

Az (-)-1-(Benzofurán-2-il)-2-propilaminopentán ((-)-BPAP) hatásai tüdő adenokarcinóma modelleken

Doktori értekezés

Dr. Mervai Zsolt

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Baghy Kornélia, PhD., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Than Nándor Gábor, PhD., tudományos főmunkatárs
Dr. Patonai Attila, PhD., klinikai szakorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Müller Veronika, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Pápai Zsuzsanna, PhD., címzetes egyetemi tanár
Dr. Köles László, PhD., egyetemi docens

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
1.1	A DAGANATOS BETEGSÉGEK HÁTTERE ÉS A TÜDŐRÁK.....	8
1.2	A TÜDŐ ADENOKARCINÓMA KLASSZIKUS KEZELÉSI STRATÉGIÁJA.....	11
1.3	A TÜDŐ ADENOKARCINÓMA MUTÁCIÓS HÁTTERE.....	12
1.4	A TÜDŐ ADENOKARCINÓMA KEZELÉSE CÉLZOTT TERÁPIÁVAL.....	15
1.5	A TÜDŐ ADENOKARCINÓMA KEZELÉSE IMMUNTERÁPIÁVAL.....	17
1.6	KIMÉRA ANTIGÉN RECEPTOR (CAR) T-SEJTES TERÁPIA.....	18
1.7	GYÓGYSZEREK NEM ONKOLÓGIAI INDIKÁCIÓBAN, DE BIZONYÍTOTT ANTITUMOR HATÁSSAL.....	20
1.8	A (-)-DEPRENIL (DEP) ÉS A BPAP HATÁSAI.....	21
2	CÉLKITŰZÉSEK.....	24
3	MÓDSZEREK.....	25
3.1	EGÉR MODELLEK.....	25
3.1.1	<i>FBV/N egértörzs kezelése DEN-nal és tüdő tumor vonal létrehozása.....</i>	<i>25</i>
3.1.2	<i>BPAP hatásának vizsgálata a tüdő tumor vonalon FVB/N egértörzsben.....</i>	<i>25</i>
3.1.3	<i>A BPAP hatásának vizsgálata a tüdő tumor vonalon súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egértörzsben.....</i>	<i>26</i>
3.2	HUMÁN MODELL.....	26
3.2.1	<i>Szövettenyészet.....</i>	<i>26</i>
3.2.2	<i>A BPAP hatása SCID egértörzsben a szubkután xenograft H358 humán tüdő adenokarcinómára.....</i>	<i>27</i>
3.2.3	<i>Sejtproliferációs vizsgálat.....</i>	<i>27</i>
3.3	IMMUNHISZTOKÉMIA.....	29
3.4	POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR) ÉS SZEKVENÁLÁS.....	30
3.4.1	<i>DNS izolálás fagyasztott és paraffinos mintákból.....</i>	<i>30</i>
3.4.2	<i>PCR a fagyasztott és paraffinos minták DNS mintáiból.....</i>	<i>31</i>
3.4.3	<i>Szekvenálás és elektroforézis.....</i>	<i>32</i>
3.5	WESTERN BLOT.....	32
3.6	RECEPTOR FOSZFO-TIROZIN KINÁZ (P-RTK) ARRAY.....	35
3.7	STATISZTIKAI ANALÍZIS.....	36

4	EREDMÉNYEK.....	38
4.1	A DAGANATOK JELLEMZÉSE	38
4.1.1	<i>A DEN tüdő adenokarcinóma indukáló képessége</i>	38
4.1.2	<i>A spontán kialakult, a DEN indukálta és a szubkután allograft tüdőtumrok szövettani és immunhisztokémiai jellemzése</i>	39
4.1.3	<i>A tumorok mutációanalízise</i>	41
4.1.4	<i>A primer és a szubkután allograft tüdőtumor és az ép tüdőszövet jelátviteli útvonalainak összehasonlítása Western blot analízissel.....</i>	42
4.2	A BPAP HATÁSAI.....	46
4.2.1	<i>A BPAP hatása az egér szubkután allograft tüdőtumorra FVB/N törzsben</i>	46
4.2.2	<i>A BPAP hatása az egér tüdőtumorra SCID törzsben.....</i>	50
4.2.3	<i>A BPAP hatásának vizsgálata a szubkután tüdőtumor jelátviteli útvonalaira Western blot analízissel.....</i>	51
4.2.4	<i>A BPAP hatásainak vizsgálata receptor foszfo-tirozin kináz (p-RTK) array segítségével.....</i>	55
4.2.5	<i>A BPAP hatásának vizsgálata szövettenyészeten</i>	57
4.2.6	<i>A BPAP hatása a H358 humán tüdő adenokarcinóma xenograft modellben SCID egértörzsben</i>	57
4.2.7	<i>A BPAP hatásának vizsgálata a H358 humán tüdő adenokarcinóma szubkután xenograft modell jelátviteli folyamataira Western blot-tal.....</i>	59
5	MEGBESZÉLÉS.....	61
5.1	AZ FVB/N EGÉRTÖRZS TÜDŐ ADENOKARCINÓMA MODELLJÉNEK KARAKTERIZÁLÁSA.....	61
5.2	A BPAP HATÁSAI AZ EGÉR TÜDŐ ADENOKARCINÓMA MODELLRE FVB/N ÉS SCID TÖRZSBEN	68
5.3	A BPAP HATÁSAI A H358 HUMÁN TÜDŐ ADENOKARCINÓMA VONALRA <i>IN VITRO</i> ÉS <i>XENOGRAFT MODELLBEN</i>	75
5.4	A BPAP POTENCIÁLIS HATÁSMECHANIZMUSA	77
6	KÖVETKEZTETÉSEK	79
7	ÖSSZEFOGLALÁS	80
8	SUMMARY.....	81
9	IRODALOMJEGYZÉK.....	82

10	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	97
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	99

Rövidítések jegyzéke

ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i> , anaplasztikus limfóma kináz
ATCC	<i>american type culture collection</i> , amerikai típusú kultúra gyűjtemény
AX1	<i>antifungal protein AX1</i> , antifungális fehérje AX1
AXL (gén)	<i>tyrosine-protein kinase receptor UFO</i> , tirozin-fehérje kináz receptor UFO
BPAP	(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane, (-)-1-(benzofurán-2-il)-2-propilaminopentán
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , marha szérum albumin
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i> , kiméra antigén receptor
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i> , ciklin-dependens kináz 4
CK7	<i>cytokeratin-7</i> , citokeratin-7
COX	<i>cyclooxygenase</i> , ciklooxygenáz
CRS	<i>cytokine release syndrome</i> , citokin felszabadulási szindróma
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> , citotoxikus T-limfocita antigén 4
CYP450	<i>cytochrome P450</i> , citokróm P450
DAB	<i>3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride</i> , 3,3-diaminobenzidin-tetrahidroklorid
DEP	<i>deprenyl</i> , deprenil
DEN	<i>diethylnitrosamine</i> , dietilnitrózamin
DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i> , dezoxiribonukleinsav
Dtk	<i>tyrosine-Protein Kinase Dtk</i> , tirozin-fehérje kináz Dtk
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , felerősített kemilumineszcencia
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermális növekedési faktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , epidermális növekedési faktor receptor
EML4	<i>echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
Eph-R	<i>erythropoietin-producing human hepatocellular receptor</i> , eritropoetin termelő emberi hepatocita receptor
ErB2	<i>erythroblastic oncogene B2</i> , eritroblaszt onkogén B2
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i> , extracelluláris szignál-regulálta kinázok

FBS	<i>foetal bovine serum</i> , bovin szérum
FISH	<i>fluorescence in situ hybridization</i> , fluoreszcens in situ hibridizáció
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> , hepatocita növekedési faktor
HGFR	<i>hepatocyte growth factor receptor</i> , hepatocita növekedési faktor receptor
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i> , tormaperoxidáz
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma</i>
MAO-B	<i>monoamine oxidase B</i> , monoamin-oxidáz B
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition factor</i> , mezenhimális-epiteliális tranzíciós faktor
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , fő hisztokompatibilitási komplex
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , rapamicin célpontja emlősben
MuSK	<i>muscle-specific kinase</i> , izom specifikus kináz
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , sejtmagi faktor – kappa-könnyű-lánc-erősítő az aktivált B sejteknek
NGF	<i>neurotrophic factor receptors</i> , neurotrofikus faktor receptor
NSAID	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drug</i> , nem szteroid gyulladáscsökkentő
NSCLS	<i>non-small cell lung cancer</i> , nem-kissejtes tüdőtumor
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , foszfát-pufferelt sóoldat
PBST	<i>phosphate-buffered saline + Tween</i> , foszfát-pufferelt sóoldat + Tween
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> , proliferáló sejtmag antigén
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polimeráz-láncreakció
PD-1	<i>programmed death-1</i> , programozott sejthalál-1
PDGF-R α	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i> , trombocita-eredetű növekedési faktor receptor alfa
PPAP	<i>1-phenyl-2-propylaminopentane</i> , 1-fenil-2-propilaminopentán
p-RTK	<i>phospho-receptor tyrosine kinase</i> , foszfo-receptor tirozin kináz
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i> , polivinil difluorid
Rb	<i>retinoblastoma</i> , retinoblasztóma
RET	<i>rearranged during transfection</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i> , súlyos kombinált immunhiányos

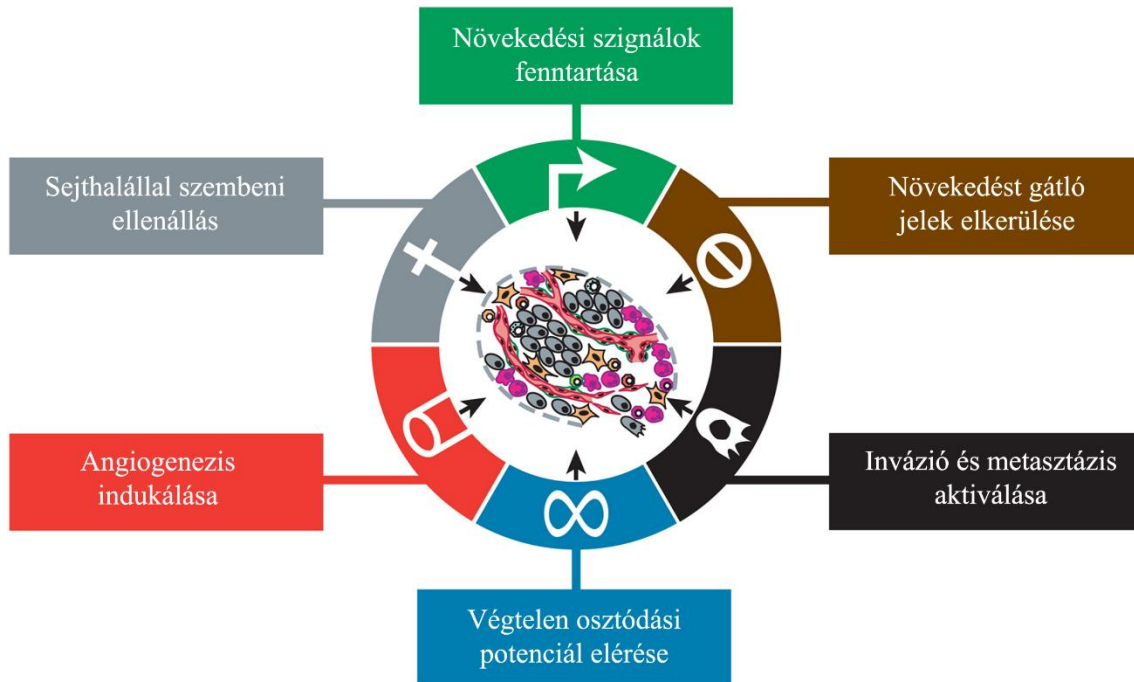
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> , kissejtes tüdő tumor
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , nátrium dodecyl szulfát
SRB	<i>sulforhodamine-B</i> , szulforodamin-B
TAA	<i>tumor associated antigen</i> , tumor asszociált antigén
TBST	<i>tris-buffered saline + Tween</i> , tris-pufferelt sóoldat + Tween
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-sejt receptor
TIE	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i> , tirozin kináz immunoglobulin és EGF szerű domainekkel
TIL	<i>tumor infiltrating lymphocyte</i> , tumor infiltráló limfocita
TKI	<i>tyrosine-kinase inhibitor</i> , tirozin-kináz inhibitor
Tris	<i>tromethamine</i> , trometamin
TTF1	<i>thyroid transcription factor-1</i> , pajzsmirigy transzkripció faktor-1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaszkuláris-endotheliális növekedési faktor

1 Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 A daganatos betegségek háttere és a tüdőrák

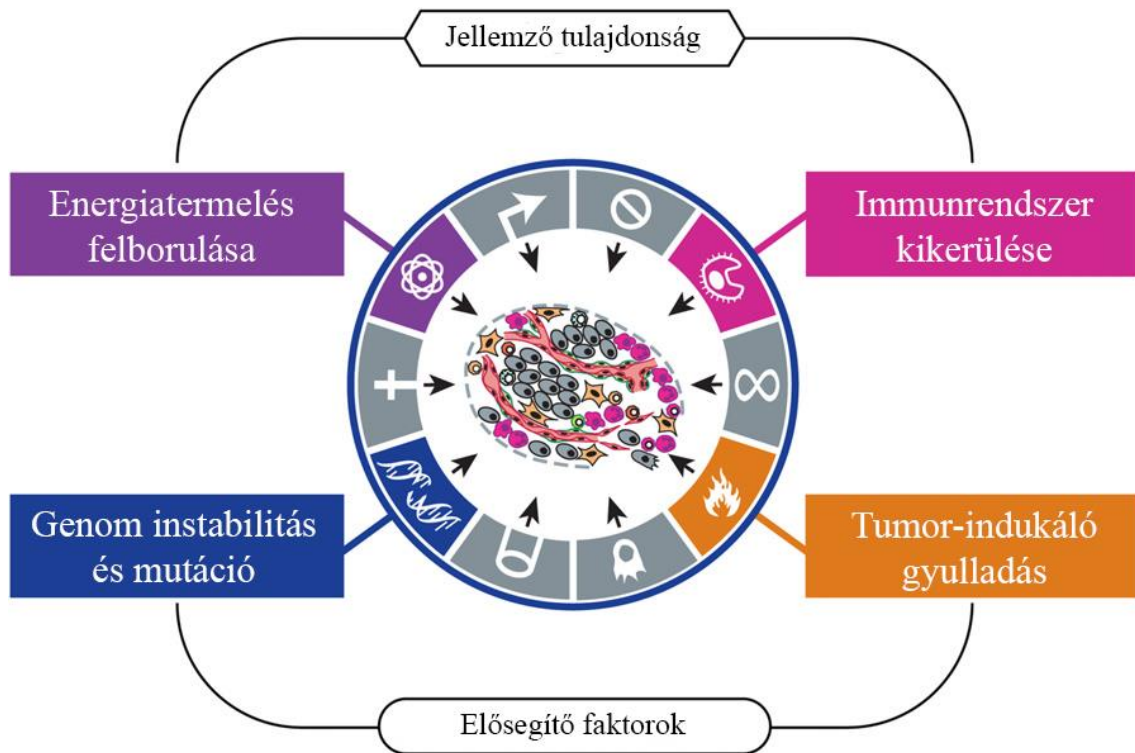
A tumoros megbetegedésekről a köztudatban gyakran egyetlen betegség képe él, pedig a rák nem egyetlen megbetegedés, hanem gyűjtőfogalomként több kórképet foglal magába. Daganat a szervezet legtöbb sejtjéből kiindulhat, de ezek eredetüknek megfelelően különböző tulajdonságokkal, genetikai hátérrel, áttétképző hajlammal rendelkeznek, és ezért eltérő kezelési stratégiát igényelnek. A gyógyszeres kezelés szempontjából lényeges, hogy a különböző tumorerő kialakulásához eltérő növekedési jelpályák kóros aktivációja vezet el, így progressziójukért különböző fehérjék túlműködése vagy épp eltűnése lehet a felelős [1]. Ezekből következően az eltérő eredetű és molekuláris mintázatú tumorerő külön betegségi típusként kezelendők annak ellenére, hogy lefolyásukat tekintve sokszor azonos képet mutatnak.

A daganat sejtjeiről tulajdonságait tekintve elmondható, hogy a normál sejtekkel ellentétben végtelen osztódási potenciállal rendelkeznek, melyet a telomeráz enzim újraaktiválásával érnek el [2]. Azáltal, hogy a folyamatban kulcsszerepet játszó génekben funkcióvesztéses mutációk jöhetnek létre, képesek a programozott sejthalál elkerülésére, kiiktatva ezzel az önmegsemmisítést, mint utolsó védekezési lehetőséget [3]. Neoangiogenezissel, vagyis az új erek létrehozásának serkentésével saját érhalózatot alakítanak ki, ami hozzásegíti őket a szükséges tápanyagokhoz és az oxigénhez, ezzel gyorsítva a növekedésüket [4]. Nem reagálnak a növekedést gátló szignálokra, mert a jelátvitel ellenőrző pontjain szereplő növekedést lassító fehérjéiket mutációval vagy delécióval elvesztették [5]. Invázió és metasztázis képző hajlamuk van, aminek segítségével képesek bejutni az érrendszerbe vagy a nyirokcsomókba és távoli szervekbe adnak áttéteket [6]. Megfelelő fehérjék aktivációjával önfenntartó növekedési faktorokat/jeleket termelnek maguk számára, ezáltal egyéb növekedési stimulus nélkül is képesek működni, máskor az adott receptorok túlzott kifejezésével válnak fokozottan érzékenyebbé a külső jelekre (1. ábra) [7].



1. ábra: A tumorsejt legfőbb tulajdonságai [7]

Ezek a megállapítások további kutatásokat és a daganatok jobb megismerését követően kiegészültek. A felsoroltakon kívül a daganatokra jellemző a sejtszintű energiatermelés szabályozásának felborulása, mivel a sejtburjánzáshoz szükséges megnövekedett energiaigényt fedezniük kell [8]. Az immunrendszer ellenőrzését olyan fehérjék expressziójával kerülnek ki, melyek gátolják az immunsejtek aktiválódását, amennyiben azok felismernék a tumorsejteket [9]. A gyulladásos folyamatok segítenek a tumor kialakulásában és növekedésében, mivel környezetükben emelkedik a növekedési faktorok mennyisége és szabadgyökök száma, így krónikus gyulladás esetén a daganatok kialakulásának az esélye jelentősen nagyobb [10]. A genom instabilitásával a sejt magas mutációs rátát alakít ki. A sorozatos mutációk létrejötte hozzájárul a daganat tulajdonságainak változásához és az esetleges terápiarezisztencia kialakulásához (2. ábra) [11].



2. ábra: A tumorsejt újabban felfedezett tulajdonságai [11]

E folyamatok jelentősége igen nagy, és feltérképezésük azért is fontos, mert napjainkban a daganatos megbetegedések száma világszerte nő [12, 13]. Nincs ez másként hazánkban sem, ahol a világban megfigyelhető tendenciához hasonlóan a halálozásokért az esetek jelentős részében a daganatos betegségek a felelősek. A különböző daganatok eloszlása nemenként eltér, de mindkét nemnél dominánsan megjelenik a tüdőrák, mely a daganatok közül a legtöbb ember halálát okozza [12, 13].

A tüdődaganatok kialakulásában az egyik legjelentősebb rizikó a dohányzás. Egyéb tényezők, mint például az étkezési szokások, genetikai fogékonyság, légszennyezettség hatásait is feltételezik, illetve ezek együttes hatása a dohányzással tovább növelheti a tüdőtumor kialakulásának kockázatát [14]. A dohányfüst egyes összetevői a szervezetben a citokróm P450 rendszer általi metabolizmus után válnak karcinogénné és kötődnek a DNS-hez. Ilyenek például az aromás szénhidrogének és a nitrózaminok [15]. A DNS-ben így keletkezett károsodások kijavításra kerülhetnek, vagy a sejtben elindulhat az apoptózis, illetve az adott hiba rögzülhet is és a mutáció tovább öröklődhet az utódsejtbe. Ezek a mutációk több fontos fehérje génjében létrejöhetnek, így

érinthehetnek onkogéneket és tumorszupresszor géneket [16]. Az előbbire példa a kirsten rat sarcoma (KRAS) vagy az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), míg az utóbbira a p53, p21^{CIP1} vagy a p16^{INK4} tumorszupresszor gének. A tumorszupresszorok közül kulcsfontosságú fehérje a p53, mely központi szabályozó szerepet játszik a sejtciklus során. Génje a daganatok több mint a felében mutációt szenved, és nincs ez másként a tüdőtumorkok esetében sem [16, 17]. A KRAS onkogén mutációja jóval gyakrabban fordul elő dohányos vagy dohányos múltú betegeknél, mint a nem dohányzóknál [18].

A tüdőtumorkokat a klasszikus felosztás szerint fenotípusuk és klinikai viselkedésük alapján sorolhatjuk a kissejtes tüdőtumorkokhoz (SCLC) és nem-kissejtes tüdőtumorkokhoz (NSCLC), melyek közül az utóbbi adja az esetek 85%-át [19]. Ezen belül az NSCLC szövettani típusait tekintve az adenokarcinóma a domináns, melyet erre az altípusra jellemző markerekkel, például citokeratin-7-tel (CK7) és tiroid transzkripciósfaktor-1-gyel (TTF1) lehet karakterizálni [20-22]. Klinikai viselkedésüket tekintve a NSCLC esetében jelentősen jobb a prognózis és a terápiás lehetőségek száma is sokkal nagyobb mértékben növekszik, mint az SCLC-nél. A World Health Organization felosztását követve a tüődaganatok feloszthatók szövettani típusaik és altípusaik alapján epitheliális tumorokra, amin belül külön csoportot képez az adenokarcinóma, a laphámsejtes karcinóma és a neuroendokrin tumorok, melyekhez a kissejtes karcinómát sorolják [23].

1.2 A tüdő adenokarcinóma klasszikus kezelési stratégiája

A daganatok terápiajában a legkritikább esetben kerül sor monoterápiás kezelésre. A korai (1-2 stádium) esetek döntő többségében a terápia szerves részét képezi a daganat műtéti eltávolítása. Inoperábilis (3-4-es stádium) esetén a sugárterápia és a kemoterápia, a kezelési megoldás, melyet különböző protokollok alapján az onkoteam dönt el. A betegek gyakran e kezelési stratégiák kombinációjában részesülhetnek [24, 25]. Ahogy említettem, a betegség korai stádiumában és az előrehaladott esetek egy bizonyos részében a műtét az azonnal választott kezelési stratégia. A beteg állapotától függően kerül eltávolításra a tumor és a környező nyirokcsomók, növelve ezzel az áttétképződés

elkerülésének esélyét. A műtét kiterjesztésének a mértékét a tumor nagysága határozza meg [26].

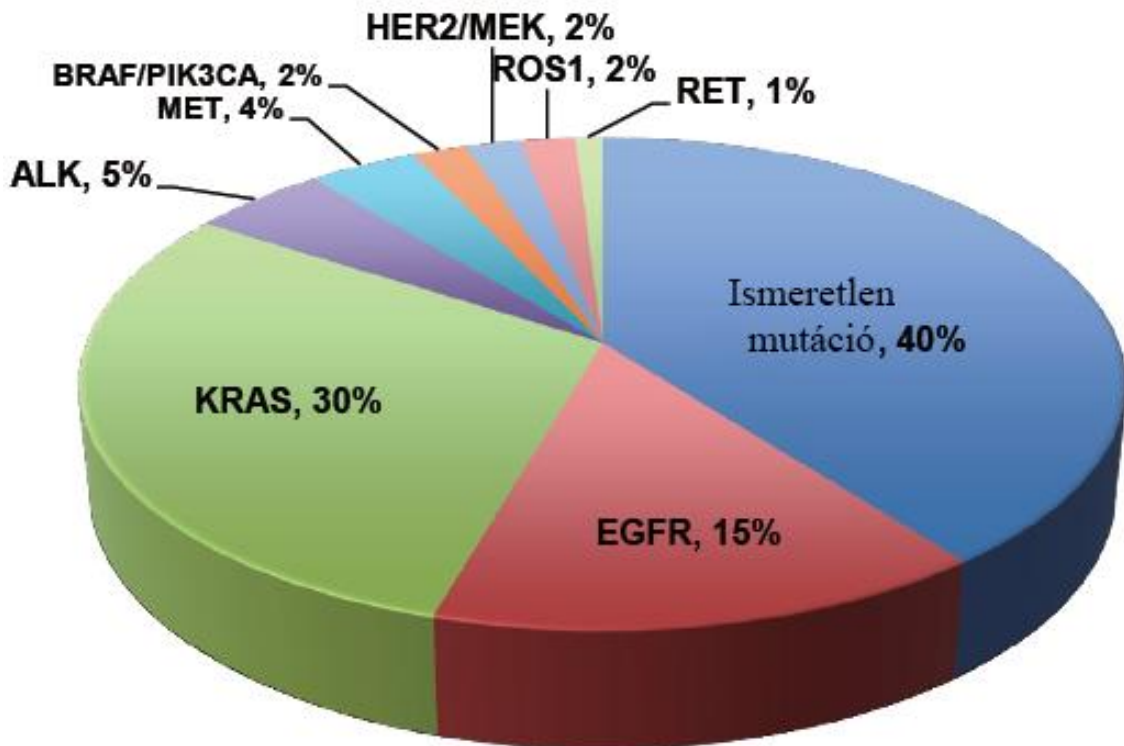
A sugárterápia elsősorban akkor kerül alkalmazásra, ha a páciens elutasítja az operációt vagy az állapota nem teszi lehetővé azt. Ilyen esetben a korai stádiumú tüdőtumorknál alkalmazzák a sugárterápiát gyógyító céllal, azonban ennek eredményessége elmarad a műtététől [27].

A tüdő adenokarcinóma terápiás lehetőségeinek még mindig nagy részét teszik ki a klasszikus kemoterápiás protokollok. Ezeknek a citotoxikus szereknek a leggyakoribb alkalmazása az adjuváns forma, ahol a daganat műtéti eltávolítását követően alkalmazzák, a kiújulás megelőzése érdekében [25]. Ennél a daganat típusnál a kezelési sémák állandó szereplői a platina vegyületek, legfőképp a ciszplatin, melyet kombinációban alkalmaznak egyéb citotoxikus vegyületekkel [28, 29]. Viszonylagos hatékonyságuk mellett azonban a citotoxikus kemoterápiás kezelés számos mellékhatással jár. E vegyületek hatásmechanizmusa a gyorsan osztódó sejtek fokozott érzékenységből adódik, így relatíve szelektívek a tumorsejtekre. Azonban a magas osztódási szám jellemző a bél és gyomornyálkahártya sejteire, a szőrnövekedésre, az ivarsejtekre, a vérképződésre és a bőrre is, amiből következően a kemoterápiás szerek mellékhatásai a hányás és hasmenés, a hajhullás, a meddőség, alacsony vörös és fehérvérsejtszám és nehezen gyógyuló sebek kialakulása [30].

1.3 A tüdő adenokarcinóma mutációs háttere

A daganatok közötti magas reprezentációjuk miatt a tüdőtumorkra mind a kutatás, mind a terápia területén nagy figyelem terelődik. A tüdő adenokarcinóma azon daganatok közé tartozik, melyeknél a driver mutáció jelentőségét elsők között ismerték fel. A terápiát nagyban befolyásolják ezek a mutációk, melyek főleg az EGFR és a KRAS génjeiben jönnek létre [31, 32]. E fehérjék génjeiben a mutációk általában adott régiókban, úgynevezett „forró pontokban (hot spot)” keletkeznek, amely a KRAS esetében elsősorban a 2. exont, EGFR esetében pedig a 18., 19. és 21. exont érintik melyek a tirozinkináz doménon helyezkednek el [33, 34]. Ezek a módosulások lehetnek pontmutációk, melyek során csak egyetlen nukleotid cseréje történik, vagy deléciók, amely során több nukleotid is elvész a génszakaszból. E változások olyan fehérjéket

eredményeznek, amelyek kikerülnek a szabályozó hatások alól. Így jön létre a driver mutációt hordozó fehérje, ami öfenntartó növekedési szignált biztosít a sejt számára [33, 34]. A közelmúltban, a tüdő adenokarcinómákban több driver mutáció jelentőségét is felismerték (3. ábra) [35].

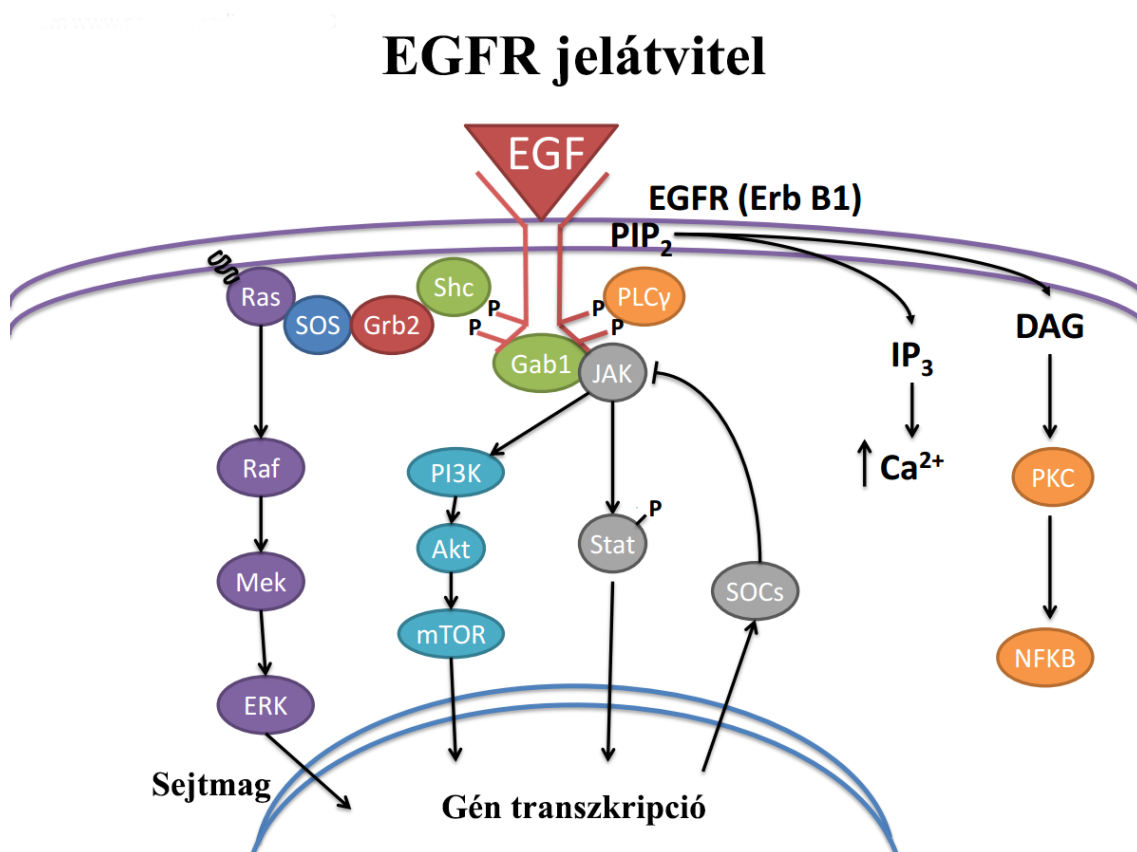


3. ábra: A tüdő adenokarcinóma legfőbb mutációi és azok gyakorisága [35]

Az EGFR egy transzmembrán fehérje, amely a sejthez eljutó növekedési faktorokat köti, és ezáltal egy összetett foszforilációs kaszkádon keresztül osztódási jeleket küld a sejtmagba [36]. Az EGFR-t követő fő jeltovábbító kaszkádot alkotják a KRAS-MEK-ERK fehérjék, melyek kapcsolati hálója összetett, így más jelpályák is hatással vannak az útvonalra. Az EGFR és az mTOR útvonal például kölcsönösen hatással van egymásra (4. ábra) [37].

