik szignifikánssá. A vörösvértetek szintén tapasztalhatóak jól detektálható eltérések, de az eredmények kevésbé kongruensek, így azok funkcióbeli manifesztálódása bizonytalan, de feltételezhető.

Az értekezés összefoglalása

Munkánkat egy konkrét napi igazságügyi probléma megoldása inspirálta, mely során kísérletes körülmények között sikerült megalapozott választ adni egy jogi és orvosi konzekvenciával járó kérdésre a kemoterápiás kezelést követően.

Figyelembe véve a rosszindulatú daganatos megbetegedések emelkedő tendenciáját a kemoterápiás kezelések okozta mellékhatások egyre markánsabb előfordulása várható. A gyógyszer szintek direkt meghatározása a napi rutinban körülményes és sokszor nehézségekbe ütközik. A beadott dózisokból csak durva következtetéseket lehet levonni egy-egy adott betegnél, mivel a farmakokinetika több okból kifolyólag egyéni variációkat mutathat. Fontos kiemelni, hogy a kemoterápiás szerek többségénél a terápiás és toxikus szint igen közel esik egymáshoz, vagy akár fedhetik is egymást. A DSC vizsgálat segítségével azonban lehetőség nyílt az indirekt hatások kimutatására.

Saját klinikai munkásságomban, az intervenciós onko-radiológiában a szelektív transzarteriális citosztatikus kezelések és kemoembolizációk során, valamint azokat követően fontos szerepet játszhatna, ha relatíve egyszerűen meghatározható vagy megbecsülhető lenne a kemoterápiás gyógyszer szintje, és ebből kifolyólag az adott szelektívnek szánt beavatkozás szisztémás hatása. Az adatok ismeretében következtetést lehetne levonni a terápia várható hatásának, a beavatkozás sikerességének és a kezelés folytatásának megítélésében. Ugyanilyen lényeges az esetleges mellékhatások, a toxikus következmények előrejelzése, mely szintén befolyásolja a beteg további sorsát és kezelését. Eredményeink alapján a vér DSC-vel történő vizsgálatával minderre lehetőség nyílt.

A kutatásunkhoz kiválasztott kemoterápiás szer – ciklofoszfamid – alkalmazása esetén jól detektálható dózis dependens eltéréseket sikerült kimutatni mind az ideg-izom komplex, mind a szívizom esetében és a vér alkotóelemeinél is. Eredményeinket szinkron értékelve kiolvasható, hogy milyen dózis esetén alakulnak ki olyan mértékű eltérések a vér alkotóelemein, melyek már nagy valószínűséggel a szívizmon vagy a perifériás idegeken és a harántcsíktolt izmokon létrejövő károsodásokat jelezheti.

Célkitűzéseink teljesülése, az értekezés elért új eredményei

Vizsgálatainkkal megalapozottan megerősítésre került, hogy a ciklofoszfamid hosszú távú alkalmazása során számítani kell perifériás neuropátia és motilitási diszfunkció létrejöttére az ideg-izom komplexen, melynek hátterében strukturális módosulások állnak.

Egyértelmű szerkezeti változások jönnek létre a szívizomzatban, melyek többek között a pumpa-funkció romlása által nagy valószínűséggel szerepet játszik a ciklofoszfamid kezelések szövődményeként ismert kardiomiopátia kialakulásában.

A vér alakos elemein, vörösvértesteken és vérplazmán DSC segítségével szintén jól kimutatható változások alakulnak ki. A termogramok eltérése jól jellemezhetően dózis dependenciát mutat, így indirekt információt nyújt az aktuális és kumulatív gyógyszer-szintről a keringésben. Emellett a bizonyított szerkezeti átalakulások mértéke feltehetően korrelál a funkcionális módosulásokkal, diszfunkciókkal, de az ez irányú pontosabb megállapításokhoz további vizsgálatok, humán alkalmazás során történő mérések szükségesek.

A DSC-vel detektálható eltérések prediktív értékűek a dózis dependens mellékhatások, szövődmények megítélésben.

Mindezek alapján a megfelelő humán standardizációkat követően a DSC alkalmaznak tartható a napi klinikai kezelések során a betegek szoros követésében, a mellékhatások megelőzésében, mérséklésében.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani munkahelyi vezetőimnek, Dr. Bogner Péter professzor úrnak, a Radiológiai Klinika igazgatójának és Dr. Battyáni István tanár úrnak, az Intervenciós Radiológia tanszékvezetőjének a tudományos értekezés megírására való ösztönzésükért, segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Nyitrai Miklós egyetemi tanár úrnak, a doktori program vezetőjének, hogy befogadott, a kutatáshoz lehetőséget adott és munkámban támogatott.

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Lőrinczy Dénes professzor úrnak, odaadó lelkesedéséért, fáradhatatlan biztatásáért kutatásunk során. A kalorimetriás mérések kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítsége nélkül vizsgálatunk nem tudott volna megvalósulni. Önzetlensége örök példa marad számomra.

Köszönöm Dr. Barthó Lóránd professzor úrnak az állatkísérletekhez nyújtott tevéleges támogatását, és külön köszönet illeti Dr. Könczöl Franciska egyetemi docenst, az állatkísérletek kivitelezésében és a preparatív munka végzésében nyújtott pótolhatatlan segítségéért.

Hálás köszönettel tartozom családomnak, feleségemnek és gyermekeinknek türelmükért és megértésükért. Támogatásukkal, biztatásukkal elengedhetetlenül hozzájárultak munkám elkészültéhez.

Az értekezés tárgykörébe tartozó közlemények

Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the peripheral nerve and muscle damage in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2016. 126: 47-53.

IF: 1,953

Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the left ventricle damage in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2017. 127: 1181–1185.

IF: 1,953

Farkas P, Könczöl F, Lőrinczy D: Examination of the blood plasma and red blood cells in cyclophosphamide monotherapy with DSC in animal models. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2017. 127:1239–1243

IF: 1,953

Farkas P, Lőrinczy D: New possibilities of application of differential scanning calorimetry - new clinical diagnostic methods on the horizon? Temperature. 2017. 4(2): 1-3.

Összesített impakt faktor: 5,859

Értekezés tárgykörébe tartozó előadások:

Farkas P, Könczöl F, **Lőrinczy D:**

Examination of the cyclophosphamide induced polyneuropathy on guinea pig sciatic nerve, gastrocnemius and heart muscle as well as in blood samples with DSC.

Symposium lecture at 12th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis and 5th Czech – Hungarian – Polish – Slovakian Thermoanalytical Conference Zakopane, Lengyelország, 2015.

Farkas P, Könczöl F, **Lőrinczy D:**

New Possibilities of application of DSC as a new clinical diagnostic method.

Invited lecture at 1st Journal of Thermal Analysis and Calorimetry Conference and 6th V4 (Joint Czech-Hungarian-Polish-Slovakian) Thermoanalytical Conference Budapest, 2017.