

# A modulált elektro-hipertermia kemo- és radioterápiát támogató hatásának tanulmányozása hasnyálmirigy adenocarcinoma sejtvonalakon

Doktori értekezés

**Dr. Forika Gertrud**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Krenács Tibor, DSc., kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Sárközy Márta Julianna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kárpáti Sarolta, DSc., professzor emerita

Tagok: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2022



**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>1. BEVEZETÉS - IRODALMI HÁTTÉR.....</b>	<b>7</b>
1.1 A hasnyálmirigy daganatos megbetegedése .....	7
1.2 Epidemiológia.....	7
1.3 Etiológia és rizikófaktorok .....	7
1.3.1 Gyakran előforduló genetikai eltérések PDAC-ban .....	8
1.4 A hasnyálmirigy daganatok szövettani felosztása .....	10
1.5 Diagnózis, szűrés, kezelhetőség .....	11
1.5.1 Diagnosztikai lehetőségek .....	11
1.5.2 Kezelési lehetőségek.....	12
1.5.3 Kemo- és radiorezisztencia mechanizmusok PDAC-ben.....	13
1.6 Hipertermia.....	15
1.6.1 Hipertermia az onkológiában.....	15
1.6.2 Termoradioterápia, termokemoterápia és termokemoradioterápia a klinikumban	18
1.7 Warburg-hatás .....	22
1.8 Modulált elektro-hipertermia.....	23
1.8.1 Fizikai háttér .....	24
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MÓDSZEREK .....</b>	<b>26</b>
3.1 Sejttenyésztés .....	26
3.2 Termoradioterápia kezelések.....	26
3.3 Termokemoterápia kezelések .....	28

3.4 Élő sejtek arányának vizsgálata.....	29
3.5 Sejtmorfológia és immuncitokémia.....	30
3.6 Sejtviabilitás elemzés resazurin próbával.....	31
3.7 Áramlási citometria mérések.....	31
3.8 Kapilláris Western blot (WES).....	32
3.9 Kolónia formáló próba.....	33
3.10 Statisztikai analízis.....	34
<b>4. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>35</b>
4.1 Az mEHT citotoxikus hatása PDAC-ben.....	35
4.1.1 A mono- illetve radioterápiás kombináció jelentősen csökkenti az élő sejtek arányát.....	35
4.1.2 Gemcitabinnal kombinálva a mEHT csökkenti a PDAC sejtek életképességét....	36
4.2 Az mEHT kaszpáz-függő apoptózist okoz PDAC sejtekben.....	39
4.2.1 Radioterápiás és mEHT kombináció jelentősen emeli a kaszpáz-aktivált apoptotikus testek arányát.....	39
4.2.2 Az mEHT kemoterápiával kombinálva elsősorban az intrinsic útvonalon keresztül aktiválta a kaszpáz-3-at.....	41
4.3 Az mEHT radio- és kemoterápiával kombinálva képes csökkenteni a kolóniaképző sejtek arányát.....	45
4.4 Az mEHT képes blokkolni a sejtciklust G1 illetve S és G2/M fázisban.....	47
4.4.1 Az mEHT kezelés besugárzás után a SubG1 fázis frakció emelkedését okozza Panc1 sejtekben.....	47
4.4.2 Kemoterápiával kombinálva az mEHT blokkolja a sejtek S illetve G2/M fázisba lépését.....	49
4.5 Az AKT és a p21 <sup>waf1</sup> fehérjék szerepe a sejtciklusblokkban kezeléseket követően.....	50
4.5.1 Radioterápiával kombinálva az mEHT p21 <sup>waf1</sup> emelkedés során gátolja az AKT aktivációját.....	50

4.5.2 Az mEHT kemoterápiás kombináció során is emeli a p21 <sup>waf1</sup> fehérje szintet a sejtekben .....	51
4.6 Hősokk fehérje expresszió változása mEHT kezelést követően .....	53
<b>5. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>56</b>
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>61</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>62</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>63</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>64</b>
<b>10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>87</b>
10.1 A disszertációhoz kapcsolódó elsőszerzős közlemények .....	87
10.2 A disszertáció témájához közvetlenül nem kapcsolódó társszerzős közlemények	87
10.3 Könyvfejezet.....	88
10.4 A disszertációtól független társszerzős közlemények.....	88
<b>11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....</b>	<b>89</b>

## Rövidítések jegyzéke

<b>AIF-1</b>	apoptózis indukáló faktor-1
<b>ALDH</b>	aldehid-dehidrogenáz
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	adenozin trifoszfát
<b>BSA</b>	szarvasmarha szérum albumin
<b>CDK</b>	ciklin-dependens kináz
<b>CLS</b>	Cell Line Services
<b>CRC</b>	colorectalis carcinoma
<b>CSC</b>	cancer stem cell/tumor progenitor sejt
<b>dFdCTP</b>	difluorodeoxicitidin trifoszfát
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>DTT</b>	ditiotreitolt
<b>EDTA</b>	etiléndiamin-tetraecetsav
<b>EMT</b>	epitheliális-mesenchimális tranzíció
<b>FBS</b>	foetalis borjú szérum
<b>GDP</b>	guanozin-difoszfát
<b>GEM</b>	gemcitabin
<b>GTP</b>	guanozin-trifoszfát
<b>H&amp;E</b>	hematoxilin-eozin festés
<b>HCC</b>	hepatocelluláris carcinoma
<b>HIF</b>	hypoxia indukálta faktor
<b>HIPEC</b>	hipertermiás intraperitoneális kemoterápia
<b>HIV</b>	humán immundeficiencia-vírus

<b>HPV</b>	humán papilloma vírus
<b>HSP</b>	hősokk fehérje
<b>IGF</b>	inzulin-szerű növekedési faktor
<b>IMDM</b>	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
<b>IPMN</b>	intraduktális papilláris-mucinózus neoplázia
<b>LDH</b>	laktát dehidrogenáz
<b>MDM2</b>	mouse double minute 2
<b>MDR</b>	multidrug rezisztencia
<b>mEHT</b>	modulált elektro-hipertermia
<b>mEHT+GEM</b>	modulált elektro-hipertermia és gemcitabin kombinációs kezelés
<b>NET</b>	neuroendokrin tumor
<b>NHRF</b>	nem homológ rekombináns fehérjék
<b>PanIN</b>	pancreas intraepitheliális neoplasia
<b>PBS</b>	foszfát pufferolt sóoldat
<b>PD-1</b>	programozott sejthalál receptor-1
<b>PDAC</b>	pancreas duktális adenocarcinoma
<b>PDL-1</b>	programozott sejthalál ligand-1
<b>PI</b>	propidium-jodid
<b>Rth</b>	sugárterápia
<b>Rth+mEHT</b>	sugárterápia és modulált elektro-hipertermia kombinációs kezelés
<b>ROS</b>	reaktív oxigéngyök
<b>TBS</b>	Tris pufferoldat
<b>TBST</b>	Tris pufferoldat mely tartalmaz 0,5%-nyi Tween 20-at
<b>WBH</b>	whole body hyperthermia
<b>WES</b>	kapilláris Western blot

## 1. Bevezetés - Irodalmi háttér

### 1.1 A hasnyálmirigy daganatos megbetegedése

A hasnyálmirigy egy retroperitoneális mirigyes szerv, mely kettős funkciót lát el: exocrin állománya emésztő enzimeket termel, endokrin része (Langerhans-szigettként ismert) pedig inzulint, glucagont, szomatosztatint és vasoaktív intestinális peptidet választ ki. Ilyenformán a hasnyálmirigyben előforduló daganatok típusa kiindulási sejtől függően két nagy csoportra oszthatók: neuroendokrin tumorok (NET), melyek a szigetsejtek daganatai, illetve az exocrin állomány sejtjeiből származó adenomák és carcinomák (1). A mirigyhámból kiinduló malignus tumorokat pancreas duktális adenocarcinomáknak (PDAC) nevezzük, melyek az összes hasnyálmirigy daganat 85%-át teszik ki (2).

### 1.2 Epidemiológia

A hasnyálmirigy malignus megbetegedése a 2020-as GLOBOCAN felmérés szerint nincs benne a 10 leggyakrabban előforduló ráktípus között (3). Ez biztató adat is lehetne, azonban ha a PDAC okozta halálozásokat nézzük, akkor már meglehetősen megugrik a rangsor, hiszen az évi 466 003 PDAC miatt elhunyt beteggel már a 7-ik legmagasabb mortalitású rákos megbetegedéssel állunk szemben (2). A leginkább aggodalomra okot adó adat azonban az egy, illetve öt éves túlélési ráta, melyek 24%, illetve alig több, mint 10% (4). A 100 000 lakosra számolt új megbetegedések száma, illetve éves halálozások adatai szerint Magyarország vezető pozíciót foglal el világviszonylatban mindkét nemnél. Az európai 9,3, illetve 7,4-es átlaghoz képest itthon 13,7 a PDAC megbetegedés incidenciája férfiakban és 9,2 nőkben (2). Egyes kutatók szerint a 2025-ös évre a PDAC miatti halálozás 25%-al magasabb lesz Európában, mint az emlődaganatok miatti és így a hasnyálmirigyrák a harmadik legnagyobb mortalitással bíró daganattípus lesz (5).

### 1.3 Etiológia és rizikófaktorok

Etiológiai szempontból fontos elkülöníteni a hereditár és a sporadikus hasnyálmirigy adenocarcinomákat. Míg az első egy genetikai hajlamosító tényező talaján fejlődik ki és családi halmozódás figyelhető meg, addig a sporadikus esetek fő rizikótényezői a környezeti hatások.



A PDAC daganatok 10%-át familiáris hasnyálmirigy carcinomák teszik ki. Definíció szerint azt az esetet tekintjük hereditár PDAC-nak, ahol a beteg elsőfokú rokonai között legalább két egyénnek bizonyítottan volt hasnyálmirigy daganata (6). Bár ez önmagában nem garancia a betegség kialakulására, de egy olyan családban, ahol legalább három 40 év alatti személyt diagnosztizálnak PDAC-val, a többi tagnál a kumulatív rizikó eléri a 38,9%-ot (7). Ezekben a betegekben gyakran fellelhető a *BRCA1* és *BRCA2*, esteleg *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *CDKN2A* gének mutációja (6, 8). Bizonyos országokban (Amerikai Egyesült Államok, Japán és Európa több gazdaságilag fejlett országa) nyilvántartást vezetnek a PDAC-s betegekről, mellyel a korai diagnózis esélyét remélik növelni a veszélyeztetett populáció körében: <http://jfpcr.com/> (8).

A sporadikusan megjelenő PDAC-k etiológiai hátterében feltehetőleg külső hatások játszanak nagy szerepet. Ezek közül a nem befolyásolható rizikófaktorok: férfi nem, 50 év fölötti életkor, afro-amerikai rassz és bizonyos meglévő betegségek (9). Azonban sokkal jellemzőbb a kártékony életmódbeli szokások hatása: a dohányzás például akár duplájára is növelheti a PDAC kialakulásának esélyét, az alkohol pedig önmagában másfélszeresére. Ezek mellett bizonyos táplálkozási szokásoknak is jelentős szerepe lehet a daganat kialakulásában, így a vörös húsok, a koleszterinben és nitrozaminokban gazdag ételek nagy mennyiségű fogyasztása vagy az obezitás emelhetik a kialakulás kockázatát. A PDAC gyakrabban fordul elő olyan foglalkozások esetében, ahol fémfeldolgozással, gyomirtókkal vagy klórozott szerves vegyületekkel dolgoznak (10, 11).

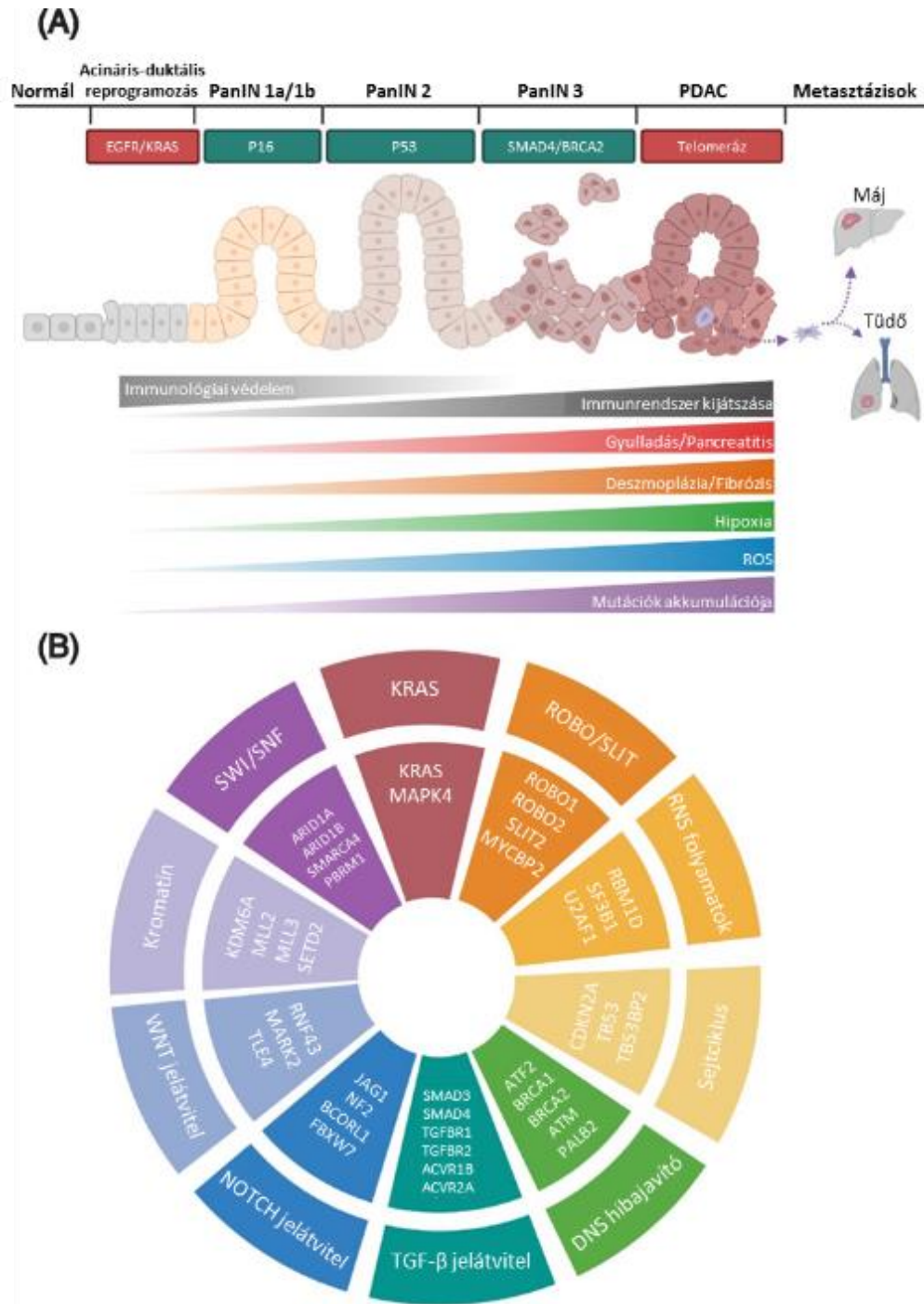
### 1.3.1 Gyakran előforduló genetikai eltérések PDAC-ban