Az EGFR útvonal azért bír nagy jelentőséggel az adenokarcinómák esetében, mert ebben a jelátviteli útvonalban bekövetkező módosulások sokkal gyakoribbak, mint az egyéb útvonalakban létrejövő driver mutációk [38]. Az EGFR mutáció az esetek mintegy

15%-ban fordul elő, a KRAS pedig 30%-ban, de ennek mértéke különböző faktoroktól függően változhat. Az EGFR az ErbB receptorcsaládba tartozik, ahova ezen kívül még három, hozzá hasonló receptor tirozin kináz fehérje sorolható [39]. Ezek a Her2, ErbB3 és ErbB4, melyek közül a Her2-nek nagy jelentősége van az emlődaganatokban, ahol jellemzően nagyobb számban expresszálódik a sejtfelszínen [40].



4. ábra: Az EGFR jelátviteli útvonal vázlatos felépítése a főbb fehérjékkel (forrás:

<https://www.pancreapedia.org/pathways/egfr-and-other-tyrk-mediated-growth-factor-receptors> nyomán)

A célzott, személyre szabott terápia előretörésével egyre nagyobb szerepet kap minden, akár csak kis mértékben is előforduló mutáció, amennyiben beigazolódik róla, hogy driver szereppel bír. A megváltozott működésű mutáns fehérjékre gyakran fejlesztenek ki speciális molekulákat, amik képesek gátolni a működésüket [41]. Az utóbbi időben egyre nagyobb figyelmet kap az ALK fehérje elváltozása, ami a tüdő adenokarcinómák 3-7%-ban fordul elő [35]. Az ALK gén a tüdő adenokarcinóma

esetében általában az EML4 génnel fúzionál, így egy olyan onkogén jön létre, ami folyamatos proliferációs jelet biztosít a tumorsejt számára [42].

Megfigyelték a MET gén jelentőségét is a tüdő adenokarcinómáknál. Ennek a gének az amplifikációja mintegy 4-5%-ban fordul elő, és felsokszorozása révén proliferációt, migrációt, inváziót és metasztázist indukál a daganatsejtekénél [43]. Ezen kívül jellemző a MET génnél az exon 14 „skipping” mutáció is.

Egy újabb csoportot jelentenek azok a tüdő adenokarcinómák, ahol a ROS1 génje fúzionál más génekkel kromoszóma átrendeződés során, és hoz létre driver mutációt [44]. Az adenokarcinóma esetek mindössze 1-2%-át érinti ez a mutáció, de ez már elég ahhoz, hogy terápiás célpontot jelentsen. A ROS1 fúziós fehérjéi az AKT/mTOR és EGFR jelátviteli úttal is kapcsolatban állnak [45].

A BRAF fehérje mutációját is felfedezték a tüdőtumoroknál, azonban az adenokarcinómás esetek kevesebb, mint 5%-ban előforduló mutációról van szó. E mutációk nagyjából fele azonos a malignus melanománál gyakran előforduló V600E mutációval, ami ellen jelenleg elérhető terápia [46].

1.4 A tüdő adenokarcinóma kezelése célzott terápiával

Az adenokarcinómában a leggyakoribb a KRAS és az EGFR elváltozása, melyből az előbbi ~30%-ot, az utóbbi ~15%-ot tesz ki [35]. Ezekből az EGFR mutációnak kihasználása teszi ki a jelenlegi célzott terápia nagy részét. Bár az EGFR túlzott kifejeződése is előfordul a tüdőtumorokban, itt az emlődaganatokkal ellentétben sokkal nagyobb jelentőséggel bír az aktiváló mutációk szerepe [47]. A legelső molekulák, amik ezeket az elváltozásokat célozták a tirozin-kináz inhibitor (TKI) erlotinib, lapatinib és gefitinib voltak [48]. A jelenleg elérhető elsővonalbeli EGFR ellenes terápiára kialakuló rezisztencia nem csak más jelátviteli útvonalakban jöhet létre, hanem az EGFR génje is elszenvedhet további mutációt, mint például a T790M módosulás [49].

A KRAS mutációja az egyik leggyakoribb az EGFR gén elváltozásai mellett az adenokarcinómákban. Mutációja esetén az EGFR ellenes terápiától semmilyen hatás nem várható, ezért a KRAS vizsgálata a diagnosztika egyik legelső lépése [50]. Minden

erőfeszítés ellenére, a KRAS mutációjával szemben jelenleg nem létezik célzott terápia [51]. Sikeresnek tűnő próbálkozások rendre előfordulnak az irodalomban, azonban ezek a klinikai vizsgálatokban eddig kudarcot vallottak [52].

Az ALK mutáns adenokarcinómákban alkalmazott krizotinibbel nagyon jó eredményeket értek el a terápiában [53]. A krizotinib gátolja továbbá a MET-et és a ROS1-et is. A ROS1 és az ALK között közel 50%-os a szerkezeti azonosság, ennek is tudható be a hatás [35]. Ahogy az EGFR inhibitorok esetében, úgy az krizotinibbel szemben is kialakulhat rezisztencia. Ezért felelős lehet az ALK amplifikációja, illetve bizonyos esetekben az EGFR amplifikációját is megfigyelték [54]. A leggyakoribb oka a rezisztenciának azonban a tirozin-kináz doménben bekövetkező pontmutáció. A krizotinib rezisztencia esetén bevethető újabb hatóanyag a ceritinib, amely sokkal erősebb gátlószere az ALK-nak, így azt akkor is képes gátolni, amikor a krizotinibbel szembeni rezisztencia mutációkat alakít ki [55].

A BRAF V600E mutációja ellen malignus melanómában sikerrel alkalmazzák a vemurafenibet [56]. Azokban az adenokarcinómás betegekben, ahol a BRAF-nak ez a mutációja felelős a növekedési szignálért ez a kezelés megoldást jelenthet, azonban ez csak egy nagyon szűk csoportja a betegeknek [57].

A daganatoknak a növekedéshez fontos a tápanyag ellátottság. Mivel a kapillárisokból a tápanyag csak adott távolságig képes eljutni, ezért egy növekvő tumorban idővel nem tud minden sejtet ellátni az érhálózat. A daganatnak új erekre van szüksége. Azt a folyamatot, aminek a során új érhálózat képződik neoangiogenezisnek nevezzük. A hozzá kapcsolódó jelátviteli folyamatok részletesebb megismerése után, a célzott terápia is megszületett ellene [58]. Ilyen például a bevacizumab, mely a vérben keringő vaszkuláris-endoteliális növekedési faktor (VEGF) ellen kifejlesztett monoklonális antitest [59]. NSCLC-ben jellemzően platina alapú kemoterápiával kerül kombinált alkalmazásra, azonban jelentős mértékű hozzáadott élettartam nyereség nem várható a bevacizumabtól [60].

A felsorolt terápiák alkalmazását mindig komoly diagnosztikus lépések előzik meg, hogy a beteg a számára megfelelő terápiában részesüljön. A jó minőségű, megfelelő mennyiségű és reprezentatív minta elengedhetetlen. Ezek teljesülése esetén következik a

minta feldolgozása és értékelése. A diagnosztikában több vizsgálati módszert is alkalmaznak attól függően, hogy mi a keresett eltérés.

Az EGFR, KRAS és BRAF vizsgálatában a mintából való DNS izolálást követően a mutáció szempontjából a releváns DNS szakasz polimeráz láncreakcióval (PCR) való felszorzozása történik, amit szekvenálás követ [61-63]. Ezzel megállapítható, hogy az adott eltérés megtalálható-e az adott exonban.

Immunhisztokémiával vizsgálható például az ALK, ROS1, MET és BRAF amplifikáció, de az így kapott eredmények további megerősítést igényelhetnek fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH) [63].

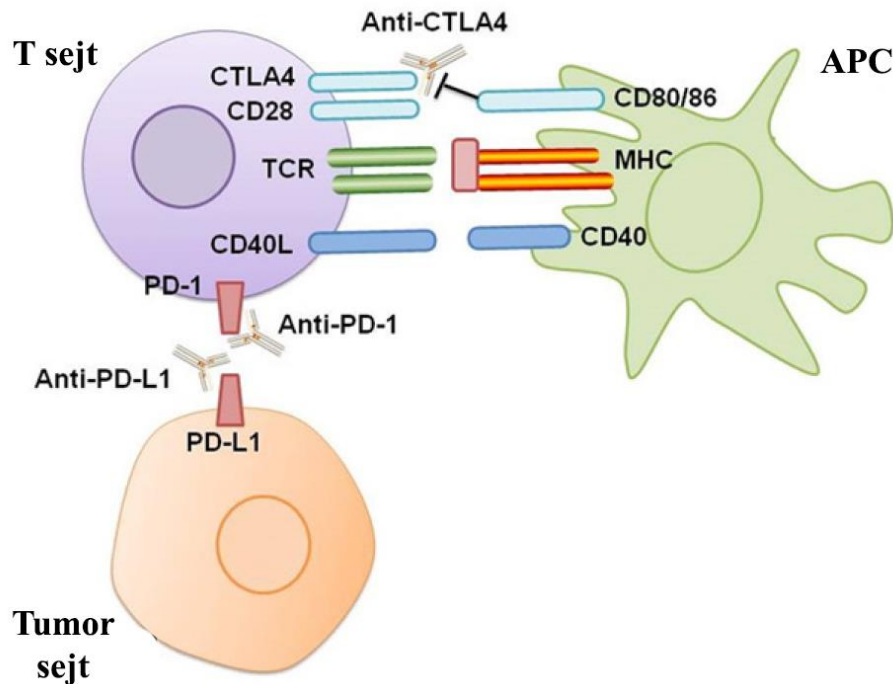
1.5 A tüdő adenokarcinóma kezelése immunterápiával

Az utóbbi évek nagy eredményei között tartják számon a tumorsejtek és immunsejtek közti kölcsönhatásokat befolyásoló terápiás lehetőségek megjelenését, melyet több tumortípus mellett az NSCLC-ben is sikerrel alkalmaznak [64]. A túlzott immunválasz elkerülése miatt a T-limfociták felszínén több receptor is található, ami az immunreakciót gátolja. Ilyen például a citotoxikus T-limfocita antigén-4 (CTLA-4) vagy a programozott sejthalál-1 (PD-1) receptorok [65].

A PD-1 receptor annak ligandjával, a PD-L1-gyel kapcsolódva csökkenti az aktivált T-sejt működését, proliferációját és citokin termelését. A tumorok felszínén jellemzően nagy számban van jelen a PD-L1, míg a tumort infiltráló limfociták (TIL) felszínén tipikusan magas a PD-1 receptor szint [66]. A PD-1 receptor ellenes antitestek a nivolumab és pembrolizumab, melyekkel jó eredményeket értek el a vizsgálatok során [67, 68]. A diagnosztika ezen a terápiás területen is fontos szerephez jut. A kezelés eredményességéhez fontos tudni PD-L1 szintet a tumoron. Ez nagyban határozza meg, hogy milyen mértékű siker várható a terápiától [67].

A CTLA-4 az aktivált T-limfocita felszínén jelenik meg és más aktiváló faktorokkal versenyzik az antigén prezentáló sejt (APC) felszínén lévő közös ligandokért, a B7-1 és B7-2-ért. A tüdő tumor képes a T-limfociták fokozott CTLA-4 expresszióját szabályozni, ezzel gátolni az aktivációjukat [64]. Jelenleg a melanomában már

törzskönyvezett CTLA-4 ellenes monoklonális antitestet, az ipilimumab-ot tesztelik klinikai vizsgálatokban NSCLC ellenes indikációban (5. ábra) [69].



5. ábra: Az APC, a T-sejt és a tumorsejt kapcsolatrendszere a tumor mikro környezetében [64]

1.6 Kiméra antigén receptor (CAR) T-sejtes terápia

A közelmúlt egyik ígéretes terápiájának tűnik a CAR T-sejtes terápia, aminek hatékonysága egyelőre csak B-sejtes limfómában bizonyították, azonban intenzív kutatás folyik a szolid tumorokban való alkalmazási lehetőségek feltérképezéséért is.

A tumor-immunrendszer kapcsolatrendszerének jobb megismerése tette lehetővé a már említett PD-1, PD-L-1 és CTLA-4 ellenőrzőpontokba való beavatkozást és a terápia lehetőségeinek bővítését. Ezzel párhuzamosan kialakultak a T-sejttel való kezelési lehetőségek is. A tumor mintából izolált tumor infiltráló limfocita (TIL) *in vitro* felszaporítása, és ezzel egy, az adott tumor asszociált antigénre (TAA) érzékeny limfocita populáció létrehozása majd visszajuttatása a páciensbe egy új terápiás opciót teremtett [70]. A módszer az eredményességei ellenére több nehézséggel is rendelkezik. Akadályt

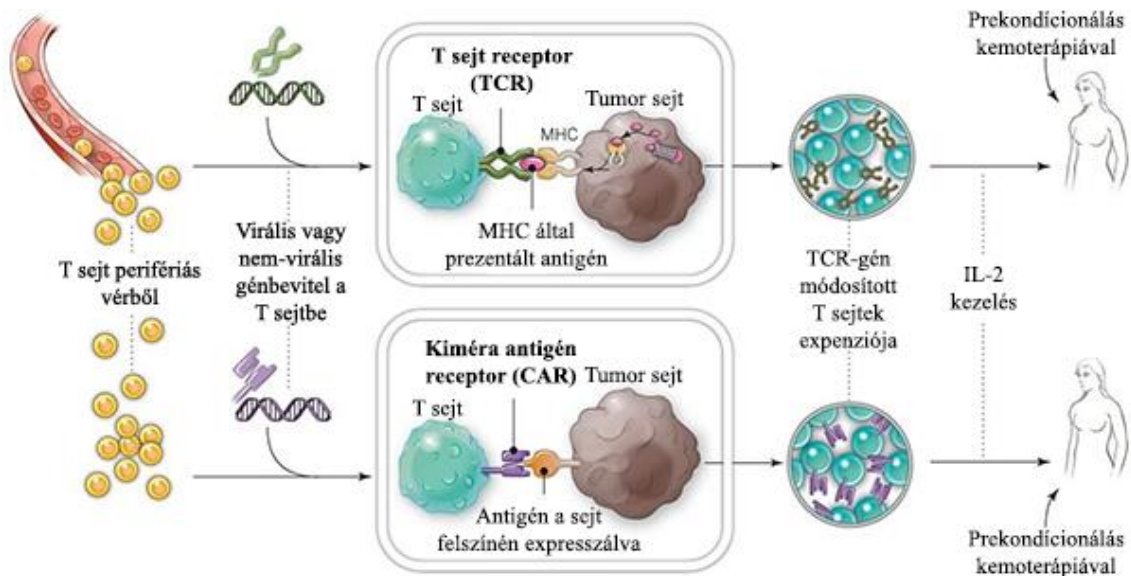
jelenthet a TIL kinyerése és felszaporítása olyan módon, hogy a specifikusságát és funkcióját megtartsa [71].

A módosított T-sejtekkel kapcsolatos első próbálkozások adott TAA-t céloztak módosított T-sejt receptoron (TCR) keresztül. Erre a célra a TCR α és β láncait módosították, hogy az adott TAA-t képesek legyenek felismerni. Ennek a módszernek az alkalmazhatóságát korlátozza, hogy a tumor líziséhez továbbra is a hagyományos jelátviteli út szükséges a fő hisztokompatibilitási komplexen (MHC) keresztül. A daganat sejtek felszínéről azonban gyakran eltűnik az MHC-I, így a T-sejtek nem képesek felismerni és megtámadni [71].

A CAR T-sejteknek nem szükséges az MHC épsége a tumorsejt elpusztításához. A CAR olyan szintetikus receptor, ami a sejtfelszíni molekulák széles spektrumához tud csatlakozni, legyen az lipid, szénhidrát vagy protein [72]. Az elsőgenerációs CAR még csak a citotoxikus hatás elindítására volt képes, a második és a harmadikgenerációs azonban már rendelkezik a T-sejt proliferáció és citokin szekréció elindításának képességével is [73].

A CAR T-sejtek előállítását a páciens T-sejtjeinek izolálásával kezdődik. Ezután a kiválasztott T-sejt populációt elkülönítik és aktiválják. Az aktiváció szükséges a későbbi lépéshez, ami során az adott CAR cDNS szekvenciával transzfektálják a sejtet. A virális és nem-virális transzfektálás is bevett eljárásnak számít. Ezt követően a sejtek felszaporítása következik, majd az ellenőrzési lépések után fagyasztásra kerülhetnek, vagy visszaadhatják a betegnek (6. ábra) [74].

A CAR kezelési stratégia fő szempontja, hogy legyen az adott tumornak olyan célozható antigénje, amely kellően magasan reprezentált és nem, vagy csak nagyon alacsony szintben található meg a normál sejteken [71]. Bár ez a terápia nagyon jó eredményekkel szolgálhat, mellékhatásai súlyosak lehetnek. Ilyen például a citokin felszabadulási szindróma (CRS), az idegrendszeri toxicitás, vagy az esetleges allergiás reakció a rekombináns fehérje ellen [75].



6. ábra: A T-sejt terápia lépéseinek vázlatos összefoglalása (forrás: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells> nyomán)

1.7 Gyógyszerek nem onkológiai indikációban, de bizonyított antitumor hatással

A daganatok molekuláris hátterének megismerésével, az új célpontok megjelenésével a terápia bővítése is lehetővé válik. Azonban hosszú ideje elérhető, más indikációban alkalmazott gyógyszerek esetében is kiderülhet, hogy rendelkeznek daganat gátló hatással. Az ilyen vegyületek azért is előnyösek, mert régóta elérhetőek, és sok tapasztalat halmozódott fel róluk, pl. ismert a toxikológiai profiljuk, farmakokinetikájuk, más gyógyszerekkel való interakcióik, így rövidebb idő alatt lehet az új indikációban elérhetővé tenni, mint egy teljesen új molekulát [76].

Nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID): Ezek a molekulák a ciklooxygenáz 1, 2 (COX1, 2) enzimek gátlásával a prosztanoid szintézist csökkentik és így hatnak a gyulladással kapcsolatos reakciókra, lázra és fájdalomra. Ilyen például az aszpirin, a diklofenák, vagy az ibuprofén [76]. Az NSAID-ek esetében preventív hatást figyeltek meg vastagbél adenokarcinómában [77]. Ezt a hatást a COX enzimek gátlásának és így a gyulladás mértékének csökkenésének tulajdonítják, illetve több ponton is beleszólnak a tumor jelátviteli folyamataiba [76].

Sztatinok: A sztatinok gyakran alkalmazott gyógyszerek a magas koleszterinszint csökkentésére, így a különböző keringési események megelőzésére [78]. Ezek a

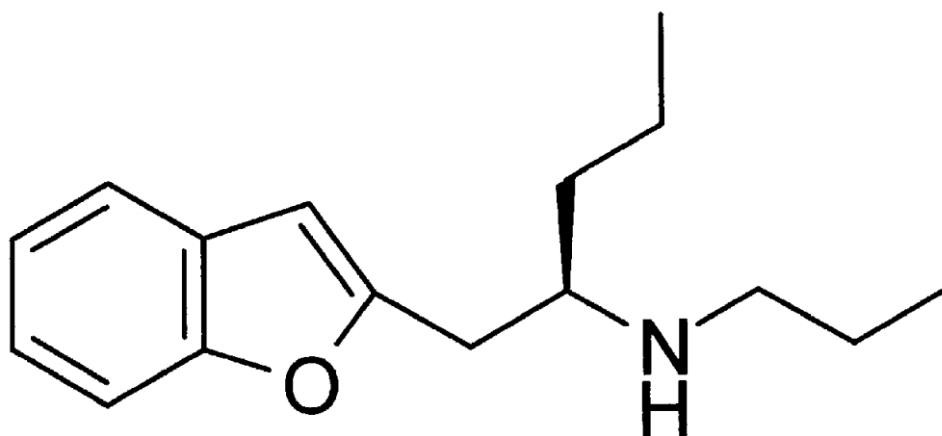
vegyületek több ponton is képesek beleszólni a daganatok progressziójába. Befolyásolják a proliferációt, az immunválaszt, az apoptózis aktiválódását és a proteasóma működését [76, 79, 80].

Anti-pszichotikumok: Az anti-pszichotikumokat olyan betegségek kezelésére használják mint például a skizofrénia, bipoláris depresszió vagy depresszió. Antitumor hatásuk vizsgálata során a fenotiazin szerkezetűeknél megfigyelték a sejt proliferációjára, metabolizmusára és migrációjára gyakorolt hatásokat [76]. Ezeket a hatásokat leírták például melanoma, fibrosarcoma, prosztatadaganat és leukémia sejteken is.

Féregellenes szerek: Ebből a gyógyszercsoportból a legnagyobb érdeklődés a niklózamidot, mebendazolt és flubendazolt övezi a daganatellenes hatások szempontjából. A niklózamidról több tumortípuson is bizonyították már, hogy képes gátolni a Wnt/ β -katenin utat, az mTORC1 jelátvitelt és az NF- κ B-t is [81]. A mebendazolal kapcsolatban *in vitro* és *in vivo* igazolták tüdőtumorkkal szembeni hatékonyságát. A sejtciklust megállította G2/M fázis határán, növelte az apoptózis mértékét, állatmodellben csökkentette a metasztázisok számát és gátolta az angiogenezist [82]. A flubendazolnak a mebendazolhoz hasonló hatása van a G2/M fázisokra, ami a mikrotubulus polimerizáció gátló hatásból adódik [83]. A flubendazol ezen hatását elsősorban neuroblastoma, leukemia és myeloma sejteken sikerült igazolni. Más sejtvonalak alacsonyabb érzékenységet mutattak a kezeléssel szemben [84].

1.8 A (-)-deprenil (DEP) és a BPAP hatásai

A feniletilamin derivátum (-)-deprenil (más néven szelegilin) az 1970-es években vált széleskörűen ismertté, amikor felfedezték a MAO-B enzimre gyakorolt szelektív blokkoló hatását. Ezzel az első ilyen vegyület lett és később a Parkinson-kór terápiajában is helyet kapott [85, 86]. Élettartam vizsgálatokból kiderült, hogy a DEP a MAO-B blokkoló (0,25 mg/kg) dózisban képes meghosszabbítani az élettartamot patkányon, egéren és beagle kutyán végzett vizsgálatokban [87-89]. A DEP ezen hatásai nyomán kifejlesztésre került egy újabb vegyület, az 1-fenil-2-propilaminopentán (PPAP), ami már nem rendelkezik a MAO-B blokkoló hatással, de továbbra is erős stimulálója volt a központi idegrendszeri katekolaminerg folyamatoknak [90]. Ezekből az eredményekből következett később a triptamin származék BPAP kifejlesztése (7. ábra) [91].

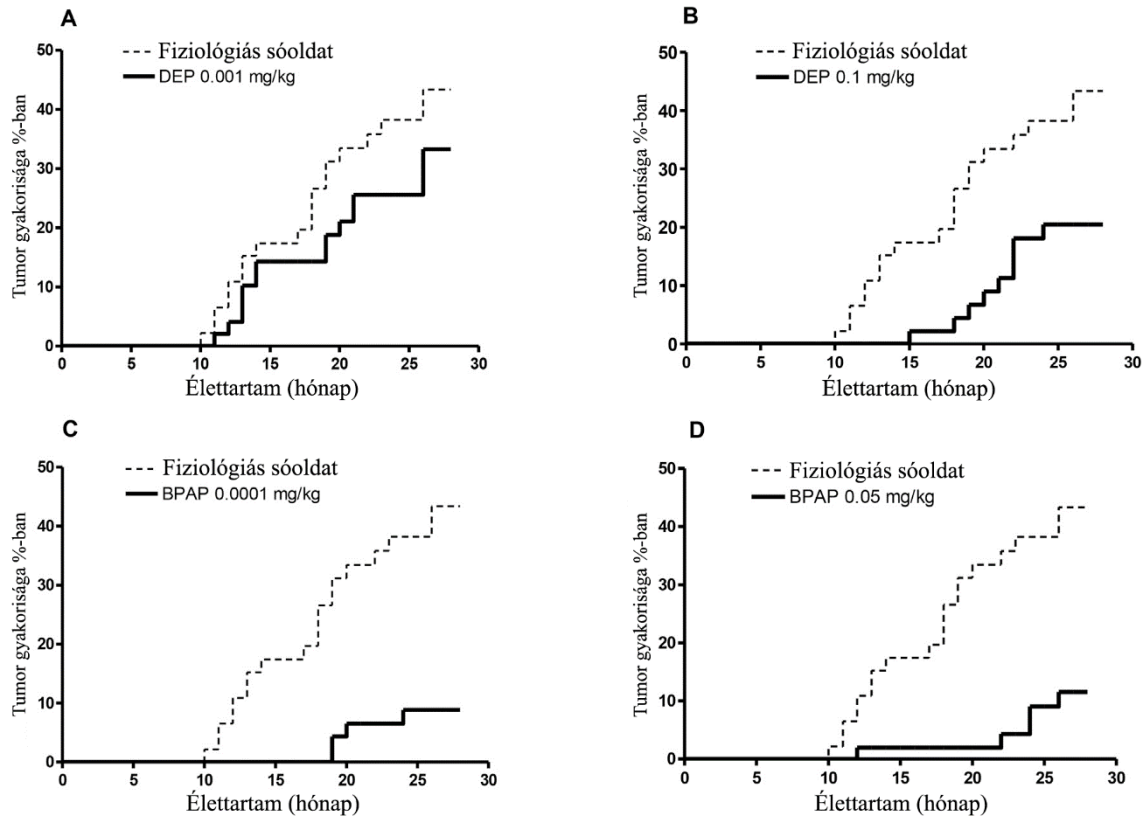


7. ábra: A BPAP szerkezete [92]

A BPAP, hasonlóan a DEP-hez, képes a központi idegrendszerben az adrenerg és szerotonerg jelátviteli folyamatokat erősíteni, azonban a MAO-B-re gyakorolt hatás a BPAP-nál nem jelentkezik [91]. Megfigyelték továbbá, hogy mindkét vegyület rendelkezik neuroprotektív és memória stimuláló hatással is [93]. A BPAP ezekkel a hatásokkal nagyon alacsony koncentrációtartományban bír [94].

Ebből kiindulva a DEP és a BPAP hatásait újabb élettartam vizsgálatokban, a DEP MAO-B blokkoló dóziséénál nagyságrendekkel alacsonyabb koncentrációban vizsgálták, és bizonyították az élettartam növekedésre gyakorolt hatását. A BPAP hatása ebben a vonatkozásban erősebbnek bizonyult, mint a DEP esetében [95].

A kísérletek során vizsgálták még a DEP-el és a BPAP-val való hosszútávú kezelés hatásait a viselkedésre, tanulási képességre az esetleges élettartam nyereség mellett. A kísérleteket Wistar patkányokon végezték és a már említett alacsony koncentráció tartományban. A tanulási képességek javulása és az élettartam jelentős megnövekedése mellett leírták, hogy mind a DEP-el, mind a BPAP-val való kezelés hatására a patkánytörzsre jellemző spontán fibroszarkóma képződés jelentősen csökkent a kontrol csoportban tapasztaltnál képest (8. ábra) [96].



8. ábra: A DEP és a BPAP kezelések hatásai a spontán fibroszarkóma manifesztációjára élettartam vizsgálat során [96]

A BPAP és DEP kezelt csoportokban a tumorok megjelenése későbbre tolódott és számuk, illetve méretük is csökkenést mutatott a kontroll csoportban tapasztaltnál képest. Bár a DEP is hatással volt a daganatképződésre a kísérlet során, a BPAP hatása sokkal erősebbnek bizonyult (8. ábra). Ennek mentén a BPAP tumorgátló hatása egyéb modelleken is vizsgálatra került. Egy *in vivo* vastagbél adenokarcinóma-máj metasztázis modellben hatékonyan csökkentette az áttétek számát [96]. A BPAP így más daganattípusokkal szemben is kedvező hatást mutatott.

A BPAP hatása sokrétű: befolyásolja az élettartamot, a tanulási folyamatokat és a viselkedést, és ezen hatásait nagyon alacsony koncentrációtartományban fejti ki. Az alábbiakban ismertetésre kerülő munkánkban bemutatjuk az általunk létrehozott *in vivo* tüdőtumor modellt, e rendszerben a BPAP tüdő adenokarcinómára gyakorolt hatását és feltérképezzük a mögötte rejlő hatásmechanizmust.

2 Célkitűzések

- A rendelkezésünkre álló egér tüdőtumor modell karakterizálása, az adenokarcinómákra jellemző leggyakoribb mutációk tesztelése, a különböző jelátviteli utak aktivitásának feltérképezése.
- A BPAP feltételezett tumor ellenes hatásainak vizsgálata a létrehozott modellen, valamint további humán tüdő adenokarcinóma sejtvonal xenograft modelljén SCID egérben.
- A BPAP lehetséges hatásmechanizmusának feltárása.

3 Módszerek

3.1 Egér modellek

3.1.1 *FVB/N egértörzs kezelése DEN-nal és tüdőtumor vonal létrehozása*

Az FVB/N egértörzs a Charles River Laboratories-tól (Wilmington, MS) származott. Összesen 40 állatot (20 hím és 20 nőstényt) vontunk be a karcinogenezis kísérletbe. Az állatok két hetes korukban egyszeri dózisu, 15 µg/g DEN-t (N0258, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US) foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS) oldva kaptak intraperitoneálisan. Ezzel párhuzamosan 14 azonos korú, de kezeletlen nőstény szolgált kontrollcsoportként. Az állatokat éteres altatás mellett termináltuk egy éves korukban.

A terminálást követően lemértük az állatok testtömegét, majd a tüdő és a máj tömegeket, illetve feljegyeztük a szabad szemmel látható tumoros elváltozásokat. Ezt követően a szervek egy részét 10%-os formalinban fixáltuk, majd paraffinos blokkokba ágyasztuk immunhisztokémiához és mutáció analízishez, illetve -80°C-on fagyasztásra is kerültek minták a későbbi Western blot vizsgálatokhoz.

A makroszkópikus tüdőtumorokból kiválasztottunk kettőt, amit eltávolítottuk, több darabra vágtuk és PBS-el való mosást követően FVB/N egerek bőre alá ültettük, hogy tumorvonalat hozzunk létre. Ezeket szükség esetén tovább oltottuk.

3.1.2 *BPAP hatásának vizsgálata a tüdőtumor vonalon FVB/N egértörzsben*

A vegyület hatásának vizsgálatához összesen 45 FVB/N állatot használtunk fel két kísérlet keretében. Az első kísérletben 27, a másodikban pedig 18 állat került bevonásra 8 hetes korukban. A kísérleteken belül az állatokat három csoportra osztottunk. Minden állatnak azonos méretű tumor ültettünk a bőre alá (az első kísérletben 5 mm-es, a második kísérletben 3 mm-es átmérő). Két csoportot kezeltünk a BPAP (Fujimoto Pharmaceutical Corp., Osaka, Japan) két különböző dóziséval. Az egyik csoport 0,0001 mg/kg (kis dózis) kezelőszert kapott, míg a másikat 0,05 mg/kg-mal (nagy dózis) kezeltük, a kontroll csoportnak pedig fiziológiás sóoldatot adtunk. Az állatokat minden

nap szubkután injekció formájában kezeltük azonos időpontban. A tumorokat eltávolítottuk, kettévágtuk és a felét formalinos fixálást követően paraffinba ágyasztuk, a másik felét pedig -80°C -on fagyasztva tároltuk.

