

(Szakmai) Beszámoló

A gyermekkori rosszindulatú daganatos betegségek közül leggyakoribbak az agydaganatok, s ezek közül is a medulloblastoma. A medulloblastoma (MB) hazai és nemzetközi gyógyulási eredményei nem javultak oly mértékben, mint leukaemiában. A MB terápiájában a műtét után oly fontos radioterápia súlyos mellékhatásai miatt 3 éves kor alatt nem alkalmazható. Különösen az elsődleges daganatkiirtás utáni recidiva jelent nagy problémát; csupán a recidiva időben való felismerése és egy eredményes második műtét és kemoterápia mentheti meg a beteg életét. A relapsus korai felismerés és a műtét utáni kemoterápia alapvető feltétele az eredményes kezelésnek. Döntő fontosságú tehát a gyógyszeres terápia. Ennek eredményességében az utolsó két évtizedben alig történt előre haladás, s a jelenlegi terápiás modalitás is jelentős mellékhatásokkal jár. A molekuláris terápiától várható kedvezőbb hatás és kevesebb mellékhatás. A génterápia jelenleg még nem jöhet szóba, s a signal transductios utak gátlása sem járt az agytumorkon vonatkozásában eredménnyel.

Egyes gyermekkori tumorok, köztük a medulloblastoma sejtjein fokozott mértékben mutathatók ki somatostatin receptorok. A somatostatin receptorok feltehetően a fejlődő agy stratum granulosum externájából alakulnak ki, melyből egyes vélemények szerint a medulloblastoma precursor sejtjei is származnak. A somatostatin receptornak öt altípusa ismert: SSTR 1-5. Az SSTR-2 a foszfoprotein-foszfatok rendszeren keresztül a növekedési faktorok (EGF és IGF-1) sejtre kifejtett mitogen hatását gyengíti. A somatostatin és analógjai a hypophysis növekedési hormon termelését is gátolják, s amely a növekedési hormon, az IGF-1 tengelyen keresztül gátolja a sejtproliferációt. A somatostatin félideje nagyon rövid ahhoz, hogy akár a diagnosztikában, akár a terápiában alkalmazható legyen. Az 1982-ben kifejlesztett analóg, az octreotid tartalmazza azt az aminosavszekvenciát, mely az élő szervezetben előforduló biológiai hatásért felelős, jelentősen hosszabb viszont felezési ideje, s nagyobb a növekedési hormonra kifejtett gátló hatása. Az octreotidnak a SSTR-2-re van kifejezett hatása.

Célkitűzés

Vizsgálatainkban a következő kérdésekre vártunk választ:

1. a sebészileg eltávolított medulloblastoma sejtek somatostatin receptor pozitivitása kapcsolatba hozható-e a citosztatikumokkal szembeni válaszreakciókkal, azaz van-e prognosztikai jelentősége?
2. medulloblastoma recidivában módosul-e a somatostatin receptor expressziója?
3. szövettényészetben növekvő medulloblastoma sejtvonalban kimutatható-e a medulloblastoma terápiájában használatos citosztatikumok és az octreotid között szinergizmus, azaz jelenthet-e az octreotid és a citosztatikumok kombinált alkalmazása új megközelítést e daganatok terápiájában?
4. human medulloblastomából kialakított xenograft tumor modellen mennyiben képes az octreotid a tumor növekedését gátolni?
5. elősegíti-e az octreotid scintigráfia a medulloblastoma, ill. műtét utáni recidivájának korai diagnózisát?
6. Célunk volt továbbá: az octreotid liquor farmakokinetikájának vizsgálata.
7. Medulloblastomás megbetegedésekben új komplex kezelés és az egységes nyomonkövetés kidolgozása.

A fenti célok közül octreotid liquor farmakokinetikát nem tudtuk vizsgálni, mivel orvostikai feltételei miatt a kutatási időszak alatt csak egy olyan betegünk volt, aki octreotid terápiában részesült és shuntján keresztül a megfelelő időpontban liquor volt nyerhető.

Elvégzett vizsgálatok és eredmények

1. A kutatási időszakban és azt megelőzően sebészileg eltávolított és immunhisztokémiailag megvizsgált 24 esetben a medulloblastoma sejteiben az SSTR2 receptor minden esetben kimutatható volt. Így összefüggés a receptor kimutathatósága és a terápiás válasz között nincs.