A hasnyálmirigy daganatok nagy részét, így a PDAC típusúakat is, 4 hasnyálmirigy-rák megalapozó „driver” génhiba jellemezi: *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* és *SMAD4* (12). A *KRAS* gén aktivációja a kifejlett daganatok 92%-ban fellelhető, de már a pancreas intraepitheliális neoplasiákban (PanIN), vagyis a prekursor léziókban is kimutatható (**1. Ábra**). A *KRAS* fehérje a MAPK/ERK jelút szigálközvetítésében játszik jelentős szerepet és ezáltal részt vesz a sejtdifferenciáció és migráció szabályozásában (13). Az onkogén pontmutációja tipikusan a 2-es exon G12 vagy G13-as kodonjaiban vagy a 3-as exon Q61-es kodonjában egyetlen aminosav cseréjével jön létre, melynek következtében a *KRAS* hidrolizációs képessége gyengül és a guanozin-trifoszfát (GTP) nem alakul át guanozin-difoszfáttá (GDP) (14). Megfigyelték, hogy a reverzibilis PanIN vagy

intradukális papilláris-mucinózus neoplasiák (IPMN) nagyrészt a *KRAS* mutációja miatt jönnek létre, de a daganatok progressziójához gyakran egyéb genetikai eltérésekre is szükség van (15, 16).

A tumorszupresszor génként számontartott *CDKN2A* mutációja szintén megfigyelhető előrehaladott PanIN tumorokban. Az általa kódolt p16<sup>INK4A</sup> fehérje szerepe a sejtciklus G1/S ellenőrzőpontjában fontos, ahol a genetikailag nem megfelelő osztódást meggátolja és szenescenciát (tartós osztódásgátlást) idéz elő (17). A *CDKN2A* gén kódolja továbbá a p14<sup>ARF</sup> proteint is, mely a „mouse double minute 2” (MDM2) és p53 fehérjék segítségével képes apoptózist indukálni. Jellemző, hogy a génmutáció következtében főleg a p16 fehérje funkcióvesztése dominál PDAC daganatokban (18). A sejtciklus regulációjában résztvevő abberáns fehérjék viselkedése megteremtheti további mutációk lehetőségét, így a *CDKN2A* inaktivációja akár okozója is lehet a *KRAS* mutációjának, nem csak mellékes résztvevője (19).

Másik tumorszupresszor génmutáció a *TP53* inaktivációja, mely a PDAC-k 75%-ában van jelen (20). A *TP53* a genom őrzőjeként többek között fontos szerepet játszik a sejtek túlélésének, proliferációjának és apoptózisának szabályozásában. PDAC daganatokban jellemzően *TP53* misszenz pontmutációk alakulnak ki, melyek aminosav szubsztitúciót eredményeznek (21). Az így keletkezett inaktív p53 fehérje nem képes ellátni funkcióit, ami a sejt túlélését és a dezoxiribonukleinsav (DNS) instabilitását fokozza (22). A *SMAD4* génnel együtt a tumoriniciáció utolsó fázisában fellépő mutációként jelenik meg (23). A *SMAD4* deficittel kapcsolatban megfigyelték, hogy további sejtciklust szabályozó fehérje felülregulációjához vezet, így érzékenyebbé válnak a sejtek a nukleozid analógokra (pl. gemcitabinra), miközben az eleve magasabb ROS képződést és intenzív autophagiát segítve a sugárterápia rezisztenciáját segíti elő (24, 25). Ezen információk alapján a *SMAD4* mutációja PDAC-ban felmerül, mint prediktív marker.



**1. Ábra:** A PDAC-k kialakulásának folyamata és gyakran előforduló mutációik (Stoica és munkatársai nyomán) módosítva (26).

#### 1.4 A hasnyálmirigy daganatok szövettani felosztása

Szövettanilag ugyan a hasnyálmirigy duktusrendszere csupán az állomány 4%-át teszi ki, mégis a pancreas primer daganatainak 80%-a duktushámsejtekből indul ki (27). A

daganatképződés több lépéses folyamat, mely során először az acináris sejtek dukális irányba differenciálódnak (28). A metaplasztikus sejtek ezután olyan hyperplastikus szöveti struktúrát hoznak létre, melyben a legtöbb esetben már a *RAS* gén mutációja mellett sejtciklus regulátor fehérjéket kódoló génmutációk is jelen vannak (PanIN-1A és PanIN-1B). Az apoptózis gátlását elősegítő génhibák kialakulását követően atípusos hyperplasia és/vagy alacsony grádusú dysplasia jelenik meg (PanIN-2), mely később „high grade” dysplasia, illetve „in situ” carcinoma kialakulásához vezethet (PanIN-3) (29). A premalignus léziók közé a PanIN mellett, az intraduktális papillaris neoplasia és a mucinosus cysticus neoplasia alacsony és magas dysplasias formái sorolhatók, továbbá a külön entitásként számon tartott intraduktális tubulopapillaris neoplasia. A PanIN-ből kialakuló PDAC-k beleértve a különböző szubtypusokat (adenosquamosus, koloid, pecsétgyűrűsejtes, differenciálatlan, medulláris) már az exocrin pancreas malignus daganatai közé tartoznak. A csoport egyéb ritkábban előforduló entitásokat is magába foglal, mint az acináris carcinoma vagy cystadenocarcinoma, a kevert sejtes carcinomák illetve a pancreatoblastoma és serosus cystadenoma (1). Az endocrin hasnyálmirigy daganatai jelentősen ritkábbak és felosztásuk szerint két nagyobb kategóriára oszthatók: jól differenciált neuroendocrin tumorok és rosszul differenciált neuroendocrin carcinomák (30).

### 1.5 Diagnózis, szűrés, kezelhetőség

A korai stádiumban lévő betegek diagnosztizálása, egy hatékony szűrőprogram kialakítása és így a kezelési lehetőségek széleskörű kihasználása a PDAC esetében csak jövőbeli terv. A betegek nagy része (80-85%) lokálisan előrehaladott, irrezekábilis stádiumban, nem ritkán már távoli áttétek jelenléte mellett kerül diagnosztizálásra (31). A tünetek nem specifikusak és főként a daganat térfoglalása miatt okoznak panaszt (hasi fájdalom, hirtelen fogyás, diabetes mellitus), illetve a hasnyálmirigy feji részében kialakult daganatok elzárhatják az epevezetéseket és sárgaságot okozhatnak (32).

#### 1.5.1 Diagnosztikai lehetőségek

A sporadikusan előforduló hasnyálmirigy daganatok számos esetben incidentálisan kerülnek felfedezésre. Az egyéb okból elvégzett hasi ultrahang vagy computer tomográfias vizsgálat során azonosított cystikus vagy tumorszerű struktúra mindig felveti

a daganat lehetőségét (33). Különösen nagy jelentősége van a hasnyálmirigy feji részén felismert gyanakvásra okot adó képleteknek, hiszen a PDAC-k 70%-ban itt alakulnak ki (34). Az ultrahang vizsgálat egy olcsó és megbízható eljárás, azonban a hasnyálmirigy retroperitoneális elhelyezkedése miatt, nehezen vizualizálható és nagyban befolyásolja a diagnózist a radiológus tapasztalata és a beteg anatómiája. Az endoszkópiával kombinált ultrahang vizsgálat megengedi a szövettani vagy citológiai mintavételt is, ezáltal pontos szövettani diagnózist is lehetőség van felállítani. A kontrasztanyaggal végzett computer tomográfias eljárással lehet a leginkább megítélni a daganat invázióját és a metasztázis lehetőségeit, a mágneses rezonancia pedig akár a duktusok részletesebb tanulmányozására is lehetőséget nyújt (35). A stádiumbesorolás és rezekabilitás megítélésében ezen eljárások hatalmas jelentőséggel bírnak, azonban magas költségük (vagy az ultrahang esetében alacsony érzékenységük) miatt sajnos szűrési lehetőségként nem merülnek fel.

Mindemellett számos kutatás kimutatta, hogy minél korábbi a diagnózis, annál jobbak a betegek túlélési esélyei, még a borderline rezekábilis tumorok esetében is (36-39), így nem csak a szűrési programok kidolgozása kulcsfontosságú, hanem a neoadjuváns kezelések hatékonyságának javítása is igen nagy jelentőségű (40).

## 1.5.2 Kezelési lehetőségek

### 1.5.2.1 Sebészi kimetszés

A sebészi kimetszés, mint egyetlen kuratív lehetőség, egy technikailag igényes és nehezen kivitelezhető folyamat. Az anatómiai viszonyok miatt (és mert a PDAC-k legnagyobb részt a feji részben alakulnak ki) a nem áttétes daganatok is könnyen irrezekábilis vagy borderline rezekábilis stádiumban kerülnek felfedezésre (41). A truncus coeliacus, az arteria és vena mesenterica superior, a vena portae és az arteria hepatica helyzetéhez mérten kerül egy hasnyálmirigy daganat rezekábilis vagy irrezekábilis besorolásba. Létezik lokálisan előrehaladott, illetve borderline besorolás is, mely a kimetszést makroszkóposan lehetővé teszi, de patológiai vizsgálat során a rezekációs széleken daganatszövet azonosítható. Ezen kategóriákba tartozó esetek adjuváns és neoadjuváns kezelése jelentősen javítani tudja a betegek túlélését (42).

### 1.5.2.2 Adjuváns és neoadjuváns kezelések

Az adjuváns terápia célja a műtét utáni loko-regionális vagy szisztémás terjedés megállítása. Ezt klasszikus módon kemo- és/vagy radioterápiával végzik és akár 6 hónapon át tartó kezelést jelenthet (32). Az Amerikai Egyesült Államokban kidolgozott protokollok a radioterápiát kombinálják gemcitabin vagy 5-fluorouracil készítménnyel, de az ellentmondásos tanulmányok miatt (43-47), az európai trend csak kemoterápiát használ adjuváns kezelésként PDAC-ban.

Neoadjuváns kezelésként a radioterápia elvesztette jelentőségét, helyette a több kemoterápiát is ötvöző FOLFIRINOX (folsav + 5-fluorouracil + irinotecan + oxaliplatin kombinációja) kezelés segíthet rezekábilissá tenni a lokálisan előrehaladott tumorok több mint 20%-át (48, 49).

### 1.5.2.3 IV-es stádiumú PDAC-k kezelése

Az inoperábilis tumorok kezelési stratégiája palliatív jellegű. A cél a beteget életben tartani a lehető leghosszabb ideig, a lehető legjobb általános állapotban (50). Amennyiben a beteg állapota megengedi, kemoterápiás lehetőségek is szóba jöhetnek a tumorterhelés csökkentésére. Legjobb eredményeket az adjuváns és neoadjuváns kezelésekkor is alkalmazott gemcitabin és FOLFIRINOX, illetve a nab-paclitaxel (abraxane, albumin-paclitaxel) kemoterápiás szerek mutattak (51, 52). Egyre nagyobb figyelem terelődik továbbá a célzott terápiás lehetőségekre és az immunterápiára. A mikroszatellita instabilitást hordozó PDAC daganatokban például ajánlják a pembrolizumab (programozott sejthalál receptor-1 (PD-1) immun checkpoint inhibitor) alkalmazását másodvonalon (53), azonban ez a típus a PDAC-k nagyon kis számát teszi ki. A több mint 90%-ban előforduló *KRAS* mutációra vagy egyéb gyakran előforduló driver mutációkra alkalmazható célzott kezelések pedig nem bizonyulnak jelentősen jobbnak a klasszikus kemoterápiás kombinációknál (54). Nehezíti továbbá az aktuális kezelések hatékonyságát a daganatok genetikai heterogenitása, ami a terápia-érzékeny tumorsejtek szelekciójával rezisztens klónok kifejlődését idézi elő (55).

### 1.5.3 Kemo- és radiorezisztencia mechanizmusok PDAC-ben

A PDAC-ban szenvedő betegek körében, még a hatékonyan tartott terápiák alkalmazása esetében is, igen gyakoriak a relapsusok (56). A rezisztencia kialakulása egy adott

kezelésre nagyban megnöveli a mortalitási indexet, főleg előrehaladott állapotú betegeknél. A kezelések során kisselektálódott tumorsejt szubklónok között feltételezhetően a tumor progenitor sejtek („cancer stem cells” – CSC) a legpotensebbek kemo- és radiorezisztens kolóniák létrehozására. A CSC-k olyan „dormant” sejtek, melyek megtartották őssejt jellemzőiket. Aszimmetrikus önmegújító osztódásra képesek, ahol csak a létrehozott, többszöri sejtciklusra képes „transit amplifying” (erősen osztódó) sejtpopuláció reagál jól kemoterápiára, az őssejt tulajdonságát megtartó „tumor őssejtek” nem (57). A CSC-k további sajátos jellemzői, hogy metabolikus aktivitásuk eltér a többi tumorsejtétől (intenzíven termelnek aldehid-dehidrogenáz – ALDH – enzimet), ritkábban osztódnak, illetve magas daganat kiváltó potenciáljuk van (58). A CSC-k könnyen adaptálódnak és antiapoptotikus mechanizmusaik általában felerősödtek (BCL-2, MCL-1), továbbá a DNS javító mechanizmusaik is intenzíven működnek (59). Mindezek mellett a tumort körülvevő stromának is jelentős szerepe van a kemo- és radiorezisztenciában. A tumormikrokörnyezet funkcionális heterogenitása, a tápanyag koncentráció szabályozása, illetve a sejt-sejt közötti kapcsolatok kialakítása komplex mintázatokat hozhat létre egy daganaton belül és magas agresszivitással társulhat (60). A rezisztencia mechanizmus másik sarokköve tehát a stroma-tumorsejt, illetve sejt-sejt közötti kapcsolatok időbeni változását leíró epitheliális-mesenchimális tranzíció (EMT). A rezisztencia kialakításán kívül, az EMT-nek tulajdonítható a tumorsejtek migrációs képességének kifejlesztése és ezáltal a metasztázis képződés, továbbá a hypoxiához való adaptáció is (61, 62).