A tumor átmérőket és az állatok testtömegeit hetente háromszor mértük tolómérő segítségével. A tumor térfogatokat az következő egyenlettel számoltuk: $V = (\pi \times a \times b^2) \div 6$, ahol a 'V' a tumor térfogata, az 'a' a hosszabb, a 'b' pedig a rövidebb átmérője a tumornak.

3.1.3 *A BPAP hatásának vizsgálata a tüdő tumor vonalon súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egértörzsben*

Az FVB/N törzshöz hasonló kivitelezéssel vizsgáltuk a BPAP hatását SCID egértörzsben. Ehhez a kísérlethez összesen 18 állatot használtunk fel és az FVB/N törzsön végzett kísérlethez képest itt kisebb (2 mm-es átmérőjű) tumorokat ültettünk az állatok bőre alá, azon megfontolásból, hogy az adaptív immunrendszer nélkül a nagyobb tumor az állat gyors halálához vezetne.

A kísérlet közben a tumorátmérőt és a tumortérfogatot az FVB/N törzsön végzett kísérlet szerint mértük és számoltuk. A minták tárolása a további kísérletekhez a korábbi kísérletnél leírt módon történt.

3.2 Humán modell

3.2.1 *Szövettenyésztet*

A H358 sejtvonalat (ATCC kód: CRL-5807) RPMI-1640 médiumban (R8758, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) növesztettük 10%-nyi borjú szérummal (FBS) (F6178, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), illetve 100 U/ml penicillinnel és 100 $\mu\text{g/ml}$ sztreptomocinnel (P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) kiegészítve, 5%-os CO_2 atmoszférában 37°C -on. A sejteket 75 cm^2 területű (T75) flaskákban tartottuk, hetente kétszer cseréltünk rajtuk médiumot és 80%-os konfluencia elérése esetén passzáltuk

tripszin-EDTA (T4174, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) segítségével. A sejteket passzáláskor 800 rpm-el centrifugáltuk az eredeti mennyiség harmadát szélesztettük egy újabb T75-ös flaskában.

A H358 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalat felszaporítottunk, majd 10 millió sejtet oltottunk 150 µl PBS-ben szuszpendálva SCID egér bőre alá. A szubkután oltáshoz a sejteket ebben az esetben csak EDTA-val vettük fel, hogy a sejtfelszíni fehérjéket a tripszin ne eméssze le. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk és az üledéket PBS-el háromszor szuszpendáltuk, hogy az EDTA maradékát is eltávolítsuk. Az élő sejtek számát Bürker-kamra segítségével határoztuk meg tripán kék festés mellett.

3.2.2 *A BPAP hatása SCID egértörzsben a szubkután xenograft H358 humán tüdő adenokarcinómára*

A kísérletbe 30 SCID állatot vontunk be. Minden állat bőre alá azonos méretű (3 mm-es átmérő) tumort oltottunk. Az állatokat három csoportra osztottuk és naponta kezeltük őket fiziológiás sóoldattal, illetve kis és nagy dózisú BPAP-val. A tumor átmérőket és az állatok tömegeit hetente egyszer mértük. A kísérletet 10 hét után termináltuk. A tumorokat eltávolítottuk és lemértük a tömegeiket. Ezt követően a tumorokat félbe vágtuk, felét 10%-os formalinban fixáltuk, a másik felét lefagyasztottuk és -80°C-on tároltuk. A tumortérfogat a már korábban bemutatott képlet segítségével számoltuk és ez alapján vettük fel a növekedési görbéket.

3.2.3 *Sejtproliferációs vizsgálat*

A proliferáció mérés szulforodamin-B (SRB) protokoll alapján történt a H358 tüdő adenokarcinóma sejtvonalon. Az SRB egy fehérjéhez kötődő festék, aminek a bekötődött mennyisége arányos a leállítás időpontjában mért sejtszámmal, így a festéket visszaoldva, abszorbancia mérésével következtetni lehet a leállítás pillanatában jelen lévő sejtszámra [97].

A sejteket tripszin-EDTA-s felvétel és Bürker kamra segítségével történő megszámolás után 96 lyukú tenyésztőedénybe tettük ki 3000 sejt/lyuk/100 μ l médium mennyiségben. Huszonnégy óra után a kontroll sejtek esetében a tápfolyadékot 200 μ l friss médiumra cseréltem, a kezelésre kijelölt sejteknél pedig a médium a megfelelő koncentrációjú kezelő anyagot tartalmazta. A pontos kezelési koncentráció megállapítása nem volt lehetséges, mivel nem tudtuk, hogy a BPAP milyen koncentrációban van jelen a vérben, ezért a kísérlet során abból indultunk ki, hogy milyen hígítást alkalmazunk az állatkísérletek során, illetve figyelembe vettük, hogy mekkora adag kerül beadásra egy átlagos testtömegű egérnek. Ezen információk alapján állapítottunk meg két közelítő koncentrációt, ami a kis dózis esetében 0,3 nM-os, a nagy dózis esetében 0,1 μ M-os végkoncentrációt jelentett a BPAP-ra nézve.

Ezt követően a 0 órás tenyésztőedényt fixáltuk az alábbi protokoll alapján, amit aztán 24 óránként a többire is alkalmaztuk:

- 50 μ l 50%-os triklórecetsav (TCA) hozzáadása minden lyukhoz
- 1 óra inkubálás 4°C-on
- alapos, ötszöri átöblítés csapvízzel figyelve arra, hogy a víz sugara ne közvetlenül a lyukak alján fixált sejteket érje
- az edény kiszárítása, majd 50 μ l SRB hozzáadása minden lyukhoz (SRB 1%-os ecetsavban oldva, 0,4 m/v%-os koncentrációban)
- 20 perc várakozási idő után a nem kötődött festék lemosása 1%-os ecetsavval, majd az edény kiszárítása
- megkötött festék visszaoldása 150 μ l, 10 mM-os pufferezetlen Tris oldatba
- abszorbancia mérése 570 nm-en Multiskan MS ELISA plate reader-el (A.A. Lab Systems, Ramat-Gan, Israel)

A sejtek mennyiségét 0, 24, 48, 72 órás időpontokban határoztam meg. Kiértékelésnél a nyolc párhuzamos abszorbancia értékeket átlagoltam. A kezeletlen kontroll minták 0 órás értékét 1-nek vettem, ehhez normalizáltam a kezelt sejtek értékeit, majd felvettem a növekedési görbét.

3.3 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatok a DEN indukálta primer, a szubkután allograft és a spontán keletkezett tüdő tumor mintákból készültek. A metszeteket leszálló alkohollal (xilol – 100%-os etanol – 70%-os etanol – desztillált víz) deparaffináltuk, melyet desztillált vizes mosás követett. Az antigén feltárás citrát pufferrel történt (10 mM citromsav, 0,05% Tween 20, pH=6) kuktában, forrástól számított 10 percig. A metszeteket lehűlést követően 3x5 percig mostuk foszfát-pufferelt sóoldattal, amihez 0,05% detergenst adtunk (PBST). Az endogén peroxidázok blokkolására 3%-os H₂O₂-ot alkalmaztunk 10 percig. Újabb mosási lépés után az aspecifikus kötőhelyeket szobahőmérsékleten blokkoltuk 5 m/V%-os PBS-ben oldott marha szérum albuminnal (BSA).

Az elsődleges antitesteket 1 m/V%-os BSA/PBS oldatban oldottuk és egy éjszakán át inkubáltuk a mintákkal 4°C-on. Az antitestek specifikációját és hígításait az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Elsődleges antitestek immunhisztokémiához

Elsődleges antitest	Gyártó	Katalógus szám	Forrás	Hígítás
TTF-1	Abcam, Cambridge, UK	ab76013	nyúl	1:50
CK7	Atlas antibodies, Stockholm, Svédország	HPA007272	nyúl	1:100

Másnap a metszeteket PBST-vel 5x5 percig mostuk. A másodlagos antitest mind a két esetben tormaperoxidáz (HRP) konjugált, poliklonális anti-nyúl ellenanyag volt (P0448, Dako, Glostrup, Dánia), amivel egy órán át, szobahőn inkubáltuk a mintákat. Ezt követően a mintákat PBST-vel mostuk majd 3,3-diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB), (Novolink Polymer Detection System, RE7150-K, Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) előhívó reagenst cseppentettünk a metszetekre.

A sejtmagokat hematoxilinnel festettük. Felszálló alkohol sorral (70%-os etanol – 100%-os etanol – aceton – xilol) víztelenítettük a mintákat, majd kanadabalzsammal történő fedést követően a mintákat fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A lemezek később szkennelésre kerültek Pannoramic 250 Flash II digitális szkennelőkészülékkel (3D Histech Ltd., Budapest, Magyarország). Az így kapott képeket Pannoramic Viewer (3D Histech Ltd., Budapest, Magyarország) programmal tovább vizsgáltuk.

3.4 Polimeráz láncreakció (PCR) és szekvenálás

3.4.1 *DNS izolálás fagyasztott és paraffinos mintákból*

A fagyasztva tárolt szubkután allograft tüdő-tumor mintákat folyékony nitrogénes hűtés mellett alkohollal előzetesen kitisztított mozsárban porítottuk és az így kapott mintát szuszpendáltuk 400 µl lízis pufferrel (0,2 M NaCl, 0,02 M EDTA, 0,04 M Tris és 0,5% SDS), amit előtte kiegészítettünk 20 µl Proteináz K-val (10 mg/ml, Roche, Basel, Svájc) és 2 µl β-merkaptoetanollal.

A paraffinos metszeteken a DEN indukálta primer és spontán kialakult tumoros területeket fénymikroszkóp alatt kijelöltük, majd deparaffinálást követően acetonnal és alkohollal mostuk. A kiszáradást követően a kijelölt területeket eltávolítottuk és Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7,4) pufferrel, amihez előzetesen 2 mg/ml Proteináz K-t adtunk, inkubáltuk 55°C-on egy éjszakán át 300 rpm-es rázatás mellett.

Az inkubálást követően az enzimet hőinaktiváltuk 95°C-on 10 percig, majd 15 percig hűtöttük a mintákat jégen. A lizátumokat 15 percig centrifugáltuk 13000 rpm-el és ezt követően a felülúszókhöz adtunk 50 µl, 5M-os NaCl-ot, amit újabb 15 perc jégen való inkubálás követett. Ezt követően a mintákat az előző paraméterekkel centrifugáltuk és a felülúszókat 1-1 ml jéghideg etanolhoz adtuk. A mintákat centrifugáltuk majd a pelleteket Savant AES 1000 SpeedVac system-el (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) szárítottuk. Az így kapott pelleteteket 50 µl TE pufferben oldottuk és a DNS koncentrációkat NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) mértük.

3.4.2 PCR a fagyasztott és paraffinos minták DNS mintáiból

A primereket az egér EGFR 19-es és 21-es exon-okra és a KRAS 2-es exon-ra terveztük (2. táblázat).

2. táblázat: PCR-hez használt primer szekvenciák

Gén	Primer szekvencia
EGFR exon 19 forward	5'-CTGGATCCCAGAAGGTGAGA-3'
EGFR exon 19 reverse	5'-GGAAGCAAGATTGACCTTATGAA-3'
EGFR exon 21 forward	5'-TTGGCAGCCAGGAATGTACT-3'
EGFR exon 21 reverse	5'-GGCTGTCAGGAAAATGCTTC-3'
KRAS exon 2 forward	5'-TGTAAGGCCTGCTGAAAATG-3'
KRAS exon 2 reverse	5'-GCACGCAGACTGTAGAGCAG-3'

A reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztük. ImmoMix Red 2x (BIO-25002, Bioline, London, UK) PCR reakció mixet használtunk, amihez 20 pmol forward és reverse primert adtunk (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), illetve MgCl₂-ot (BIO-37026, Bioline, London, UK) és 50 ng DNS-t reakciónként. A PCR ciklusok a következők voltak:

3. táblázat: PCR ciklusok

előzetes denaturálás	95°C	10 perc	1x
denaturáció	95°C	40 mp	40x
anelláció	KRAS exon 2: 59°C EGFR exon 19: 56°C EGFR exon 21: 57°C	40 mp	
elongáció	72°C	40 mp	

A PCR reakciókat Veriti 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) műszerrel kiviteleztük.

A PCR termékek méretét és tisztaságát 2%-os agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

3.4.3 *Szekvenálás és elektroforézis*

A PCR termékek tisztítására ExoSap (78201, Affymetrix, Cleveland, OH) kivet használtunk. A szekvenáló reakció BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (4337454, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) segítségével végeztük, amit tisztítási lépés követett Nucleo-SEQ kit (ref 740523, Macherey-Nagel, Düren, Németország) felhasználásával. A lépéseket az adott termékhez tartozó gyártói protokollok szerint végeztük.

A mintákat 20 µl formamidban eluáltuk és 95°C-on 1 percig denaturáltuk. A kapilláris elektroforézist 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) műszerrel végeztük. A szekvenciák elemzéséhez a BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) programot használtuk.

3.5 Western blot

Az egér tüdő tumor karakterizáló Western blot-hoz a kellően nagyméretű (5 mm-nél nagyobb átmérőjű), fagyasztva tárolt DEN indukálta primer és a szubkután allograft tumorokat használtuk fel, illetve egészséges állatok ép tüdejét vizsgáltuk. Az ép tüdőszövet a spontán tumorképződést vizsgáló kísérlet azon állataiból származott, ahol a tüdőben semmilyen elváltozást nem találtunk. A BPAP kezelésű, szubkután tumoros kísérletekből az első, nagyobb állatszámú kísérlet mintáit és a SCID kísérlet mintáit vizsgáltuk, illetve később a H358 szubkután xenograft mintákat. Csoportonként 5-5 minta került további vizsgálatra.

A tumorokat fehérje kinyerése céljából folyékony nitrogénes hűtés mellett porítottuk a DNS izolálásnál már említett módon. Az így nyert szövetre lízis puffer

mértünk (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1% Triton-X100, illetve 1:100-hoz hígításban NaF (10 mM-os), Na₃VO₄ (1 mM-os), és 1:200-hoz proteáz inhibitor koktélt (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) adtunk hozzá.

A fehérje oldatokat ezt követően 4°C-on történő 13000 rpm-es centrifugálással nyertük ki a felülúszóból.

A fehérjekoncentrációk meghatározása a következő protokoll szerint történt:

- 10 µl minta hozzáadása az előzetesen 1x-re hígított 990 µl Bradford-reagenshez, majd homogenizálás. A reagens halvány barna színűből kék színűvé változik fehérje hatására. Az kék szín erőssége a fehérje koncentráció függvénye.
- abszorbancia mérése 595 nm-en Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 spektrofotométerrel
- koncentráció meghatározása a BSA standard hígítási sor alapján kapott abszorpciós egyenes segítségével

Minta előkészítése:

- azonos koncentráció beállítása a kapott értékek alapján (hígítás lízis pufferrel)
- hozzáadni annyi β-merkaptotetanolt, hogy koncentrációja a Laemli pufferben 7,5% legyen
- denaturálási lépés 5 percig 99°C-on

A futtató (10%-os poliakrilamid gél + 0,1% SDS) és a koncentráló (4%-os poliakrilamid gél + 0,1% SDS) gélek elkészítését és a zsebek kialakítását követően betöltöttem a denaturált mintákat 30 µg/25 µl/zseb mennyiségben. A szeparálás konstans feszültség mellett, 200 V-al történt 40 percen keresztül. A fehérjéket PVDF membránra blottoltam, melyet előzetesen metanollal, majd blottoló pufferrel aktiváltam (10 V/V% Tris-glicin, 10 V/V% metanol és 80 V/V% dH₂O). A blottolás konstans áramerősség mellett 75 mA-el történt egy éjszakán keresztül 4°C-on.

Az ezt követő lépések az alábbi protokoll szerint történtek:

- membránok mosása Tris-el pufferelt sóoldattal (TBS) 3x5 percig
- membránok festése Ponceau festékkel (2,5 mM) 15 percig (a festék a fehérjékhez kötődik és a betöltések egységességéről, illetve a blottolás sikerességéről ad információt)
- megfestett membránok differenciálása dH₂O-val, majd fotózása Kodak Image Station 4000 MM készülékkel
- festék kimosása a membránból TBS-el
- aspecifikus antitest kötőhelyek blokkolása 5 m/V%-os tejpor TBS oldatával 1 órán keresztül
- 5x5 perc mosás 0,5% Tween 20-at tartalmazó TBS-el (TBST)
- elsődleges ellenanyagok 1%-os tejpor oldatával inkubálás egy éjszakán át 4°C-on

4. táblázat: Felhasznált elsődleges ellenanyagok:

Elsődleges antitest	Gyártó	Katalógus szám	Forrás	Hígítás
Akt	Cell Signaling Technology, Danvers, MA	#4691	nyúl	1:1000
p-Akt (Thr308)	Cell Signaling Technology	#2965	nyúl	1:1000
p-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	#4058	nyúl	1:1000
p-Erk ½	Cell Signaling Technology	#4370	nyúl	1:1000
p-S6	Cell Signaling Technology	#2211	nyúl	1:1000
CDK4	Neomarkers, Fremont, California, US	#MS-616	egér	1:250
PCNA	Atlas antibodies, Stockholm, Svédország	HPA030522	nyúl	1:1000
Cyclin D1	Neomarkers, Fremont, California, US	MA5-14512	nyúl	1:250
p-Rb S780	Cell Signaling Technology	#9307	nyúl	1:250
p16	LabVision-Thermo Fisher Scientific, Waltham, US	MA5-17093	egér	1:250

NF- κ B	Cell Signaling Technology	#8242	nyúl	1:1000
c-jun	Cell Signaling Technology	#9165	nyúl	1:1000
β -actin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	A2228	egér	1:5000

Az inkubálási idő után 5x5 perc TBST-s mosást követően a másodlagos ellenanyag került alkalmazásra az adott membránon, ami az elsődleges ellenanyagtól függően az alábbiak voltak:

- HRP konjugált nyúl ellenes antitest kecskéből 1:2000 arányban (Dako, Glostrup, Dánia)
- HRP konjugált egér ellenes antitest kecskéből 1:2000 arányban (Dako, Glostrup, Dánia)

A reakció idő 1 óra volt melyet 5x5 perc mosási szakasz követett. Végül a membránokon való reakció előhívása felerősített kemilumineszcencia (ECL) segítségével történt sötétben, a reagens fényérzékenysége miatt. A fényreakció detektálása Kodak Image Station 4000 MM-el történt 10 perces expozíciós idővel. A kapott eredmények kvantitatív értékelését a GelAnalyzer denzitometriai analízis szoftver segítségével végeztem.

3.6 Receptor foszfo-tirozin kináz (p-RTK) array

Az egér tüdő tumor SCID állatokon végzett kísérlet fagyasztott tumoraiból izolált fehérjeoldatokból történt a p-RTK-ok meghatározása a Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array Kit segítségével (ARY014, R&D Systems, Minneapolis, MN).

Mérési protokoll:

- a membránokat 2-2 ml array pufferben (blokkoló reagensként funkcionál) 1 órán keresztül inkubáljuk folyamatos rázás mellett
- inkubálás alatt a minták előkészítése, azok hígítása array pufferrel úgy, hogy a végtérfogat 1,5 ml legyen

- 1 óra után az array puffer eltávolítása a megfelelő membránhoz az adott minta hozzáadása
- állandó rázatás mellett egy éjszakán át inkubáljuk 2-8 °C között
- a minták eltávolítása után a membránokat mosópufferrel mossuk 3x10 percig
- az anti-foszfo-tirozin-HRP detekciós antitest hígítása array pufferben, majd a membrán hozzáadása 2-2 ml-hez
- szobahőmérsékleten, folyamatos rázás mellett inkubálni 2 órát
- membránokat mosópufferrel mossuk 3x10 percig
- a membránokról óvatosan eltávolítjuk a mosópuffert egy papírtörülkö segítségével, majd 1-1 ml Chemi Reagent Mix-et pipetázunk az antitestet tartalmazó oldalára
- így egy műanyag fóliába zárjuk, a bent maradó buborékokat eltávolítjuk és a reagenssel 1 percig inkubáljuk
- a műanyag fóliából eltávolítjuk az előhívó reagens
- a membránokat a fóliában az detektáló készülékbe helyezük és 1-10 percig exponáljuk a képet

A fényreakció detektálása Kodak Image Station 4000 MM készülék segítségével történt 10 perces expozíciós idővel. A kapott eredmények kvantitatív értékelését a GelAnalyzer denzitometriai analízis szoftver segítségével végeztem.

A kapott pontok adott RTK-kat jelölnek, amik a gyártó által mellékelt referencia táblázat segítségével értékelhetők.

3.7 Statisztikai analízis

Az állatkísérletekhez minden statisztikai analízist a GraphPad Prism 7.00 szoftver (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. Az adatokat D'Agostino & Pearson teszt használatával elemeztük a normál eloszlásra. A változások szignifikanciáját nem-paraméteres teszttel (Mann–Whitney U-teszt) vagy a Student-féle T-próbával vizsgáltuk attól függően, hogy az adatok milyen eloszlást mutattak. Vizsgáltuk a független kísérletek reprodukálhatóságát, és csak a megismételhető

szignifikáns változásokat számítottuk szignifikánsnak. A szignifikancia szintet sztenderd $p < 0,05$ -ben határoztuk meg.

A Western blot eredményekhez az átlagok és a szórások értékeinek, illetve a kétmintás t-próba eredményeinek a számolására a Microsoft Office Excel programot használtunk. Az állatkísérelt eredményei standard error-ral, míg a Western blot eredményei standard deviációval kerültek feltüntetésre. A szignifikancia szintek négy csoportba kerültek besorolásra (5. táblázat).

5. táblázat: Szignifikancia jelölések

p értéke	százalék	szignifikáns	jelölés
$p > 0,05$	>5%	nem	
$p < 0,05$	5%	igen	* vagy #
$p < 0,01$	1%	igen	** vagy ##
$p < 0,001$	0,1%	igen	*** vagy ###

4 Eredmények

4.1 A daganatok jellemzése

4.1.1 *A DEN tüdő adenokarcinóma indukáló képessége*

Az alapvetően hepatokarcinogenezis kísérletekhez használt DEN potens tüdőtumor induktornak mutatkozott az FVB/N egértörzsön. A 40 db DEN-al kezelt állatból 39 élte meg az egy éves kort, amikor terminálásra kerültek.

A terminációt követő boncolás során 39 állatból 28-ban találtunk makroszkópikus tüdőtumort. Közülük hat tüdejében több fókuszban is látható volt daganat. A tumorok megjelenése nem mutatott jelentős különbséget a nemek között (6. táblázat). Megfigyelhető, hogy a tumorok miatt az átlagos tüdőtömeg jelentősen, mintegy ~50%-kal emelkedett a normálhoz képest.

6. táblázat: A kialakult tüdőtumorer eloszlása és a tüdőtömegek összehasonlítása

Nem	Összes állat	Állatok száma makroszkópikus tüdőtumorrall	Átlagos tüdőtömeg	Átlagos tüdőtömeg/testtömeg (%-ban)
Hím	19	15	0,24 g	0,78
Nőstény	20	13	0,23 g	0,78

A kontrollként indított, 14 DEN-nal nem kezelt állatból kettőben alakult ki 1 év alatt spontán tüdőtumor, de ez összefüggésben van az FVB/N törzsön végzett élettartam (longevity) vizsgálatok eredményeivel és az irodalomban fellelhető adatokkal, melyek szerint erre az egértörzsre magas spontán tüdőtumor kialakulás jellemző (7. táblázat).

7. táblázat: A tüdőtumорок száma és a tüdőtömegek a kezeletlen csoportban

Összes állat	Állatok száma makroszkópikus tüdőtumорral	Átlagos tüdőtömeg	Átlagos tüdőtömeg/tesztömeg (%-ban)
14	2	0,15 g	0,5

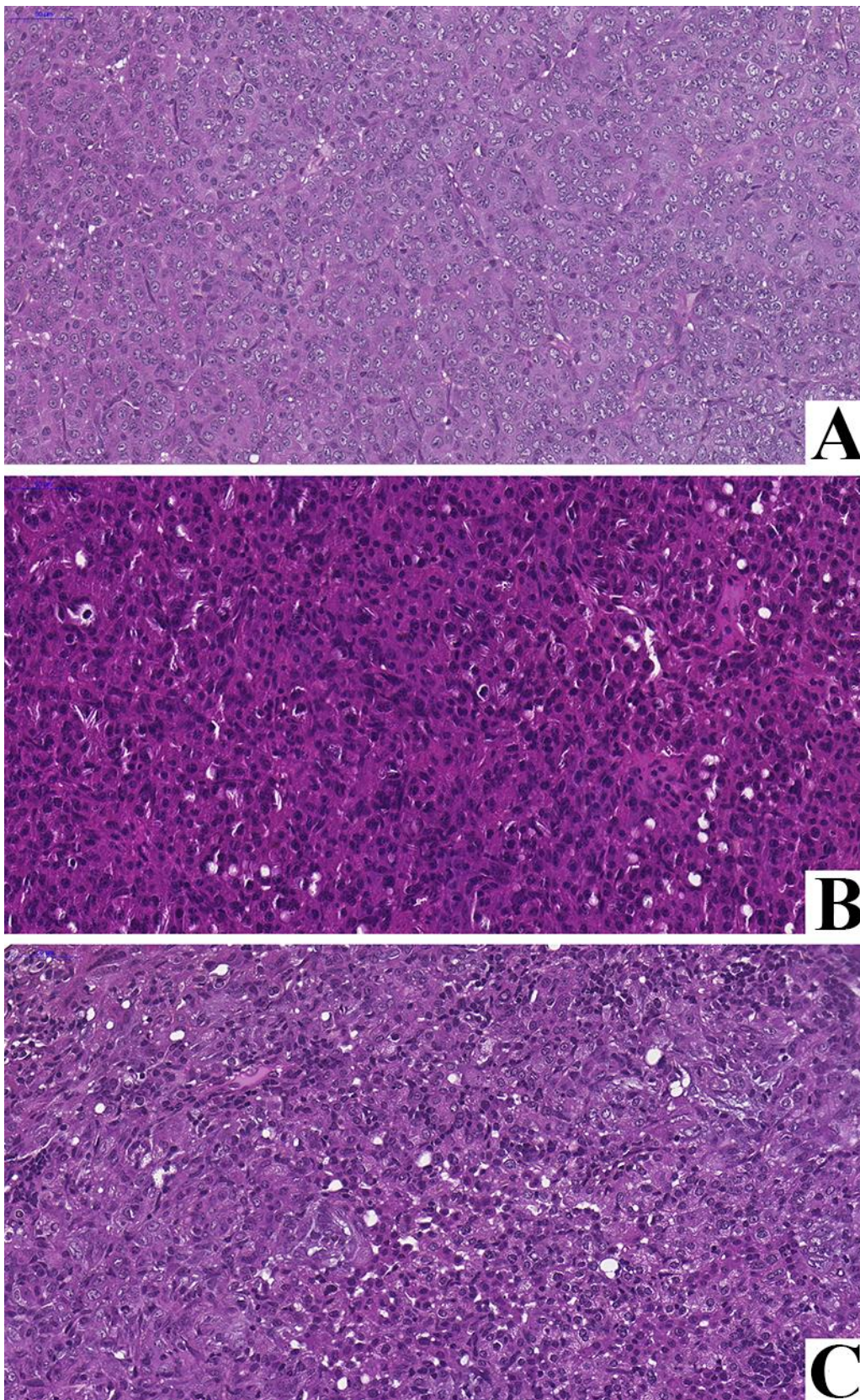
A kontroll csoportban csak nőstényeket vizsgáltunk, mert az irodalomban nem figyeltek meg különbséget az FVB/N egértörzsben spontán kialakuló tüdőtumорок nemek közti eloszlásában [98]. Ezt később az 6. táblázatban összefoglalt eredményeink is igazolták.

4.1.2 *A spontán kialakult, a DEN indukálta és a szubkután allograft tüdőtumорок szövettani és immunhisztokémiai jellemzése*

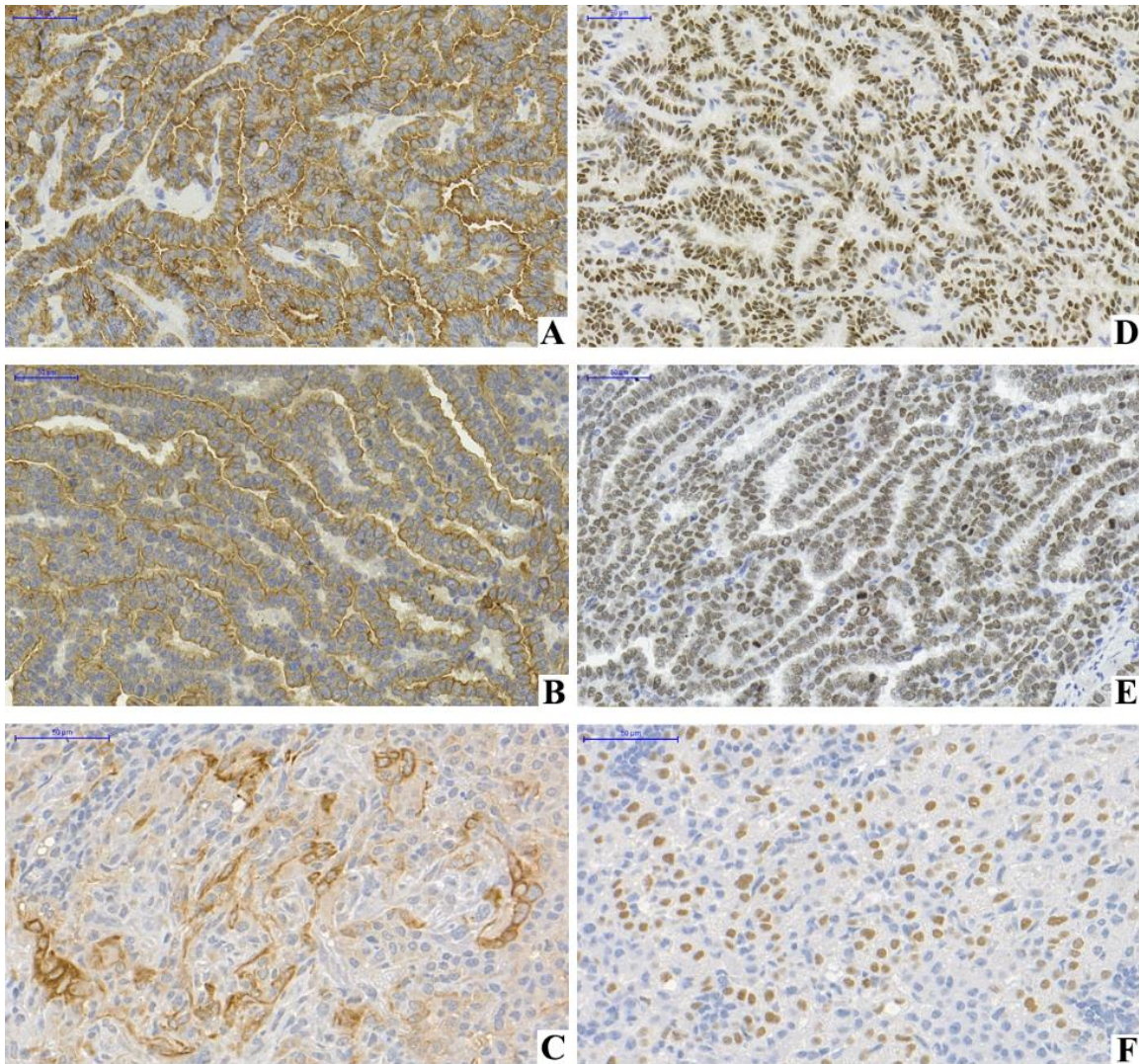
A hematoxin-eozin festett metszetekben mindhárom tumortípusnál mirigyes elrendezésű daganatszövet volt látható.

