

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

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

A különböző daganatok eloszlása nemenként eltér, de mindkét nemnél dominánsan megjelenik a tüdőrák, mely a daganatok közül a legtöbb ember halálát okozza. A tüdőtumorerő kialakulásában az egyik legjelentősebb faktor a dohányzás, de egyéb tényezők, mint például az étkezési szokások, genetikai fogékonyság, légszennyezettség hatásait is feltételezik. 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. A DNS-ben így keletkezett károsodások kijavításra kerülhetnek, 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 érinthetnek onkogéneket és tumorszupresszor géneket. 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 KRAS onkogén mutációja jóval gyakrabban fordul elő dohányos vagy dohányos múltú betegeknél, mint a nem dohányzóknál.

A tüdőtumorerőket fenotípusuk és klinikai viselkedésük alapján feloszthatjuk kissejtes (SCLC) és nem-kissejtes tüdőtumorerőkre (NSCLC), melyek közül az utóbbi adja az esetek 85%-át. Ezen belül az NSCLC szöveti eredetét tekintve az adenokarcinóma a domináns, melyet erre az altípusra jellemző markerekkel, például citokeratin-7-tel (CK7) és tiroid transzkripciós faktor-1-gyel (TTF1) lehet karakterizálni. Klinikai viselkedésüket tekintve a NSCLC esetében jelentősen jobb a prognózis és a terápiás lehetőségek száma is sokkal nagyobb mértékben növekszik, mint az SCLC-nél.

Az NSCLC terápiás lehetőségeinek még mindig nagy részét teszik ki a klasszikus kemoterápiás protokollok. Ezeknek a citotoxikus szerekeknek a leggyakoribb alkalmazása az adjuváns forma, ahol a daganat műtéti eltávolítását követően alkalmazzák, a kiújulás megelőzése érdekében. Ennél a daganat típusnál a kezelés állandó szereplői a platina vegyületek, legfőképp a ciszplatín,

melyet kombinációban alkalmaznak egyéb citotoxikus vegyületekkel.

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. 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 doménen helyezkednek el. Így jön létre a driver mutációt hordozó fehérje, ami önfenntartó növekedési szignált biztosít a sejt számára. Az EGFR egy transzmembrán fehérje, amely a sejthez eljutó növekedési faktorokat köti, és ezáltal egy összetett foszforilációs kaszkádon keresztül osztódási jeleket küld a sejtmagba. 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. Az EGFR mutáció az esetek mintegy 15%-ban fordul elő, a KRAS pedig 30%-ban.

Az EGFR mutációk kihasználása teszi ki a jelenlegi NSCLC ellenes célzott terápia nagy részét. A legelső molekulák, melyek a mutáns fehérjét célozták a tirozin-kináz inhibitor (TKI) erlotinib, lapatinib és gefitinib voltak. A KRAS módosulása az egyik leggyakoribb mutáció és ennek esetén az EGFR ellenes terápiától semmilyen hatás nem várható, ezért a KRAS vizsgálata a diagnosztika egyik legelső lépése. A KRAS mutációjával szemben jelenleg nem létezik célzott terápia.

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.

A feniletilamin derivátum (-)-deprenil a MAO-B enzimre blokkoló hatást fejt ki, ezzel az első ilyen vegyület lett, és később a Parkinson-kór terápiájában is helyet kapott. Élettartam vizsgálatokból kiderült, hogy a DEP a MAO-B blokkoló (0,25 mg/kg) dózisban képes meghosszabbítani az élettartamot

patkányon, egéren és beagle kutyán. Ezekből az eredményekből következett később a triptamin származék BPAP kifejlesztése. A BPAP szintén képes a központi idegrendszerben az adrenerg és szerotonerg jelátviteli folyamatokat erősíteni, azonban nincs hatása a MAO-B-re. Mindkét vegyület rendelkezik neuroprotektív és memóriastimuláló hatással is. A BPAP ezekkel a hatásokkal nagyon alacsony koncentrációtartományban bír.