A PDAC-ra jellemző magas kemorezisztencia multifaktoriális. Ismert, hogy a tumor asszociált makrofágok és myofibroblasztok inzulin-szerű növekedési faktor (IGF) 1-et és 2-öt termelnek (63), de a hypoxia indukálta faktor 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) által okozott metabolikus átprogramozás is bizonyítottan kemorezisztenciát tud okozni (64). Nem elhanyagolható a stroma, mint fizikai barrier a kemoterápiás szerek ellen, és a CSC-k szerepe sem a *de novo* rezisztencia mechanizmusok kialakulásában (65, 66).

A radioterápia kedvező hatása PDAC-re ellentmondásos. Egyre több bizonyíték van tumorméret csökkentő eredményekről (67-69) programozott sejthalál ligand-1 (PDL-1) gátlók kíséretében is (70), azonban klinikai tanulmányok és *in vitro* kísérletek is magas radiorezisztenciáról számolnak be (71, 72). A PDAC-k jelentős része már kezdetektől fogva ellenálló a sugárterápiával szemben és ennek egyik fő okozója úgy tűnik, hogy a

hypoxia. Ezt alátámasztja az a tanulmány, melyben HIF-1 $\alpha$  gátlót adagoltak egereknek és a későbbi sugárterápiával kombinálva jelentős javulást láttak a radioterápia sejtölő hatásában (73).

A hypoxia mellett megfigyelték, hogy vannak génmutációk is, melyek felelősek lehetnek a sugárterápia elleni rezisztencia kialakulásában. Kiemelt szerepet tulajdonítanak például a *SMAD4* depleciónak (25), illetve fontos szerepet játszik a felülregulált *EGFR* és az intenzív AKT foszforiláció is (74, 75). Megfigyelték továbbá, hogy amennyiben a G2 fázist reguláló checkpoint kinase 1 (CHK1) gátlókat vagy WEE1 stimuláló szert használtak szimultán sugárterápiával, a rezisztens sejtek nem tudták már kivédeni a radioterápia hatásait és autofágiában pusztultak el (76, 77). Felmerül így a sejtciklust szabályozó ciklin-dependens kinázok (CDK-k) gátlásának lehetősége, mint kiegészítő terápiás lehetőség a radioterápia mellett.

A hasnyálmirigy daganatok besugárzása ugyanakkor a tumorelles immunválaszra is hatással van. Bizonyított, hogy radioterápiát követően megnőtt az antitumor immunitást gátló „myeloid-derived” szupresszor sejtek aránya (78-80).

Mindezek fényében nem meglepő a kemo-, immuno- és radioterápiákat támogató és rezisztencia mechanizmusokat gátló, alternatív kezelési lehetőségek körüli intenzív érdeklődés.

## 1.6 Hipertermia

### 1.6.1 Hipertermia az onkológiában

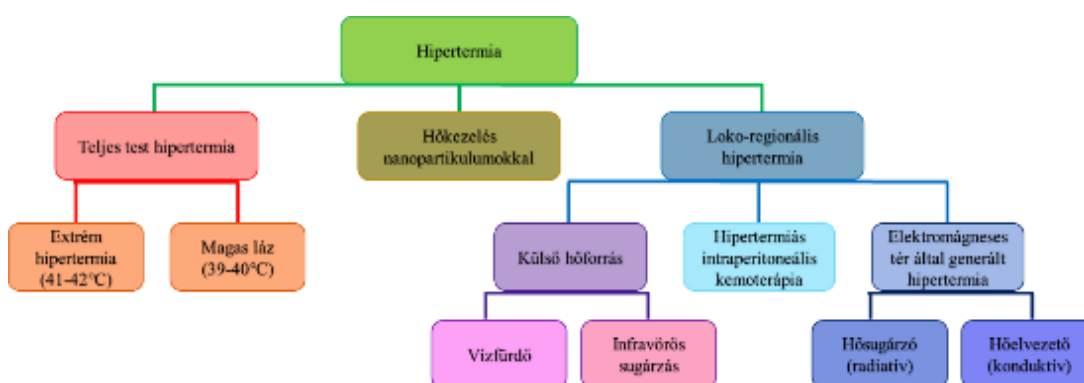
A terápiás hipertermia definíció szerint magas testhőt vagy egy betegséget kezelendő indukált lázat jelent (81). Az onkológiában főleg szolid daganatokra használt terápiás lehetőség, melynek célja a malignus tumorszövetek eradikálása a szervezetből (82). Ismert ugyanis, hogy a tumorsejtek sokkal érzékenyebbek a fizikai behatásokra (sugárzás vagy akár hőmérséklet ingadozás), mint a normál szöveti sejtek (83). A 39-45°C közötti terápiás hőmérséklet *in vitro* körülmények között akár önmagában is képes jelentős sejtkárosodást előidézni (84, 85), azonban a klinikum jellemzően kiegészítő terápiaként használja akár kemo-, radio- vagy célzott terápiák mellett (86-88). Attól függően, hogy



mekkora testrészen kívánjuk alkalmazni a hőkezelést, többféle hipertermiát különböztetünk meg (**2. Ábra**).

#### 1.6.1.1 Teljes test hipertermia („whole body hyperthermia” - WBH)

A teljes test hipertermia kezelés során a beteg a primer daganat méretétől és elhelyezkedésétől függetlenül a teljes testére kiterjedő hőkezelésben részesül. Célja a perifériás vér felmelegítése és a keringés segítségével a hő elvezetése a test minden szövetébe (89). Megkülönböztetünk extrém WBH-t, mely során a testhőmérséklet eléri a 41-42 °C-ot a 60 perces kezelési protokoll alatt, illetve láztartományon belüli WBH-t, ahol az akár 6 órán át tartó kezelés alatt a testhőmérsékletet 39-40 °C között tartják (90). A klinikai tanulmányok kevésbé biztatóak a használhatóság terén. A magas testhőmérséklet huzamosabb ideig fenntartva nem veszélytelen és a terápiás válasz messze elmarad a kívánttól. Kiderült fázis I-es és II-es vizsgálatokból, hogy jelentős myeloszuppressziót (grade 3 vagy 4) okoz a kemoterápia és a WBH kezelés együttes alkalmazása a betegek jelentős részénél, de előfordult kamrai aritmia és akut veseelégtelenség is (91). Ezen információk fényében kemoterápia és WBH kombinációs kezelés hatékonyságát igazoló fázis III vizsgálat malignus daganatok kezelésére nem született. Kiderült azonban, hogy más területeken, nem onkológiai betegek terápiájának kiegészítéseként a WBH releváns lehet (92, 93).



**2. Ábra:** Az onkológiai kezelésekre használt hipertermia típusai

#### 1.6.1.2 Loko-regionális hipertermia

A teljes test hipertermiával ellentétben a loko-regionális hőterápia célzottan kezeli a test egy kisebb régióját, de akár szelektíven a malignus daganatokra is tud fókuszálni (94, 95). A külső hőforrás, például a végtagok vízfürdője vagy fókuszált infravörös hullámhosszon

sugárzó lámpák, klasszikusan a testfelszíni szövetek irányából a mélyebb rétegek felé csökkenő grádienssel képes a hőt leadni, így bőr és nyálkahártya felszíneken alkalmazhatók elsősorban. Létezik ugyanakkor a regionális hőkezelés egy sajátos formája: a hipertermiás intraperitoneális kemoterápia (HIPEC) (96). Ez egy műtét közbeni speciális termokemoterápia, amikor nyitott vagy részlegesen zárt hasfallal, a peritoneális térben 41-43°C-ra hevített kemoterápiás szuszpenziót perfundálnak 30-90 percig. A hevítés a testen kívül történik 43-45°C-ra és az áramlási egység 1 L/perc (97). A kemoterápia a daganat típusától függően lehet mitomycin C, oxaliplatin, doxorubicin, 5-fluorouracil, de akár ezek kombinációja is. Leggyakrabban ovarium, colorectalis és pancreas carcinomák esetében használják a már kialakult peritonealis carcinomatosis kezelésére vagy ennek megelőzésére (98-101).

A szisztémás kezelés és a loko-regionális hőterápia között helyezkedik el a micro- és nanopartikulumokkal végzett hipertermia, ahol fényérzékeny vas-oxidot tartalmazó kolloid méretű részecskéket juttatnak a beteg daganatának közvetlen környezetébe. A külső fényforrással vagy mágneses mezővel közvetített energiát a nanopartikulumok szelektíven elnyelik és lokálisan leadják a tumornak, ami így jelentősen károsodik (102, 103). Hasonlóképpen léteznek termoszenzitív liposomába csomagolt kemoterápiás szerek, melyeket szisztémásan adva a loko-regionális hőkezeléssel „aktiválni” lehet, így magasabb koncentrációban lehet bejuttatni a célszervbe a megfelelő szert (104, 105).

A loko-regionális hipertermia kezelés klasszikus, nem invazív formája azonban az elektromágneses tér által létrehozott hőkezelés. Számos készülék létezik, különböző hullámhosszokat (infra-, mikro- vagy rádióhullám) használva, továbbá az elektromos tér elvezetésének technikája is különbözhet: lehet radiatív (hősugárzó) vagy konduktív (hőelvezető) (89). A különböző technikák célja a termális hatás minél pontosabb fókuszálása, illetve a bevitt energia minél nagyobb hasznosítása.

A klinikai tanulmányokban jellemzően konduktív vagy sugárzó forrásokat használnak, de a dózist főként a kezelendő szövetben elért hőmérséklet határozza meg (41-44°C), amit a bevitt energia mennyiségével szabályoznak (89, 106).

A termo-abláció a hőkezelések azon formája, amikor a testhőmérsékletnél jelentősen magasabb hővel (>50°C), néhány perces időtartamra korlátozva, azonnali szövetkárosodást érnek el, jellemzően sejtnekrózist okozva a szöveteken belül (107). A

technika inkább a sebészi kimetszés vagy a sugársebészet (gamma kés) minimálisan invazív társaként használatos, de jelentősége főleg a rövidtávú hatása miatt nagy és kevésbé képes hosszantartó citotoxikus hatást kifejteni (108, 109).

Összességében, mivel még nem teljesen ismert a hőterápia molekuláris hatása különböző tumortípusokra, egyelőre a hipertermiás eljárások indikációi korlátozottak. Végstádiumú betegek esetében vagy olyan kisgyerekeknél, ahol a kemoterápia hosszútávon nagy morbiditással járna, az abláció is és a magas láz tartományban működő hipertermia is felmerül terápiás lehetőségként (110, 111).

#### 1.6.2 Termoradioterápia, termokemoterápia és termokemoradioterápia a klinikumban

Számos tanulmány foglalkozik a termoradioterápiát és termokemoterápiát alkalmazó kombinációs kezelések előnyeivel a klasszikus kezeléseken felül. Egy összefoglaló tanulmány, mely 6 különböző klinikai kísérlet eredményeit vizsgálta, megállapította, hogy rectum carcinomával diagnosztizált betegek 2 éves túlélése jelentősen magasabb volt termoradioterápiás kezeléssel, mint a csak besugárzásban részesült egyéneknek (112). A loko-regionális hipertermiával kombinált sugárkezelés során az akut toxicitás ugyanakkor nem különbözött a két csoportban, így meglehetősen biztonságosnak tűnik a két kezelés együttes alkalmazása. Lokálisan recidivált emlő daganatok esetében szintén additív hatású volt a hipertermia a radioterápiás kezeléssel együtt, (113, 114) az akut toxicitás csökkenésével. Cervix carcinomában is vizsgálták a termoradioterápia hatásait, ahol egy tanulmány szerint 77%-ban értek el teljes remissziót, ami nem tér el jelentősen a kemoradioterápia hatékonyságától hasonló betegpopulációban (115). További összesítő klinikai tanulmányok is beszámolnak a lokálisan előrehaladott cervix carcinomák jobb kezelési esélyeiről, tekintettel a túlélésre, teljes remisszióra, illetve akut toxicitásra (116, 117). A méhnyakrákokat gyakran megelőző magas rizikójú humán papilloma vírus (HPV) fertőzésre alkalmazott hipertermia 3 hónapos utánkövetéssel a nők 85,19%-ban volt képes a fertőzést eradikálni (118). Egy kutatócsoport prospektív tanulmányai szerint a modulált elektro-hipertermiával (mEHT) és kemoradioterápiával kezelt humán immundeficiencia-vírussal (HIV) fertőzött nők IIB és IIIB stádiumú cervix carcinomájának lokális kontrollja jelentősen jobb volt, mint a hipertermia kezelésben nem részesült csoporté (119, 120).