Immunohisztokémiával vizsgáltuk a DEN indukálta primer és szubkután, illetve a spontán létrejött tüdőtumорок TTF1 és CK7 markereinek expresszióját (9-10. ábra). Ezek a diagnosztikában is széleskörűen használt markerei a tüdő adenokarcinómának. Az összes mintán kimutatható volt mindkét fehérje magas expressziója, ezzel megállapítható volt az adenokarcinóma típus. Ezt a pozitívítást a spontán kialakult tumорок is mutatták.

A 9-10-es ábrákon a DEN indukálta primer tumor, a szubkután allograft és a spontán tumor reprezentatív mintái együtt kerülnek bemutatásra.



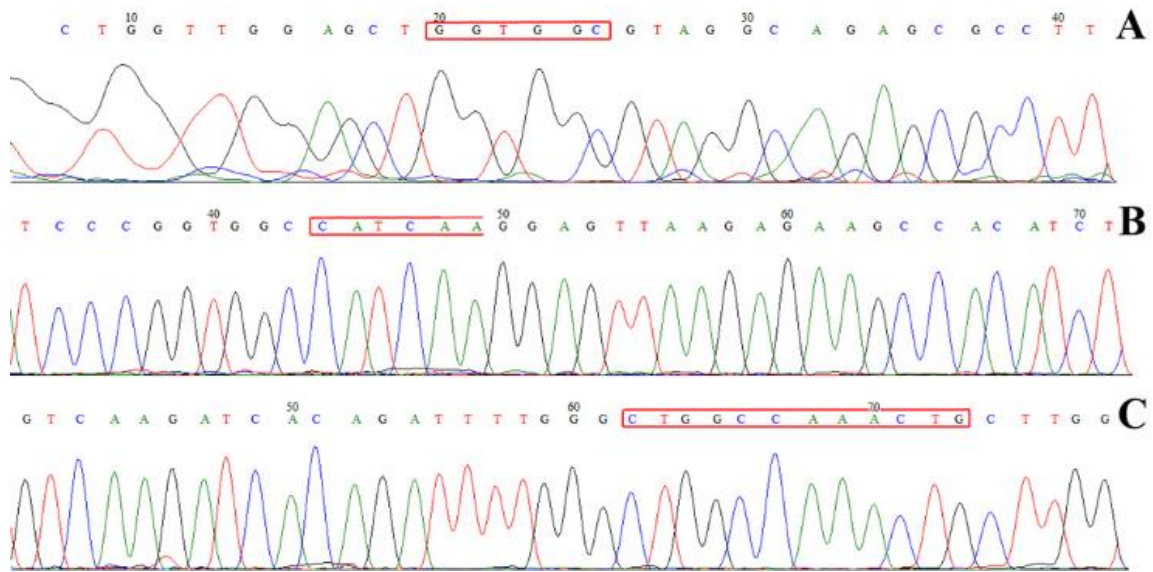
9. ábra: A tumorok vizsgálata hematoxilin-eozin festéssel: A: primer tüdő tumor, B: szubkután allograft tüdő tumor, C: spontán tüdő tumor; Lépték = 50 μ m



10. ábra: A tumorok vizsgálata immunfestéssel: A: primer tüdő tumor (CK7), B: szubkután allograft tüdő tumor (CK7), C: spontán tüdő tumor (CK7); D: primer tüdő tumor (TTF1), E: szubkután allograft tüdő tumor (TTF1), F: spontán tüdő tumor (TTF1); Lépték = 50 µm

4.1.3 A tumorok mutációanalízise

Mind a 28 DEN hatására kialakult, a két spontán keletkezett és a szubkután allograft tüdő tumorban is meghatároztuk a KRAS 2-es exon, illetve az EGFR 19, 21-es exonok szekvenciájának forrópont (hot spot) régióit. Egyetlen tumorban sem találtunk mutációt a vizsgált régiókban (11. ábra).



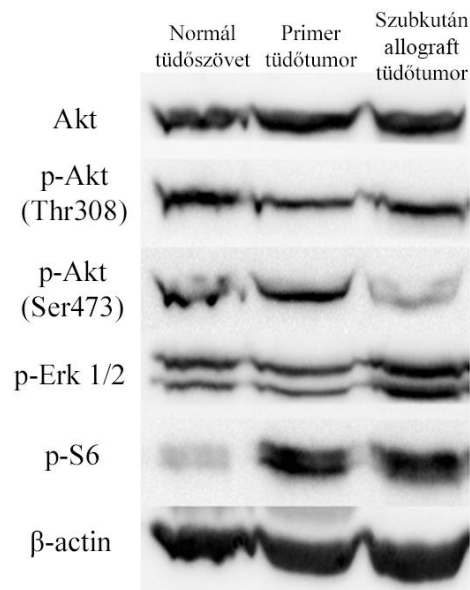
11. ábra: Mutációanalízis Sanger-szekvenálással: A: KRAS exon 2 szekvencia; B: EGFR exon 19 szekvencia; C: EGFR exon 21 szekvencia. A pirossal kiemelt bázisrészek a mutáció szempontjából releváns régiókat jelölik.

4.1.4 A primer és a szubkután allograft tüdő tumor és az ép tüdőszövet jelátviteli útvonalainak összehasonlítása Western blot analízissel

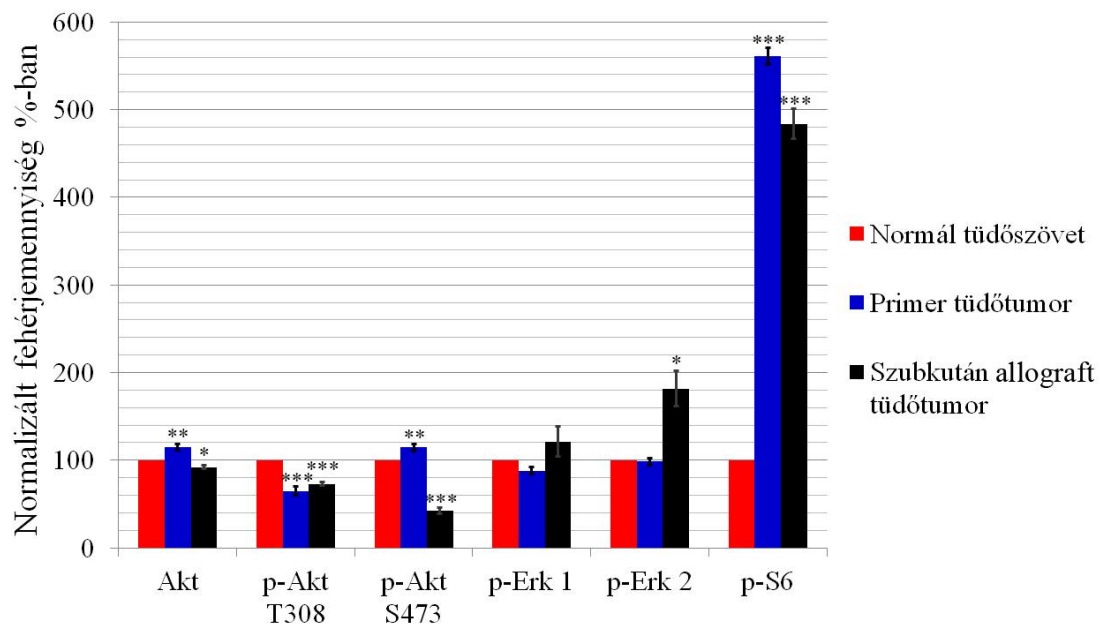
Az összehasonlítás során elsősorban az Akt/mTOR jelátviteli utat vizsgáltuk, aminek jelentős szerepe van a tüdő adenokarcinómák esetében [99]. Az összes Akt szintjében nem következett be jelentős változás, míg a foszforilált formáinak a mennyisége jelentősen változott. A p-Akt-nak a Thr308-on foszforilált formája ~40%-kal csökkent a tumorokban az ép szövetben tapasztalhoz képest. Ezzel szemben a Ser473-on foszforilált Akt csak a szubkután allograft tumorokban csökkent, a primer tumorokban még enyhe emelkedést mutatott. Mindegyik változás szignifikánsnak mutatkozott.

A p-Erk 1 és 2 emelkedést mutatott a szubkután allograft tumorvonalban, ami a tumor esetleges új mutációira és agresszívabbá válására enged következtetni. A növekedés 20%, illetve 80% volt. Ezzel szemben a primer tumorban a p-Erk szintje nem mutatott változást a normál tüdőszövethez képest (12. ábra).

A



B



12. ábra: A normál tüdőszövet összehasonlítása a primer és a szubkután allograft tumorral a főbb jelátviteli fehérjék szempontjából. A: Reprerzentatív Western blot képek a vizsgált fehérjék mennyiségének változásairól. B: A fehérjék mennyiségi változásai a Western blot eredmények kvantifikálását követően.

Statisztika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

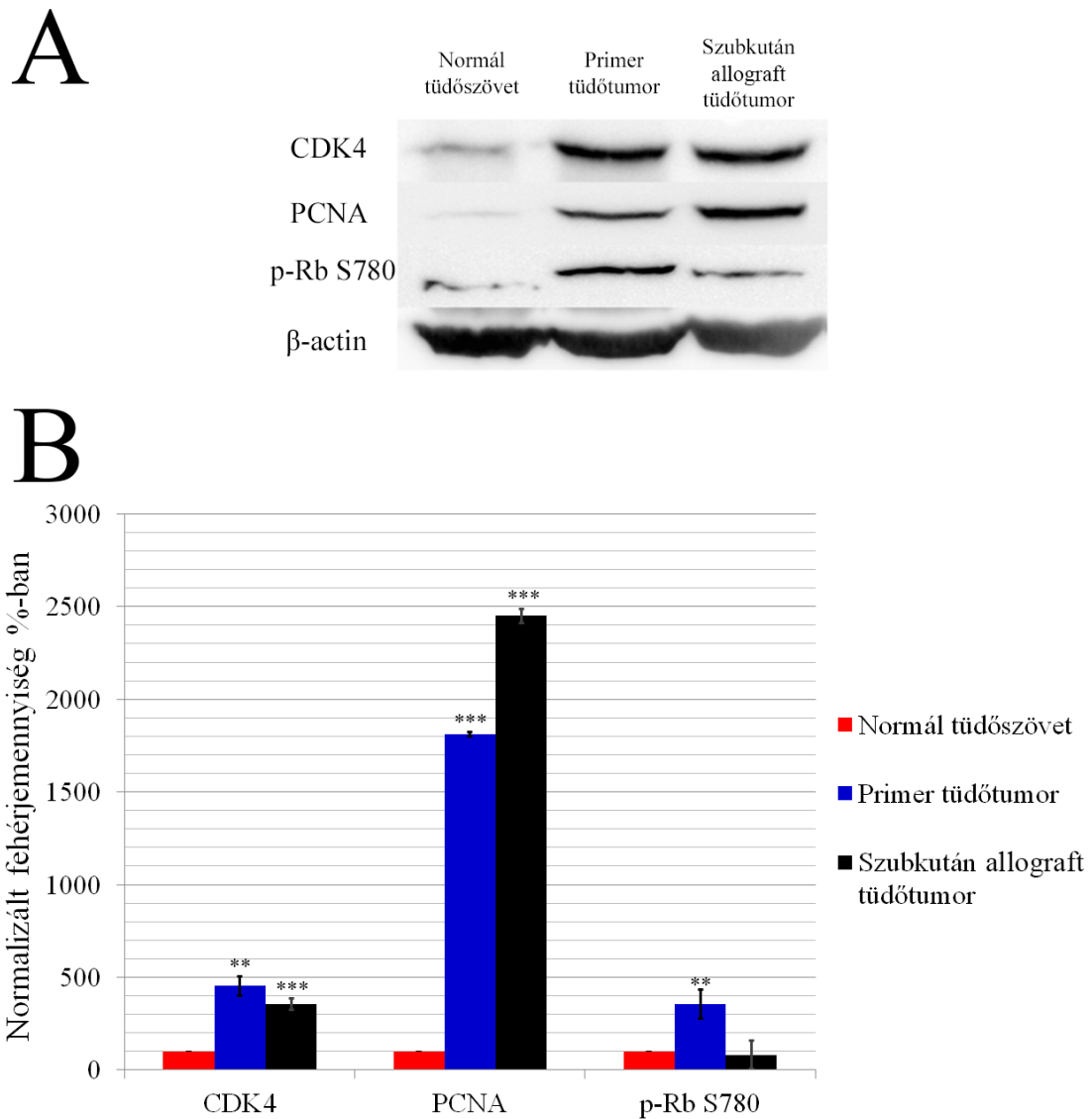
A p-S6, ami az mTOR 1-es komplexével van közvetlen kapcsolatban és ezért jelzi az mTOR útvonal aktivitását [100]. A p-S6 magas szintje az mTOR útvonal jelentős

aktivitására utal. A p-S6 mind a két tumorban mintegy ötszörösére emelkedett a normál szövetben található mennyiséghez képest. Az emelkedés mindkét esetben szignifikáns volt.

A sejtciklus változásait vizsgálva a G1/S fázis határán megfigyeltük a ciklin-dependens kináz 4 (CDK4) jelentős mértékű emelkedését. A primer tumorban a CDK4 szintje mintegy négyszeresére, a szubkután tumorban pedig háromszorosára emelkedett a normál szövetéhez képest. Mind a két változás szignifikánsnak mutatkozott.

A proliferáló sejt nukleáris antigén (PCNA) az S fázisban kap fontos szerepet a DNS replikáció során, ezzel jó marker a sejtosztódás mértékének megfigyelésére. A vizsgált daganatokban a szintje jelentősen változott [101]. A primer tumormintákban mintegy 18-szoros, a szubkután mintákban pedig közel 24-szeres mértékben emelkedett a kontrollként használt normál tüdőhöz képest.

A foszforilált retinoblasztóma (Rb) jelentősen emelkedett a primer tumorban, mintegy négyszeres mértékben. Ezzel szemben azonban a szubkután mintákban nem változott kimutatható mértékben a kontrollhoz képest (13. ábra).



13. ábra: A normál tüdőszövet összehasonlítása a primer és a szubkután allograft tumorra a G1/S fázis főbb fehérjéi szempontjából. A: Repräsentatív Western blot képek a vizsgált fehérjék mennyiségének változásairól. B: A fehérjék mennyiségi változásai a Western blot eredmények kvantifikálását követően.

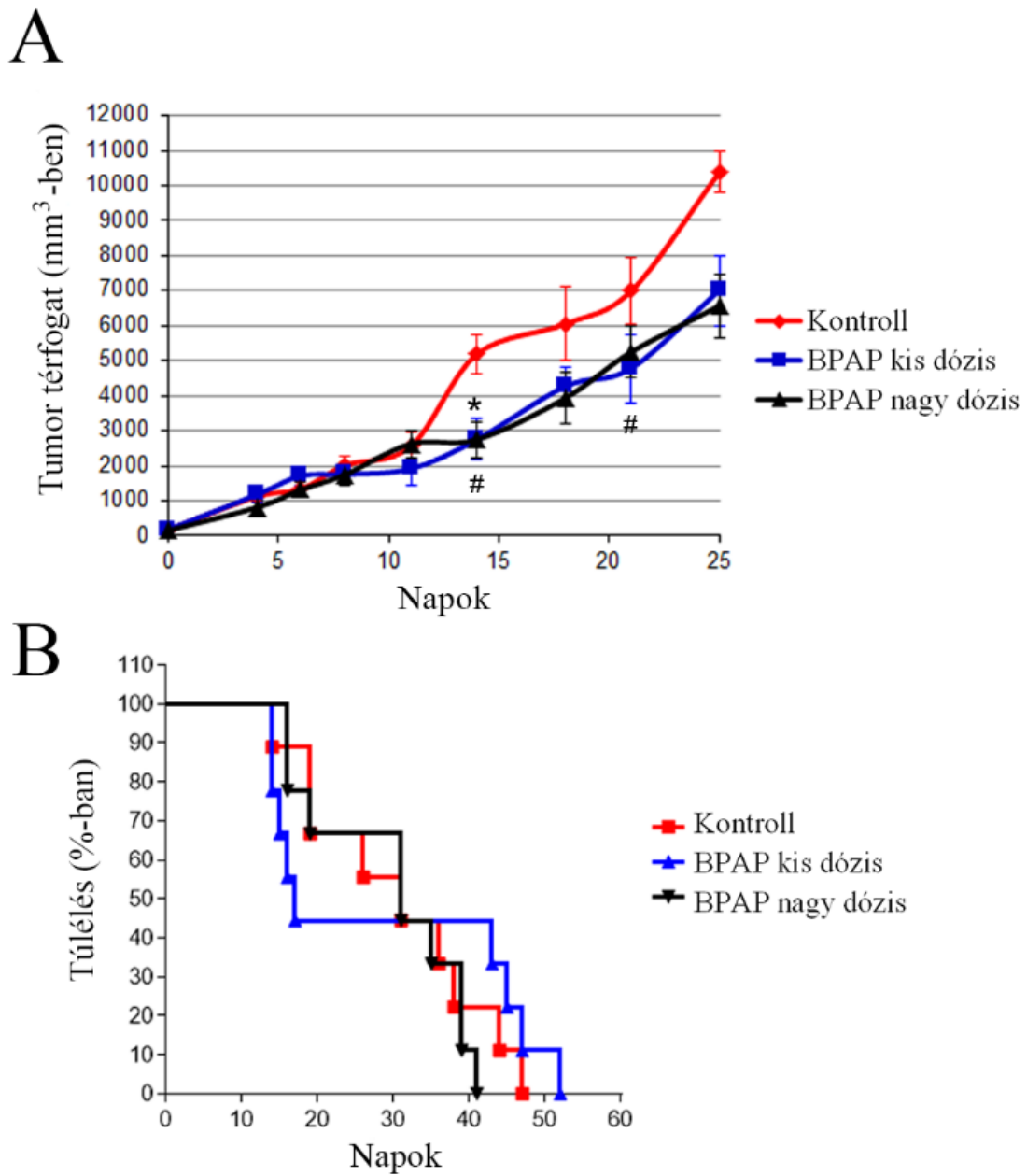
Statisztika: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.2 A BPAP hatásai

4.2.1 *A BPAP hatása az egér szubkután allograft tüdőtumorra FVB/N törzsben*

A BPAP tumorgátló hatását két független kísérletben vizsgáltuk, melyekben a kezelőszer mind a két dózisa jelentősen visszafogta a daganat növekedését. A tumor térfogatok mind a két kísérlet esetében közel azonos mértékben, 40%-kal csökkentek a BPAP kis és nagy dózissal való kezelésekre (14. és 15. ábra). Az első kísérletnél (14. ábra) nagyobb (5 mm-es átmérőjű) szubkután beültetett tumorokkal indult a kísérlet, ami viszonylag gyors növekedéshez, majd korábbi elhullásokhoz vezetett. Látható, hogy a kezelés a 10. nap környékén kezdett el érdemi hatást kifejteni, ami a kísérlet végéig fennállt. Az ábra 'B' részében látható a túlélés, amiben nagy különbség nem mutatkozott a csoportok között.

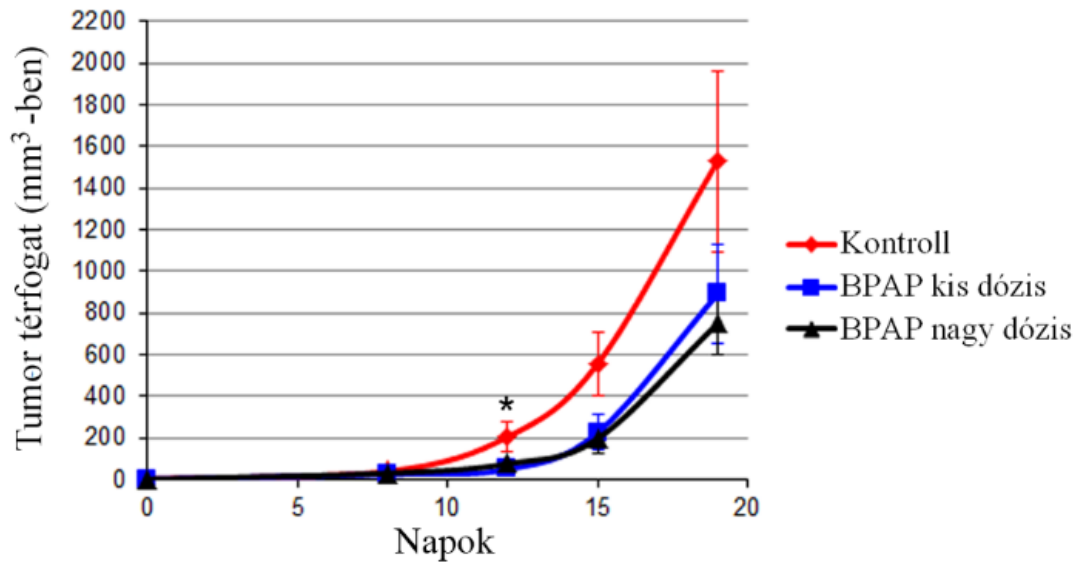
A 15. ábrán a kísérlet ismétlését mutatjuk be, ahol kisebb (3 mm-es átmérőjű) tumorokat ültettünk szubkután és látható, hogy a tumorok lassabban indultak növekedésnek és élesen elvált a 10. naptól a kezelés a kontrolltól. A gátlás mértéke azonos volt, azonban a túlélésben jelentős különbséget figyeltünk meg. Az ábra 'B' részén látható, hogy az állatok túlélése jobb volt a kezelt csoportokban. A kísérlet 30. napján a kis és nagy dózissal kezelt csoportokban kétszer annyi állat volt még életben, mint a kontroll csoportban.



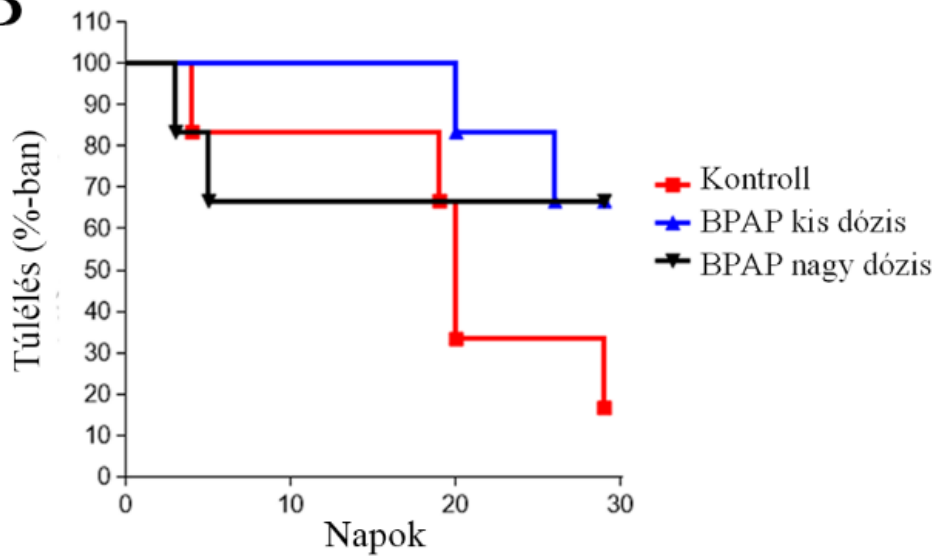
14. ábra: A szubkután allograft tüdő adenokarcinóma növekedése FVB/N törzsben BPAP kezelés mellett (1. kísérlet) 'A' rész: tumor térfogatok növekedési görbéje, 'B' rész: az állatok túlélése %-ban ábrázolva.

* $p < 0,05$ (kis dózis és kontroll között); # $p < 0,05$ (nagy dózis és kontroll között)

A



B

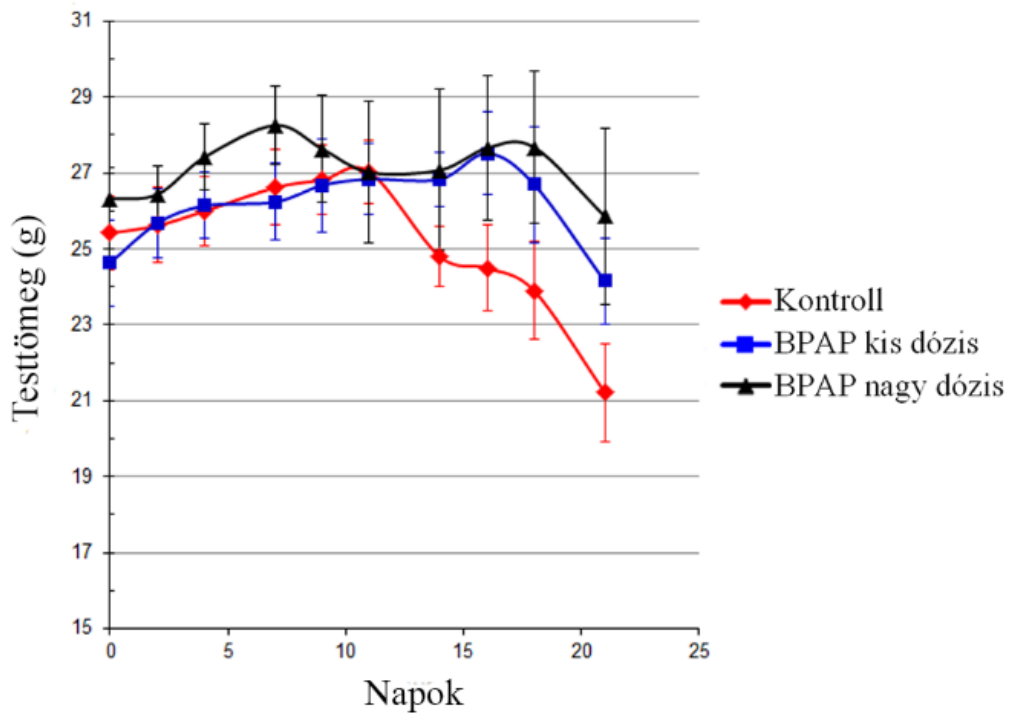


15. ábra: A szubkután allograft tüdő adenokarcinóma növekedése FVB/N törzsben BPAP kezelés mellett (2. kísérlet) 'A' rész: tumor térfogatok növekedési görbéje, 'B' rész: az állatok túlélése %-ban ábrázolva.

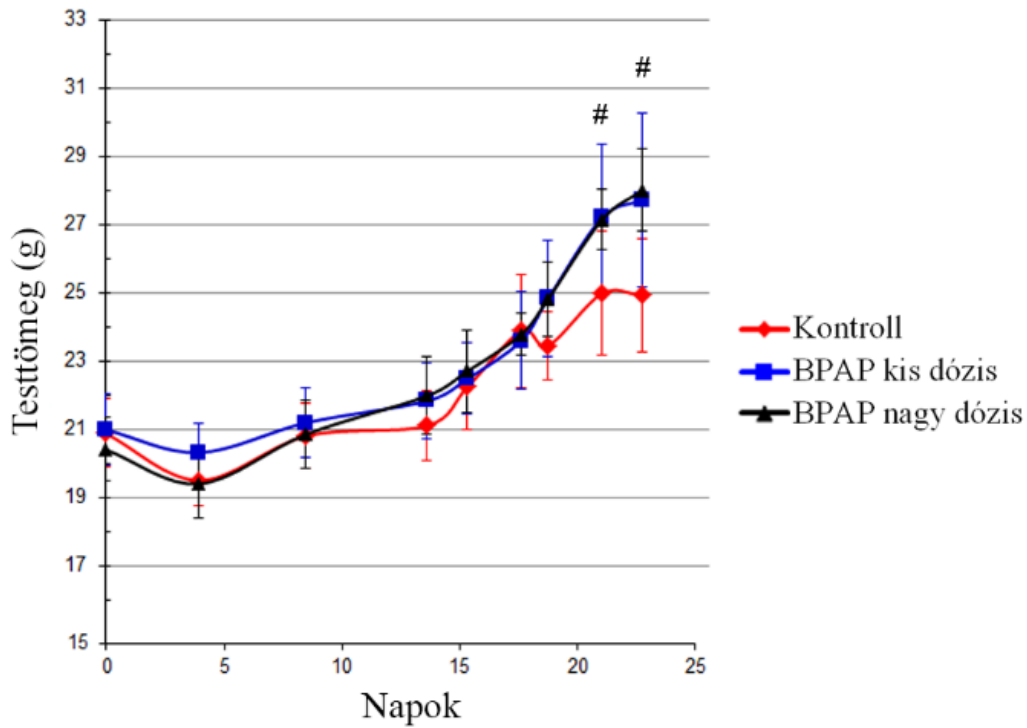
* $p < 0,05$ (kis dózis és kontroll között)

A BPAP kezelt állatok kevésbé voltak cachexiásak, mint a kontroll csoport állatai (16. ábra).

A



B



16. ábra: A BPAP hatása a cachexia-ra FVB/N egértörzsben a két kísérlet során, # $p < 0,05$ (nagy dózis és kontroll között)

Az első kísérletnél a nagyméretű (5 mm-es átmérőjű) kiindulási tumorok miatt, az állatok testsúlyának növekedése hirtelen megállt. Ezt követően enyhén emelkedett az összes csoportban a kísérlet 10. napjáig, ahol azonban a két kezelt csoport megtartotta a testtömegét, miközben a kontroll csoport jelentősen vesztett belőle. A testtömegek utolsó mérésénél a kontroll és kis dózis között átlag 3, a kontroll és a nagy dózis között átlag 5 gramm volt a különbség.