Ebből kiindulva a DEP és a BPAP hatásait újabb élettartam vizsgálatokban, a DEP MAO-B blokkoló dóziséknél nagyságrendekkel alacsonyabb koncentrációban vizsgálták, és bizonyították az élettartam növekedésre gyakorolt hatását. A kísérleteket Wistar patkányokon végezték. A tanulási képességek javulása és az élettartam jelentős megnövekedése mellett leírták, hogy mind a DEP-lel, mind a BPAP-val való kezelés hatására a patkánytörzsre jellemző spontán fibroszarkóma képződés jelentősen csökkent a kontrol csoportban tapasztaltnál képest. A kezelt csoportokban a BPAP és DEP hatására a tumorok megjelenése későbbre tolódott és számukat tekintve csökkenést mutatott. A BPAP hatása sokkal erősebbnek bizonyult a DEP-nél. Ennek mentén a BPAP tumorgátló hatása egyéb modelleken is vizsgálatra került. Egy *in vivo* kolon adenokarcinóma-máj metasztázis modellben hatékonyan csökkentette az áttétek számát. 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 fejei ki. Az alábbiakban ismertetésre kerülő munkánkban bemutatjuk a BPAP hatását a tüdő adenokarcinómára és feltérképezzük a mögötte rejlő hatásmechanizmust.

2. Célkitűzések

- A rendelkezésünkre álló egér tüdő tumor 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

***In vitro* vizsgálatok:** Humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalat (H358) alkalmaztunk. BPAP-val kezeltük a sejteket szulforodamin-B sejtproliferációs assay kísérlet során, valamint xenograft modell létrehozásához nagy mennyiségben szaporítottuk fel a sejteket.

***In vivo* vizsgálatok:** FVB/N egérben dietilnitrózamin egyszeri, kis dóziséval tüdő tumor indukáltunk. Ebből szubkután allograft vonalat hoztunk létre. Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk DEN kezelésben nem részesült állatokban a spontán tumor képződés mértékét. További kísérletek során a létrehozott, szubkután tumorvonalon vizsgáltuk a BPAP hatását. Ezt követően SCID egérben teszteltük a BPAP hatását ugyanazon tumoron azonos kísérleti felépítésben. Végezetül H358 xenograft modellben vizsgáltuk a BPAP hatását a tumornövekedésre. A kísérletek során az egyik csoport 0,0001 mg/kg (kis dózis) kezelőszert kapott, míg a másikat 0,05 mg/kg-mal (nagy dózis) oltottuk, a kontroll csoportnak pedig fiziológiás sóoldatot adtunk.

Az állatkísérletekből származó szövetmintákat fagyasztva, illetve paraffinos blokkokba ágyazva tároltuk és később molekuláris vizsgálatokhoz használtuk fel.

Mutációanalízis: A DEN tumorindukáló hatásának vizsgálata során keletkező tumorok mindegyikében Sanger szekvenálással vizsgáltuk az EGFR 19. és 21. exonját, illetve a KRAS 2. exonját. Ugyanezt a vizsgálatot elvégeztük a spontán kialakuló tumorokon és a BPAP kezeléssel kísérlethez használt szubkután allografton is.

Fehérje aktivitás és diagnosztikai vizsgálatok: Immunhisztokémiával vizsgáltuk a diagnosztikában is használt adenokarcinóma markereket, a *TTF1-et* és a *CK7-et*. A tirozin kináz receptorok aktivitásának méréséhez foszfo-RTK Proteome Profiler Array-t használtunk. A jelátviteli fehérjék mennyiségi összehasonlító vizsgálatához **Western blot** technikát alkalmaztunk. A vizsgált fehérjemolekulák az alábbiak voltak: Akt, p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308), p-Erk 1 és 2, p-S6, CDK4, PCNA, Cyclin D, p-Rb (S780), p16, NF- κ B, c-jun és β -aktin.

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 kísérleteket 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 állatkísérlet eredményei standard error-ral, míg a Western blot eredményei standard deviációval kerültek feltüntetésre.

4. Eredmények

A DEN tüdőtumor indukáló képessége és a tumorok karakterizálása

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 különbséget a nemek között. A kontrollként indított, 14 DEN-nal nem kezelt állatból mindösszesen kettőben alakult ki spontán tüdőtumor.

Az összes mintán kimutatható volt a TTF1 és a CK7 fehérjék magas expressziója, ezzel megállapítható volt az adenokarcinóma eredet. Ezt a pozitivitást a spontán kialakult tumorok is mutatták.

Mind a 28 DEN hatására kialakult, a szubkután allograft és a két spontán keletkezett tüdőtumorban is vizsgáltuk a KRAS 2-es exon, illetve az EGFR 19, 21-es exonok szekvenciájának forrópont (hot spot) régióit. Egyetlen tumorban sem találtunk ezeken a helyeken mutációt.

Western blot-tal vizsgáltuk a fagyasztva tárolt DEN indukálta primer tumor mintákat és a szubkután allograftot ép tüdőszövethez viszonyítva. Az összehasonlítás során elsősorban az Akt/mTOR és MAPK jelátviteli utakat vizsgáltuk. A p-Akt-nak a Thr308-on foszforilált formája ~40%-kal csökkent a tumorokban az ép szövetben tapasztalható képest. Ezzel szemben a Ser473-on foszforilált Akt csak a szubkután allograft tumorban csökkent, a primer tumorban még enyhe emelkedést mutatott.