2. 1997 és 2007 között primeren és recidívában is az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben műtött 10 beteg esetében mind a primer tumorban, mind a recidívában a SSTR2 receptor kimutatható volt, tehát receptor-statusz módosulás recidívában betegeinknél nem volt megfigyelhető.

3. Szövettenyészetben végzett vizsgálatainkat Daoy sejt kulturán végeztük. A szövettenyészetben végzett vizsgálatokkal arra kerestük a választ, hogy a SSTR2 pozitív medulloblastoma sejteken érdemes-e a kemoterápiás kezelést kiegészíteni SSTR agonista (octreotide) kezeléssel, melyről bizonyították, hogy antiproliferatív és proapoptotikus hatása is van. Az általunk használt Daoy medulloblastoma sejtek expresszáltak SSTR2 receptort, mind immunhisztokémiai, mind SCID egér xenografton végzett in vivo Octreoscan vizsgálat alapján. A kezelésnél 3 féle cytosztatikum (vincristin, etoposid, cisplatin) és az octreotide dózis-hatás görbét állítottuk fel 72 órás kezelés során MTT assay-el vizsgálva. A vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy mindhárom cytosztatikus szer önmagában jelentős antiproliferatív hatással bír medulloblastomában. A SSTR agonista octreotide esetében is észlelhető volt antiproliferatív hatás, mely azonban csak szuperfiziológiás dózisban volt kimutatható (>40uM). Az octreotide e dózisban történő szisztémás adagolására, toleranciájára vonatkozó irodalmi adat nincsen. Azt nem tudtuk bizonyítani, hogy ez a hatás toxikus, vagy pedig valódi receptor mediálta hatás, mivel nem állt rendelkezésünkre SSTR negatív sejt vonal. Többféle SSTR pozitív sejt vonalon is elvégeztük az octreotide kezelést: Ewing- sarcoma SK-ES-1, colon tumor HT-29, pancreas tumor Panc-1, azonban minden kísérletben azonos lefutású dózis-hatás görbe alakult ki, mely csak indirekt bizonyítéka a SSTR receptor mediálta hatásnak. A mitózis és az apoptózis vizsgálata kimutatta, hogy az octreotide nagy dózisú kezelésnél sem eredményezett apoptózist, azonban >40uM-os dózisonál a mitózis teljes és folyamatos gátlása volt megfigyelhető. A kombinált adagoláshoz az octreotide legkisebb hatékony dózisát alkalmaztuk (2,5uM). A cytosztatikumok kombinálása octreotiddal nem eredményezett szinergista hatást, sőt a vincristin hatását az octreotide részlegesen gátolta, mint az a vincristinnek a sejtoszlást metaphasisban gátló hatása alapján várható volt. Összességében megállapíthattuk, hogy a nagy dózisú SSTR agonista kezelés hatékony a medulloblastoma esetében, mely hatás a sejtosztódás gátlásának eredménye, s nem a megnövekedett sejtpusztulásé. A cytosztatikumok hatását octreotiddal történő kombinálása a kezelést nem teszi hatékonyabbá. Ennek alapján felmerül, hogy az octreotidot elsősorban a cytosztatikus kezelés befejezése után, hosszútávú fenntartó kezelés formájában lenne érdemes alkalmazni. A szükséges nagy koncentrációt esetleges közvetlen intrathecalis kezeléssel lehetne megvalósítható, ehhez azonban további vizsgálatok szükségesek.

4. Xenograftot 10^6 Daoy sejtnek SCID egerek mindkét oldalára aether anaesthesiában történt transplantációjával hoztunk létre. A tumor a beültetés utáni 23. napon ért el tapintható nagyságot. Scintigraphiás vizsgálatát 2,5 mg ^{99m}Tc izotóppal jelzett octreotidnak (hydrazinonicotinamid-Tyr³-octreotide) az egerek farokvénájába való injectálása után 1- és 20 órával végeztük Mediso X-Ring gamma camera-val. Vizsgálataink során 10 napon keresztül 5 egér alacsony (2µg/kg) és 5 egér magas dózisú (100 µg/kg) octreotide kezelésben részesült, s 5 állat szolgált kontrollként. A tumor nagyságát a 0., 4., 7., 11., 14., 18. és 21. napon caliper-el a tumor legnagyobb átmérőjében, s arra merőlegesen határoztuk meg. Ebből számítottuk ki képlet alapján a tumor tömegét, melyet a 0. napon mért tumorvolumennel hasonlítottuk össze.