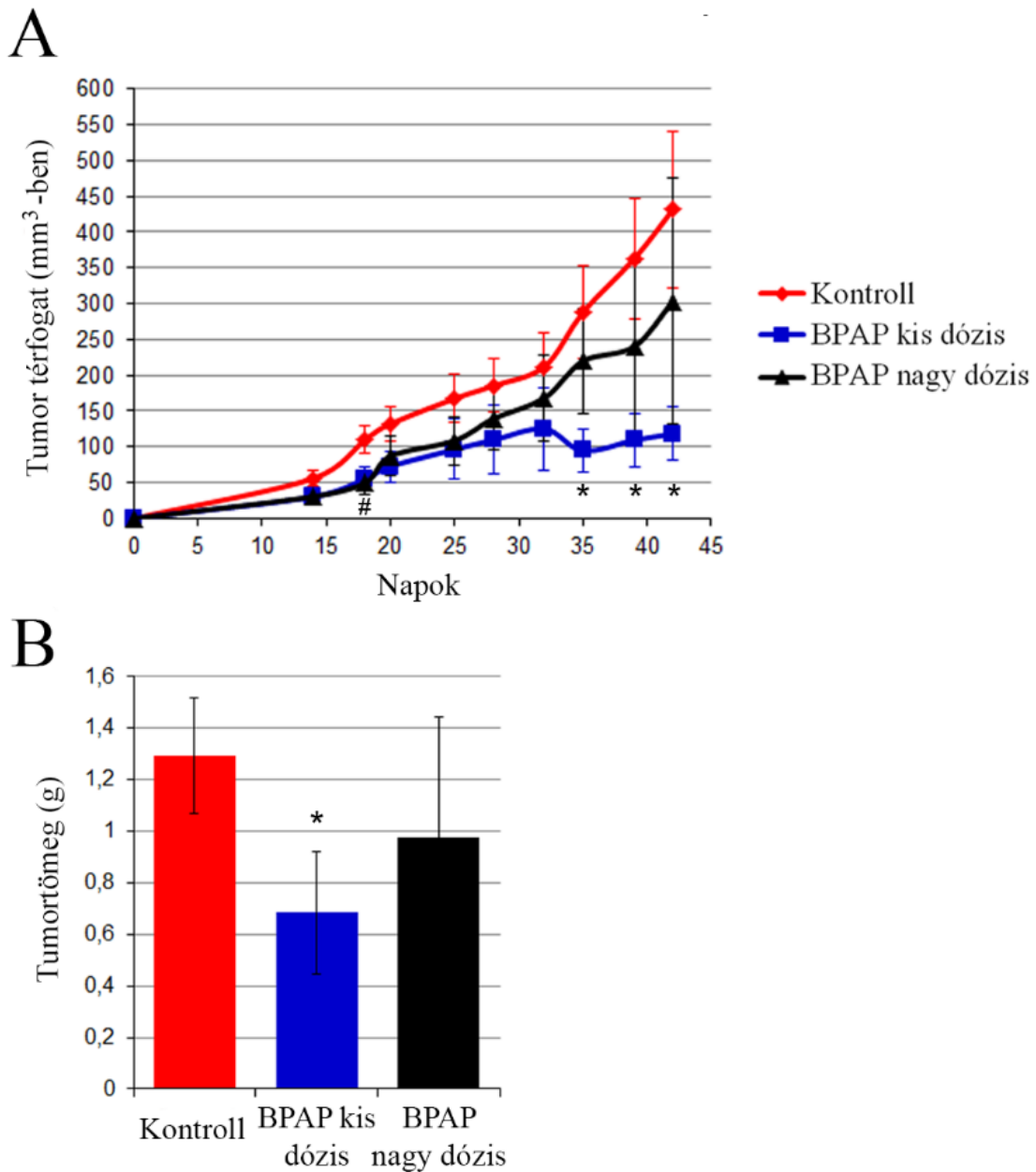
A 16. ábra 'B' részén, a 2. kísérlet során látható, hogy az állatok jobban meg tudták tartani, illetve a 10. naptól még növelni is tudták a testtömegüket. Ez részben annak is köszönhető, hogy ebben az esetben kisebb (3 mm-es átmérőjű) tumorok lettek az állatoknak szubkután beültetve. A kísérlet 17. napját követően a kontroll állatok testtömegének növekedése megtorpant, míg a BPAP kezelt csoportok tovább tudták növelni azt.

A két kísérlet során testtömegek alakulásából egyértelműen megállapítható, hogy bár a szórások viszonylag nagyok voltak a BPAP kezelés gátolta a cachexia kialakulását. A nagy dózis hatása az eredmények alapján jelentősebbnek tűnt a testtömeg megtartása szempontjából.

4.2.2 *A BPAP hatása az egér tüdőtumorra SCID törzsben*

A BPAP hatását SCID egértörzsben is vizsgáltuk, hogy az immunrendszer esetleges szerepét a hatásban felmérjük. Hasonlóan az FVB/N törzsben tapasztalt eredményekhez, a BPAP az immunkompromittált törzsben is tumornövekedés gátló hatást fejtett ki (17. ábra).

A BPAP nagy koncentrációja itt kevésbé bizonyult hatásosnak, azonban még ez is mintegy 30%-os tumortérfogat csökkenést eredményezett. A kis dózis esetében a kísérlet végére már 70%-os gátlás volt látható. Az ábra 'B' részénél a kísérlet végénél kivett tumorok tömegének átlaga került ábrázolásra. Látható, hogy a kis dózissal kezelt állatokban a tumorok mintegy fele akkora tömegűek voltak, mint a kontroll csoportban.



17. ábra: Szubkután tüdő adenokarcinóma növekedése SCID törzsben BPAP kezelés mellett. 'A' rész: tumor térfogatok növekedési görbéje, 'B' rész: tumor tömegek átlaga. Statisztika: * $p < 0,05$ (kis dózis és kontroll között); # $p < 0,05$ (nagy dózis és kontroll között)

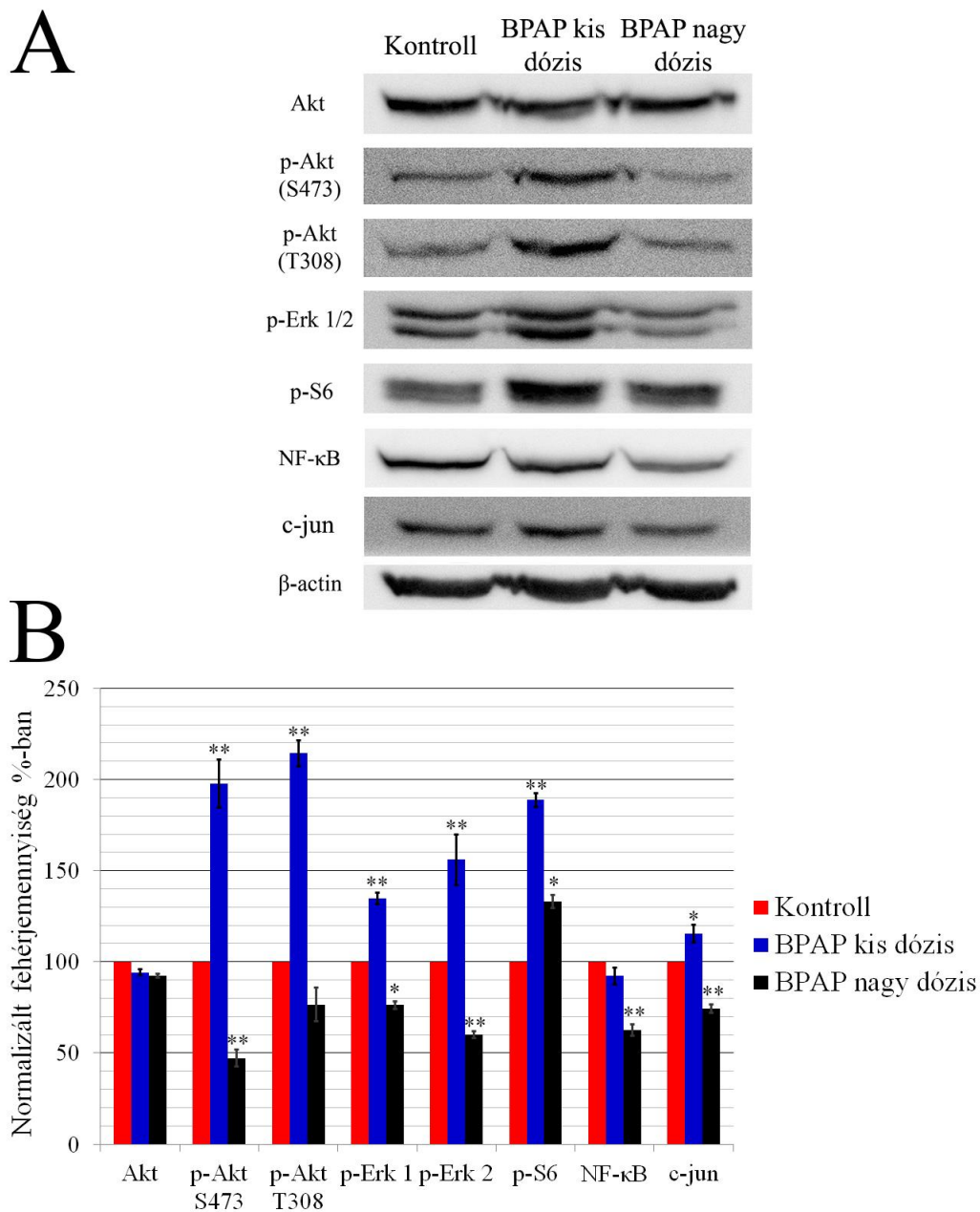
4.2.3 A BPAP hatásának vizsgálata a szubkután tüdő tumor jelátviteli útvonalaira Western blot analízissel

A primer és szubkután tumorokat a normál tüdőszövettel összehasonlító Western blot vizsgálatokból kiderült, hogy milyen jelátviteli útvonalak aktívak a tumorban. A

BPAP kezelés hatásmechanizmusának vizsgálata során ugyanezeket a jelátviteli utakat elemeztük. A kezelést összehasonlító Western blot eredmények a SCID kísérletből származó tumorok jelátviteli változásait mutatják be. A fehérje szintek változásának összehasonlításából kiderült, hogy a BPAP kis és nagy dózisa eltérően hatott a már vizsgált jelátviteli útvonalakra.

A kis dózis a duplájára emelte mindkét p-Akt szintjét, ezzel szemben a BPAP nagy dózisa a p-Akt Ser473-at felére, a p-Akt Thr308-at pedig 75%-ra csökkentette. Ez utóbbi kivételével a különbségek szignifikánsnak bizonyultak. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a p-Erk 1 és 2 esetében a két kezelés következtében. A kis dózisú kezelés 40%-kal, illetve 50%-kal emelte, a nagy dózisú pedig hasonló mértékben csökkentette a fehérje szintjét. A p-Erk összes változása különböző mértékben, de szignifikánsnak bizonyult.

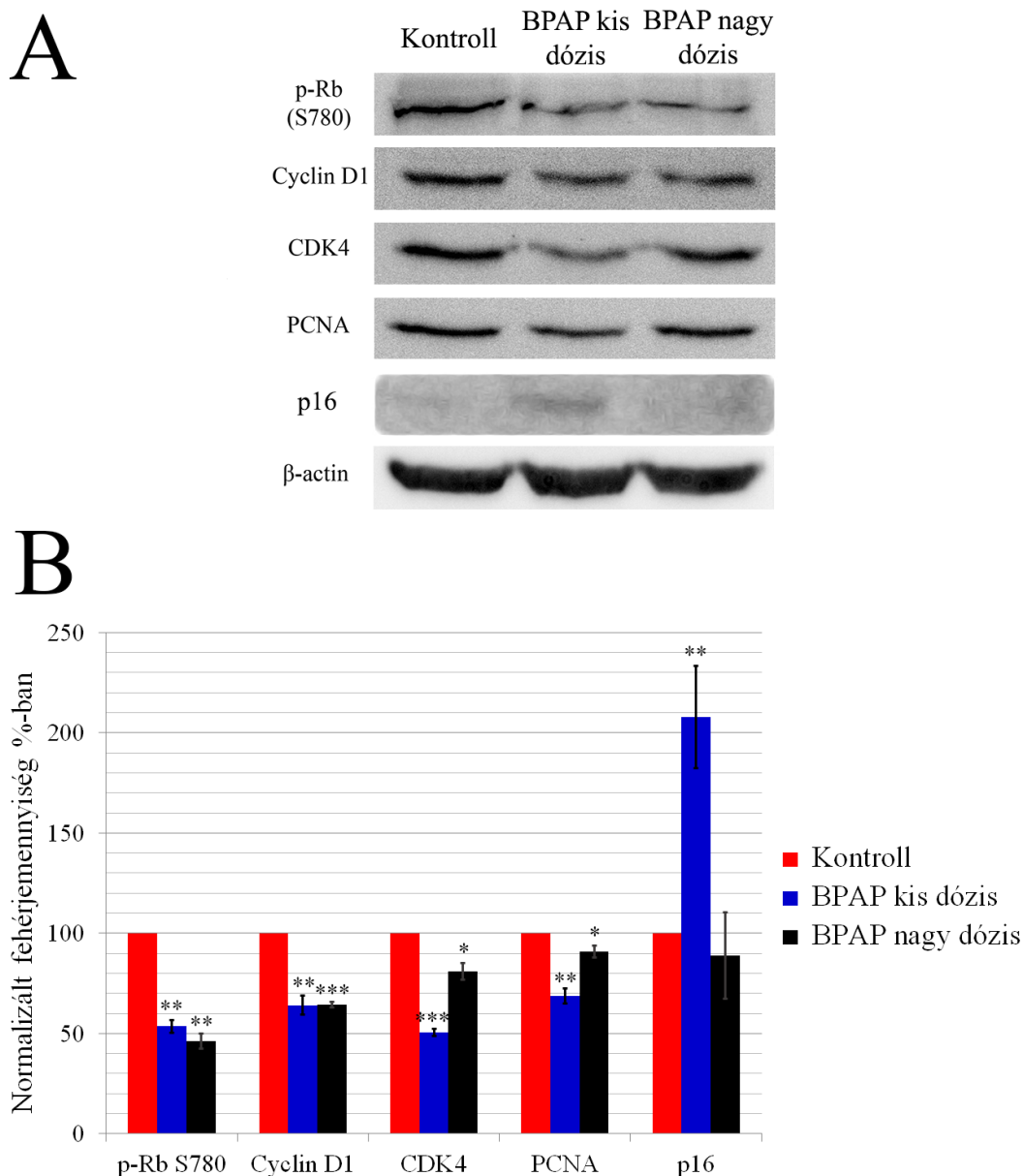
A p-S6 szintjét mind a két kezelés emelte, azonban a nagy dózis csak ~30%-kal, szemben a kis dózis által kiváltott közel 90%-os növekedéssel. Az NF- κ B mennyiségét a BPAP kis dózis 10%-kal, a nagy dózis pedig 40%-kal csökkentette, ez utóbbi különbség szignifikánsnak bizonyult. A c-jun szintjében a kis dózis 15% emelkedést eredményezett a fehérje szintjében, míg a nagy dózis hatására 30%-os csökkenést következett be (18. ábra).



18. ábra: A BPAP hatása a SCID szubkután tüdő tumor jelátviteli útvonalaira. A: Reprezentatív Western blot képek a vizsgált fehérjék mennyiségének változásairól. B: A fehérjék mennyiségi változásai a Western blot eredmények kvantifikálását követően. Statisztika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

A BPAP hatására a G1-S fázis határán is jelentős változások következtek be a szabályozó fehérjék szintjében. A p-Rb Ser780 szintje szinte azonos mértékben, 50%-kal csökkent mind a két dózis hatására. A Cyclin D1 szintje a kis és nagy dózis hatására is közel 40%-kal csökkent.

A CDK4 mennyiségére a kis dózisú kezelés jelentősebb hatással volt, mint a nagy dózis. Előbbi felére csökkentette a szintjét a kontrollban tapasztalt mennyiséghez képest. A nagy dózis ezzel szemben mindössze 20%-os csökkentést ért el. Az S fázis marker PCNA szintjére hasonlóan hatottak a kezelések. A kis dózis 35%-kal, míg a nagy dózis mintegy 10%-kal csökkentette azt (19. ábra). Az eredmények minden esetben szignifikánsnak bizonyultak.



19. ábra: A BPAP hatása az SCID szubkután tüdőtmor sejtciklus fehérjéire. A: Reprezentatív Western blot képek a vizsgált fehérjék mennyiségének változásairól. B: A fehérjék mennyiségi változásai a Western blot eredmények kvantifikálását követően. Statisztika: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

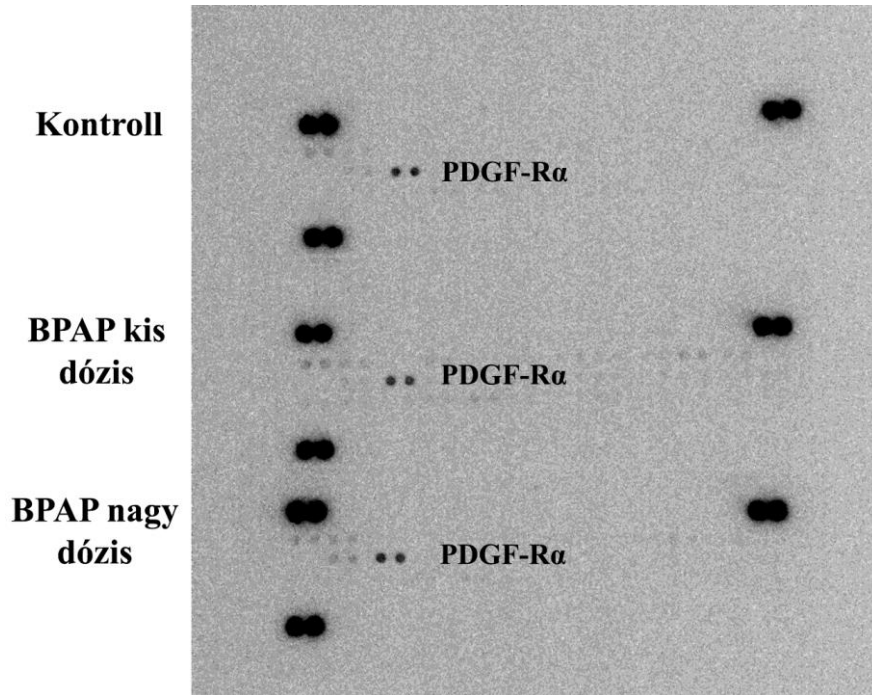
A p16^{INK4} tumorszupresszor fehérje szintje a kis dózissal való kezelés hatására több, mint duplájára emelkedett, míg a nagy dózis nem változtatott számottevően a mennyiségén. Mind a kis dózis a p16^{INK4} esetében és a nagy dózis a c-jun esetében szignifikánsan változtatták az említett fehérjék mennyiségét.

A sejtciklus fehérjéinek vizsgálatából látható, hogy míg a BPAP kis és nagy dózisa eltérően hatottak a jelátviteli útvonalakra (18. ábra), addig a sejtciklusnál már egyértelmű osztódásgátlást eredményeztek.

4.2.4 *A BPAP hatásainak vizsgálata receptor foszfo-tirozin kináz (p-RTK) array segítségével*

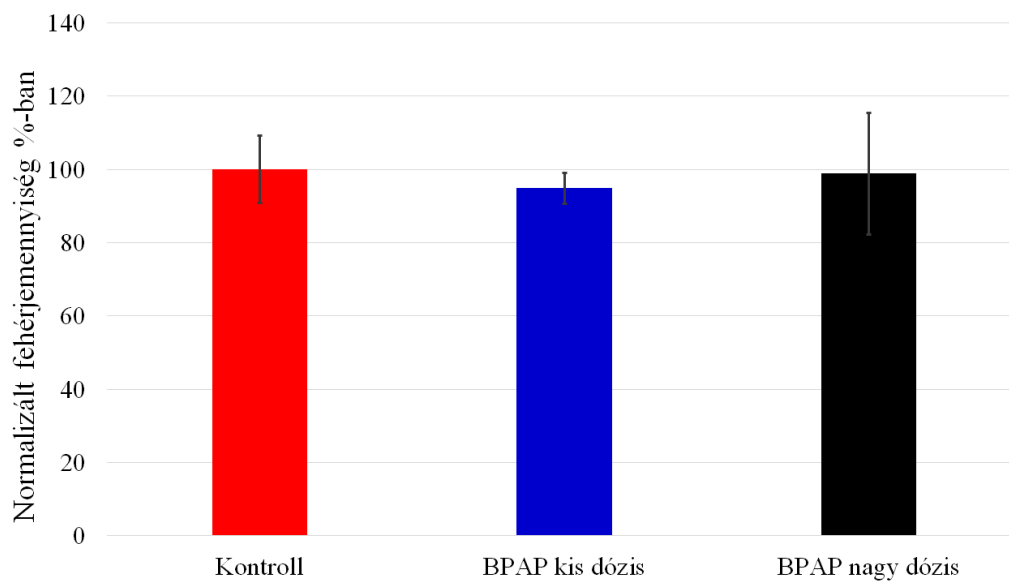
A minták a kísérlethez szintén a SCID törzsben végzett szubkután tüdő tumor BPAP-val való kezeléséből származnak. A kontroll ebben az esetben is fiziológias sóval kezelt csoport volt. A membránokon megjelenő pontok mind a három csoport esetében a trombocita-eredetű növekedési faktor receptor α -t (PDGF-R α) jelölték (20. ábra). Az array képes még detektálni az EGF, Insulin, AXL, HGF, RET, TIE, NGF, VEGF, MuSK és Eph receptor családok tagjait. A membránok bal felső és alsó, illetve jobb felső sarkaiban a kontroll pontok láthatóak, amik a kísérlet sikerességét jelzik, illetve a membrán orientációját.

Mind a három csoportban megfigyelhető az EGFR és az ErbB2 aktivitása, azonban szintjükben jelentős különbség nincs. Ezen kívül a kis és nagy dózisoknál enyhe aktivitás megfigyelhető az Axl és Dtk fehérjéknél, azonban ez nagyságrendekkel elmarad a PDGF-R α szintjétől.



20. ábra: A *p*-RTK array-vel kapott eredmények kiértékelése. Az egyedüli aktív receptornak a PDGFR α bizonyult, melynek mennyisége a BPAP hatására nem változott.

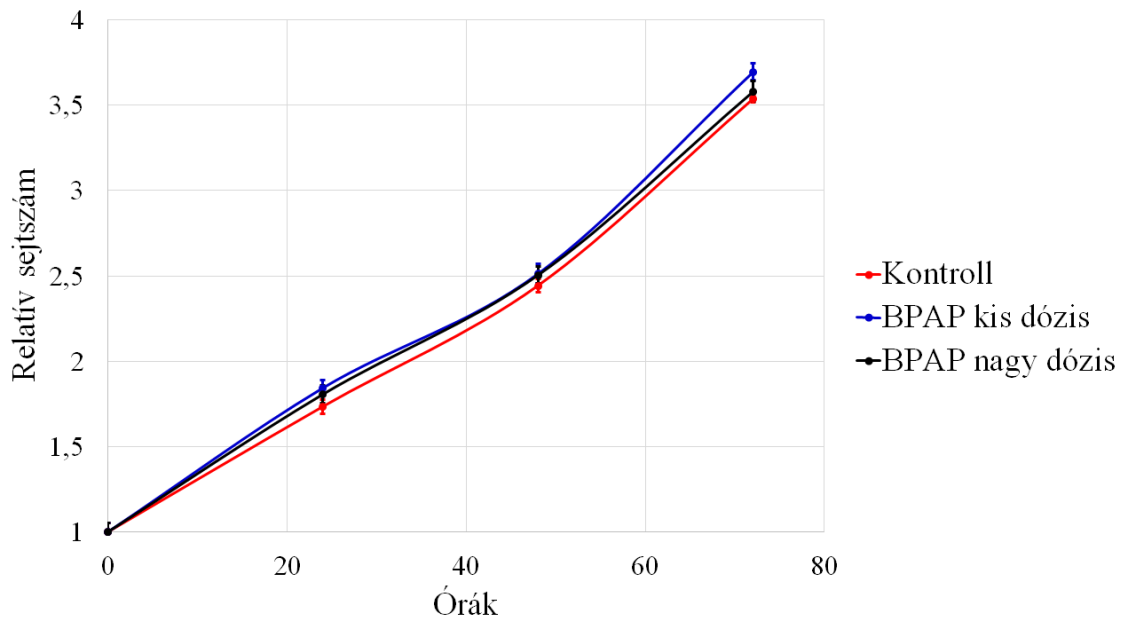
A PDGF-R α pontjait egyenként denzitometráltuk és a csoportonkénti átlagolást követően összehasonlítottuk. Nem figyelhető meg szignifikáns változás a receptor szintjében a kezelés hatására a kontrollhoz viszonyítva (21. ábra).



21. ábra: A PDGF-R α változásának összehasonlítása a kezelési csoportokban

4.2.5 A BPAP hatásának vizsgálata szövettenyészetben

Az SRB proliferációs assay kísérlet során a BPAP nem mutatott hatást a H358 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonal proliferációjára (22. ábra). Mivel a BPAP pontos koncentrációja nem ismert a vérplazmában, ezért hatását egy adott koncentrációtartományban vizsgáltuk. Bár a kezelési dózisok csak közelítőek voltak, valószínűsíthető, hogy valamilyen gátló hatás megjelent volna a sejtproliferációs assay-val, ha a BPAP közvetlenül hatna a sejtekre. Ennek hiányában feltételezhető, hogy az állatkísérletekben tapasztalt hatás nem a sejtekre direkt hatásként jelenik meg, hanem más úton alakul ki.

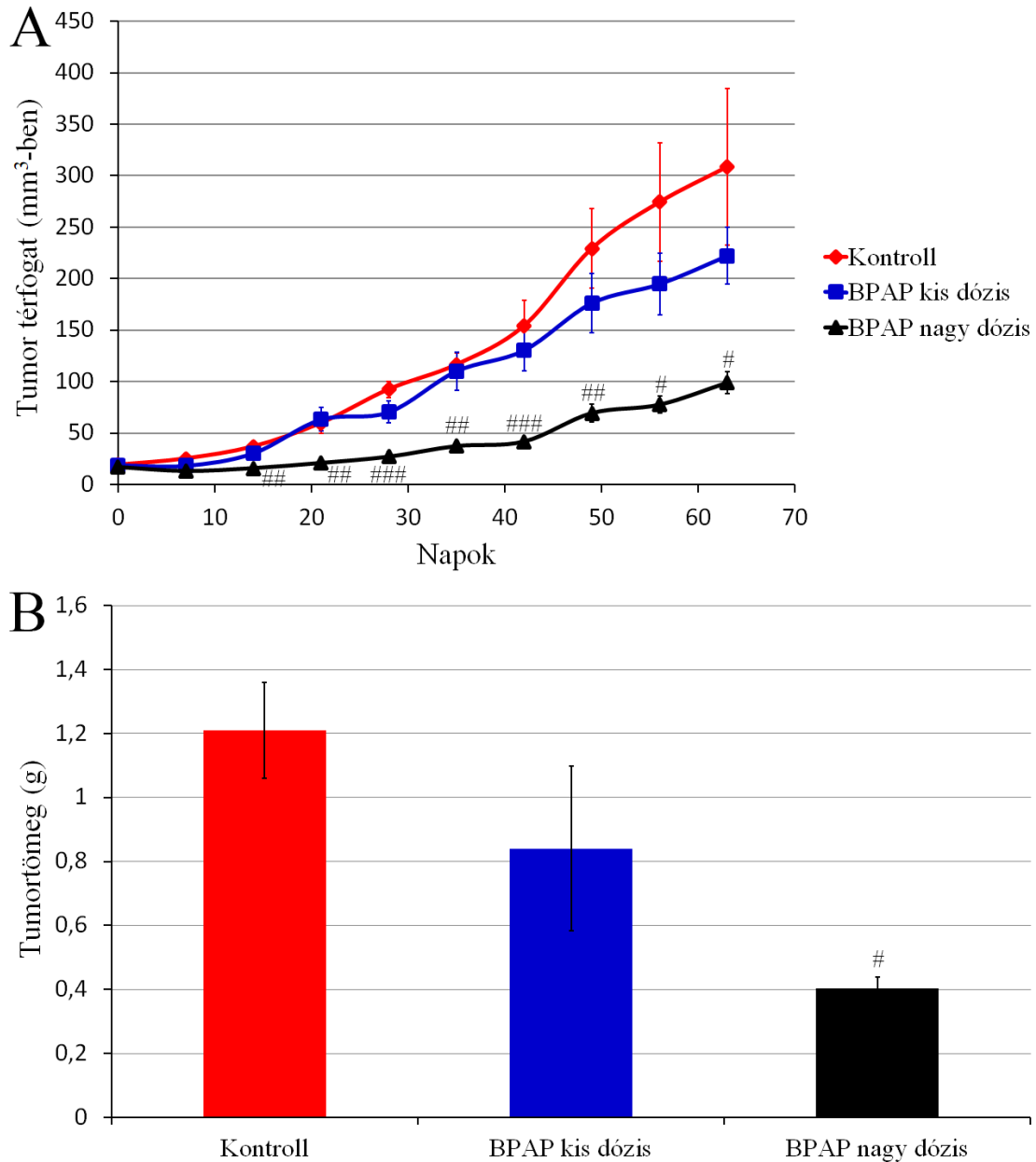


22. ábra: A BPAP hatása a H358 sejtvonal proliferációjára *in vitro* körülmények között

4.2.6 A BPAP hatása a H358 humán tüdő adenokarcinóma xenograft modellben SCID egértörzsben

A BPAP kis dózisa a kísérlet 40. napjáig nem mutatott gátlást a tumor növekedésére a kontroll csoporthoz képest. Ezt követően viszont viszonylag gyenge, nem szignifikáns hatás megfigyelhető a H358 tumor proliferációjára. A kísérlet végére ez a

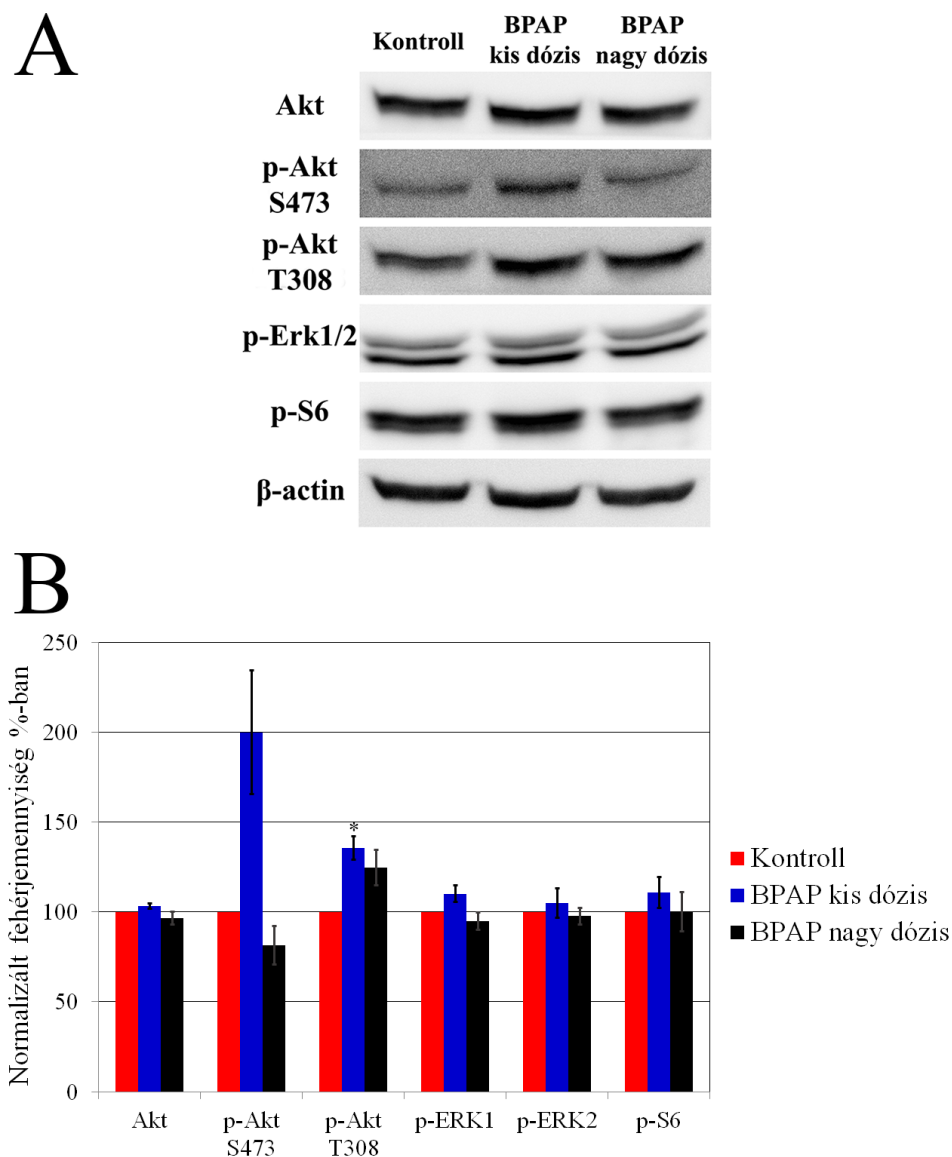
gátlás ~30%-os térfogatkülönbséget eredményezett a kontroll állatok tumorjához képest. A BPAP nagy dózisa azonban az egész kísérlet során sokkal jelentősebb gátlást mutatott, mely már a kísérlet kezdetétől jelen volt. Termináláskor ezek a tumorok ~65%-kal voltak kisebbek a kontroll csoport tumorjaihoz viszonyítva (23. ábra). A nagy dózis hatása szignifikánsnak mutatkozott.