A p-Erk 1 és 2 emelkedést mutatott a szubkután tumorvonalban. A növekedés 20%, illetve 80% volt. Ezzel szemben a primer tumorban a p-Erk szintje nem mutatott változást a normál tüdőszövethez képest. A p-S6 mind a két tumorban jelentősen, mintegy ötszörösére emelkedett a normál szövetben található mennyiséghez képest.

A sejtciklus változásait vizsgálva a G1/S fázis határán megfigyeltük a CDK4 jelentős mértékű emelkedését. A primer tumorban a CDK4 szintje mintegy négyszeresére, a szubkután tumorban pedig háromszorosára emelkedett a normál szövetéhez képest. A PCNA primer tumormintákban mintegy 18-szoros, a szubkután mintákban pedig közel 24-szeres mértékben emelkedett a kontrollként használt normál tüdőhöz képest. A p-Rb jelentősen emelkedett a primer tumorban, mintegy négyszeres mértékben. Ezzel szemben azonban a

szubkután mintákban nem változott kimutatható mértékben a kontrollhoz képest.

A BPAP hatása az egér tüdőtumorra

Állatkísérlet eredményei

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 hatására. A kísérlet során megfigyeltük, hogy a BPAP kezelés hatására az állatoknál kevésbé jelentkeznek a cachexia tünetei, mint a kontroll csoportnál. A két kísérlet során a testtömegek alakulásából megállapítható, hogy a BPAP kezelés gátolta a cachexia kialakulását. A nagy dózis hatása az eredmények alapján jelentősebbnek tűnt a testtömeg megtartása szempontjából.

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. A BPAP nagy koncentrációja itt kevésbé bizonyult hatásosnak, azonban még ez is mintegy 30%-os tumortérfogat csökkenést eredményezett. A kis dózissal a kísérlet végére már 70%-os gátlás volt látható és itt a tumorok mintegy fele akkora tömegűek voltak, mint a kontroll csoportban.

Western blot eredményei

A BPAP kezelés hatásmechanizmusának vizsgálata során szintén az mTOR/Akt jelviteli utakat elemeztük Western blot segítségével a SCID allograft kísérletből származó tumormintákon. Az eredményekből kiderült, hogy a BPAP kis és nagy dózisa eltérően hatott.

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. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a p-Erk 1 és 2 esetében a két kezelés következtében. A kis dózissal való kezelés 40%-kal, illetve 50%-kal emelte, a nagy dózissal pedig hasonló mértékben

csökkentette a fehérje szintjét. 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. A c-jun szintjében a kis dózis 15% emelkedést okozott a fehérje szintjében, míg a nagy dózis hatására 30%-os csökkenést következett be.

A BPAP hatására a G1-S fázis határán is jelentős változások következtek be a szabályozó fehérjék szintjében. A p-Rb Ser780 50%-kal csökkent mind a két dózis hatására. A ciklin D1 szintje a kis és nagy dózis hatására is közel 40%-kal csökkent. A CDK4-et a kis dózis a felére csökkentette, míg a nagy dózis mindössze 20%-os csökkentést ért el. Az S fázis marker PCNA-t a kis dózis 35%-kal, míg a nagy dózis mintegy 10%-kal csökkentette azt. A p16^{INK4} szintje a kis dózissal való kezelés hatására több, mint duplájára emelkedett, míg a nagy dózis nem változtatott számottevően a mennyiségén.

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

p-RTK assay

A minták az assay-hez szintén a BPAP kezelés hatását vizsgáló SCID kísérletből származnak. 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.

A BPAP hatásai a H358 tüdő adenokarcinómára

In vitro kísérletek eredményei

Az SRB proliferációs kísérletben a BPAP nem mutatott hatást a H358 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonallal szemben. Mivel a BPAP pontos koncentrációja nem ismert a vérplazmában, ezért hatását egy adott koncentráció tartományban vizsgáltuk. Bár a kezelési dózisok csak közelítőek voltak, valószínűsíthető, hogy valamilyen gátló hatás megjelent volna a sejtproliferációs assay-vel, ha a BPAP közvetlenül hatna a sejtekre.