Az alacsonyabb dózissal kezelt állatokban az octreotide nem befolyásolta a xenograft növekedését, magasabb dózisú octreotide kezelés után azonban a tumor-növekedés átmeneti

gátlása volt észlelhető. Toxicus mellékhatást az octreotid magas dosisával kezelt állatokban sem láttunk. Megfigyeléseinkből arra következtettünk, hogy egéren az octreotid csak a human terápiában használatosnál lényegesen magasabb koncentrációban gátolja a medulloblastomás sejtek növekedését, s ez a gátló hatás a szer adagolásának befejezése után egy héttel már nem érvényesül. Kísérleteink alapján tehát tumornövekedést gátló hatás csak tartósan és nagy adagban adott octreotidtól várható. További kísérleteknek kell tisztázni, hogy a jelenleginél hosszabb ideig adott octreotidnak lehetnek-e mellékhatásai.

5. A somatostatin receptor scintigráfias vizsgálatát 45, agydaganatban szenvedő gyermekben (0-18 év) tanulmányoztuk. A 45 gyermekből 21 esetben (46,7%) volt a szövettani diagnózis MBL. A többi 24 gyermek közül 8 betegnek volt ependymómája (17,8%), 6-nak astrocytomája (13,3%), 4-nek glioblastomája (8,9%), 3-nak primitív neuroectodermális tumora (PNET) (6,7%). Három gyermeknek (6,7%) egyéb szövettani diagnózisa volt (corpus pineale tumor, anaplasticus ganglioma, agytörzsi glioma). A vizsgálatoknál radiofarmakonként ¹¹¹In-DTPA-D-Phel-octreotide-ot (Octreoscan; Mallinckrodt Medical, Petten, Hollandia) alkalmaztunk. A beadást követő napon SPECT vizsgálatot végeztünk a koponyáról, amit minden esetben planaris felvételekkel egészítettünk ki. Összesen 56 szcintigráfias vizsgálat készült Octreoscan alkalmazásával (SPECT és planaris felvételek). A vizsgálatokat később hagyományos agyi szcintigráfias, Tc99m-jelölt glükohexonát adásával egészítettük ki. A Tc99m-mel jelölt vegyület iv. beadása után egy órával SPECT és planaris felvételeket készítettünk. Ezt követően adtuk be az Octreoscan, amelynek eredményét a következő napon olvastuk le, ismételt SPECT és planaris felvételek segítségével. A betegeknél a daganat első in vivo Octreoscan vizsgálatára a műtéti terápiát követően került sor (38 vizsgálat), az esetleges reziduális tumorszövet kimutatása céljából. Egy gyermeknél lehetőségünk volt a klinikai diagnózis felállításakor, az első műtéti beavatkozás előtt elvégezni az Octreoscan-vizsgálatot (primer daganat in vivo SSTR-státusának felmérése). A műtéti-, sugár- ill. kemoterápiás kezelés utáni vizsgálati periódus alatt recidiváló betegeknél a recidiváló daganat aktivitását is mértük (összesen 17 vizsgálat). Négy gyermeket (8,9%) vizsgálatunk három alkalommal: kezelés előtt (1x) és után (2x). Két gyermeket (4,4%) kétszer. Az MRI vizsgálatokra a műtét előtt, a műtétet és a sugárterápiát követően 6 héttel, illetve a kemoterápia befejezését követően, majd 6 havonta, illetve recidiva gyanúja esetén került sor. A különböző MRI-centrumokban készült felvételeket egy független onko-radiológiai team – a vizsgálati lelet ismerete nélkül – újra lelelte. Az 56 Octreoscan-vizsgálat közül 27 vizsgálatnál (48,2%) találtunk egyértelműen kóros aktivitásfelvételt: 1 primer tumorban (3,7%), 15 műtét és sugárkezelés utáni reziduumban (55,5%) és 11 recidiváló daganatban (40,7%). 29 Octreoscan-vizsgálatot ítéltünk negatívnak (51,8%). A 27 pozitív Octreoscan-vizsgálatból 16 (59,2%) medulloblastoma, 4 (14,8%) ependymoma, 4 (14,8%) astrocytoma, illetve 3 (11,1%) glioblastoma diagnózissal küldött gyermek volt. A műtét előtti markáns Octreoscan-felvétel a második posztoperatív vizsgálat felvételein eltűnt. A harmadik vizsgálatot 3 év elteltével végeztük, a felvételeken a recidiváló intracerebrális és az extracranialis tumoros elváltozásokban ismét igen magas Octreoscan-felvételt regisztráltunk. Három gyermekben a műtét és irradiatio után vitális residuum jelenlétére utaló Octreoscan-halmozást detektáltunk. 2 esetben ez a következő kontroll vizsgálatnál az effektív kezelés következtében negatívvá vált. Sajnos azonban mindkét gyermek harmadik kontroll vizsgálata recidiva jelenlétére utalt, más lokalizációban, mint a primer elváltozás. 17 vizsgálatot recidiváló tumor esetében végeztünk. Kóros aktivitásfelvételt 13 alkalommal találtunk. A kóros folyamat rendszerint nagy kiterjedésű, disszeminált volt. A 45 agytumoros gyermeknél végzett 56 (100%) Octreoscan-vizsgálatból 37 esetben (66,1%) a szcintigram és az elvégzett MRI-vizsgálatok eredményei megegyeztek, 19 vizsgálati eredménynél (33,9%) azonban a két vizsgáló eljárás eltérő eredményt mutatott. Nem vizsgálati számra, hanem a betegekre vetítve ez azt jelenti, hogy a betegek 71,1%-ánál az MRI- és az Octreoscan-vizsgálatok eredményei megegyeztek. Ugyanakkor a betegek 35,6%-ánál a két képalkotó eljárás eredménye eltért egymástól. Négy betegnél (hat