23. ábra: A BPAP hatása a H358 humán tüdőtumorkok növekedésére szubkután xenograft modellben. A: A tüdőtumorkok térfogatának növekedése a kísérlet során. B: Tüdőtumorkok tömege a kísérlet terminálásakor. Statisztika: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$

4.2.7 *A BPAP hatásának vizsgálata a H358 humán tüdő adenokarcinóma szubkután xenograft modell jelátviteli folyamataira Western blot-tal*

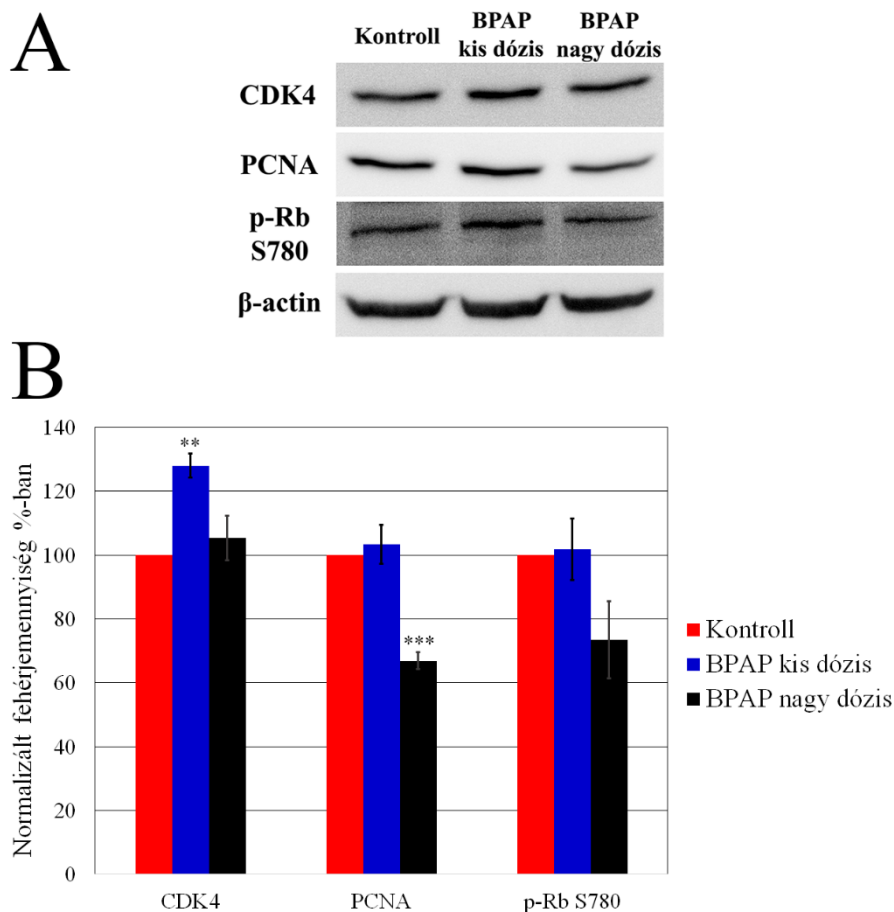
A jelátviteli útvonalak elemzése a BPAP kezelt H358 tumor esetében nem vezetett olyan eredményre, mint az egér tüdődaganat esetében. Ugyanazokat a jelátviteli utakat vizsgáltuk, mint a korábbi kísérletek esetében. A p-Erk1/2 és a p-S6 szintjében nem következtek be számottevő, szignifikáns változások (24. ábra).



24. ábra: A BPAP hatása a H358 humán szubkután xenograft modelljelátviteli útvonalaira. A: Reprerzentatív Western blot képek a vizsgált fehérjék mennyiségének változásairól. B: A fehérjék mennyiségi változásai a Western blot eredmények kvantifikálását követően. Statisztika: * $p < 0,05$

A kis dózissal való kezelés hatását mind a két p-Akt szintje nőtt. A Ser473-on foszforilált a kontrollban lévő mennyiség kétszeresére, míg a Thr308-as változat mintegy 40%-kal emelkedett, azonban a szórásadatok miatt szignifikánsnak csak ez utóbbi bizonyult. A nagy dózis nem okozott szignifikáns változást egyik esetben sem. A Ser473-as Akt-ot enyhén csökkentette, a Thr308-at pedig gyengén emelte.

A nagy dózis nem változtatott a CDK4 szintjén, a kis dózis azonban még emelte is azt közel 30%-kal, ami szignifikánsnak bizonyult. A PCNA szintjét a nagy dózis 35%-kal csökkentette. A kis dózis nem okozott változást a szintjében. A nagy dózis a PCNA-hoz hasonló mértékben csökkentette a p-Rb S780 szintjét, vagyis emelte az aktív Rb mennyiségét, a kis dózis azonban itt sem okozott számottevő változást (25. ábra).



25. ábra: A BPAP hatása a H358 humán szubkután xenograft modell sejtciklus fehérjeire. A: Reprezentatív Western blot képek a vizsgált fehérjék mennyiségének változásairól. B: A fehérjék mennyiségi változásai a Western blot eredmények kvantifikálását követően. Statisztika: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

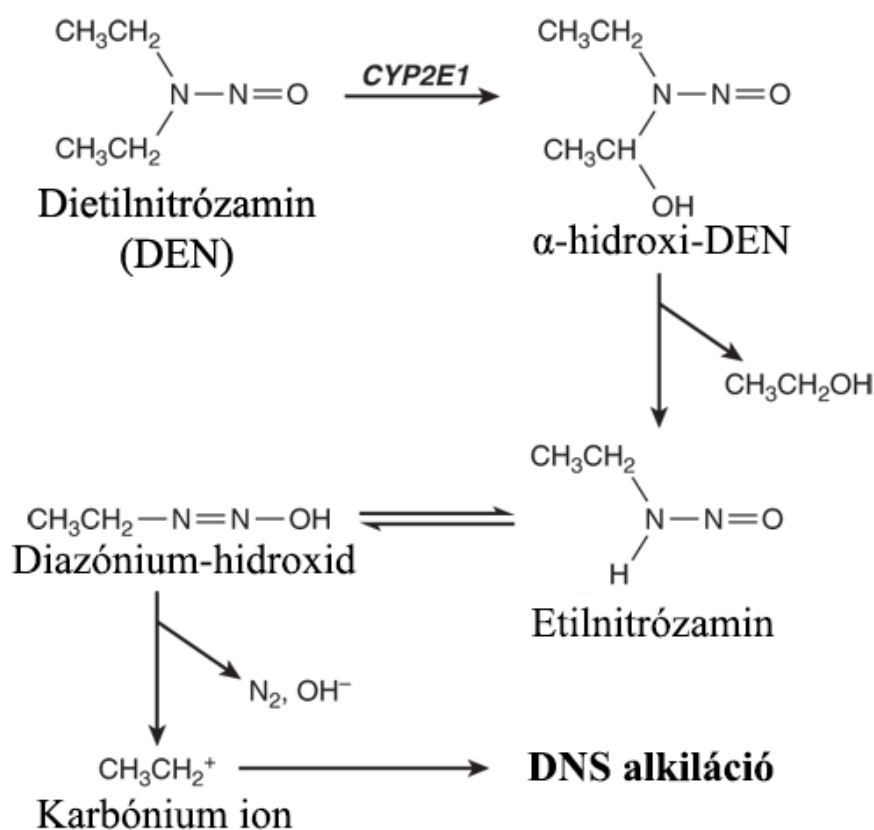
5 Megbeszélés

Munkánk során az első lépés a DEN indukálta tüdő tumor jellemzése volt. Kérdés volt a daganat szövettani típusa, a fő adenokarcinómákra jellemző „driver” mutációk megléte vagy hiánya és az aktív jelátviteli útvonalainak megismerése. Ezt követően a BPAP hatását vizsgáltuk a tüdő tumor modellünkben az FVB/N és a SCID törzsekben, illetve teszteltük a megismert jelátviteli útvonalak változásait. Végül megnéztük, hogy milyen hatással van a BPAP egy humán tüdő adenokarcinóma sejt vonalra *in vitro* és *in vivo* körülmények között.

5.1 Az FVB/N egértörzs tüdő adenokarcinóma modelljének karakterizálása

A DEN az állatkísérletekben régóta és széleskörűen használt májkarcinogén [102, 103]. Már egyszeri alkalmazás után képes a kísérleti állatban adott időn belül májtumort létrehozni. Hatásmechanizmusáról elmondható, hogy a citokróm P450 (CYP450) enzimek általi bioaktivációja után több lépésben, erős alkiláló vegyületté alakul, ami adduktot képez a DNS-el és ez direkt karcinogén hatást eredményez (26. ábra) [104]. A CYP450 egy enzimes család melynek több típusa expresszálódik a szervezetben. Legjellemzőbb előfordulási helyük a máj, de bizonyos típusai a vesében, bőrben, tüdőben is előfordulnak. Fő feladatuk a xenobiotikumok metabolizmusában van és ezzel a szervezet számára idegen anyagokat alakítják át oly módon, hogy azok kiüríthetőek legyenek [105]. Mivel a metabolizáció fő szerve a máj, ezért kérdés, hogy miért a tüdőben jelent meg az FVB/N törzsben a daganat.

Egyes esetekben megfigyelték, hogy a nitrózamin vegyületek képesek tüdő tumor is indukálni elsősorban olyan törzsekben, ahol a tüdő tumorok spontán előfordulása magasabb, mint más daganatoké [106-108]. Az irodalomban az A/J egértörzsben a DEN-t 50 mg/kg koncentrációban alkalmazták tüdő tumor létrehozásához. A mi modellünkben ezzel szemben csak 15 mg/kg-ot használtunk. Két különböző egértörzsben a DEN két eltérő dózisa is nagyszámú tüdő tumorhoz vezetett, míg a májtumorok megjelenése elmaradt, vagy csak minimális volt.



26. ábra: A DEN metabolizmusa és a karcinogenezis indukálásának mechanizmusa [109]

Az FVB/N egértörzsben kialakult tüdő tumor karakterizálásáról elmondható, hogy a hematoxin-eozin festés alátámasztotta az adenokarcinóma szövettani típusát, melyet az immunhisztokémiában használt CK7 és TTF1 markerekkel is bizonyítottuk (9-10. ábra). Ezek a diagnosztikában is gyakran alkalmazott markerei a tüdő adenokarcinómáknak [21, 22]. Ezzel sikerült bizonyítani, hogy a létrehozott tüdő tumor a leggyakrabban előforduló, adenokarcinóma típusba tartozik. Ennek tisztázását követően megkezdhetjük a tumor mutáció analízisét ismerve a klinikumban leggyakrabban előforduló molekuláris változásokat ebben a daganattípusban (3. ábra).

A már említett A/J egértörzsben a DEN 50 mg/kg-os dózis hatására a tüdő tumorok 80%-ában a KRAS gén mutáns volt [108]. Saját kísérleteinkben az FVB/N törzsben a 15 mg/kg DEN-nel indukált tüdő tumorok egyikében sem találtunk EGFR vagy KRAS mutációt. Humán adatokból tudjuk, hogy a tüdő adenokarcinómákban jellemzően az EGFR az esetek 15-45%-ban hordoz mutációt (hazánkban 10%-ban) míg a KRAS

esetében ez 20%-30% körüli érték, azonban ezek a számok függenek a vizsgált földrajzi régiótól és olyan rizikó faktoroktól, mint például a dohányzás [110]. Ezek a mutációs adatok az EGFR és KRAS génekben arra utalhatnak, hogy az irodalomban vizsgált A/J egértörzsben a nagyobb dózisnak köszönhetően alakultak ki a mutációk, de magyarázatként szolgálhat az a tény is, hogy az két törzs eltérő genetikai háttere miatt eltérő mértékben hajlamos a KRAS mutációra. A nitrózaminok dóziszfüggő mutáció kialakító hatását más egértörzs RAS génjében már megfigyelték [111]. Rendelkezésre áll azonban olyan irodalmi adat is az A/J törzsen, ami nem talált számottevő különbséget a mutáció gyakoriságában a spontán és a karcinogén anyag hatására [112].

Az FVB/N egértörzs élettartam vizsgálatokból jól ismert, és az előforduló daganatos megbetegedések szempontjából részletesen jellemzett. A tüdőtumorra való fogékonysága jelentősen magasabb, mint bármelyik másik tumorra, azonban mindemellett a májtumorok incidenciája viszonylag ritka az esetükben [98]. Ez magyarázatul szolgálhat arra a megfigyelésünkre, hogy a DEN miért hozott létre sokkal több tüdőtumort. A DEN felerősítheti az eleve magas tüdőtumorra való fogékonyságot, így gyorsítva a daganatképződés folyamatát [107].

A DEN-nel indukált tüdő adenokarcinóma modellünknek azért is nagy a jelentősége, mert a tüdőrák az egyik legmagasabb reprezentált daganatos megbetegedés, így kutatása is intenzíven folyik. Egy jó állatkísérleti modell hasznos eszközként szolgálhat a további kutatásokhoz [19]. *In vitro* kísérletekhez sokféle tüdőtumor sejtvonal elérhető, de az *in vivo* vizsgálatokhoz a lehetőségek korlátozottak, jóllehet sokkal jobb közelítést ad egy vegyület emberben várható hatásáról, ha élő szervezetben vizsgálják.

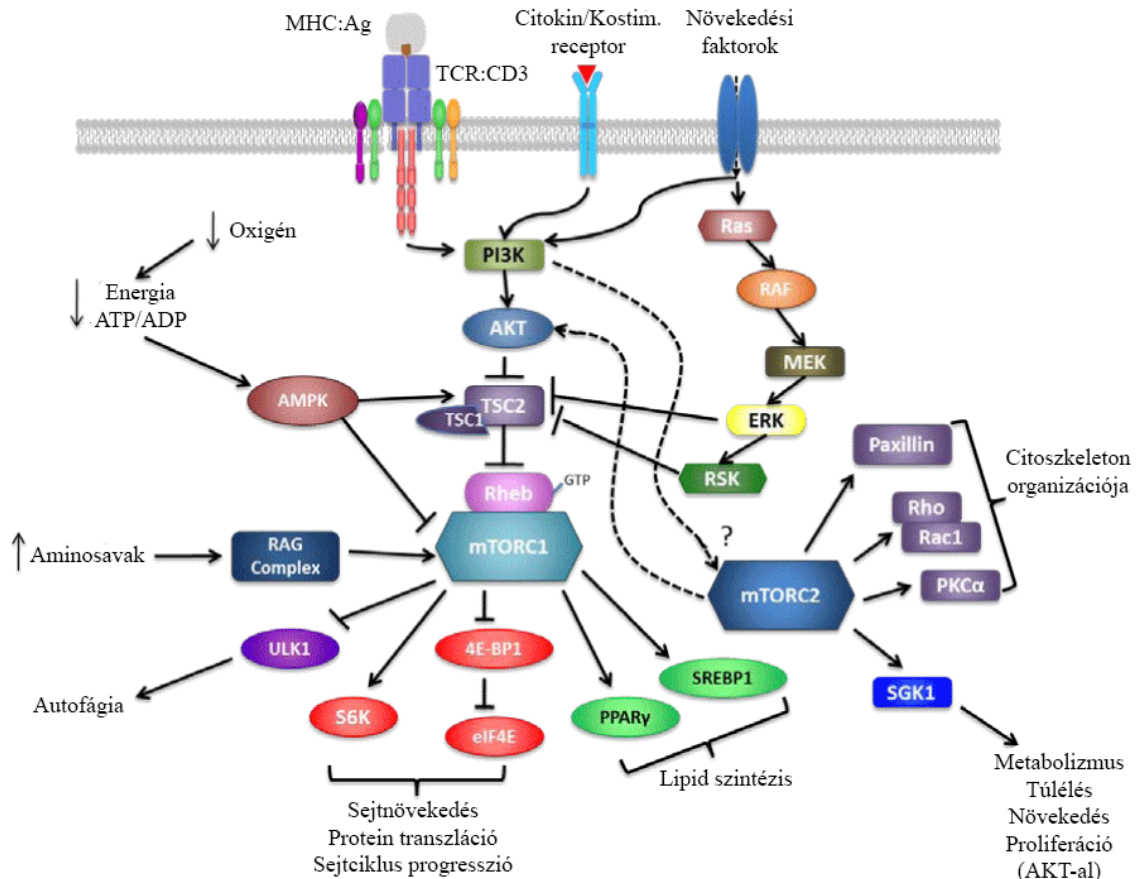
Egérben tüdőtumor létrehozására alkalmas módszerek közé tartozik a Jaaksiegte retrovírussal való daganatindukció, azonban ez csak immunhiányos egerekben működik [113]. Benzopirénnel és 4-(metilnitrózamin)-1-(3-piridil)-1-butanonnal is sikerrel indukáltak már tüdődaganatot néhány egértörzsben [106]. Cre-rekombináz alkalmazásával létrehozott tumor modell is megtalálható az irodalomban, azonban módszertanilag bonyolult technikáról van szó [107]. A DEN-nel történő karcinogenezis az FVB/N törzs esetében egy könnyen reprodukálható és egyszerű módja a tüdőtumor létrehozásának. További haszna lehet a módszernek, hogy eredményeink alapján a KRAS exon 2 és EGFR exon 19 és 21-et nem érintő karcinogenezissel alakul ki tüdő

adenokarcinóma. Ez valószínűleg az egértörzs genetikai hátterének, illetve az alacsony DEN dózisonak köszönhető.

A tumor szövettani típusának karakterizálása után fontos volt a sejtben zajló jelátvitelt is megismerni, ami egyrészt részletesebb képet ad a tumorvonal tulajdonságairól, másrészt segít értelmezni a későbbi kezelés hatásait. A karakterizálást az mTOR fehérjéhez kapcsolódó hálózattal kezdtük, mivel ez központi szerepet játszik a sejtek életében és az adenokarcinómában nagy jelentőségű EGFR/KRAS tengellyel is összeköttetésben áll.

Aktiválódása több jelátviteli út felől is megtörténhet, jellemzően például az Akt és az Erk felől, melyek olyan foszforilációs kaszkád részei, amik a sejtmembrán receptorok felől érkező jelet továbbítják a sejtmag felé [114]. Az mTOR az mTORC1 és C2 komplexekben tölti be funkcióját. A C1-es komplex aktiválódhat az Erk útvonal felől vagy a p-Akt Thr308 által. Ezzel párhuzamosan kevésbé ismert mechanizmusok révén a C2-es komplex aktiválódás is megtörténik, ami foszforálja az Akt-ot a Ser473-as pozícióban [115]. Ezzel az Akt teljes aktivitást ér el és további aktiváló hatást fejt ki a C1-re, ezzel egy visszacsatolást generálva a kaszkádban (27. ábra).

Az egér tüdő tumor karakterizálásában azért is választottuk az mTOR útvonalat, mert ez a jelátvitel fontos szerepet játszik a tüdő tumorokban. Mind az Erk útvonal az EGFR és a KRAS miatt, mind pedig az Akt nagymértékű aktiválódása megfigyelhető a tüdő daganatokban [99].



27. ábra: Az mTOR jelátviteli útvonala, a hozzá kapcsolódó főbb fehérjék és azok hatásai [114]

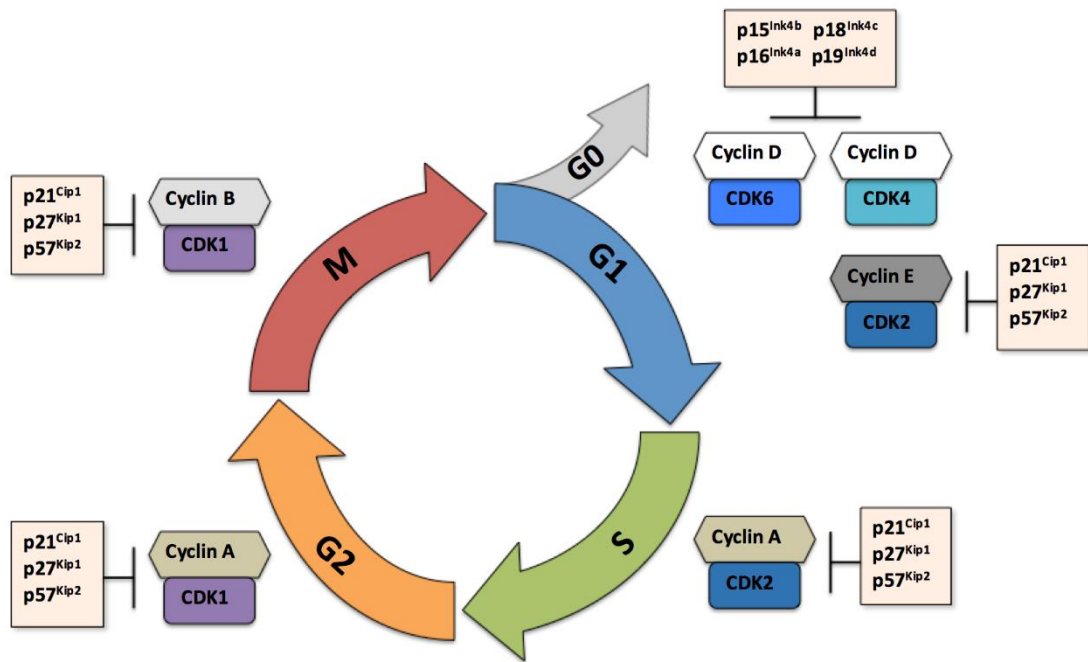
Az mTOR-nak az aktiválódást követően szerteágazó hatása érvényesül. Serkenti a sejtnövekedést, fehérjeszintézist, sejtciklus progressziót. Hatással van a sejt túlélésére, metabolizmusára, lipidszintézisére és a citoszkeleton formálódására (27. ábra) [114]. Hatásainak összességét tekintve a sejtek túlélését és osztódását segíti.

A DEN indukálta tumor mintákban a p-S6 megemelkedett mennyisége magas mTOR aktivitásra utal, ami erős proliferációs szignált jelent a sejt számára és a túlélést segíti [116]. Ezzel szemben mind a két p-Akt szintje csökkent a szubkután fenntartott tumorban, míg a primer tumorban csak a p-Akt Ser473 mennyisége csökkent. Ennek magában egy osztódást csökkentő hatást kellene eredményeznie, azonban a szubkután daganatokban megemelkedett Erk aktivitás okozhatja az mTOR jelátvitel aktiválódását is [117, 118]. A primer tumorban ezzel szemben nem változott számottevően a p-Erk szintje, csak a p-Akt S473 mutat aktivitás növekedést. Ez azonban kevésbé magyarázza

az mTOR ilyen mértékű aktiválódását. Feltételezhetően más jelátviteli útnak is szerepe lehet ebben a daganatban. Jóllehet erre a tumorra az Akt aktivitásának a csökkenése jellemző, azonban az eredményekből az látszik, hogy mégis magas az mTOR útvonal aktivitása.

A mTOR jelentette proliferációs stimulus egy folyamatosan működő sejtciklust eredményez. Ezek a változások jól megfigyelhetők a primer és szubkután tumorok mintáin az ép tüdőszövethez viszonyítva. A CDK4 és a PCNA szintje a tumorokban a kontroll szövethez viszonyítva sokszorosára emelkedett. A CDK4 a G1 fázis során a CDK6-al és Cyclin D-vel együtt biztosítja a sejt számára az S fázisba történő átlépést, míg a PCNA S fázis markerként jelzi a sejtciklus aktivitás mértékét, vagyis hogy a sejtek milyen arányban jutottak túl a G1/S restrikciós ponton (28. ábra) [101, 119]. Látható, hogy jelentősen nőtt a sejtciklus aktivitása, illetve az is, hogy a szubkután daganatban jelentősen aktívabb a sejtciklus, ami illik ahhoz a megfigyeléshez, hogy ez a daganat pár átoltást követően agresszívabban növekedett, mint ami a korai szubkután oltást követően volt megfigyelhető.

A p-Rb Ser780 ugyanezt a változást szemlélteti. A CDK-k által foszforilációval inaktivált Rb szintje jelentősen megnőtt a primer tumorban, azonban a szubkután mintában mennyisége visszaesett a normál szövetben megfigyelt szintre. Ez magyarázható egy esetleges hiperfoszforiláció miatti megnövekedett lebomlással [120]. Az is feltételezhető, hogy a többszöri átoltást és a primer tumorhoz képest agresszívabb fenotípussal rendelkező szubkután tumorban a Rb génje deléciós mutáció következtében elveszett, ezért a fehérje nem expresszálódik, ami egy szintén gyakori jelenség a tumorok között [121-123].



28. ábra: A sejtciklus fázisai, a CDK-Cyclin komplexek és a szupresszor fehérjék áttekintése (forrás: <http://www.cubocube.com/dashboard.php?a=1642&b=1691&c=1>)

A primer és a szubkután allograft tumor molekuláris összehasonlításából látható, hogy a tumor idővel változott. Megjelent az Erk túlműködése és a PCNA magasabb szintje is gyorsabb osztódást feltételez. A p-Rb eltűnése is a lebomlását, vagy delécióját feltételezi, ami szintén a túlzott osztódást támaszthatja alá. A daganat fenotípusának változását ezek a változások molekuláris szinten is igazolják. A szubkután tumort intenzívebb osztódás jellemezte, mint a primer tumor, mely az állatkísérletekre így alkalmasabbá tette [124]. Elképzelhető, hogy történt egy grade váltás a szubkután allograft esetében, amit a megfigyelések és molekuláris változások alátámasztani látszanak.

5.2 A BPAP hatásai az egér tüdő adenokarcinóma modellre FVB/N és SCID törzsben

Az FVB/N egértörzsben a BPAP eredményesen gátolta a szubkután allograft tumor növekedését (14. és 15. ábra). A tumor térfogatra gyakorolt hatást tekintve a két kezelési dózis között nem látható jelentős különbség. Az első kísérletnél jóval nagyobb tumorok (5 mm-es átmérőjű) kerültek beoltásra az állatokba, ezért a túlélésben jelentős különbség nem mutatkozott, azonban a tumortérfogat növekedésének különbsége jól látható a kezelt és a kontroll csoportok között. A második kísérletnél már kisebb tumorok (3 mm-es átmérőjű) lettek az egereknek szubkután beültetve, így a túlélési különbség is jobban megfigyelhető a kezelt csoportok javára.

A két kezelési koncentráció hatása között látszólag nem mutatkozik jelentős különbség, azonban molekulárisan megfigyelhető, hogy a jelátviteli útvonalak tekintetében a két dózis hatása eltérő. A DEN indukálta tüdődaganat jellemzése alapján vizsgáltuk a BPAP hatását a jelátviteli utakra. Az Akt útvonalnak jelentős szerepe van a tüdőtumorkban és mint kiderült, ez a DEN kezelésre létrejött FVB/N egér tüdőtumorkban is megfigyelhető [99].

A p-Akt Ser473/Thr308-ra és p-Erk 1 és 2-re gyakorolt hatások tekintetében a kis és a nagy kezelési dózis ellentétesen hatott. Míg a nagy koncentráció mindegyik esetben gátló hatást eredményezett, addig a kis dózis emelte a fehérjék aktivitási szintjét. Az utóbbi esetben ezekből a változásokból egy markáns sejtproliferációnak kellene következnie, míg a nagy dózis egy egyértelmű osztódást gátló hatást fejt ki. A sejtciklus fehérjék vizsgálatából azonban kiderül, hogy mind a két dózissal való kezelés esetében egy G1 fázis blokk alakul ki, ami egy osztódás gátlást eredményez és így összhangban a tumortérfogatok alakulásával.

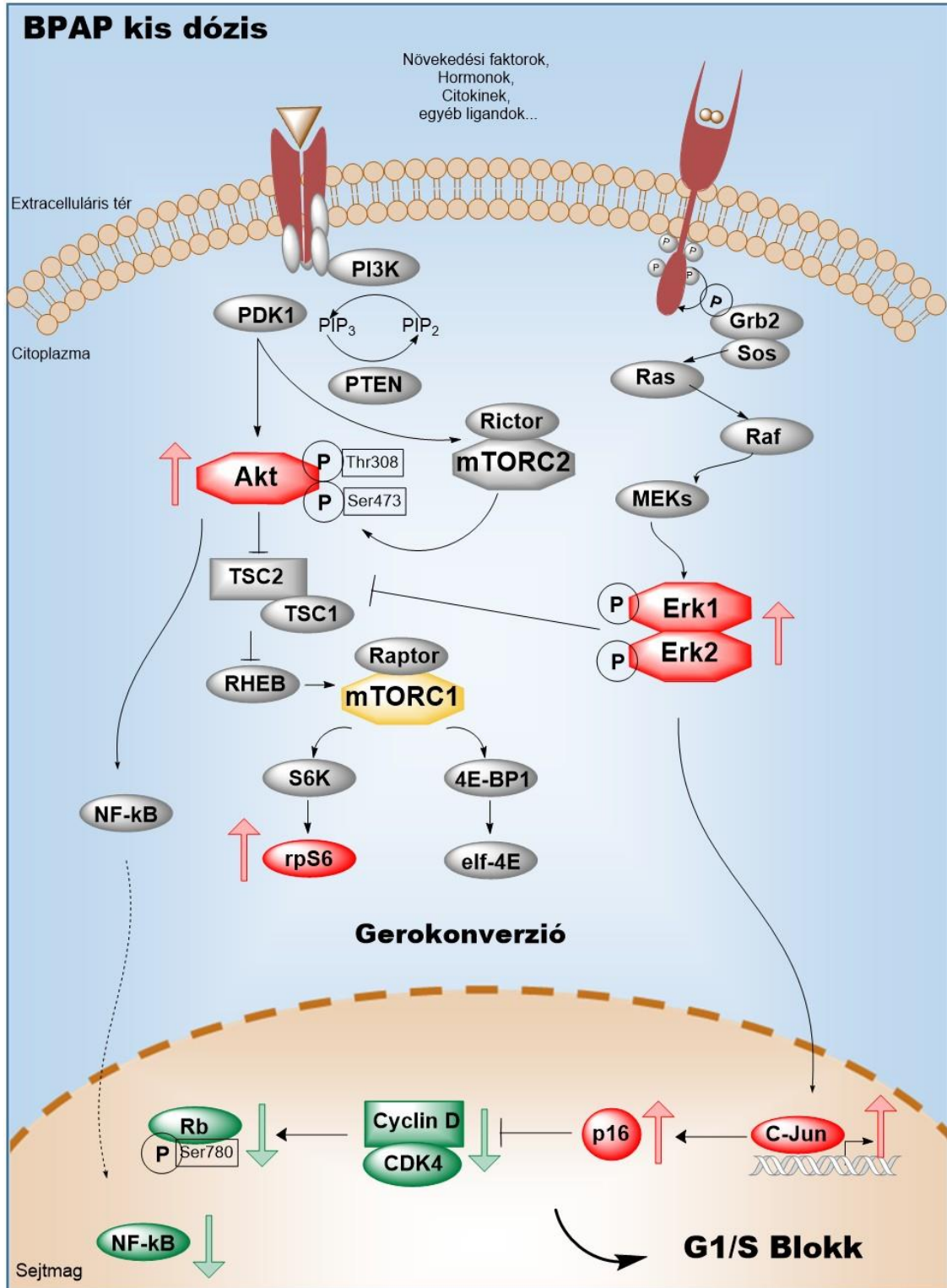
A kis dózis hasonló mértékben csökkentette a p-Rb S780 és a Cyclin D1 szintjét, mint a nagy dózis, illetve a CDK4 és PCNA szintjét még nagyobb mértékben. Eszerint a sejtciklus G1 fázisának fő hajtóelemei, a Cyclin D1 és a CDK4 szignifikánsan lecsökkentek a BPAP kezelés hatására, az osztódásgátló Rb pedig nagymértékben aktiválódott, ahogy a foszforiláltsága lecsökkent. Ezeket a változásokat az S fázis marker PCNA szintjében közvetve le is lehet követni.