Pancreas daganatok kombinált hipertermiás kezelésére is születtek már klinikai tanulmányok. Egy nemrég publikált munkában, ahol irrezekábilis PDAC-ban szenvedő betegeket kezeltek termoradioterápiával, lényegesen hosszabb átlag túlélést tapasztaltak, mint amit az irodalomból ismerünk. Emellett a daganatok átlagosan 17%-kal zsugorodtak és a tumormarkerek szintje is szignifikánsan lecsökkent a kezelt betegeken (121). A HEATPAC néven bejegyzett fázis 2-es vizsgálatba lokálisan előrehaladott hasnyálmirigy daganatos betegeket válogattak be, és kezeltek kemoradioterápiával vagy termokemoradioterápiával. A tripla kezelésben részesült betegek átlag túlélése 24 hónap volt és 2 beteg esetében a daganat sebészileg eltávolíthatóvá vált (122). Egy hazai retrospektív tanulmány szerint szintén hosszabb túlélési periódus érhető el lokálisan előrehaladott PDAC-s betegek esetében kemoterápia és mEHT kombinált kezelésével, a standard kemoterápiával szemben (123).

A hasnyálmirigy daganatok mellett számos további szolid tumor esetében javítja a hipertermia a kemoterápia hatásfokát. Például egy fázis III vizsgálat keretén belül abdominális vagy retroperitoneális lágyrész sarcomás betegek neoadjuváns kezelésére a standard etoposide+ifosfamide+doxorubicin kombinációt használták a betegek egyik csoportján, a másik csoport pedig ugyanazt a kemoterápia kombinációt kapta, de hipertermia kiegészítéssel. A hozzáadott hipertermia kezelésben részesült betegek progressziómentes túlélése nagyobb volt, mint a csak kemoterápiával kezelt betegeké. Jobb volt a mortalitási ráta és a lokális tumorprogresszió is, amikor a standard kezelést kiegészítette a termoterápia. Sajnos a mellékhatások tekintetében azonban a hőkezelés felerősítette a grade 3-as vagy 4-es leukopenia gyakoriságát (124). Az additív hatása miatt a termoterápiát nagy érdeklődés kíséri gyermekkori tumorok kezelésében. A kemoterápiás szerek a gyermekek esetében késői mellékhatásokkal is járhatnak, továbbá a gyermekek a kemoterápia maximális tolerabilitását is hamarabb eléri (110). Egy kutatócsoport prospektív tanulmányt folytatott 44 kiújuló extratesticularis csírasejtes malignus tumorban szenvedő gyermekben (125). A betegek ciszplatin+etoposid+ifosfamide kemoterápiás kombinációja mellett a ciszplatin kezelése alatt 1 óra hipertermiás kezelést is kaptak. Az 5 éves túlélés 72% volt, ami meghaladja az irodalomban leírt hasonló kiindulású és stádiumú tumoros betegek túlélési esélyeit (69,6% sacroccocygealis régióban elhelyezkedő csírasejtes tumorok és 53,2% a IV-es stádiumú csírasejtes

tumorok 5 éves túléléséhez képest) (126, 127). Több esetben az irrezekábilis tumorokat sikerült a kezelés hatására eltávolítani, ami szintén javított a betegek általános állapotán.

Mindezek megerősítik, hogy a modern, radiatív vagy kapacitív elektromos tér segítségével létrehozott mély szöveti hipertermia, kombinálva nanopartikulumok és/vagy hőre aktiválódó burkokba csomagolt kemoterápiás szerek alkalmazásával, számos daganat kezelésében nyújt kiemelkedő terápiás hatást. Tehát a kemo- vagy radioterápiát, támogató hipertermia, a klinikai tanulmányok szerint is biztonságos és hatékony kiegészítő terápiás lehetőségként tarthatjuk számon (86).

#### 1.6.2.1 Radioszenzitizáló molekuláris hatások

A termoradioterápia klinikailag megfigyelt citotoxikus hatását számos tanulmány modellezte *in vitro* körülmények között. Ismert ugyanis a radioterápia direkt DNS károsító hatása, melyet a hipertermia kezeléssel kiegészítve több ponton is lehet potenciózni. A hőkezelésre, mint fizikai behatásra a daganatsejtek érzékenyebbek, így az direkt és indirekt módon is tudja károsítani a DNS-t. Kimutatták, hogy a legalább 44°C-os hőterápia direkt módon egyszálú DNS törést okoz a tumorsejtek magjában (128), indirekt módon pedig a hibajavító fehérjék denaturációját, illetve a sejtciklus S fázisának blokkolását okozza (129-131). A DNS-t direkt károsító hatások önmagukban csak kiegészíthetnék a radioterápiát, ami a daganatsejtekben sokszor felülregulálódott hibajavító mechanizmusok miatt elveszítenék jelentőségüket. Az indirekt hatások jelenlétét több tanulmány is igazolta, hiszen például egy kutatócsoport *in vitro* vizsgálta a nem homológ rekombináns fehérjék (NHRF) aktivitását humán fibroblasztokban. Azt tapasztalták, hogy a termoradioterápia kombinációjával kezelt sejtekben az össze nem illesztett duplaszálú DNS törések mennyisége 13%-kal, a rosszul összeillesztett duplaszálú DNS mennyisége 51%-kal magasabb volt a monoterápiás csoporthoz képest (132). Mások megfigyelték, hogy jelentősen csökkent a DNS-függő protein kinázok aktivitása, ahogy a KU70, KU80 és BRCA1 fehérjék szintje is lecsökkent hipertermia kezelés után *in vitro* körülmények között. Egy másik kutatócsoport kimutatta, hogy a BRCA2 fehérje szintje is jelentős csökkenést mutat *in vitro* sejt kultúrákban 41-42°C-os hőkezelés és radioterápia után, rövid idejű mintavételekkor (133). Saját kutatócsoportunk is megemelkedett számú  $\gamma$ H2AX fókuszokat talált Panc1 pancreas adenocarcinoma sejtmagokban még 24 órával termoradioterápia után is (134, 135).

Az ionizáló sugarak a vízmolekulák radiolízise révén reaktív oxigén gyököket (ROS) generálnak, melyeknek direkt sejtkárosító és indirekt DNS károsító hatása már régóta ismert (136). A magas ROS szint a sejten belül apoptotikus és/vagy nekrotikus folyamatokat indít be, melyeket a sejtek antioxidáns hatású enzimekkel igyekeznek semlegesíteni. Ilyen szabad gyököket hatástalanító enzimek többek között, pl. a glutathion-peroxidáz, a kataláz és a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát. Azonban PDAC-kban leírták már, hogy a megemelkedett antioxidáns enzimek tumorpromóterként is szolgálhatnak (137), de emlő, tüdő és bőr daganatokban is bebizonyosodott tumornövekedést támogató szerepük (138, 139). Radiorezisztencia szempontjából azonban legfőbb szerepe a hypoxiának van. Oxigénhiányos környezetben ugyanis az ionizáló sugarak kevésbé tudnak szabad oxigén gyököket generálni, és amennyiben a DNS hibajavító mechanizmusok is felülregulálódtak, úgy a sejt ellenállhat a terápiának (135, 140). *In vivo* körülmények között a hipertermia jobb vérellátást biztosít a szolid tumorok környezetében, ezáltal jelentősen javítani tudja az oxigenizációt (141). Ennek következtében a szabad oxigén gyökök mennyisége megemelkedik, míg a túlélésért felelős HIF-1 $\alpha$  szintje lecsökken (142). Mindezek fényében a besugárzás előtt alkalmazott hőterápia az oxigénellátás javításával tudja fokozni a radioterápia hatását, irradiációt követően pedig a DNS károsító hatások felerősítésével és a hibajavító mechanizmusok gátlásával érzékenyíti a sejteket a sugárterápiára (143, 144)

#### 1.6.2.2 Kemoszenzitizáló molekuláris hatások

A radioterápia direkt hatásai mellett a hipertermia számos kemoterápiás ágens hatását is javítani tudja, így például az alkiláló szereket, a platina származékokét, az anthraciklineket, az antimetabolitokét, de akár tubulin-kötő ágenseket is (144). Cisplatin, carboplatin és oxaliplatin kemoterápiás szerek esetében a tumorsejtek gyógyszerfelvétele arányosan nőtt a hipertermia során alkalmazott hőmérséklettel (145). A liposzomákba csomagolt gyógyszerkészítmények felvétele szintén jelentősen javult hőterápia hatására, amit *in silico* és *in vitro* is modelleztek (146-148). A Caelyx néven kiadott liposzomába csomagolt doxorubicint, illetve a már speciálisan termoszenzitív liposzóma burokból zárt doxorubicin tartalmú ThermoDox készítményeket hipertémiával kombinálva fázis II/III klinikai tanulmányokban is vizsgálták (105, 149). Megállapították, hogy humán kezelésekre is alkalmasak, biztonságosak és a vizsgált emlődaganatos, illetve

hepatocelluláris carcinomában (HCC) szenvedő betegeknél a mellékhatásokat is csökkenteni tudták a kettős kezeléssel.

A gyógyszerfelvétel mellett a hipertermia az enzimaktivációt is felgyorsítja, így a sejteken belüli kemoterápiás szerek metabolizmusa intenzívebb, mely az inaktív hatóanyagok aktív metabolitokká alakulását segíti (144). Ilyen kemoterápiás szer például a gemcitabin, melynek aktív metabolitja a difluorodeoxicitidin trifoszfát (dFdCTP). Panc1 PDAC sejtvonalon figyelték meg, hogy hipertermia kezelés mellett a gemcitabin konverziója dFdCTP-á szignifikánsan magasabb a citoplazmában. A jelenséget a dezoxicitidin-kináz aktivitásának megemelkedésével és/vagy a metabolitot degradáló citidin deamináz enzim csökkenésével magyarázzák hőkezelést követően (150).

A kemoterápia egyik nagy kihívása az ún. „multidrug” rezisztencia (MDR) gének felülregulációja és az ABC transzporterek intenzív működése. Ezek a sejtmembránban elhelyezkedő efflux csatornák, melyek az intenzív glikolízis következtében felgyorsított ütemben pumpálják ki a keletkezett adenzin-trifoszfátokat (ATP), ugyanakkor aktívan eliminálják a kemoterápiás szereket is a citosolból (151). Egér emlőcarcinoma sejtvonalon végzett kísérleti modellen megvizsgálták a doxorubicin effluxáért felelős ABCG2 transzporter aktivitását hipertermia kezelés után (152). A hőkezelésben részesült sejtekben jelentősen megemelkedett a sejten belüli doxorubicin koncentráció, amit az SCL22A16 influx transzport fehérje szint emelkedése és ezzel egyidejűleg az ABCG2 efflux transzport fehérje szint csökkenése kísért.

Szintén nagy kihívás a kemoterápiás kezelések során a CSC-k jelenléte. Ezek a sejtek felelősek sokszor a daganatok heterogenitásáért, kiújulásáért, illetve számos esetben bebizonyosodott, hogy képesek rezisztenciát kialakítani több kemoterápiás ágens ellen is (57). Több kutatás igazolta a hőkezelés őssejtekre gyakorolt gátló hatását prosztata adenocarcinoma, tüdő kissejtes carcinoma és adenocarcinoma, illetve emlő adenocarcinoma sejtvonalakban is. A CSC-k számának és aktivitásának csökkenését kimutatták *in vitro* és *in vivo* körülmények között is (153-155).

### 1.7 Warburg-hatás

Otto H. Warburg már 1927-ben leírta, hogy a malignus daganatok energiatermelésre oxigén jelenlétében is inkább a glikolízist részesítik előnyben és jelentős mennyiségű

laktátot halmoznak fel az intercelluláris térben (156). A malignus daganatokra jellemző sajátos tulajdonságok közé, az általa leírt mechanizmus azonban csak 2011-ben lett „rendellenes anyagcserút”-ként besorolva (157). Ma már azt is tudjuk, hogy a magas laktát szint a szolid tumorsejtek környezetében nem egy kiváltó tényező, hanem a felülexpresszált HIF-1-nek és a metabolikus útvonalak különböző résztvevőinek (cMYC, RAS, AKT) köszönhető (158). A Warburg-hatásnak számos olyan következménye van a tumorkörnyezetre, amely főleg a kemo-, de a radioterápia hatékonyságát is megnehezíti. Az emelkedett laktát dehidrogenáz (LDH) szint összefüggésbe hozható a DNS javító mechanizmusok felülregulálódásával (159). A már említett *RAS* onkogén mutációja is felerősíti a glikolízist, ami pozitív feedback során további mutált *RAS*-t hoz létre (160). Ugyanígy az *AKT* és az *ERK* fehérjéket kódoló gének felülregulációja is ok-okozati összefüggést mutat a magas LDH szintekkel, ami túlélési és sejtproliferációs szignálútvonalat is aktivál (161, 162). A magas extracelluláris laktát szinthez kompenzatorikusan társuló alkalikus citoplazma felerősíti a hypoxia elleni rezisztenciát és proliferációra hajlamosítja a tumorsejteket, ezzel egyidejűleg csökken a daganatellenes szerek és az immunrendszer hatékonysága is (163). Ezen felül egyes tanulmányok szerint az intenzív glikolízis által létrehozott savas mikrokörnyezet és a hypoxia kedvező feltételeket biztosít a CSC-k fennmaradásához, melyek szintén a kemoterápiás szerek elleni rezisztencia kialakulását segítik elő (164).

Egér emlő tumorsejt modellen megfigyelték, hogy az alacsonyabb pH érzékenyíteni tudja a sejt kultúrákat hőterápiára, továbbá a tumor progenitor sejt arányt mutató kolóniaformáló próbában is csökkenést láttak a hőkezelt csoportokban (165). A megemelkedett laktát és ionkoncentráció felvetette az elektromos tér által létrehozott hipertermia tumorszelektív hatását. Az elektromos töltésekben (pl. ionok) gazdag tumorszövetben a dielektromos állandó magasabb, ami részben a tumor savas pH-jú (pl. az emelkedett laktát szint miatt) mikrokörnyezetének köszönhető. Ennek következtében az elektromos energia feldúsul a tumorszövetben, és ez lehetőséget ad a tumorok elektrohipertermia kezelésére.

### 1.8 Modulált elektro-hipertermia

Az mEHT a hipertermia azon formája, amikor amplitúdó-modulált elektromos tér által generált hőt használunk malignus szövetek kezelésére. A kezelés két kapacitív



kicsatolású (a tumor része az elektromágneses térnek) elektróda között, 13,56 MHz amplitúdóval modulált elektromos tér generálásával szelektíven hat a szövetekre, ahol így ~42°C-os kontrollált hőstressz váltható ki (166).