Xenograft modell

A H358 tumor sejtvonalat szubkután SCID egerekbe ültettük, az egereket pedig naponta kis ill. nagy dózisú BPAP-val kezeltük. A BPAP kis dózisa a kísérlet 40. napjáig nem mutatott gátlást a tumor növekedésére a kontroll csoporthoz képest. Ezt követően azonban gyenge hatás megfigyelhető volt. 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.

Western blot

A jelátviteli útvonalak elemzése a BPAP kezelt H358 tumorvonal esetében nem vezetett olyan eredményre, mint az FVB/N egér tüdődaganat modell esetében. A p-Erk1/2 és a p-S6 szintjében nem következtek be számottevő változások. A kis dózissal való kezelés hatását mind a két p-Akt szintje növelte. 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 változást egyik esetben sem. A nagy dózis nem változtatott a CDK4 szintjén, a kis dózis azonban még emelte is azt közel 30%-kal. 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, a kis dózis azonban ebben az esetben sem okozott számottevő változást.

5. Következtetések

Az FVB/n egértörzs tüdő adenokarcinóma modelljének karakterizálása

A DEN az állatkísérletekben régóta és széleskörűen használt májkarcinogén. Hatásmechanizmusáról elmondható, hogy a citokróom P450 enzimek általi bioaktivációja után több lépésben, erős alkiláló vegyületté alakul, ami adduktot képez a DNS-sel és ez direkt karcinogén hatást eredményez. Egyes esetekben megfigyelték, hogy a nitrózamin vegyületek képesek tüdőtumort is indukálni elsősorban olyan törzsekben, ahol a tüdőrák spontán előfordulása magasabb, mint más daganatoké.

Az FVB/N egértörzsben kialakult tüdőtumor immunhisztokémiával mind CK7 és TTF1-re erős, pozitív jelet adott, a hematoxilin-eozin festés képe pedig tovább erősítette az adenokarcinóma diagnózisát. Ezzel bizonyítottuk, hogy adenokarcinóma szövettani típusba tartozik. Az FVB/N törzsben indukált tüdő daganatok egyikében sem találtunk EGFR vagy KRAS mutációt. Az FVB/N egértörzs tüdőtumorra való fogékonysága jelentősen magasabb, mint bármelyik másik tumorra, azonban mindemellett a májtumorer incidenciája viszonylag ritka az esetükben. A DEN felerősítheti az eleve magas tüdőtumorra való fogékonyságot, így gyorsítva a daganatképződés folyamatát. A DEN-nel indukált tüdő adenokarcinóma modellünknek azért is nagy a jelentősége, mert a tüdőrák az egyik legmagasabban reprezentált daganatos megbetegedés, így kutatása is intenzíven folyik. Egy jó állatkísérleti modell hasznos eszközként szolgálhat a további kutatásokhoz.

A karakterizálást az mTOR fehérjéhez kapcsolódó hálózattal kezdtük, mivel ez központi szerepet játszik a sejtek életében és a tüdőtumorokban nagy jelentőségű EGFR/KRAS tengellyel is összeköttetésben áll. Az mTOR-nak az aktiválódást követően szerterágazó hatása érvényesül. Serkenti a sejtnövekedést, fehérjeszintézist, sejtciklus progressziót. Hatással van a sejt túlélésére, metabolizmusára, lipidszintézisére és a citoskeleton formálódására. Hatásainak összességét tekintve a sejtek túlélését és osztódását segíti. A DEN indukálta tumor mintákban a p-S6 megemelkedett mennyisége magas mTOR aktivitásra utal. 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. Jelentősen nőtt a sejtciklus aktivitása, illetve a szubkután daganatban lényegesen aktívabb a sejtciklus, ami illik ahhoz a megfigyeléshez, hogy ez a daganat pár átoltsást követően agresszívebben növekedett, mint ami a korai bőr alá oltást követően volt megfigyelhető.

A BPAP hatásai in vivo az FVB/N egértörzs tüdő adenokarcinóma modelljére

Az FVB/N egértörzsben a BPAP eredményesen gátolta a tumor növekedését. A két kezelési koncentráció hatása között nem mutatkozott jelentős különbség, azonban molekulárisan a jelátviteli útvonalak tekintetében a két dózis hatása eltérő volt. 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 fejtett ki. A sejtciklus fehérjék vizsgálatából azonban kiderült, hogy mind a két dózissal való kezelés esetében egy G1 fázis blokk alakult ki, ami egy osztódás gátlást eredményezett összhangban a tumortérfogatok alakulásával.