A c-jun szintjét mind a két dózis szignifikánsan változtatta meg. A c-jun egy onkogén, ami a sejtciklus G1 fázison való átlépéséért felel [125]. Szintje jellemzően

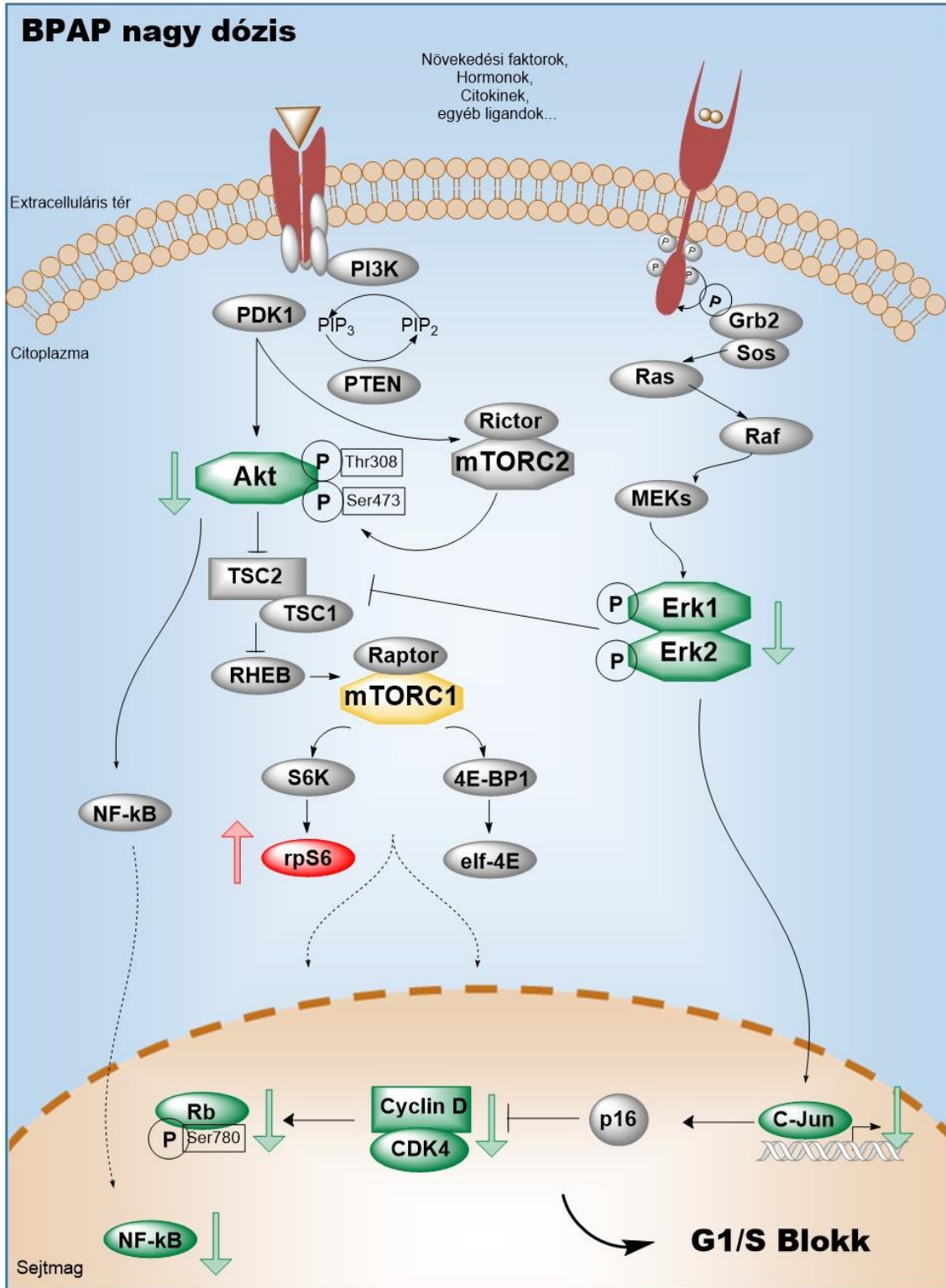
magas a tüdődaganatokban, ahol az NSCLC-ben a tumorok ~30%-ban fordul elő túlzottan nagy mennyiségben. Ezzel szemben a légutak normál szövetében nem találtak kimutatható mennyiségben [126]. A BPAP nagy dózisa csökkentette a szintjét, ami összhangban van ennek a kezelésnek a többi hatásával. A kis dózis ezzel szemben azonban szignifikáns módon emelte a mennyiségét, ami összhangban van az Akt és Erk fehérjékre kifejtett aktiváló hatással.

Az eredő hatást tekintve mind a két kezelési koncentráció hasonló volt, azonban a jelátviteli utakra gyakorolt hatásukat tekintve ellentétes változásokat okoztak. A p-S6 szintjét és ezzel az mTOR aktivitását a kis dózis sokkal jobban megemelte, mint a nagy dózis. Ez összefüggésben lehet azzal, hogy a kis dózis az Akt és Erk jelátvitelre is serkentő hatással volt, így ezek az utak erősítették az mTOR aktiválódását [117]. A nagy dózis mTOR aktivitás növelő hatására az eredményekből nehéz választ találni. Az mTOR központi szerepet játszik a sejt jelátvitelében és sok jelátviteli pályával áll kapcsolatban, ezért ez az enyhe emelkedés jöhet más, nem vizsgált útvonalról egy esetleges kompenzáló mechanizmusként [127, 128].

Ebből következően a BPAP két kezelési koncentrációja eltérő mechanizmussal hathat. A nagy dózisonak egyértelmű gátló hatása van a jelátviteli utakra, ezzel szemben a kis dózis furcsamód, de emeli ezeknek az utaknak az aktivitását. Végeredményben azonban mind a két koncentráció a G1/S restrikciós ponton lévő sejtciklus blokkot hoz létre. A két kezelési dózis hatásait a 29. és 30. ábrák foglalják össze. A továbbiakban megpróbálunk magyarázatot találni a kis dózis ennyire eltérő hatásaira, amire a gerokonverzió jelensége szolgálhat segítségként.



29. ábra: A BPAP kis dózisának hatása az egér tüdő tumor jelátviteli útvonalaira a Western blot eredmények alapján összegezve. A kis dózisú BPAP az Akt/mTOR, valamint az Erk1/2 útvonalak stimulálásával a c-jun és p16^{INK4} fehérjéken keresztül gerokonverziót indukál, mely a sejt proliferációját blokkolja.



30. ábra: A BPAP nagy dózisának hatása az egér tüdő-tumor jelátviteli útvonalaira a Western blot eredmények alapján összegezve. A nagy dózisú BPAP a fő jelátviteli útvonalak gátlásán keresztül konvencionális sejtciklus blokkhoz vezet.

A kis dózisa adott ellentmondásos molekuláris változások háttérben a gerokonverzió jelensége állhat. A gerokonverzió egyfajta sejtnövekedés, ami sejtciklus blokk alatt következik be, vagyis a növekedési szignálok mellett sem történik meg a sejtosztódás. A gerokonverziót olyan növekedés serkentő és tápanyagérzékeny mechanizmusok idézik elő, mint amilyen az mTOR is [129].

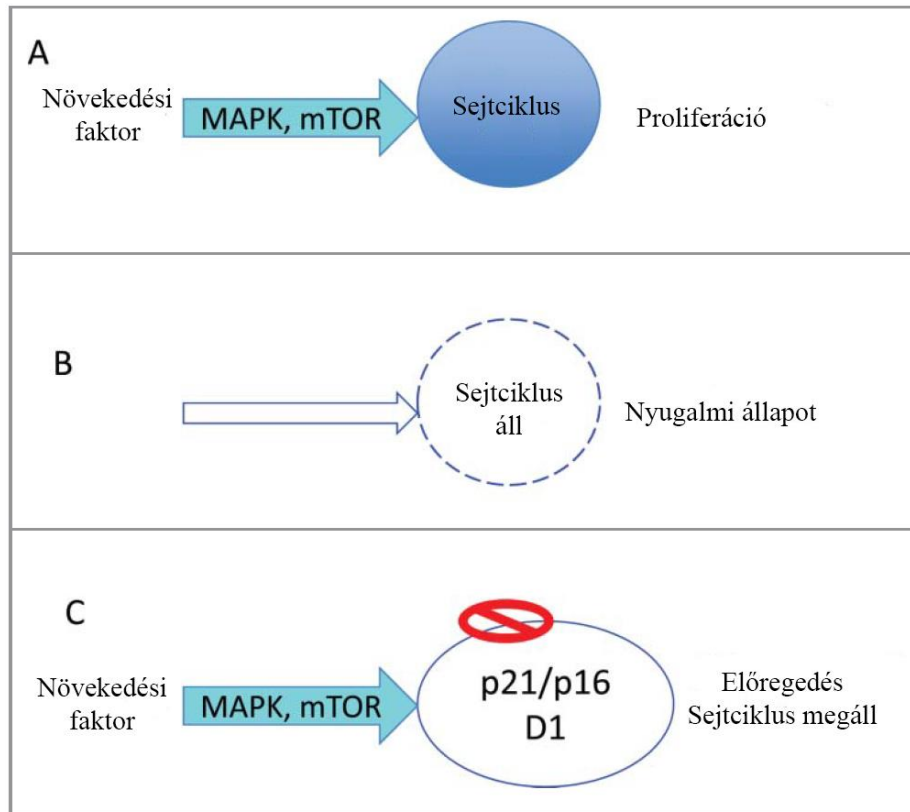
A hiperproliferáló sejtek, mint például a daganatsejtek osztódását a tumorszupresszor fehérjék megállítják. Ilyenek például a p21 és p16 (28. ábra). A sejtciklus blokkolása mellett a növekedési ingerek továbbra is jelen lehetnek. Mivel a sejt a szupresszorok miatt nem tud osztódni így elindulhat egy folyamat, ami egy előregedésre jellemző morfológiát mutat és jellemzője, hogy a sejt elveszti az osztódás újra indításának képességét [130]. Ezt nevezzük gerokonverziónak, és ezt a folyamatot jellemzően az mTOR hajtja (31. ábra) [131]. A jelenséget megfigyelték már a klinikumban használt bizonyos gyógyszereknél is. Ilyen például a palbociclib, amit metasztatikus emlődaganatban alkalmaznak és jellemzője, hogy bizonyos feltételek mellett képes a gerokonverziót előidézni [132]. Ezt az MDM2 csökkenésével hozzák összefüggésbe.

A kezelési eredményekből látszik, hogy a kis dózis hatására magas mTOR aktivitás tapasztalható, de G1 fázis blokk van és emellett a p16^{INK4} fehérje kétszerese a kontroll és BPAP nagy dózissal kezelt csoportban tapasztalható képest. A kis dózis csoportjában pont azok a molekuláris változások zajlottak le, ami a gerokonverziós folyamat elindulásához szükséges. Ez magyarázhatja a kis dózisban tapasztalt ellentmondásos eredményeket. A p21^{WAF1/CIP1} szintet két különböző antitesttel is próbáltuk megállapítani, azonban ez sikertelen volt. Ez jelenheti az antitestek hibáját is, de előfordulhatott, hogy a p21^{WAF1/CIP1} mutáció miatt elveszett a sejtől és ezért nem sikerült a mennyiségi vizsgálata.

A p16^{INK4} megemelkedésének mechanizmusa nem teljesen tisztázott, azonban az irodalomban fellelhető arra vonatkozó információ, hogy a c-jun-nak egyfajta védőszerepe lehet, mivel képes megvédeni a p16^{INK4} promóterét a metiláció általi inaktiválódástól [133]. Mivel a kis dózisban a c-jun szintjének emelkedését tapasztaltuk ezért valószínűsíthető, hogy szerepet játszik a p16^{INK4} ilyen módon történő emelkedéséhez, előidézve ezzel a gerokonverziót.

A nagy dózis hatása esetében nem találtunk gerokonverzióra utaló jelet. Mind az mTOR, mind a p16^{INK4} alacsony, a kontrolltól alig eltérő szintet mutat. A két kezelés

hatásában közös pont a G1/S fázis blokkolása, azonban ennek mechanizmusa a jelátviteli utak szintjén az említettek szerint eltér.

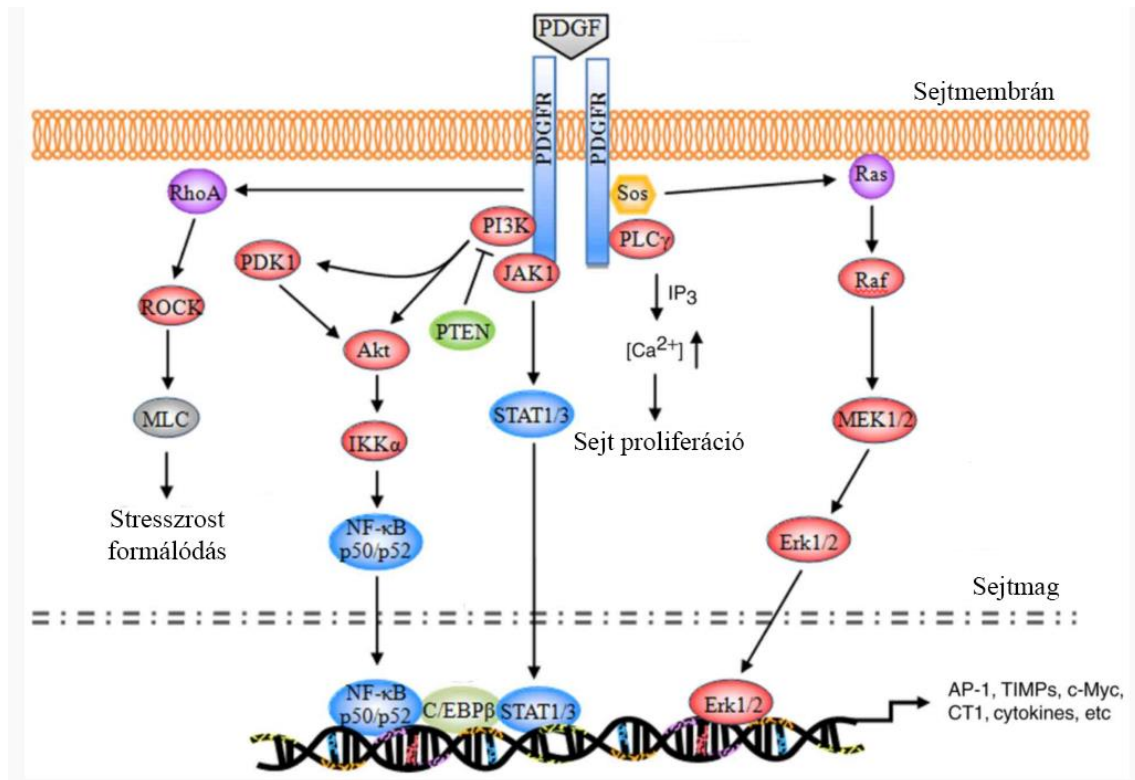


31. ábra: A gerokonverzió folyamata: A: növekedési faktorok hatására a sejtciklus működik és a sejt osztódik; B: növekedési inger hiányában a sejt nyugvó állapotban tartózkodik; C: magas p21 és p16 mellett a növekedési faktorok hatására a sejt öregedési jeleket mutat [129]

A p-RTK array segítségével a tumorban aktív sejtfelszíni receptorokról kaphattunk egy általános képet és a kezelés hatására bekövetkező változásokat vizsgálhattuk. A kísérlet egyedül a PDGF-R α -t mutatta aktívan működő jelpályának, azonban különbség nem látható a szintjében egyik csoportban sem.

A PDGF-R jelátvitel jellemzően aktív a különböző daganatokban, mint például a gasztrointesztinális tumorokban, krónikus myeloid leukémiában, glioblastómában vagy tüdőtumorokban. Jelpályáját tekintve szerteágazó a hatása, így például a MAP kinázok

útvonalra is jelentős aktiváló hatással van (32. ábra) [134, 135]. Ez magyarázhatja például azt is, hogy miért jelent meg az ERK aktivitás a szubkután tumorvonalban.



32. ábra: A PDGF-R jelátviteli útvonal főbb fehérjei és azok kapcsolatrendszere [135]

A két kezelés csökkentette az NF- κ B szintjét, azonban a nagy dózis hatása sokkal erőteljesebb volt. Az NF- κ B szerepe sokrétű a sejt életében. Hatását leírták már a gyulladásos folyamatokban [136]. Megfigyelték, hogy szerepet játszik a kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakulásában, így a gátlása erősítheti a kezelés hatékonyságát [137]. Ezeken kívül jelentős funkciót tölt be a cachexia kialakulásában [138].

A cachexia a végstádiumú daganatos betegek azon állapota, amikor megindul a zsírszövetek és izmok lebontása, ami jelentős testsúlycsökkenéshez vezet és ehhez immunrendszeri elégtelenség és metabolikus diszfunkciók társulnak. Egy komplex kórkép, ami a betegség végét jelzi és a páciens halálával jár végső soron [139]. Az FVB/N törzsön lefolytatott kísérlet során a BPAP kezelés hatására az állatok kisebb mértékben vesztek a testsúlyukból. A kis dózis hatására 14%-kal, a nagy dózissal való kezelés

után pedig 24%-kal volt nagyobb az állatok átlagos testtömege a kontroll csoportéhoz képest. A testtömegek megtartásának mértéke egybevág az NF- κ B szintjében tapasztalt változásokkal.

A BPAP mind a két egértörzsben gátló hatást fejtett ki a szubkután beültetett tüdődaganatra. A gátlás mértéke a két kezelési koncentráció esetében az FVB/N törzsben nagyon hasonló, mintegy 40-50% körüli volt. A SCID törzsön folytatott kísérlet során azt vizsgáltuk, hogy az immunrendszernek van-e szerepe a hatás kialakulásában. A SCID egér genetikai módosítást következtében nem rendelkezik B, illetve T limfocitákkal, ezért nincs adaptív immunrendszere, így jó modellt nyújt xenograft kísérletekhez [140]. A BPAP kis dózisének hatása a SCID törzsön is hasonló mértékben jelent meg, mint az FVB/n egerek esetében (17. ábra). Az eredményekből megállapítottuk, hogy a BPAP tumorra gyakorolt hatásában valószínűsíthetően nincs kimutatható szerepe az adaptív immunrendszernek [141].

5.3 A BPAP hatásai a H358 humán tüdő adenokarcinóma vonalra *in vitro* és *xenograft modellben*

A BPAP hatását már korábban is vizsgálták sejtproliferációs assay-vel más tumorsejtvonalakon. A HTB-186 és az UW-228-2 medulloblasztóma vonalak egyikét sem gátolta az alkalmazott széles kezelési tartományban [96].

Az egér tüdő adenokarcinómát sajnos többszöri próbálkozás ellenére sem tudtuk szövettenyészetbe átvinni. A hatásmechanizmus azon részének a tisztázásához, hogy a sejtre gyakorolt közvetlen vagy közvetett hatásról van-e szó, ez mindenképpen nagy segítségre lett volna, azonban a sejtvonal se Petri csészében, se az erre a célra kialakított gél rétegen nem indult növekedésnek, így más sejtvonalat kellett találnunk, amin kipróbálhatjuk a hatását.

Az *in vitro* használt kezelési koncentráció meghatározásában problémát jelentett, hogy nem ismertük a pontos koncentrációt, ami az állat plazmájában folyamatos kezelés mellett kialakul. Az alacsony dózisok miatt a BPAP-t nem tudtuk megmérni a plazmában, ezért több koncentrációt alkalmaztunk a sejtkísérlet során, hogy egy esetleges direkt sejthatást kimutathassunk. A mi kísérletünk során a H358 tüdő adenokarcinóma

sejtvonalon nem sikerült hatást kimutatni. Ez valószínűsíthetően azt jelenti, hogy a BPAP nem a daganathoz közvetlenül köthető célpontra fejti ki hatását, azonban ennek biztos eldöntéséhez a H358 tumorvonalat *in vivo* körülmények között is ki kellett próbálni a kezelés mellett.

A BPAP kezelés egyik vizsgált koncentrációban sem volt hatással a proliferációs assay-ben a H358 sejtvonalra. A tumort SCID állatba oltottuk és az idővel kialakult tapintható tumor többször átoltottuk, hogy fenotípusát tekintve alkalmas legyen az állatkísérletre. A tumor növekedése az általunk létrehozott egér tüdődaganathoz képest viszonylag lassú volt. Négy passzálást követően úgy figyeltük meg, hogy a tumor fenotípusa már nem változik így kísérletet indítottunk vele. A BPAP kezelés ebben az esetben eredményre vezetett. Egy viszonylag gyengébb, nem szignifikáns hatás volt a kis dózis részéről, azonban egy nagyon erős, mintegy 65%-os tumortérfogat csökkenés volt megfigyelhető a nagy dózis hatására a kísérlet végén.

A H358 sejtvonalon végzett kísérletekből kiderült, hogy a BPAP valószínűsíthetően nem közvetlenül a sejtre gyakorol gátlást, hanem valamilyen közvetett mechanizmus révén akadályozza a tumor növekedését. Ennek a tumorvonalnak az esetében erősebb a nagy dózis hatása, mint a kis dózisé.

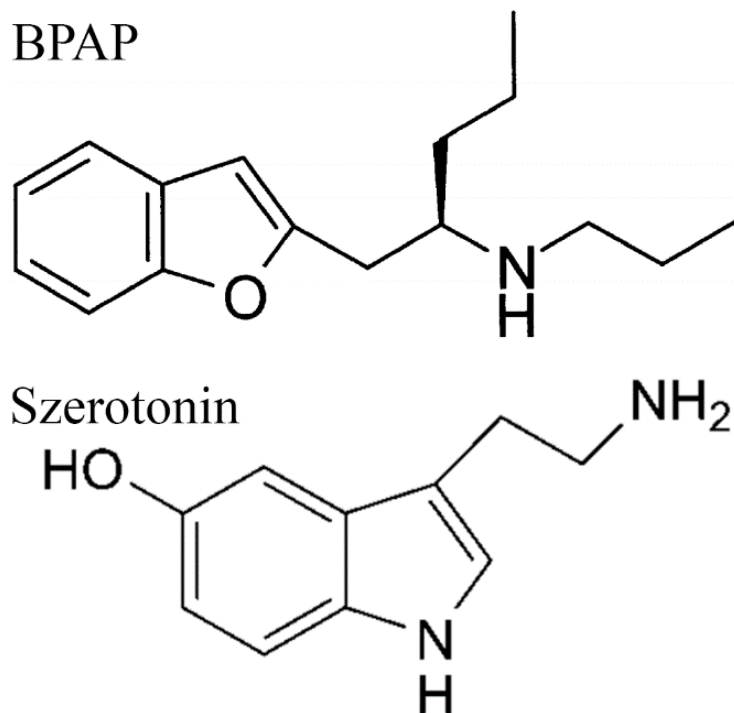
A H358 egy humán tüdő adenokarcinóma vonal, ami, mint a későbbi vizsgálatokból kiderült, G12C KRAS mutációval rendelkezik [142]. Ez a mutáció viszonylag gyakori a tüdő adenokarcinómáknál és elsősorban olyan betegek esetében írták le, akiknek az anamnézisében szerepel a dohányzás [33]. Ennek a kísérletnek az eredményei alapján azt feltételezzük, hogy a BPAP mutáns KRAS esetén is hatékony kezelés lehet, azonban a mögötte rejlő mechanizmus egyelőre kérdéses.

A főbb útvonalakat, amiket az egér tumor esetében vizsgáltunk, a H358 vonal esetében is megnéztük Western blot-tal. Az itt tapasztalt változások eltérő képet mutatnak a korábbi daganat jelátviteli útvonalaitól. A kis dózis a p-Akt S473-at és T308-at is emelte, míg a nagy dózis szignifikáns módon egyiket se változtatott. A p-Erk 1 és 2, illetve az mTOR azonban egyik dózis hatására sem változott meg a kontroll értékéhez képest, vagyis a gerokonverzió jelensége ennek a sejtvonalnak az esetében kizárható. Elmondható, hogy erre a KRAS mutáns tumorvonalra a nagy dózis van jelentős hatással,

míg a kis dózis hatása elenyésző, a hatásmechanizmus azonban eltér az egér daganatnál tapasztalttól.

5.4 A BPAP potenciális hatásmechanizmusa

A BPAP szerkezetét tekintve nagymértékű átfedést mutat a szerotoninnal (33. ábra). Az alapvázat tekintve egy 6-os és egy 5-ös gyűrű anellációjából alakul ki a BPAP esetében a benzofurán, a szerotonin esetében az indolváz. Mind a két vegyület esetében az 5-ös gyűrűből kiindulva található egy nitrogén atom, két szénatomnyi távolságra. A kiindulási hely eltér a két molekulánál.



33. ábra: A BPAP és szerotonin szerkezetének összehasonlítása [92, 143]

A BPAP hatással van a szerotonerg jelátvitelre és elképzelhető, hogy ez egy hatásként megjelenik a tumorokkal szembeni védekezésésként is. A szerotonerg receptor bizonyos modulátorairól kimutatták már, hogy rendelkeznek gyulladáscsökkentő hatással és ezáltal kedvezően befolyásolhatják a daganat progresszióját [144]. Ez azzal a megfigyeléssel is összeegyeztethető, hogy a BPAP az eredményeink alapján nem közvetlenül a tumorsejtre hat, hanem közvetett mechanizmussal hozza létre a gátlást.

A BPAP daganat ellenes hatásának szempontjából releváns kötési helyet nem ismerünk, azonban eredményeinkből az látható, hogy többféle tumor ellen is hatékony kezelésnek bizonyul. KRAS mutáns tüdőtumorra is jelentős hatást képes gyakorolni, azonban itt a kis dózis hatása minimális volt, míg a nagy dózisé jelentős. Elképzelhető, hogy a kicsitől több nagyságrenddel eltérő nagy dózis esetében már egyéb kötőhelyek is számításba jönnek, melyek a kis dózisonál nem játszanak szerepet, ezért is tér el ennyire a két dózisonál tapasztalt hatásmechanizmus. A klinikumban használt gyógyszerek között is előfordul és ki is használják a dózisfüggő hatásmechanizmust [145].

6 Következtetések

Célunk volt, hogy megvizsgáljuk a DEN indukálta tüdőtumort, majd a BPAP hatását, annak mértékét és mechanizmusát erre a daganatra. Eredményeinkből az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A DEN egyszeri kis dózisa is képes tüdőtumort indukálni az FVB/N egértörzsnél, aminek genetikai háttérével fogva eleve magasabb a tüdőtumороk iránti fogékonysága.
2. Az így kialakult daganat minden esetben adenokarcinómának bizonyult és mind az EGFR, mind a KRAS génjei vad típust mutattak.
3. A tumorra magas mTOR aktivitás jellemző.
4. A BPAP hatékonyan gátolta a szubkután tumorok proliferációját mind FVB/N, mind pedig SCID egértörzsből.
5. A BPAP hatása valószínűsíthetően nem az adaptív immunrendszeren keresztül jön létre.
6. A BPAP hatékonynak bizonyult a cachexia során fellépő súlyvesztéssel szemben, mely hatás dózis függőnek mutatkozott.
7. A két dózis hatásmechanizmusa molekuláris szinten eltért. A nagy dózis egy általános gátlást fejtett ki a jelátviteli utakra, míg a kis dózis a gerokonverzióra utaló hatást mutatott.
8. A BPAP nem mutatott hatást *in vitro* körülmények között a H358 sejtvonalra, *in vivo* SCID egérben azonban igen, vagyis valószínűsíthetően nem egy daganatsejtekre közvetlenül gyakorolt hatásról van szó.
9. A H358 sejtvonal KRAS mutációt hordoz, ami mellett a BPAP nagy dózisa továbbra is erős gátlást képes mutatni.

7 Összefoglalás

Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy a DEN egyszeri dózisa tüdőtumort indukál az FVB/N egértörzsnél. Ez a tumor TTF1 és CK7 markerekre pozitívnak bizonyult, vagyis az adenokarcinóma szövettani típusba tartozik. EGFR és KRAS mutációt nem találtunk benne. A tumorból szubkután allograftot hoztunk létre. A jelátviteli útvonalait elemezve kiderült, hogy aktív benne az mTOR pálya és ezzel párhuzamosan a p-Erk 1 és 2 is magas aktivitást mutat, míg a p-Akt szintje lecsökkent az egészséges tüdőszövethez képest.

A BPAP erős központi idegrendszeri hatásokkal rendelkezik. Ilyen a tanulás serkentése vagy az idegsejtek védelme. Élettartam vizsgálatokból kiderült, hogy a BPAP-val kezelt állatokban kevesebb a spontán tumorok száma. Megállapítottuk, hogy a BPAP jelentős hatással van az általunk létrehozott szubkután allograft tüdőtumorra. A gátlás mind a két dózisonál jelentős volt mind az FVB/N és a SCID törzsből. A jelátvitel elemzésekor kiderült, hogy a kis és a nagy dózis eltérően hat a fő útvonalakra. A kis dózis egy általános serkentést, míg a nagy dózis egy általános gátlást okozott. A sejtciklust azonban mind a kettő azonosan gátolta a G1/S pontnál. Ezt a gerokonverzió jelensége magyarázhatja, ami a kis dózis esetében alakul ki. Ilyenkor a sejtben a folyamatos osztódási jelek mellett a sejtciklust tumorszupresszor fehérjék blokkolják. E folyamatok hatására a sejt öregedésre jellemző morfológiát vesz fel és elveszti osztódási képességét.

A BPAP hatását megvizsgáltuk a H358 humán tüdőtumor sejtvonalon szövettanyészetben és a létrehozott szubkután xenograft modellben is. A kezelés *in vitro* nem mutatott hatást, azonban *in vivo* jelentős tumorgátlás mutatkozott a nagy dózis esetében. A kis dózis itt csak gyenge hatást eredményezett. A H358 sejtvonalon KRAS mutációt hordoz, ami a klinikumban terápiarezisztenciát és rossz prognózist jelent a beteg számára. Vizsgáltuk a korábbi kísérleteknél is elemzett jelpályákat, azonban ez nem vezetett eredményre a H358 szubkután xenograft esetében.