### 1.8.1 Fizikai háttér

A biológiai szövetek meghatározott dielektromos állandóval (permittivitás) és fajlagos vezetőképességgel (konduktivitás) rendelkeznek attól függően, hogy az őket alkotó sejtek metabolikus aktivitása során mennyi ion és víz halmozódik fel a citoplazmában vagy az extracelluláris térben (167, 168). A biológiai szövetek elektromos térrel való ingerlése a sejtekben lévő töltéssel rendelkező molekulák térbeli átrendeződését okozza, polaritásuktól függően. A dipól rotáció és súrlódás következtében pedig lokálisan hő termelődik (169). A malignus tumorok elektromos vezetőképessége általában jelentősen eltér a normál szövetekétől, például emlőcarcinomák ellenállása változó árammal generált elektromágneses térben (impedancia) alacsonyabb a környező normál szövetekénél (170). Hasonlóan, vizsgálták a dielektromos állandót és konduktivitást normál májszövetben és malignus májtumorokon belül is, mely során azt találták, hogy *in vivo* modellben a daganatszövet effektív konduktivitása 16%-al magasabb volt, mint a környező normál májszöveté (171). Megvizsgálták *in vitro* körülmények között máj, tüdő és emlő normál szöveti sejtek dielektromos állandóját és összehasonlították ezen szövetekből származó carcinoma sejtekével. Jelentős eltéréseket tapasztaltak már a normál szövetek között is, azonban mindhárom esetben az elektromos vezetőképesség a daganatos sejtek tenyésztéseiben magasabb volt, mint a normál sejtek tenyésztéseiben (172). Egy átfogó tanulmány szintén arról számolt be, hogy a malignus szövetszaporulatoknak magasabb a konduktivitása, víztartalma és az intracitoplazmatikus nátrium ion koncentrációja a releváns normál szövetekhez képest (173).

Összegezve elmondható, hogy ha malignus daganatokat elektromágneses mező hatásának teszünk ki, akkor hatékonyabban tudunk bennük – illetve azokból kialakított sejtenyésztésekben – szelektív és kontrollált hőt generálni, mint a környező normál szövetekben. Az elektromágneses tér a tumorszövetben feldúsul, így célzott hőkezelést tesz lehetővé, mindemellett pedig közvetlenül is hat a sejtmembrán lipid tutajokban koncentrálódó dipól tulajdonságú receptor molekulákra is.

## 2. Célkitűzések

Hipotézisünk szerint az mEHT klinikai hatékonyságát olyan molekuláris változások okozzák, melyek támogatni tudják a klasszikus kemo- illetve radioterápia okozta citotoxicitást. Korábbi egér colorectalis carcinoma sejtvonalon elvégzett apoptózis-indukciós mechanizmusok vizsgálatára alapozva tanulmányoztuk az mEHT okozta molekuláris változásokat. Ennek érdekében PDAC sejtvonalakon vizsgáltuk az mEHT hatását önállóan, illetve sugárkezeléssel, vagy kemoterápiával kombinálva.

Vizsgálataink a következő pontokra tértek ki részletesen:

- Az mEHT monoterápia hatékony lehet-e PDAC sejtek kezelésére?
- Radioterápiával vagy kemoterápiával kezelt sejtekben az mEHT képes-e felerősíteni ezen kezelések citotoxikus hatását?
- Milyen sejthalál útvonalak aktiválódnak mEHT és sugár-, illetve kemoterápia kombinált kezelés során PDAC sejtekben?
- Milyen hatással vannak a kombinációs kezelések a sejtreplikációra és miben különbözik a radio- és kemorezisztens sejtvonal válaszreakciója a kemoszenzitív sejtvonaléhoz képest?
- Milyen dinamikával változik a sejtstressz asszociált hősokkfehérjék expressziója Panc1 és Capan1 sejtvonalakban mEHT kezelést követően?

### 3. Módszerek

#### 3.1 Sejttenyésztés

Kísérleteink során két pancreas carcinoma sejtvonalat használtunk. Az egyik a primer PDAC-ből izolált Panc1, amely egy radio- és kemorezisztens sejtvonal, a másik a Capan1, amelyet májmetasztázisból izoláltak és irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy érzékenyen reagál gemcitabin (GEM) kezelésre (174). A sugárterápia és mEHT kombinációjának vizsgálatai során Panc1 sejtvonalat használtunk, míg a kemoterápiás kísérleti sorozatunkhoz mindkét sejtvonalon elvégeztük a méréseinket. A Panc1 sejtvonalat az ATCC-től (ATCC® HB-8065™; HB-8064™ American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA), a Capan1-et pedig a CLS-től (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Németország) vásároltuk. Az ATCC az Iscove's Modified Dulbecco's Mediumot javasolja a Panc1 sejtek tenyésztéséhez, így ebben növesztettük őket. A Capan1 sejteket a nekik megfelelő Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (IMDM LM-I1092 és DMEM LM-D1111, Biosera, Boussens, Franciaország) szaporítottuk. Mindkét sejttenyésztő oldatot 10% hőinaktivált foetalis borjú szérummal (FBS, FB-1001H, Biosera) és 0,16 mg/ml Genta-Gobens Gentamicin antibiotikummal (Laboratorios Normon, Madrid, Spanyolország) egészítettük ki. Az IMDM médiumhoz továbbá 1% 2 mM-os L-glutamint (XC-T1715 Biosera) adtunk. A kezelések alkalmával mindig friss, komplett, az adott sejtvonalnak megfelelő médiumot adtunk a sejtekhez. A sejtek a tenyésztés során, illetve a kemoterápiás kezelések alatt 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-dal dúsított inkubátorban voltak elhelyezve. A hőterápiás kezelés és a besugárzás ideje alatt szobahőmérsékleten, normál összetételű levegőn tartottuk őket.

#### 3.2 Termoradioterápia kezelések

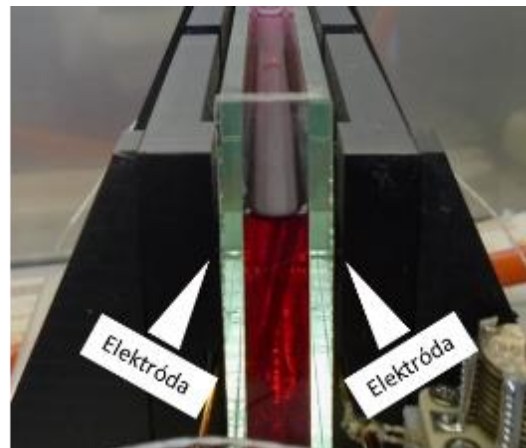
A konfluens Panc1 sejttenyészeteket 0,25% tripszin és 0,22 mg/ml etiléndiamin-tetraecetsav (Trypsin-EDTA, XC-T1717/100, Biosera) keverékével leoldottuk a tenyésztőedény aljáról, centrifugáltuk és tripánkék festés (0,4% Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) mellett megszámloltuk a sejteket, utána pedig elkészítettünk egy 10<sup>5</sup> sejt/ml médium szuszpenziót. Egy-egy 24×40 mm-es steril fedőlemezt helyeztünk el 60 mm-es Petri csészékben, majd 4 ml sejtsuszpenziót pipettáztunk az edényekbe, melyeket 24 órára inkubátorba helyeztünk, hogy a sejtek megfelelően letapadhassanak a

fedőlemezre. A kezelések után mindegyik fedőlemezt új Petri csészébe helyeztük, friss médiumot adtunk a sejtekhez és a mintavételek idejéig visszahelyeztük az inkubátorba.

A sugárterápiát (Rth) egy GSR D1 gamma irradiátor készülékkal végeztük, mely Cs-137 izotópot használ (Gamma-Service Medical GmbH, Leipzig, Németország) és mintánként 2 Gy dózist alkalmaztunk.

Az mEHT kezelések egy 10 mm széles, 60 ml térfogatú üvegedényben történtek, mely a Lab-EHY 100 (Oncotherm Kft, Budaörs, Magyarország) hipertermiás készülék kezelő edénye/küvetája volt. Az edény két hosszanti oldalán, egymással szemben egy-egy elektróda volt elhelyezve, az edényen belül pedig 2 optikai szenzor segítette a sejtenyésző oldat hőmérsékletének monitorozását. A küvetába vertikálisan helyeztük el az üveglemezeket, így az elektromos térre merőlegesen feküdtek egy rétegben a sejtek (**3. Ábra**). Az 5 perces előmelegítési fázisban (20-25 W energia bevittével) közel 42°C-ra hevítettük a médiumot, amit további 60 percen keresztül 7-8 W energiával tudtunk fenntartani. Az egy órás kezelést követően friss médiumba és Petri csészébe helyeztük vissza az üveglemezeket, és 24 órán keresztül inkubáltuk a sejteket (**4. Ábra**)

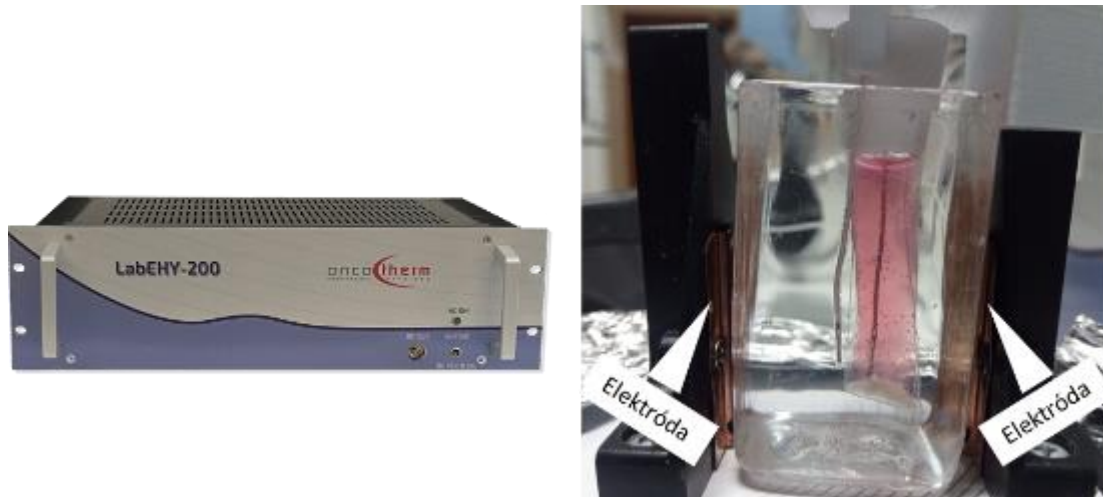
A kombinált terápiában részesülő csoportnál (Rth+mEHT) először besugaraztunk a sejteket, utána fél órán belül elkezdtük az mEHT kezelést is.



**3. Ábra:** A letapadt sejtek kezeléséhez használt külső mEHT egység, illetve a speciálisan laboratóriumi körülményekhez gyártott kezelője.

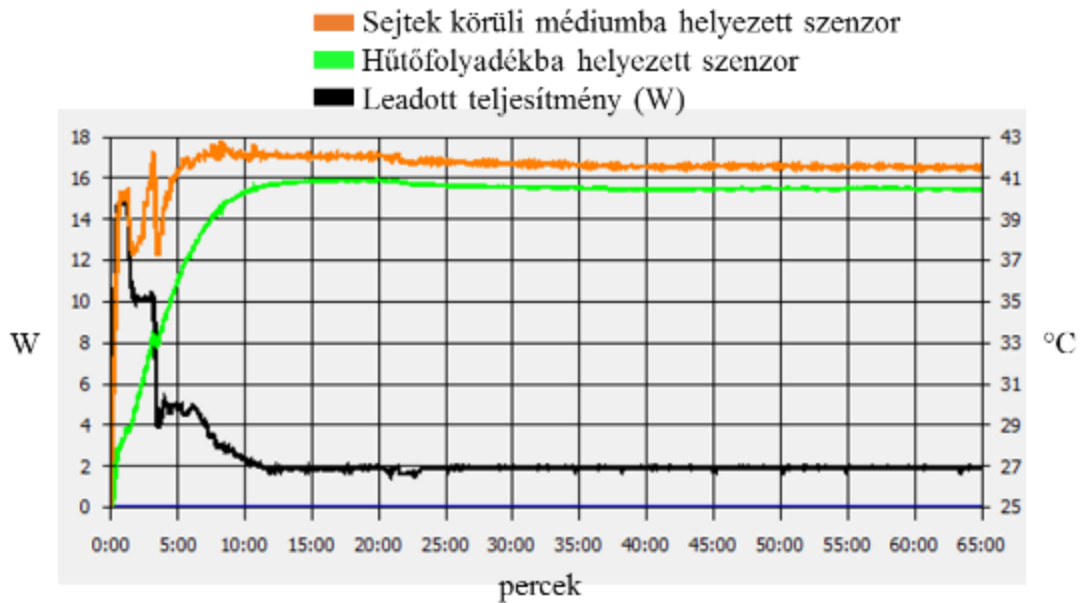
### 3.3 Termokemoterápia kezelések

Panc1 és Capan1 sejteket vizsgáltunk mEHT és GEM (Gemcitabin, Fresenius Kabi Oncology Plc., Hampshire, USA) kombinációs kezelést követően 24, illetve 48 órával. A kezeléseket ezúttal a Lab-EHY 200 (Oncotherm Kft, Budaörs, Magyarország) laboratóriumra fejlesztett hipertermiás készülékkel és a hozzá tartozó szuszpenziós aplikátorral végeztük (**4. Ábra**).



**4. Ábra:** Szuszpenziós kezelések során használt külső mEHT egység, illetve a speciálisan laboratóriumi körülményekhez gyártott küvettája.