vizsgálat) negatív MRI-lelet mellett pozitív Octreoscan-szcintigram készült, ill. 12 betegnél (13 vizsgálat) ellentétes eredményt kaptunk. Az octreoscan vizsgálatnak azért tulajdonítottunk jelentőséget, mivel ez specifikusan képes az első tumorszövet kimutatására, míg a PET, illetve PET CT gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban is pozitív. PET-vizsgálatra alkalmas szomatostatin-analóg a Ga68-DOTA-octreotide, melynek felbontóképesége szignifikánsan jobb, mint az Octreoscan-vizsgálaté, azonban alkalmazását korlátozza a vizsgálat magas költsége. Érdekes, hogy a több, mint 40 éve alkalmazott hagyományos agyszcintigráfias vizsgálatot is alkalmasnak találták a MBL-reziduum kimutatására. Az MRI-vizsgálat szerepe is vitathatatlan a reziduális tumorszövet kimutatásában, még akkor is, ha az életképességéről kevés felvilágosítást nyújt. A negatív Octreoscan-vizsgálatok ugyanis azt igazolják, hogy az MRI-vizsgálat felbontó képessége nagyobb, mint az Octreoscan-szcintigráfiáé. Természetesen a negatív Octreoscan-felvétel csak akkor értékelhető terápiás hatásként, ha a daganat előző vizsgálata octreotid-pozitív volt. Az Octreoscan azonban vizsgálataink alapján olyan esetben is kimutathat tumorszövetet, amikor az MRI vizsgálattal nem volt lehetséges. A receptor-specifikus vizsgálat nemcsak a diagnosztikában előny, hanem felhasználási lehetőséget jelenthet a terápiában is: specifikusan a daganatsejtekhez kötődő izotópokkal sugárkezelés végezhető, vagy citosztatikumoknak a daganatos sejtekhez való kötődésével a környező egészséges sejtek a terápia károsító hatásától megkímélhetők.

Eredményeinket összegezve megállapítható, hogy a medulloblastoma esetében az Octreoscan vizsgálat nem specifikus e tumorfelelésekre és csak kevés esetben mutat ki tumort MRI negativitás esetében. Ugyanakkor felbontóképesége kisebb az MRI-nél. Így a jövőben alkalmazása csak az MRI vizsgálat kiegészítéseként, illetve csak terápiás szempontból jöhet szóba sugárzó izotóppal vagy citosztatikummal összekapcsolva.