A c-jun szintjét mind a két dózis szignifikánsan megváltoztatta. A c-jun egy onkogén, melynek szintjét a BPAP nagy dózisa csökkentette, ami összhangban van a kezelés a többi hatásával. A kis dózis ezzel szemben azonban szignifikáns módon emelte a mennyiségét, ami egybevág az Akt és Erk fehérjékre kifejtett aktiváló hatással. Ebből következően a BPAP két kezelési koncentrációja eltérő mechanizmussal hathat, melyre a gerokonverzió jelensége szolgálhat magyarázatként.

A gerokonverzió egyfajta sejtnövekedés, ami sejtciklus blokk alatt következik be, vagyis a növekedési szignálok mellett sem történik meg a sejtosztódás. A gerokonverziót olyan növekedést serkentő mechanizmusok idézik elő, mint az mTOR. A hiperproliferáló sejtek osztódását a p21^{CIP1} és p16^{INK4} megállítják. A sejtciklus blokkolása mellett a növekedési ingerek továbbra is jelen lehetnek. Mivel a sejt a szupresszorok miatt nem tud osztódni, így elindulhat egy olyan

folyamat, melyben a sejt egy előregedésre jellemző morfológiát mutat és jellemzője, hogy elveszti az osztódás újra indításának képességét. Ezt a jelenséget nevezzük gerokonverziónak. A kezelési eredményekből látszik, hogy a kis dózis hatására magas az mTOR aktivitása, de jelen van a G1 fázis blokk, melyet a p16 fehérje kétszeres mennyisége jellemez a kontroll és BPAP nagy dózissal kezelt csoportban mért értékekhez képest. A nagy dózis hatása esetében nem találtunk gerokonverzióra utaló jelet.

Mindkét kezelés csökkentette az NF- κ B szintjét, azonban a nagy dózis hatása sokkal erőteljesebb volt. Az NF- κ B jelentős funkciót tölt be a cachexia kialakulásában. A cachexia a végstádiumú daganatos betegek állapota, egy komplex kórkép, ami a betegség végét jelzi és a páciens halálához vezet. 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 SCID törzsön folytatott kísérlet során azt vizsgáltuk, hogy az immunrendszernek van-e szerepe a hatás kialakulásában. A SCID egérnek nincs adaptív immunrendszere, így jó modellt nyújt xenograft kísérletekhez. A BPAP kis dózisának hatása a SCID törzsön is hasonló mértékben jelent meg, mint az FVB/n egerek esetében. Megállapítottuk, hogy a BPAP tumorra gyakorolt hatásában nincs kimutatható szerepe az adaptív immunrendszernek.

A BPAP hatásai a H358 humán tüdő adenokarcinóma sejtvonalra in vitro és xenograft modellben

Az egér tüdő adenokarcinóma sejtvonalunkat 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.

Kísérletünk során a H358 tüdő adenokarcinóma sejtvonalon nem sikerült hatást kimutatni. Ez valószínűleg azt jelenti, hogy a BPAP nem a daganathoz közvetlenül köthető célponton fejt ki hatását, azonban

ennek biztos eldöntéséhez a H358 tumorvonalat *in vivo* körülmények között is ki kellett próbálni a kezelés mellett.

A H358 tumorsejteket SCID állatba oltottuk. 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 egy humán tüdő adenocarcinoma sejtvonala, ami, mint a későbbi vizsgálatokból kiderült, G12C KRAS mutációval rendelkezik. Ezt a mutációt elsősorban olyan betegek esetében írták le, akiknek az anamnézisében szerepel a dohányzás. Kísérletünk eredményei alapján azt feltételezzük, hogy a BPAP mutáns KRAS esetén is hatékony kezelés lehet, azonban a mögötte rejlő mechanizmus egyelőre kérdéses.

Eredményeinkből az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A DEN egyszeri kis dózisa is képes tüdőtumort indukálni az FVB/N egértörzsnél, aminek genetikai hátterénél fogva eleve magasabb a tüdőtumorok iránti fogékonysága.
2. Az így kialakult daganat minden esetben adenokarcinómának bizonyult és mind az EGFR, mind a KRAS génjei vad típusúak.
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 hatékonyan bizonyult a cachexia során fellépő súlyvesztéssel szemben, mely hatás dózis függőnek mutatkozott.
7. A BPAP 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 sejtvonala, *in vivo* SCID egérben azonban igen, vagyis valószínűsíthetően nem egy, a daganatsejtekre közvetlenül gyakorolt hatásról van szó.
9. A H358 sejtvonala KRAS mutációt hordoz, ami mellett a BPAP nagy dózisa továbbra is erős gátlást képes mutatni.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

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.

7. 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 Gézá**né **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. Sági Zoltá**nnak és **Dr. Papp Gergő**nek, 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.