A konfluens sejt kultúrákat tripszinnel leoldottuk a tenyésztő edény aljáról és számolást követően  $10^6$  sejt/1,5 ml szuszpenziót készítettünk. Kezelő zsákba pipettáztunk 1,5 ml szuszpenziót, lezártuk és belemerítettük a készülék desztillált vízzel telt küvettájába. A küvetta két oldalán helyezkedett el a két elektróda, melyek az elektromos teret generálták. A kezelő zsák körüli desztillált víz segített szimulálni az *in vivo* hőelvezetést és fókuszáltabbá tette az energiaáramlást a szuszpenzió felé. Egy optikai szenzort helyeztünk a szuszpenzióba, egy másikat pedig a desztillált vízbe, melyek segítségével monitoroztuk az elért hőmérsékletet. A kezelések egy 5-10 perces felfűtési idővel kezdődtek, melyet 10 W átlag energiabevittel értünk el. A további 55-60 percben pedig 2.4 W átlag energiabevittel  $42 \pm 0,3^\circ\text{C}$ -on tartottuk a szuszpenzió hőmérsékletét (**5. Ábra**). A kezelést követően a szuszpenziót kihígítottuk a kívánt sejt koncentrációra és tenyésztő edényekbe ültettük ki a mintavételek idejére.



**5. Ábra:** A Lab-EHY 200 készüléken monitorozott hőmérséklet és teljesítménygörbék. Megfigyelhető az elérni kívánt hőmérséklet ( $42^{\circ}\text{C}$ ) automatikus teljesítmény alapú „feedback” szabályozása. A gyors felfűtéshez szükséges magas teljesítményt követően szükséges alacsony ( $\sim 2\text{ W}$ ) fenntartó érték.

Kemoterápiás kezeléseinkhez egy  $1000\ \mu\text{M}$ -os törzsoldatot készítettünk, melyhez a GEM-et neutrális foszfát pufferolt sóoldatban (PBS) oldottuk fel. A kísérletek során ezt tovább hígítottunk a sejtenyésző médiumban a megfelelő koncentrációra. Kettős kezelések esetében az mEHT kezelést követően a sejteket tartalmazó szuszpenzióba adagoltuk a GEM-et, és így inkubáltuk a sejteket további 24, 48 vagy 72 órán keresztül.

### 3.4 Élő sejtek arányának vizsgálata

A tripánkék festék nem képes behatolni a sejtbe az intakt sejtmembránon keresztül, ezért alkalmas mikroszkóp alatti élő és halott sejtek elkülönítésének vizsgálatára. Az mEHT kezelése után 24 órával a sejtekhez tripszint adagoltunk, míg le nem váltak a fedőlemezről, majd a tripszint leállítottuk szérum tartalmú médiummal és a szuszpenzióból  $20\ \mu\text{l}$ -nyit elegyítettünk  $5\ \mu\text{l}$  tripánkék festékkel. Mikroszkóp alatt, Bürker-kamrában megszámoltuk az élő sejteket a kontroll, az Rth, az mEHT és az Rth+mEHT csoportokban.

### 3.5 Sejmorfológia és immuncitokémia

A fedőlemezen végzett kezeléseket követően a hematoxin-eozin (H&E) festést és az immuncitokémiai reakciókat közvetlenül a fedőlemezre növesztett sejteken végeztük. A szuszpenzióban kezelt sejteket a kezelés után 6 lyukú sejtenyésző edényekbe osztottuk szét, melyek tartalmaztak egy-egy steril 18×18 mm-es fedőlemezt. Ezekben az edényekben inkubáltuk a sejteket 24, illetve 48 órán keresztül, majd a H&E festést és az immuncitokémiai reakciókat ebben az esetben is a fedőlemezre tapadt sejteken végeztük el. Minden esetben a sejtekről eltávolítottuk a médiumot és 2-szer mostuk őket PBS oldattal, amit 15 perces fixálás követett 4%-os neutrálisan pufferelt formaldehiddel szobahőmérsékleten. A formalint eltávolítottuk és desztillált vízzel mostuk a sejteket. Morfológiai vizsgálatainkhoz a fixálást követően a sejteket hematoxilinnal festettük 2 percre, melyet 5 percre derítettünk csapvízzel, ezután pedig szintén 2 percre eozin festéket tettünk a tenyészetekre.

Az immuncitokémiai vizsgálatainkhoz a fixálást követően először az endogén peroxidázok blokkolását végeztük el 30 percre metanolban hígított 3%-os hidrogén-peroxiddal. A sejtmembránok permeabilizálása TBST pufferrel történt 30 percre. A TBST oldatot 0,01 mol/l Tris pufferoldat és 0,5% Tween-20 (Fisher Scientific, Loughborough, UK) elegyítésével 7,4-es pH-ra állítottunk be. A nem specifikus fehérjék blokkolására 3%-os szarvasmarha szérumból albumint (BSA, 82-100-6, Merck, Darmstadt, Németország) használtunk szobahőmérsékleten 30 percre. Az 1% BSA-ban hígított elsődleges antitestekkel (**1. Táblázat**) 2 órán keresztül inkubáltuk a mintákat (ez alól kivétel volt a besugárzás és mEHT kísérleti sorozatunkban a hasított kaszpáz-3 vizsgálata, ahol az inkubációs idő 16 óra volt). Gondos, 3x3 perces mosás után a mintákat egér vagy nyúl IgG-t felismerő, kecskében termelt polimer-peroxidáz konjugátummal jelölt (Histols MR-T, Histopathológia Kft. Pécs) reagenst alkalmaztunk. Az egérben termelt elsődleges antitestek esetében ezt a lépést megelőzte egy 30 perces jelerősítő reagens alkalmazása. A chromogén reakciót DAB chromogén/hidrogén-peroxid szubsztrát kittel (DAB Quanto, TA-060QHDX, Thermo-Fisher, Cheshire, UK) végzett előhívással tettük láthatóvá, majd 3x3 perces mosás után hematoxilinnal magfestést is végeztünk. Az elkészült reakciókat tartalmazó fedőlemezeket víztelenítettük és tárgylemezre borítva fedtük le. A reakciókat digitalizáltuk, a hasított kaszpáz-3 reakciót QuantCenter

képanalízis szoftver segítségével kvantifikáltuk (Pannoramic scanner, 3DHISTECH, Budapest, Magyarország).

**1. Táblázat:** Az immuncitokémiai vizsgálatok során használt ellenanyagok és hígításaik

Antigén specificitás	Faj	Klón	Gyártó*	Referencia szám	Hígítás
Hasított kaszpáz-3	Nyúl	5A1E	Cell Signaling	#9664	1:300
Citokróm C	Nyúl	136F3	Cell Signaling	#4280S	1:100
E-Cadherin	Nyúl	EP700Y	Cell Marque	#246R-14	1:100
N-Cadherin	Egér	32/N-Cadherin	BD Bioscience	#610921	1:100

\*Cell Signaling, Danvers, MA, USA; Cell Marque, Rocklin, CA, USA; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA

### 3.6 Sejtviabilitás elemzés rezaurin próbával

Kontroll és mEHT kezelt sejteket ültettünk ki 96 lyukú sejttenyésztő edénybe  $10^4$  sejt/200  $\mu$ l koncentrációban lyukanként. A médiumba 0-tól 100  $\mu$ M GEM-t adagoltunk soronként a sejtekhez, majd azokat 24, 48 és 72 órán keresztül inkubálva tenyésztettük.

A rezaurin egy redox-szenzitív sejtmembrán permeábilis festék, mely a mitokondriális aktivitás következtében resorufinná bomlik. A resorufin 530-570 nm hullámhosszú fényel gerjesztve 580-590 nm-en spektrofluorométerrel detektálható.

A rezaurin sót (R7017, Sigma-Aldrich) 0,3 mg/ml koncentrációban PBS-ben oldottuk fel, amit a kísérletek során  $10\times$ -esre hígítottunk a sejteken lévő médiumban. A 2 órás inkubációt követően Fluoroskan FL Microplate Fluorometerrel (Thermo-Fisher) megmértük a resorufin jelintenzitást és a kontroll csoporthoz viszonyítva határoztuk meg a sejtek éltképeségét.

### 3.7 Áramlási citometria mérések

A kezeléseket követően először begyűjtöttük a sejtek felülúszóját és utána a letapadt sejteket tripszines kezeléssel gyűjtöttük be a fedőlemezekről, vagy a sejttenyésztő edény aljáról. Centrifugálást követően 2-szer mostuk a sejteket PBS-el. A sejtciklus méréseinkhez a sejt pelletet  $-12^{\circ}\text{C}$ -on etanollal fixáltuk egy éjszakán át. Mosási lépés után 20 ng RNaseA (R5503, Sigma-Aldrich) és 10  $\mu$ l-nyi 1 mg/ml propidium-jodidot (PI, 1304MP, Thermo-Fisher) elegyítettünk 250  $\mu$ l PBS-be mintánként és  $4^{\circ}\text{C}$ -on 60 percig inkubáltuk. Az apoptotikus és nektrotikus sejtek jelölésére Alexa Fluor 647 Annexin V



fehérjét (1:100; #640912, BioLegend, San Diego, CA, USA) és 1 µl PI festéket hígítottunk mintánként 100 µl Annexin V pufferbe és 15 percig inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten.

Az aktivált/foszforilált AKT fehérje méréseinkhez a sejteket tripszinezés és mosás után paraformaldehidből készített 10%-os formalinban fixáltuk 4°C-on, 30 percig. Dupla mosási lépés után a sejteket 0,2% Tween-20 tartalmú PBS-el permeabilizáltuk 20 percig. Újabb mosást követően nyúl monoklonális, phospho-Akt (p-Akt/Ser473) specifikus elsődleges antitesttel (1:100, clone: D9E; Cell Signaling) inkubáltuk a sejteket mindegyik csoportban szobahőmérsékleten, 60 percen keresztül. Másodlagos antitestként Alexa Fluor 488-al konjugált kecske anti-nyúl IgG-t (1:100; Thermo Fisher) használtunk, mellyel szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk a mintáinkat. A sejtekről a felülúszót centrifugálás után eltávolítottuk, ugyanígy még 2-szer mostunk, majd 300 µl PBS-ben történő reszuszpendálás után a sejteket analizáltuk.

A méréseinket CytoFLEX Flow Cytometer áramlási citométerrel és a hozzá tartozó CytExpert software-el végeztük (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA).

### 3.8 Kapilláris Western blot (WES)

A letapadt sejtekből 24 és 48 órával az mEHT kezeléseket követően fehérje extrakciót végeztünk. Előre elkészített extrakciós pufferünk 20 mM Tris-t, 2 mM EDTA-t, 150 mM NaCl-ot és 1% Triton X-100-at tartalmazott, amit az izolálás előtt kiegészítettünk 10 mM NaF-al, 0,5 mM NaVO<sub>3</sub>-al és 1:200 arányban proteáz inhibitor koktéllal (P8340, Sigma-Aldrich). A felülúszó eltávolítása után a sejteket gondosan mostunk 2-szer PBS-el. Ezt követően 150 µl extrakciós puffert pipettáztunk a fedőlemezre növesztett sejtekre, valamint 50 µl-t a 6 lyukú sejtenyésztő edénybe növesztettekbe. Az edény aljáról sejtkaparóval eltávolítottuk a lizátumot, Eppendorf csövekbe pipettáztuk és jégen további 30 percig állni hagytuk. Lecentrifugáltuk a szuszpenziókat 12.000 rpm-en 4°C-on 20 percig, majd -12°C-on tároltuk a WES mérésekig. A fehérjekoncentráció mérését Bradford (#500-0205, BioRad, Hercules, CA, USA) reagenssel végeztük a gyártói előírás szerint.

A WES készüléket (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) és az ajánlott 12-230 kDa-os Jess/Wes szeparációs csomagot (SM-W004) a gyártó által javasolt protokoll szerint

használtuk. A csomag tartalmazta a 25 kapillárisból álló fésűt, a futtató pufferrel előre feltöltött kazettát, mosópuffert, 10×-es koncentrációjú mintahígító puffert, valamint egy EZ standard csomagot, benne 12-230 biotinilált fehérje létrával, 5×-ös koncentrációjú fluoreszcens „master mix”-el és egy ditiotreitolt tartalmazó (DTT) csővel. A mérés napján előkészületeket végeztünk: a liofilozált DTT-t és a biotinilált létrát megfelelő mennyiségű desztillált vízzel kihígítottuk, továbbá az 5×-ös koncentrációjú fluoreszcens mixet kihígítottuk 20 µl DTT-vel és 20 µl eredeti mintahígító pufferrel. Ezt követően a fehérjemintáinkat 0,5 vagy 1 µg/µl koncentrációjúra hígítottuk a 100×-osan diluált 10×-es mintahígító pufferrel. Minden mintából 5 egységnyihez 1 egység fluoreszcens mixet adtunk és 5 percig 95°C-on tartottuk. Az elsődleges ellenanyagokat futtató pufferrel hígítottuk a megfelelő koncentrációjúra (**2. Táblázat**). Detektáló reagensként a gyártó saját peroxidáz-enzimmel konjugált anti-nyúl és anti-egér immunglobulin reagenseit (ProteinSimple DM-001 and DM-002) használtuk. Minden komponenst belemértünk a kazettába, amit 1000 g-n centrifugáltunk 5 percig. A védőfólia eltávolítása után a fésűt és a kazettát a futtató egységbe helyeztük és alapbeállításon futtattuk le a mérést (395 V-on futás 30 percig, 5 perc blokkolás, 30-30 perc inkubáció az elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal, 15 perc inkubáció luminollal/peroxiddal). Az expozíciós idők 1-512 mp-esek voltak. A mérések kiértékelése a készülékbe épített szoftver segítségével történt, ahol az eredmények optimalizálása érdekében mindegyik fehérjére külön expozíciós időt tudtunk választani.

**2. Táblázat:** A WES mérések során használt ellenanyagok és hígításaik.

Antigén specificitás	Faj	Klón	Gyártó	Referencia szám	Hígítás
BAX	Nyúl	poliklonális	Sigma-Aldrich	#HPA027878	1:30
p21 <sup>waf1</sup>	Egér	70/Cip1/WAF1	BD Bioscience	#610234	1:35
Hsp27	Nyúl	D6W5V	Cell Signaling	#96357	1:70
Hsp70	Nyúl	poliklonális	Cell Signaling	#4872	1:70
E-Cadherin	Nyúl	EP700Y	BD Bioscience	#RM-2100	1:70

### 3.9 Kolónia formáló próba

A daganatok rezisztenciájában jelentős szerepet játszó CSC-k egyik tulajdonsága, hogy kísérletes körülmények között akár egysejtes szuszpenzióból is képesek kolóniákat létrehozni. A legelterjedtebb *in vitro* vizsgálati módszer a CSC arány megállapítására a

kolónia formáló próba, amikor alacsony számban kiültetett sejteket minimum egy héti inkubálunk, majd megszámloljuk a legalább 50 sejtet tartalmazó populációkat.