6. Új kezelési protokoll és követés kidolgozása (adatlap; eddigi kiértékelés)

A kezelési eredmények és mellékhatások jobb követhetősége céljából új követési adatlapot dolgoztunk ki. Korábbi kezelési sémánk a nemzetközi és magyarországi kezelési protokollok eredményein alapult. A kezelés a minél teljesebb sebészi eltávolításból, a korai sugárkezelésből és a 62 hétig tartó különböző citosztatikus szerek kombinációjából álló kemoterápiás kezeléssel állt.

A sebészi beavatkozás a nemzetközi eredményekkel összehasonlítva sikeres volt betegeink között. A nagyszámú teljes tumoreltávolítás, a shuntbeültetések illetve a sebészi beavatkozások neurológiai maradványtüneteinek alacsony száma megfelel a nemzetközileg elvártnak.

Az irodalmi adatok alapján a sugárkezelés a sebészi beavatkozás után a leghatékonyabb része a kezelési protokollnak. A betegség kiterjedésének függvényében kétféle dózist alkalmaztak. Az irradiáció optimális idejéről és a sugárkezelés előtti kemoterápia szerepéről továbbra sincs nemzetközi konszenzus. Számos klinikai vizsgálatban kísérelték meg az irradiációs dózis csökkentését, a sugárkezelés okozta, késői mellékhatások csökkentése érdekében, azonban nem vált be, mivel korai relapszus alakult ki. A kemoterápiás dózis emelésével párhuzamosan végrehajtott irradiációs dóziscsökkentés lehetséges megoldásnak tűnik. Egyes klinikai vizsgálatok alapján a hosszú preirradiációs kemoterápia szignifikánsan rontja a túlélést, mivel jelentősen késlelteti az irradiáció kezdetét.

Saját terápiás protokollunkban a posztoperatív korai besugárzást megelőzően nagy dózisu intravénás és intrathecalis methotrexat kezelést alkalmaztunk. A nemzetközi irányzatok ellenére, nem hagytuk ki a methotrexat kezelést protokollunkból feltételezhető hatásossága miatt. Betegeinknél az alkalmazott dózis és beadási időtartam mellett methotrexat okozta encephalopathiát nem észleltünk. Kezelési eredményeink, melyek a nemzetközi eredményekhez hasonlóak, azt bizonyítják, hogy a methotrexat miatt a besugárzás 4 hetes halasztása nem befolyásolja a túlélést, azonban a sugárkezelés sokkal könnyebben kivitelezhető, mivel némileg hosszabb időt biztosít a beteg általános állapotának és a műtét okozta átmeneti neurológiai tünetek javulására.

A csak hosszú idő után ismétlődő azonos blokkok azt célozzák, hogy elkerüljük ugyanazon szer hosszabb adását, mely a gyógyszerrezisztencia kialakulásához vezethet. A 62 hetes kezelés jól tolerálható volt a betegek számára és a tumorvisszatérés hosszú távon is gátolható volt.

Az életminőség csökkenés elsősorban a sebészi beavatkozás következményeként alakult ki. A sebészi beavatkozást követő első félévben gyors javulást észleltünk. A betegek kevesebb, mint 15%-a fejezte be a kezelést <60-as Lansky/Karnofsky értékkel.

A betegek túlélését szignifikánsan befolyásolta a betegek életkora (3 év alatt nem alkalmazható sugárkezelés) és a tumor eltávolítás mértéke, mely bizonyítja a sebészi kezelés, és a sugárkezelés hatékonyságát. Feltehetően a primeren kimutatható metasztázisok is szignifikánsan csökkentik a túlélést, azonban a metasztázissal bíró betegek alacsony száma betegeink esetében nem tett lehetővé statisztikai vizsgálatot.

A magas rizikó csoportú betegeknél a betegség már az első évben visszatér vagy progrediál, míg az alacsony rizikójú csoportban a betegség esetleges visszatérése csak a kezelés befejezése után várható.