A tüdőtumor az egyik leggyakoribb tumortípus világszerte és egyre több a terápiás lehetőség is, azonban ezek egyre drágábbak és egyre kisebb szeletét célozzák a betegpopulációnak. A BPAP jelentős tumorgátló hatással bír, és biztató eredményt mutatott KRAS mutáció esetén is.

8 Summary

In our experiments DEN administration induced lung cancer in the FVB/N mice strain. Tumors were positive for TTF1 and CK7 markers confirming the histological type of adenocarcinoma. We found no mutation in the EGFR and KRAS genes. From primary tumors, a subcutan allograft tumor line was created for further experiments. The main signaling pathways were analyzed and the mTOR, and MAPK pathways were showed to be over activated, whereas p-Akt was decreased compared to the normal lung tissue.

BPAP is a stimulator of the central nervous system and able to enhance learning. In addition, BPAP has a role in neuroprotection, as well. In longevity studies BPAP treatment resulted in decreased spontaneous tumor incidence, leading to experiments testing its anti-tumor effect. In our studies, BPAP showed to be highly effective in the subcutan allograft lung cancer models. Both low and high dose of BPAP exposure resulted in inhibition of tumor growth in FVB/N and SCID strains. Evaluation of changes in the signaling pathways revealed that the two doses have a different mechanism of action. The low dose has an overall activation effect, whereas the high dose inhibits the main signaling pathways. Both doses arrest the cell cycle at the G1/S restriction point. The action of low dose could be explained by the phenomenon of geroconversion. When growth signals are present under cell cycle block provoked by tumor suppressor proteins the cell reaches a senescence morphology and loses its ability to proliferate.

BPAP was also applied against the H358 human lung cancer both in cell culture and in SCID strain. In vitro the compound showed no effect, however, the high dose displayed a strong inhibitory effect in vivo. The low dose BPAP resulted in a mild inhibition of tumor growth as well. This tumor line harbors KRAS mutation, a factor of poor prognosis and therapy resistance in the clinical field. We analyzed the level of the same signaling proteins as in our previous experiments but no similar trends were found suggesting that the mechanism of action is completely different.

Lung cancer is one of the most common cancer worldwide. More and more therapeutic opportunities are available, but they are getting very expensive and focusing only on a narrow subpopulation of patients. BPAP has a significant antitumor activity and has shown some promising results in tumors harboring KRAS mutation.

9 Irodalomjegyzék

1. Blanpain C. (2013) Tracing the cellular origin of cancer, *Nat Cell Biol.* 15: 126-134.
2. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. (2016) Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies, *Genome Med.* 8: 69.
3. Brown JM, Attardi LD. (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response, *Nat Rev Cancer.* 5: 231-237.
4. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. (2006) Angiogenesis in cancer, *Vasc Health Risk Manag.* 2: 213-219.
5. Amin A, Karpowicz PA, Carey TE, Arbiser J, Nahta R, Chen ZG, Dong JT, Kucuk O, Khan GN, Huang GS, Mi S, Lee HY, Reichrath J, Honoki K, Georgakilas AG, Amedei A, Amin A, Helferich B, Boosani CS, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Keith WN, Bhakta D, Halicka D, Niccolai E, Fujii H, Aquilano K, Ashraf SS, Newsheen S, Yang X, Bilsland A, Shin DM. (2015) Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds, *Semin Cancer Biol.* 35 Suppl: S55-S77.
6. Wittekind C, Neid M. (2005) Cancer invasion and metastasis, *Oncology.* 69 Suppl 1: 14-16.
7. Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell.* 100: 57-70.
8. DeBerardinis RJ, Chandel NS. (2016) Fundamentals of cancer metabolism, *Sci Adv.* 2: e1600200.
9. Muenst S, Laubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. (2016) The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts, *J Intern Med.* 279: 541-562.
10. Rakoff-Nahoum S. (2006) Why cancer and inflammation?, *Yale J Biol Med.* 79: 123-130.
11. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell.* 144: 646-674.
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. (2016) Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 66: 7-30.

13. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *Eur J Cancer*. 49: 1374-1403.
14. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. (2016) Risk factors for lung cancer worldwide, *Eur Respir J*. 48: 889-902.
15. Furrukh M. (2013) Tobacco Smoking and Lung Cancer: Perception-changing facts, *Sultan Qaboos Univ Med J*. 13: 345-358.
16. Hecht SS. (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer, *J Natl Cancer Inst*. 91: 1194-1210.
17. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. (2011) Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*, 2: 466-474.
18. Westra WH, Slebos RJ, Offerhaus GJ, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, Askin FB, Rodenhuis S, Hruban RH. (1993) K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung, *Cancer*. 72: 432-438.
19. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. (2008) Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship, *Mayo Clin Proc*. 83: 584-594.
20. Subramanian J, Govindan R. (2007) Lung cancer in never smokers: a review, *J Clin Oncol*. 25: 561-570.
21. Su YC, Hsu YC, Chai CY. (2006) Role of TTF-1, CK20, and CK7 immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma, *Kaohsiung J Med Sci*. 22: 14-19.
22. Cai YC, Banner B, Glickman J, Odze RD. (2001) Cytokeratin 7 and 20 and thyroid transcription factor 1 can help distinguish pulmonary from gastrointestinal carcinoid and pancreatic endocrine tumors, *Hum Pathol*. 32: 1087-1093.
23. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I, Panel WHO. (2015) The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors:

- Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 10: 1243-1260.
24. Yang P, Allen MS, Aubry MC, Wampfler JA, Marks RS, Edell ES, Thibodeau S, Adjei AA, Jett J, Deschamps C. (2005) Clinical features of 5,628 primary lung cancer patients: experience at Mayo Clinic from 1997 to 2003, *Chest.* 128: 452-462.
 25. Pallis AG. (2012) A Review of Treatment in Non-small-cell Lung Cancer, *Eur Onc & Haematol.* 2012;8(4): 208–212.
 26. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, Movsas B, Pisters K, American College of Chest P. (2007) Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition), *Chest.* 132: 234S-242S.
 27. Rowell NP, Williams CJ. (2001) Radical radiotherapy for stage I/II non-small cell lung cancer in patients not sufficiently fit for or declining surgery (medically inoperable): a systematic review, *Thorax.* 56: 628-638.
 28. Souglakos J. (2015) Customizing chemotherapy in non-small cell lung cancer: the promise is still unmet, *Transl Lung Cancer Res.* 4: 653-655.
 29. Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC, Keppler U, Macha HN, Pirker R, Berthet P, Breau JL, Lianes P, Nicholson M, Ardizzoni A, Chemaissani A, Bogaerts J, Gallant G. (2002) Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a cooperative multinational trial, *Ann Oncol.* 13: 1539-1549.
 30. Pearce A, Haas M, Viney R, Pearson SA, Haywood P, Brown C, Ward R. (2017) Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study, *PLoS One.* 12: e0184360.
 31. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N Engl J Med.* 350: 2129-2139.
 32. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR,

- Johnson BE, Meyerson M. (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science*. 304: 1497-1500.
33. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, Nafa K, Riedel ER, Hsu M, Pao W, Miller VA, Ladanyi M. (2008) Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma, *Clin Cancer Res*. 14: 5731-5734.
34. Jang TW, Oak CH, Chang HK, Suo SJ, Jung MH. (2009) EGFR and KRAS mutations in patients with adenocarcinoma of the lung, *Korean J Intern Med*. 24: 48-54.
35. Chan BA, Hughes BG. (2015) Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future, *Transl Lung Cancer Res*. 4: 36-54.
36. Herbst RS. (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 59: 21-26.
37. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance, *Biochim Biophys Acta*. 1773: 1263-1284.
38. Cancer Genome Atlas Research N. (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma, *Nature*. 511: 543-550.
39. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI. (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies, *J Clin Invest*. 117: 2051-2058.
40. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*. 235: 177-182.
41. Baudino TA. (2015) Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment, *Curr Drug Discov Technol*. 12: 3-20.
42. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. (2007) Identification of the

- transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer, *Nature*. 448: 561-566.
43. Sattler M, Reddy MM, Hasina R, Gangadhar T, Salgia R. (2011) The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy, *Ther Adv Med Oncol*. 3: 171-184.
 44. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. (2012) ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers, *J Clin Oncol*. 30: 863-870.
 45. Davies KD, Doebele RC. (2013) Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer, *Clin Cancer Res*. 19: 4040-4045.
 46. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, Grazia Sciarrotta M, Guetti L, Chella A, Viola P, Pullara C, Mucilli F, Buttitta F. (2011) Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations, *J Clin Oncol*. 29: 3574-3579.
 47. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno MA, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sanchez JM, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina MA, Sanchez JJ, Taron M, Spanish Lung Cancer G. (2009) Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *N Engl J Med*. 361: 958-967.
 48. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy, *Expert Opin Ther Targets*. 16: 15-31.
 49. Hrustanovic G, Lee BJ, Bivona TG. (2013) Mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies, *Cancer Biol Ther*. 14: 304-314.
 50. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, Bekele BN, Herbst RS, Wistuba, II. (2007) KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer, *Clin Cancer Res*. 13: 2890-2896.

51. Bhattacharya S, Socinski MA, Burns TF. (2015) KRAS mutant lung cancer: progress thus far on an elusive therapeutic target, *Clin Transl Med.* 4: 35.
52. Roman M, Baraibar I, Lopez I, Nadal E, Rolfo C, Vicent S, Gil-Bazo I. (2018) KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target, *Mol Cancer.* 17: 33.
53. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, Riely GJ, Solomon B, Ou SH, Kim DW, Salgia R, Fidias P, Engelman JA, Gandhi L, Janne PA, Costa DB, Shapiro GI, Lorusso P, Ruffner K, Stephenson P, Tang Y, Wilner K, Clark JW, Shaw AT. (2012) Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study, *Lancet Oncol.* 13: 1011-1019.
54. Kim S, Kim TM, Kim DW, Go H, Keam B, Lee SH, Ku JL, Chung DH, Heo DS. (2013) Heterogeneity of genetic changes associated with acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancer, *J Thorac Oncol.* 8: 415-422.
55. Shen L, Ji HF. (2014) Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer, *N Engl J Med.* 370: 2537.
56. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierio P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA, Group B-S. (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *N Engl J Med.* 364: 2507-2516.
57. Vivek Subbiah RG, Gregory J. Riely, Antoine Hollebecque, Jean-Yves Blay, Enriqueta Felip. (2017) Efficacy of vemurafenib in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC) with BRAFV600 mutation, *Journal of Clinical Oncology.*
58. Shikada Y, Yonemitsu Y, Koga T, Onimaru M, Nakano T, Okano S, Sata S, Nakagawa K, Yoshino I, Maehara Y, Sueishi K. (2005) Platelet-derived growth factor-AA is an essential and autocrine regulator of vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung carcinomas, *Cancer Res.* 65: 7241-7248.
59. Herbst RS, Sandler AB. (2004) Non-small cell lung cancer and antiangiogenic therapy: what can be expected of bevacizumab?, *Oncologist.* 9 Suppl 1: 19-26.

60. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer, *N Engl J Med.* 355: 2542-2550.
61. Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. (2013) EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples, *J Clin Pathol.* 66: 79-89.
62. Marchetti A, Milella M, Felicioni L, Cappuzzo F, Irtelli L, Del Grammastro M, Sciarrotta M, Malatesta S, Nuzzo C, Finocchiaro G, Perrucci B, Carlone D, Gelibter AJ, Ceribelli A, Mezzetti A, Iacobelli S, Cognetti F, Buttitta F. (2009) Clinical implications of KRAS mutations in lung cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors: an important role for mutations in minor clones, *Neoplasia.* 11: 1084-1092.
63. Naidoo J, Drilon A. (2014) Molecular Diagnostic Testing in Non-Small Cell Lung Cancer, *Am J Hematol Oncol.* VOL. 10.
64. Yang L, Wang L, Zhang Y. (2016) Immunotherapy for lung cancer: advances and prospects, *Am J Clin Exp Immunol.* 5: 1-20.
65. Zielinski C, Knapp S, Mascaux C, Hirsch F. (2013) Rationale for targeting the immune system through checkpoint molecule blockade in the treatment of non-small-cell lung cancer, *Ann Oncol.* 24: 1170-1179.
66. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. (2009) Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired, *Blood.* 114: 1537-1544.
67. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhaufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crino L, Blumenschein GR, Jr., Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer, *N Engl J Med.* 373: 1627-1639.
68. Rihawi K, Gelsomino F, Sperandi F, Melotti B, Fiorentino M, Casolari L, Ardizzoni A. (2017) Pembrolizumab in the treatment of metastatic non-small cell lung cancer: a review of current evidence, *Ther Adv Respir Dis.* 11: 353-373.

69. Carrizosa DR, Gold KA. (2015) New strategies in immunotherapy for non-small cell lung cancer, *Transl Lung Cancer Res.* 4: 553-559.
70. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. (2003) Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients, *J Immunother.* 26: 332-342.
71. Zeltsman M, Dozier J, McGee E, Ngai D, Adusumilli PS. (2017) CAR T-cell therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma, *Transl Res.* 187: 1-10.
72. Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. (2016) Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors, *Cancer Discov.* 6: 133-146.
73. van der Stegen SJ, Hamieh M, Sadelain M. (2015) The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors, *Nat Rev Drug Discov.* 14: 499-509.
74. Wang X, Riviere I. (2016) Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy, *Mol Ther Oncolytics.* 3: 16015.
75. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. (2016) Toxicity and management in CAR T-cell therapy, *Mol Ther Oncolytics.* 3: 16011.
76. Mudduluru G, Walther W, Kobelt D, Dahlmann M, Treese C, Assaraf YG, Stein U. (2016) Repositioning of drugs for intervention in tumor progression and metastasis: Old drugs for new targets, *Drug Resist Updat.* 26: 10-27.
77. Ruder EH, Laiyemo AO, Graubard BI, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Cross AJ. (2011) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort, *Am J Gastroenterol.* 106: 1340-1350.
78. Endo A. (2010) A historical perspective on the discovery of statins, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86: 484-493.
79. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. (2005) Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells, *Carcinogenesis.* 26: 883-891.
80. Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K. (1999) Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7797-7802.

81. Li Y, Li PK, Roberts MJ, Arend RC, Samant RS, Buchsbaum DJ. (2014) Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug, *Cancer Lett.* 349: 8-14.
82. Mukhopadhyay T, Sasaki J, Ramesh R, Roth JA. (2002) Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo, *Clin Cancer Res.* 8: 2963-2969.
83. Spagnuolo PA, Hu J, Hurren R, Wang X, Gronda M, Sukhai MA, Di Meo A, Boss J, Ashali I, Beheshti Zavareh R, Fine N, Simpson CD, Sharmeen S, Rottapel R, Schimmer AD. (2010) The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma, *Blood.* 115: 4824-4833.
84. Michaelis M, Agha B, Rothweiler F, Loschmann N, Voges Y, Mittelbronn M, Starzetz T, Harter PN, Abhari BA, Fulda S, Westermann F, Riecken K, Spek S, Langer K, Wiese M, Dirks WG, Zehner R, Cinatl J, Wass MN, Cinatl J Jr. (2015) Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen, *Sci Rep.* 5: 8202.
85. Knoll J, Magyar K. (1972) Some puzzling effects of monoamine oxidase inhibitors, *Psychopharmacol.* 393-408.
86. Heinonen EH, Myllyla V. (1998) Safety of selegiline (deprenyl) in the treatment of Parkinson's disease, *Drug Saf.* 19: 11-22.
87. Knoll J. (1988) The striatal dopamine dependency of life span in male rats. Longevity study with (-)deprenyl, *Mech Ageing Dev.* 46: 237-262.
88. Freisleben HJ, Lehr F, Fuchs J. (1994) Lifespan of immunosuppressed NMRI-mice is increased by deprenyl, *J Neural Transm Suppl.* 41: 231-236.
89. Ruehl WW, Entriken TL, Muggenburg BA, Bruyette DS, Griffith WC, Hahn FF. (1997) Treatment with L-deprenyl prolongs life in elderly dogs, *Life Sci.* 61: 1037-1044.
90. Knoll J, Knoll B, Torok Z, Timar J, Yasar S. (1992) The pharmacology of 1-phenyl-2-propylamino-pentane (PPAP), a deprenyl-derived new spectrum psychostimulant, *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 316: 5-29.
91. Knoll J, Yoneda F, Knoll B, Ohde H, Miklya I. (1999) (-)-1-(Benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane, [(-)BPAP], a selective enhancer of the impulse propagation

- mediated release of catecholamines and serotonin in the brain, *Br J Pharmacol.* 128: 1723-1732.
92. Shimazu S, Takahata K, Katsuki H, Tsunekawa H, Tanigawa A, Yoneda F, Knoll J, Akaike A. (2001) (-)-1-(Benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane enhances locomotor activity in rats due to its ability to induce dopamine release, *Eur J Pharmacol.* 421: 181-189.
 93. Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Shimazu S, Ohde H, Yoneda F, Iwasa K, Naoi M. (2004) Neuroprotective function of R-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane, [R-(-)-BPAP], against apoptosis induced by N-methyl(R)salsolinol, an endogenous dopaminergic neurotoxin, in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Life Sci.* 75: 107-117.
 94. Gaszner P, Miklya I. (2006) Major depression and the synthetic enhancer substances, (-)-deprenyl and R-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30: 5-14.
 95. Knoll J, Miklya I. (2016) Longevity study with low doses of selegiline/(-)-deprenyl and (2R)-1-(1-benzofuran-2-yl)-N-propylpentane-2-amine (BPAP), *Life Sci.* 167: 32-38.
 96. Knoll J, Baghy K, Eckhardt S, Ferdinandy P, Garami M, Harsing LG, Jr., Hauser P, Mervai Z, Pocza T, Schaff Z, Schuler D, Miklya I. (2017) A longevity study with enhancer substances (selegiline, BPAP) detected an unknown tumor-manifestation-suppressing regulation in rat brain, *Life Sci.* 182: 57-64.
 97. Orellana EA, Kasinski AL. (2016) Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation, *Bio Protoc.* 6(21): e1984.
 98. Mahler JF, Stokes W, Mann PC, Takaoka M, Maronpot RR. (1996) Spontaneous lesions in aging FVB/N mice, *Toxicol Pathol.* 24: 710-716.
 99. Yip PY. (2015) Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer, *Transl Lung Cancer Res.* 4: 165-176.
 100. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. (2014) Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer, *Biochem Pharmacol.* 90: 197-207.

101. Landberg G, Roos G. (1991) Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis, *Cancer Res.* 51: 4570-4574.
102. Kushida M, Kamendulis LM, Peat TJ, Klaunig JE. (2011) Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesions by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice, *Toxicol Pathol.* 39: 776-786.
103. Goldfarb S, Pugh TD, Koen H, He YZ. (1983) Preneoplastic and neoplastic progression during hepatocarcinogenesis in mice injected with diethylnitrosamine in infancy, *Environ Health Perspect.* 50: 149-161.
104. Verna L, Whysner J, Williams GM. (1996) N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation, *Pharmacol Ther.* 71: 57-81.
105. Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. (2013) Human cytochromes P450 in health and disease, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368: 20120431.
106. Hecht SS, Isaacs S, Trushin N. (1994) Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene: a potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents, *Carcinogenesis.* 15: 2721-2725.
107. Meuwissen R, Berns A. (2005) Mouse models for human lung cancer, *Genes Dev.* 19: 643-664.
108. You M, Wang Y, Lineen AM, Gunning WT, Stoner GD, Anderson MW. (1992) Mutagenesis of the K-ras protooncogene in mouse lung tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea or N-nitrosodiethylamine, *Carcinogenesis.* 13: 1583-1586.
109. Tannock IF HR, Bristow RG, Harrington L, *Basic Science of Oncology.* McGraw-Hill Education, New York, 2013, 592.
110. Arrieta O, Cardona AF, Martin C, Mas-Lopez L, Corrales-Rodriguez L, Bramuglia G, Castillo-Fernandez O, Meyerson M, Amieva-Rivera E, Campos-Parra AD, Carranza H, Gomez de la Torre JC, Powazniak Y, Aldaco-Sarvide F, Vargas C, Trigo M, Magallanes-Maciel M, Otero J, Sanchez-Reyes R, Cuello M. (2015) Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in NonSmall-Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP), *J Thorac Oncol.* 10: 838-843.

111. Chen B, Liu L, Castonguay A, Maronpot RR, Anderson MW, You M. (1993) Dose-dependent ras mutation spectra in N-nitrosodiethylamine induced mouse liver tumors and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced mouse lung tumors, *Carcinogenesis*. 14: 1603-1608.
112. Belinsky SA, Devereux TR, Maronpot RR, Stoner GD, Anderson MW. (1989) Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines, *Cancer Res*. 49: 5305-5311.
113. Wootton SK, Halbert CL, Miller AD. (2005) Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours, *Nature*. 434: 904-907.
114. Coquillard C, Vilchez V, Marti F, Gedaly R. (2015) mTOR Signaling in Regulatory T Cell Differentiation and Expansion, *SOJ Immunol* 3(1): 1-10.
115. Bracho-Valdes I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martinez I, Robles-Molina E, Chavez-Vargas L, Vazquez-Prado J. (2011) mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused, *IUBMB Life*. 63: 896-914.
116. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. (2004) mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E, *Mol Cell Biol*. 24: 200-216.
117. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation, *Trends Biochem Sci*. 36: 320-328.
118. Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP. (2011) ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1), *J Biol Chem*. 286: 567-577.
119. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. (2010) Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s), *Genes Cancer*. 1: 1124-1131.
120. Ma D, Zhou P, Harbour JW. (2003) Distinct mechanisms for regulating the tumor suppressor and antiapoptotic functions of Rb, *J Biol Chem*. 278: 19358-19366.
121. Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, Hong F, Allred C, Grizzle WE, Lee WH. (1990) Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 7762-7766.

122. Bookstein R, Lee EY, Peccei A, Lee WH. (1989) Human retinoblastoma gene: long-range mapping and analysis of its deletion in a breast cancer cell line, *Mol Cell Biol.* 9: 1628-1634.
123. Nakamura T, Iwamura Y, Kaneko M, Nakagawa K, Kawai K, Mitamura K, Futagawa T, Hayashi H. (1991) Deletions and rearrangements of the retinoblastoma gene in hepatocellular carcinoma, insulinoma and some neurogenic tumors as found in a study of 121 tumors, *Jpn J Clin Oncol.* 21: 325-329.
124. Mervai Z, Egedi K, Kovalszky I, Baghy K. (2018) Diethylnitrosamine induces lung adenocarcinoma in FVB/N mouse, *BMC Cancer.* 18: 157.
125. Wisdom R, Johnson RS, Moore C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms, *EMBO J.* 18: 188-197.
126. Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI. (1996) Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis, *Cancer Res.* 56: 305-315.
127. Laplante M, Sabatini DM. (2012) mTOR signaling in growth control and disease, *Cell.* 149: 274-293.
128. Saxton RA, Sabatini DM. (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease, *Cell.* 169: 361-371.
129. Blagosklonny MV. (2014) Geroconversion: irreversible step to cellular senescence, *Cell Cycle.* 13: 3628-3635.
130. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. (2008) Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked, *Cell Cycle.* 7: 3355-3361.
131. Blagosklonny MV. (2012) Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging, *Aging (Albany NY).* 4: 159-165.
132. Yoshida A, Diehl JA. (2015) CDK4/6 inhibitor: from quiescence to senescence, *Oncoscience.* 2: 896-897.
133. Kollmann K, Heller G, Sexl V. (2011) c-JUN prevents methylation of p16(INK4a) (and Cdk6): the villain turned bodyguard, *Oncotarget.* 2: 422-427.

134. Wang P, Song L, Ge H, Jin P, Jiang Y, Hu W, Geng N. (2014) Crenolanib, a PDGFR inhibitor, suppresses lung cancer cell proliferation and inhibits tumor growth in vivo, *Oncotargets Ther.* 7: 1761-1768.
135. Ying HZ, Chen Q, Zhang WY, Zhang HH, Ma Y, Zhang SZ, Fang J, Yu CH. (2017) PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review), *Mol Med Rep.* 16: 7879-7889.
136. Lawrence T. (2009) The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1: a001651.
137. Denlinger CE, Rundall BK, Jones DR. (2004) Modulation of antiapoptotic cell signaling pathways in non-small cell lung cancer: the role of NF-kappaB, *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 16: 28-39.
138. Zhou W, Jiang ZW, Tian J, Jiang J, Li N, Li JS. (2003) Role of NF-kappaB and cytokine in experimental cancer cachexia, *World J Gastroenterol.* 9: 1567-1570.
139. Kumar NB, Kazi A, Smith T, Crocker T, Yu D, Reich RR, Reddy K, Hastings S, Exterman M, Balducci L, Dalton K, Bepler G. (2010) Cancer cachexia: traditional therapies and novel molecular mechanism-based approaches to treatment, *Curr Treat Options Oncol.* 11: 107-117.
140. Bosma MJ, Carroll AM. (1991) The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses, *Annu Rev Immunol.* 9: 323-350.
141. Mervai Z, Reszegi A, Miklya I, Knoll J, Schaff Z, Kovalszky I, Baghy K. (2019) Inhibitory Effect of (2R)-1-(1-Benzofuran-2-yl)-N-propylpentan-2-amine on Lung Adenocarcinoma, *Pathol Oncol Res.*
142. Sunaga N, Shames DS, Girard L, Peyton M, Larsen JE, Imai H, Soh J, Sato M, Yanagitani N, Kaira K, Xie Y, Gazdar AF, Mori M, Minna JD. (2011) Knockdown of oncogenic KRAS in non-small cell lung cancers suppresses tumor growth and sensitizes tumor cells to targeted therapy, *Mol Cancer Ther.* 10: 336-346.
143. Mazak K, Doczy V, Kokosi J, Noszal B. (2009) Proton speciation and microspeciation of serotonin and 5-hydroxytryptophan, *Chem Biodivers.* 6: 578-590.
144. Szabo A. (2015) Psychedelics and Immunomodulation: Novel Approaches and Therapeutic Opportunities, *Front Immunol.* 6: 358.

145. Settimo L, Taylor D. (2018) Evaluating the dose-dependent mechanism of action of trazodone by estimation of occupancies for different brain neurotransmitter targets, *J Psychopharmacol.* 32: 96-104.

10 Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

1. Mervai Z, Egedi K, Kovalszky I, Baghy K. (2018) Diethylnitrosamine induces lung adenocarcinoma in FVB/N mouse. *BMC Cancer*. 18: 157.
2. Mervai Z, Reszegi A, Miklya I, Knoll J, Schaff Z, Kovalszky I, Baghy K. (2019) Inhibitory Effect of (2R)-1-(1-Benzofuran-2-yl)-N-propylpentan-2-amine on Lung Adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*.

Disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

3. Solyomvary A, Mervai Z, Molnar-Perl I, Boldizsar I. (2014) Specific hydrolysis and accumulation of antiproliferative lignans in the fruit of *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC. *Nat Prod Res*. 28: 732-739.
4. Mervai Z, Solyomvary A, Toth G, Noszal B, Molnar-Perl I, Baghy K, Kovalszky I, Boldizsar I. (2015) Endogenous enzyme-hydrolyzed fruit of *Cirsium brachycephalum*: optimal source of the antiproliferative lignan trachelogenin regulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the SW480 colon adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia*. 100: 19-26.
5. Solyomvary A, Mervai Z, Toth G, Ress AE, Noszal B, Molnar-Perl I, Baghy K, Kovalszky I, Boldizsar I. (2015) A simple and effective enrichment process of the antiproliferative lignan arctigenin based on the endogenous enzymatic hydrolysis of *Serratula tinctoria* and *Arctium lappa* fruits. *Process Biochemistry*. 50: 2281-2288.
6. Knoll J, Baghy K, Eckhardt S, Ferdinandy P, Garami M, Harsing LG, Jr., Hauser P, Mervai Z, Pocza T, Schaff Z, Schuler D, Miklya I. (2017) A longevity study with enhancer substances (selegiline, BPAP) detected an

unknown tumor-manifestation-suppressing regulation in rat brain. *Life Sci.* 182: 57-64.

7. Konye R, Toth G, Solyomvary A, Mervai Z, Zurn M, Baghy K, Kovalszky I, Horvath P, Molnar-Perl I, Noszal B, Beni S, Boldizsar I. (2018) Chemodiversity of *Cirsium* fruits: Antiproliferative lignans, neolignans and sesqueneolignans as chemotaxonomic markers. *Fitoterapia.* 127: 413-419.
8. Mihaly D, Papp G, Mervai Z, Reszegi A, Tatrai P, Szaloki G, Sapi J, Sapi Z. (2018) The oncomir face of microRNA-206: A permanent miR-206 transfection study. *Exp Biol Med (Maywood).* 243: 1014-1023.

11 Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani **Dr. Baghy Kornéliának**, a témavezetőmnek, hogy tudásával és tanácsával hozzájárult a sikeres kísérleteimhez és a doktori disszertációm létrejöttéhez. Köszönettel tartozom **Dr. Kovalszky Ilonának**, aki minden szükséges eszközt a rendelkezésemre bocsájtott és mindig igyekezett legjobb tudásával támogatni engem a kutatással töltött éveim során.

Köszönöm **Dr. Miklya Ildikónak** és **Dr. Knoll Józsefnek**, hogy a témában segítőkészek voltak, és hogy a kísérleti vegyületet a rendelkezésünkre bocsájtották. Köszönet illeti **Dr. Boldizsár Imrét**, aki egy eredményes együttműködéssel az első témámat biztosította TDK-s koromban, ezzel megadva a kezdőlökést a kutatásban való elinduláshoz.

Külön köszönet illeti **Dr. Horváth Zsoltot**, **Reszegi Andreát** és **Dr. Mihály Dórá**t, akikre mindig számíthattam a laboron belül és azon kívül is. Nagymértékben hozzájárultak ahhoz, hogy disszertációm létrejött.

Köszönettel tartozom **Dr. Kiss Katalinnak** és **Dr. Hollósi Péternek**, hogy TDK-s koromban a kísérletek módszertanát elsajátíthattam tőlük. Köszönöm **Csorba Gézáne Maricának** a sejtenyésztés terén adott segítségét. Neki hála kutatói pályám elejétől biztos alapokkal rendelkeztem a sejtenyésztés területén. Köszönöm **Dankó Titanillának**, hogy a kísérleteimhez használt sejtvonalak tenyésztésében segítséget nyújtott.

Köszönöm a sok segítséget és türelmet, amit a Molekuláris Patológia labor dolgozóitól, **Egedi Krisztinától**, **Császár Krisztinától** és **Oláhné Nagy Júliától** kaptam.

Hálával tartozom az Állatház dolgozójának, **Sztodola Andrásnak**, az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, odaadó és lelkiismeretes munkájáért.

Köszönöm **Dr. Sápi Zoltánnak** és **Dr. Papp Gergőnek**, hogy lehetővé tették számomra a nemzetközi tudományos konferencián való tapasztalat és tudás megszerzését. Köszönet illeti **Polgár Ilát**, aki rengeteget segített nekem az immunhisztokémiai minták előkészítésében.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Jakó Tamásnak, Dr. Cseresznyék Dávidnak, Dr. Horváth Eszternek, Popovich Erikának és Dr. Szilák Nórának** hogy bármilyen segítségre, támogatásra volt szükségem, mindig ott voltak és ösztönöztek.

Végezetül hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni szüleimnek, **Dr. Mervai Lászlónak és Dr. Mervai Lászlóné Ficsór Györgyinek** a szeretetükért, az odaadásukért, a támogatásukért, a belém vetett hitükért és bizalmukért.