A radioterápiával kombinált kísérleti sorozatunkban Panc1 PDAC sejteket letapadt állapotukban kezeltünk meg, majd az mEHT kezelés után 24 órával feltripszinezünk a sejteket és megszámloljuk. Készítettünk egy  $10^3$  sejt/ml szuszpenziót, amiből 100 mm átmérőjű Petri csészékbe összesen  $10^4$  sejtet ültettünk ki. 8 nap elteltével az 50 sejt feletti kolóniák szabad szemmel jól vizsgálhatók voltak, így eltávolítottuk a sejtekről a médiumot, PBS-el mostuk 2-szer és szobahőmérsékleten száradni hagytuk. Másnap a kolóniákat a jobb vizualizálás érdekében 0,1%-os kristályibolya oldattal festettük meg 30 percig. Manuálisan számoltuk meg a több mint 50 sejtet tartalmazó kolóniákat.

Amikor a szuszpenziós mEHT aplikátort használtuk, akkor a sejtek kiültetését közvetlenül az mEHT kezelést követően végeztük el. Panc1 sejtvonalnál  $10^3$  sejt/2 ml, Capan1 sejtnél pedig  $10^4$  sejt/2 ml koncentrációjú volt a sejtuszuszpenzió, amit mind a két sejtvonal esetében 6 lyukú sejtenyésztő edényre ültettünk ki. A kemoterápiával kezelt csoportokhoz hozzáadtuk a megfelelő mennyiségű GEM-et. 48 órával később mindegyik csoporton lecseréltük a médiumot friss, komplett médiumra és tovább növesztettük a sejteket még 14 napig. A mintavételkor 4%-os pufferolt paraformaldehiddel fixáltuk a kolóniákat, szintén megfestettük őket 0,1%-os kristályibolya oldattal és manuálisan számoltuk meg a több, mint 50 sejtet tartalmazó kolóniákat.

### 3.10 Statisztikai analízis

Minden kísérletünket legalább 3 alkalommal végeztük el és a legtöbb esetben minimum 3 párhuzamos minta értékeit vizsgáltuk. Statisztikai analíziseink során a nem parametrikus elosztásra javasolt Kruskal-Wallis próbát végeztünk, kiegészítve Dunn-féle *post hoc* teszttel, továbbá folytonos változók esetén többszörös kétmintás T-próbát, illetve kettőnél több csoport esetén ANOVA tesztet alkalmaztunk. Az elemzéseket GraphPad Prism szoftver csomaggal (San Diego, CA, USA) készítettük. A statisztikai szignifikancia szintet  $p < 0,05$  értéknél határoztunk meg, 95%-os konfidencia intervallum mellett.

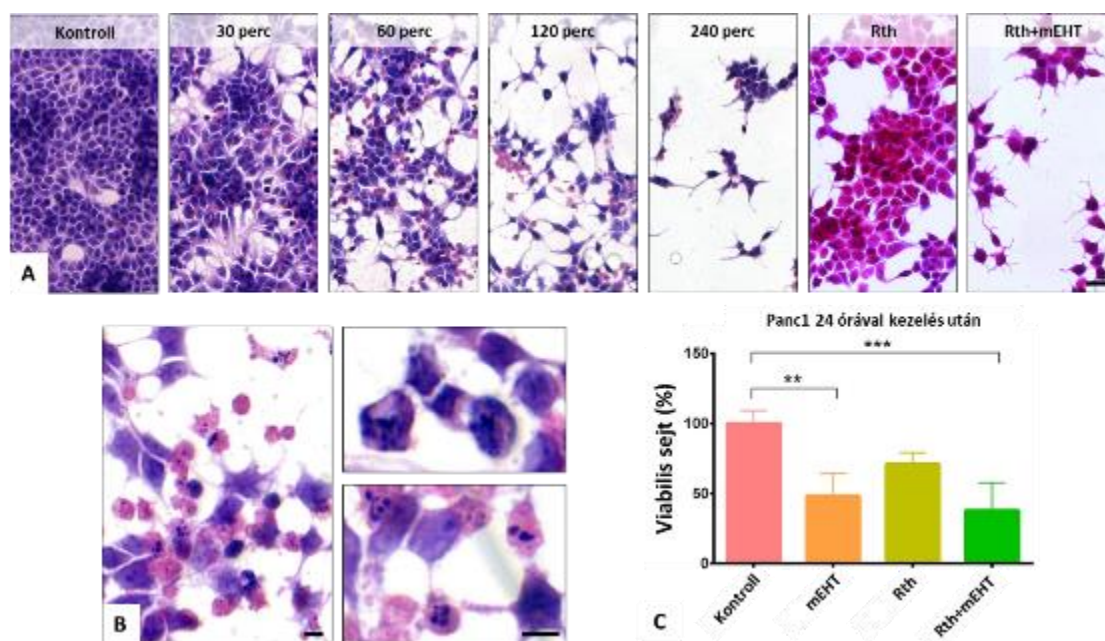
## 4. Eredmények

### 4.1 Az mEHT citotoxikus hatása PDAC-ben

4.1.1 A mono- illetve radioterápiás kombináció jelentősen csökkenti az élő sejtek arányát. Mivel a klinikai tanulmányokban használt szabadalmaztatott készülékek *in vivo* körülményekre vannak fejlesztve, a kísérleteink első lépéseként teszteltük az applikátorok és hipertermiás laboratóriumi készülékek *in vitro* körülmények közötti optimális beállításait. Panc1 sejtvonalat használtunk a régi típusú (Lab-EHY 100) készülékkel, ahol fedőlemezre növesztett konfluens sejtkultúrát vetettünk alá különböző kezelési időtartamoknak. A bevitt energiát a hőszenzorok visszacsatolási értékeiből automatikusan állítottuk. Egy 5-10 perces felfűtési fázis után 30, 60, 120 és 240 percig kezeltük a sejteket, átlagosan 7-8 W-al. A kezelést követően az üveglemezeket friss médiummal telt Petri csészékbe helyeztük vissza. 24 órával később fixáltuk a sejteket, továbbá H&E festést alkalmaztunk rajtuk. A kezelt sejtkultúrákat kontroll csoporthoz hasonlítottuk, melyet a kezelés ideje alatt 37°C-on tartottunk, utána pedig ugyanannak a médiumcserének vetettük alá, mint a többi csoportot. A sejtkultúrákat tartalmazó üveglemezeinken megfigyeltük, hogy már 30 perc mEHT monoterápia képes volt a sejtek számát csökkenteni a kontrollhoz képest (**6. Ábra A**). Minél hosszabb ideig tartott a hipertermia, annál kisebb volt a letapadt sejtek aránya, továbbá a legalább 60 percet tartó kezeléseknél alávetett csoportokban megjelentek az apoptózisra jellemző piknotikus, töredezett sejtmagok (**6. Ábra B**).

Ezen megfigyeléseinket követően, a 60 perces kezelést választottuk standard mEHT terápiának és kombináltuk radioterápiával. A Panc1 sejtkultúrán az irodalomban leírt (175) 2 Gy-t használtuk sugárdózisként. Négy csoportot különböztettünk így meg: kontroll, mEHT monoterápiával kezelt, Rth – csak radioterápiával kezelt sejtek, illetve Rth+mEHT kombinált kezelt, ahol a besugárzást követő fél órán belül elkezdtük a standard 60 perc mEHT kezelést. A kezeléseket után mind a kontroll, mind a kezelt sejteket friss sejtenyésző médiumba helyeztük és 24 óra után vizsgáltuk őket. Miután eltávolítottuk a felúszott sejttörmelékét, a lemezekről leoldott sejteket tripánkékekkel megfestve és mikroszkóp alatt megszámlálva azt tapasztaltuk, hogy az 60 perces mEHT

kezelésnek alávetett csoportban radioterápiát követően vagy anélkül, az élő sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest (6. Ábra C).



**6. Ábra:** A kezeléseket követően 24 órával, fixálás és H&E festés után, jelentős sejtpusztulás látható a letapadó kultúrákon (A) (Skála: 40 $\mu$ m). Nagyobb nagyításnál felfedezhetők már a 60 perces kezelésben részesült csoportnál az apoptózisra jellemző sejtmagi elváltozások: chromatin kondenzáció, magi töredezettség (B) (Skála: 10  $\mu$ m). Szignifikánsan csökkent az életképes sejtek száma tripánkek festést és számolást követően az mEHT ( $p = 0,014$ ) és Rth+mEHT ( $p = 0,0029$ ) kezelt csoportokban a kontrollhoz képest. A csoportokon belül szignifikáns eltérést mutatott a Kruskal-Wallis teszt is ( $p = 0,0007$ ). A diagrammon a \*\*  $p \leq 0,01$ -et és a \*\*\*  $p \leq 0,001$ -et jelöl (C).

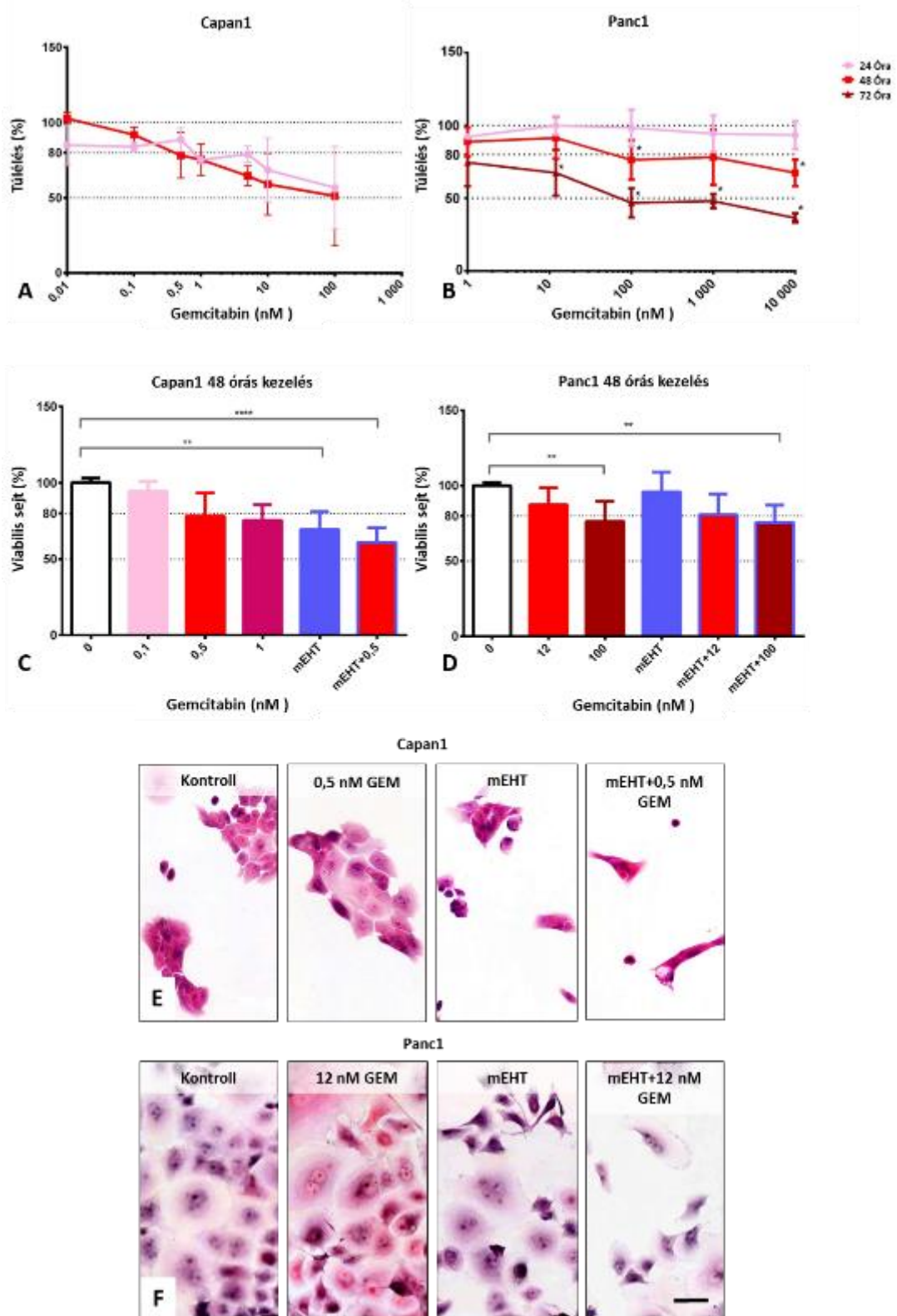
#### 4.1.2 Gemcitabinnal kombinálva a mEHT csökkenti a PDAC sejtek életképességét

Az új típusú Lab-EHY 200 készülékkel ezúttal szuszpenzió formájában kezeltük a sejteket 60 perc mEHT-val, 2-3 W energiabevittel. Kezeléseinket elvégeztük a korábbi Panc1 kemoterápiára rezisztens és Capan1 kemoszenzitív vonalon is.

Először teszteltük a megfelelő LD20 és LD50 GEM dózist mindkét sejtvonalon. Resazurin próbát használtunk viabilitás mérésre és 0-10.000 nM közötti GEM dózist alkalmaztunk a sejteken, majd 24, 48, illetve 72 órán keresztül inkubáltuk őket. Mindkét sejtvonalnál megfigyelhető volt, hogy hosszabb kezelésnél erősebb volt a GEM hatás,

mint 24 óránál. Capan1 esetében 0,5 nM GEM alkalmazásakor 48 óránál értünk el 20%-os viabilitás csökkenést, Panc1 esetében pedig 100 nM GEM-et kellett alkalmazni hasonló hatás eléréséhez (**7. Ábra A,B**).