Az alacsony rizikó csoportban kezelési eredményeink (74%) megegyeznek a nemzetközileg tapasztaltakkal (65-80%), mely azt jelzi, hogy a hagyományos kemoterápiás kezeléssel jelenleg ez a maximálisan elérhető túlélés. Az alacsony rizikójú betegek eredményeinek javulása mindezek szerint a szélesebb körű molekuláris vizsgálatokon alapuló besorolással lenne elérhető, mivel annak eredményeként valószínűleg számos alacsony rizikójú beteget át kellene sorolnunk a magas rizikójú csoportba. Az össztúlélés (jó és rossz prognózisú esetek együttvéve) kedvezőtlen eredményét (44,1%) a magas rizikójú betegek nagy aránya (közel 50%) okozza.

Az 1998-as protokoll eredményei alapján a betegeket rizikócsoportok szerinti szétválasztottuk. Ennek megfelelően a magas rizikójú betegeket (nem teljes tumoreltávolítás, primeren metasztatikus betegség, 3 év alatti életkor, kedvezőtlen szövetten: PNET, anaplasticus medulloblastoma) az alacsony rizikójú (a fenti tényezők egyike sincs jelen) betegektől eltérően kezeljük.

A nem kielégítő túlélési eredmények alapján, a kezelést a különböző rizikócsoportokban eltérő mértékben intenzifikáltuk. Az alacsony rizikójú betegek kezelését három fő szempont alapján módosítottuk. Egyrészt, a korábbi kezelés hematológiai mellékhatások szempontjából jól tolerálható volt, tehát ezek intenzifikálása lehetséges. Másrészt, a sugárkezelés alatt az éppen nem sugarazott területeken esetlegesen elhelyezkedő tumorrészek tartósan semmilyen daganatgátló kezelést nem kaptak. Harmadrészt, leukémiás betegek kezelésénél további javulást eredményezett, amikor a komplett csontvelői és perifériás remissziót eredményező intenzív kezelés után hosszabb időn át kis dózisu fenntartó kezelést alkalmaztak.

A protokollt ezen szempontok alapján a következőképpen módosítottuk: az egyes korábbi blokkok közül kettőt kiegészítettünk 4 napos iv etoposide (100mg/m²/nap) kezeléssel, míg a harmadik blokkba a VCR és a carmustin mellé beépítettük a cisplatint 2 napos kezelés formájában (40mg/m²/nap); a sugárkezeléssel párhuzamosan hetente 1,5 mg/m² VCR adását kezdtük meg, mellyel a daganatok növekedése gátolható, azonban a csontvelői mellékhatások elhanyagolhatóak; az egyéves intenzív kezelés befejezése után 4 fenntartó blokkot adunk 8 hetes szünetekkel (VCR 1,5 mg/m², cisplatin 2x40 mg/m², etoposide 4x100 mg/m²), mely a csontvelőt csak mérsékelten károsítja.

A magas rizikójú betegek kezelésénél a korai recidivák (2 éven belül) és a várható, végső rossz kimenetel miatt szintén a kezelés intenzifikálása mellett döntöttünk. Az intenzifikálás alappillérei részben hasonlóak az alacsony rizikójú betegeknél bevezetett változtatásokhoz: egyes blokkok kiegészítése és a sugárkezelés (csak 3 év feletti életkorban) alatti párhuzamos kemoterápiás kezelés. Másrészt az intenzív kezelés befejezéseként megkezdjük az ún. nagy dózisu kemoterápiás kezelés alkalmazását autológ csontvelő átültetéssel, melyhez a szükséges csontvelői őssejteket a kezelés korai fázisában szeparáljuk.

A megkezdett kezelések eredményei biztatóak, a túlélés javult a korábbiakhoz képest. Az alacsony rizikócsoporthoz sorolt betegek közül ezidő alatt jelen kezelésünkkel egyetlen beteget sem veszítettünk el, míg korábban ez az adat 5%-kal rosszabb volt. A magas rizikó csoportba sorolt betegeknél a progressziómentes túlélése 10%-kal javult 32 vs 22%, azonban az ösztülésben lényeges különbség nem volt. Hosszabb távon ebben a csoportban is javulás várható, hiszen a nagy dózisú kemoterápiás kezelés csontvelőátültetéssel körülbelül 1,5 évnél végezzük és ennek hatása még 2 éves követési időnél nem érzékelhető.

Vizsgálataink közvetlenül hozzájárultak mind az életminőség, mind a betegek túlélésének javulásához.