A potenciális komplementer hatás tesztelése érdekében az előre mEHT-val kezelt sejtekhez hozzáadtuk a fent említett GEM dózisokat és 48 óra múlva szintén elvégeztük a viabilitás próbát. Capan1 sejtvonal esetében az mEHT már önmagában is statisztikailag szignifikáns viabilitás csökkenést okozott a kontroll csoporthoz képest, de 0,5 nM GEM kezeléssel kombinálva az életképes sejtek aránya 60%-ra esett 48 óránál. Panc1 sejtvonalnál az mEHT monoterápia nem bizonyult ennyire hatásosnak, azonban a kombinált mEHT+100 nM GEM kezelés már képes volt statisztikailag szignifikáns viabilitás csökkenést okozni a kontrollhoz viszonyítva. (**7. Ábra C, D**). H&E festést is végeztünk a sejt kultúrákon 48 órával az mEHT kezelése után. Bár a két sejtvonal morfológiailag jelentősen eltér (a Capan1 sejtek szigetszerűen nőnek és jellemzőbb a spontán sejtpusztulás a Panc1-hez képest), a belső kontrollokhoz viszonyítva a mEHT+GEM csoportokban jelentős sejtszámcsökkenést tapasztaltunk mindkét sejtvonal esetében. Ahogy a fentebb említett Rth+mEHT kombinációban is, úgy ezen kezelése során is jellemző volt a sejtmagi fragmentáció és az apoptotikus testek megjelenése (**7. Ábra E,F**).



**7. Ábra:** Sejtviabilitás GEM kezelést követően Capan1 és Panc1 sejteken. Míg a Capan1 sejteknél 48 óránál 0,5 nM GEM már kiváltott 20%-os viabilitás csökkenést, addig Panc1 sejtekben ugyanezt az életképesség csökkenést 100 nM GEM-el sikerült elérni (A,B). A

*Capan1* sejtekben a 72 órás GEM kezelés következtében arányaiban oly alacsony volt már az életképes sejtek száma, hogy statisztikai analízisre alkalmatlanná vált, így ezen adatok nem kerültek bele a dolgozatba. Amikor a GEM kezeléseket megelőzte 60 perces mEHT kezelés, akkor a Kruskal-Wallis statisztikai analízis szerint szignifikáns volt a viabilitás csökkenés, mind *Capan1*, mind *Panc1* sejtvonalban a kontroll csoportokhoz képest ( $p < 0,0001$  illetve  $p = 0,0084$ ). Az mEHT monoterápia *Panc1* sejtekben nem, de *Capan1* sejtpopulációban már önmagában is képes volt szignifikánsan alacsonyabb életképességet okozni a kontrollhoz képest ( $p = 0,0013$ ) (C,D). H&E festett tenyészeteken jelentős sejtszámcsökkenés volt tapasztalható már mEHT monoterápiát követően is, de a *Capan1* sejtekben 0,5 nM GEM-mel, a *Panc1* sejteket pedig 12 nM GEM-mel kiegészítve, a morfológiai eltérések és sejtpusztulás aránya még intenzívebb volt (E,F).

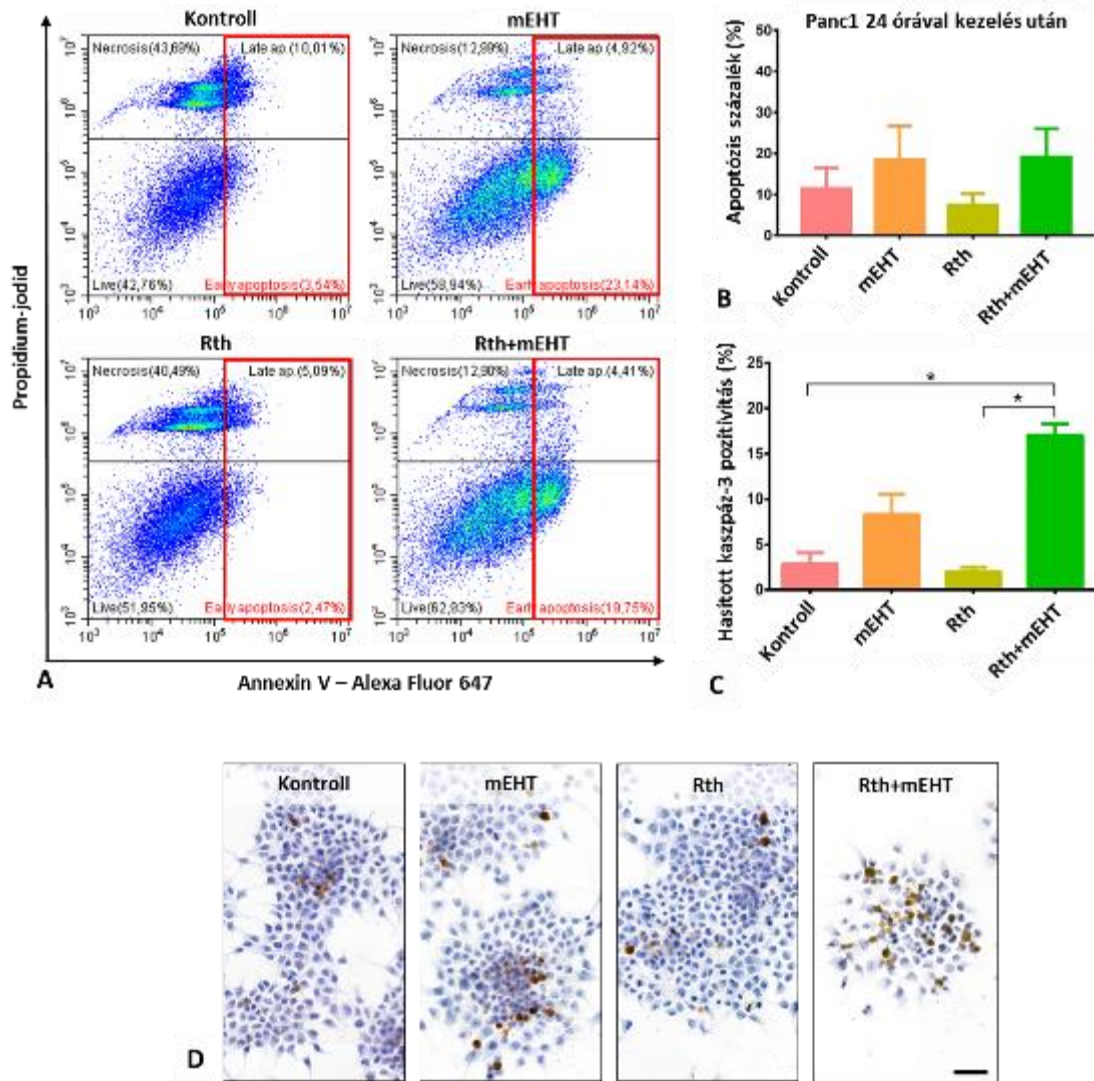
#### 4.2 Az mEHT kaszpáz-függő apoptózist okoz PDAC sejtekben

##### 4.2.1 Radioterápiára és mEHT kombináció jelentősen emeli a kaszpáz-aktivált apoptotikus testek arányát

Kettős jelölést végeztünk *Panc1* radiorezisztens sejteken PI DNS festékekkel és Annexin V flurokrómmal jelölt fehérjével, 24 órával mEHT kezelés után. Áramlási citometriával elkülönítettük az élő, korai és késői apoptózisban lévő sejteket, továbbá a nekrozis következtében keletkezett sejtörmelékét. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az mEHT és Rth+mEHT csoportokban mérsékelten megemelkedett az apoptózis arány a kontroll és az Rth csoportokhoz képest, mely emelkedést főleg a korai apoptózisban lévő sejtek száma okozta (8. Ábra A,B).

Ezek után korábbi eredményeinkre építve, immuncitokémiai eljárással *in situ* vizsgáltuk a kaszpázfüggő apoptózis mértékét a hasított/aktivált kaszpáz-3 fehérje expressziójának kimutatásával, 24 órával a kezeléseket után. A sejtmagok szignifikánsan magasabb hányadában találtunk sejtmagi pozitivitást az Rth+mEHT csoportban úgy a kontrollhoz ( $p = 0,047$ ), mint a sugárterápiában részesült csoporthoz képest ( $p = 0,028$ ) (8. Ábra C,D).



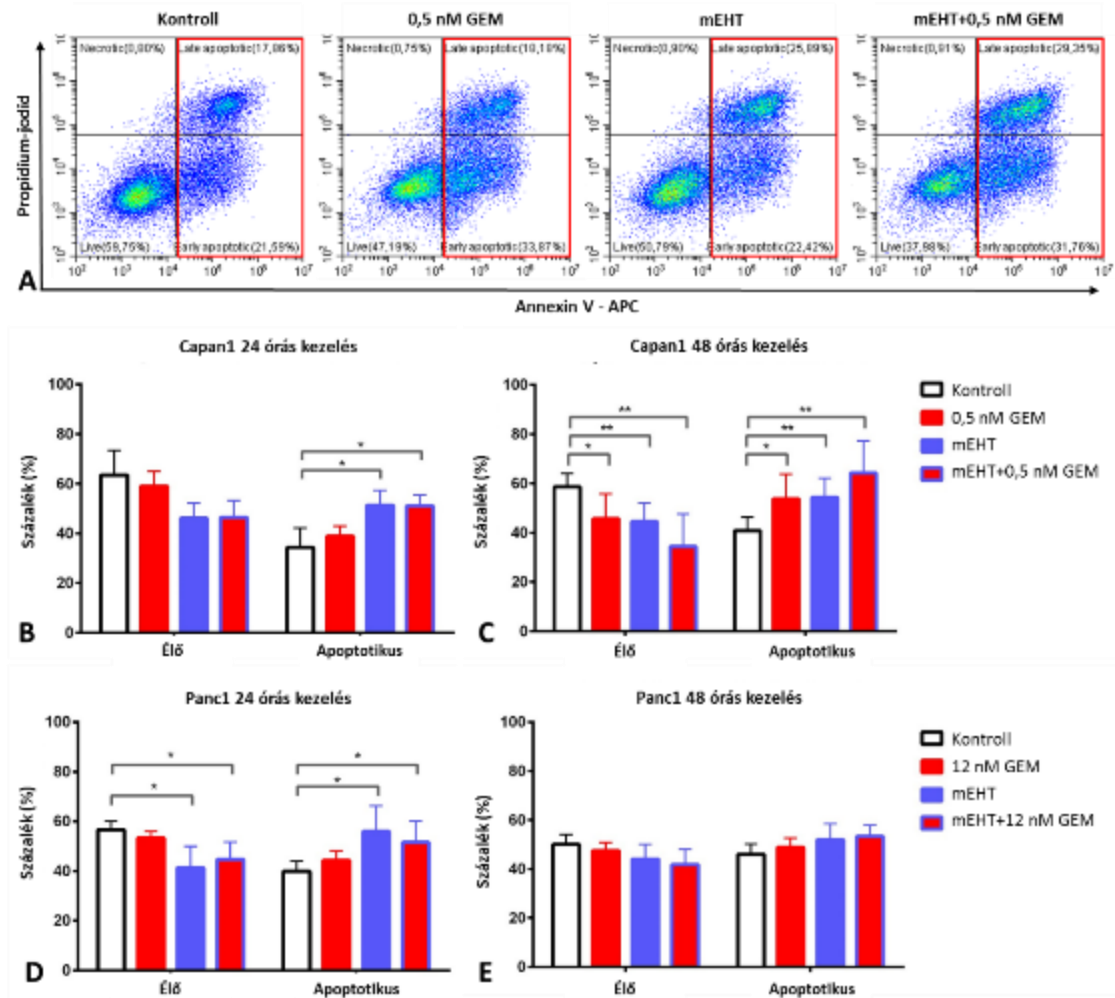


**8. Ábra:** Apoptózis-domináns programozott sejthalál jellemzi a 60 perc mEHT kezelésben részesült sejteket. Reprezentatív áramlási citometria képeken, a pirossal bekeretezett Annexin V-el jelölődött sejtek aránya megnövekedett 24 órával a kezelés után (A). Statisztikai analízis során a pozitív sejtek aránya nem bizonyult szignifikánsan eltérőnek (B), azonban hasított kaszpáz-3 fehérje expressziós immuncitokémiai vizsgálatunk már szignifikánsan magasabb sejtmagi pozitivitást mutatott az Rth+mEHT kezelt csoportokban a kontrollhoz és az Rth csoporthoz képest is ( $p = 0,047$  és  $p = 0,028$ ) (C,D). Skála: 50  $\mu$ m.

4.2.2 Az mEHT kemoterápiával kombinálva elsősorban az intrinsic útvonalon keresztül aktiválta a kaszpáz-3-at

Elvégeztük az áramlási citometriás méréseinket Panc1 és Capan1 sejtszuszpenziókon alkalmazott mEHT kezelést követően is. A sejtekhez hozzáadtuk a korábban definiált LD20 GEM dózisokat és 24, illetve 48 órán át inkubáltuk őket. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a Capan1 sejtekben szignifikánsan megemelkedett az apoptózis aránya az mEHT és mEHT+0,5 nM GEM kezelt sejtekben a kontrollhoz képest 24 és 48 óránál is. A 48 órás mintavételeink során az apoptózis emelkedés mellett szignifikáns élő sejt populáció csökkenés is megfigyelhető volt mindhárom kezelést követően (**9. Ábra A-C**).

A Panc1 sejtekben, hasonlóan a radioterápiás kísérleteinkhez, 24 órás mintavételnél az mEHT szignifikánsan megemelte az apoptózis arányát a kontrollhoz képest ( $p = 0,02$ ). Hasonló szignifikanciával emelkedett meg az mEHT+12 nM GEM kezelt sejtekben is az apoptotikus testek száma a kontrollhoz képest ( $p = 0,04$ ), ugyanakkor az élő sejtek száma arányosan kevesebbnek bizonyult. 48 órával az mEHT kezelés után azonban, a hatás jelentősen csökkent és a kombinált kezelés sem volt képes szignifikáns apoptózist kiváltani a sejtekben (**9. Ábra D,E**).

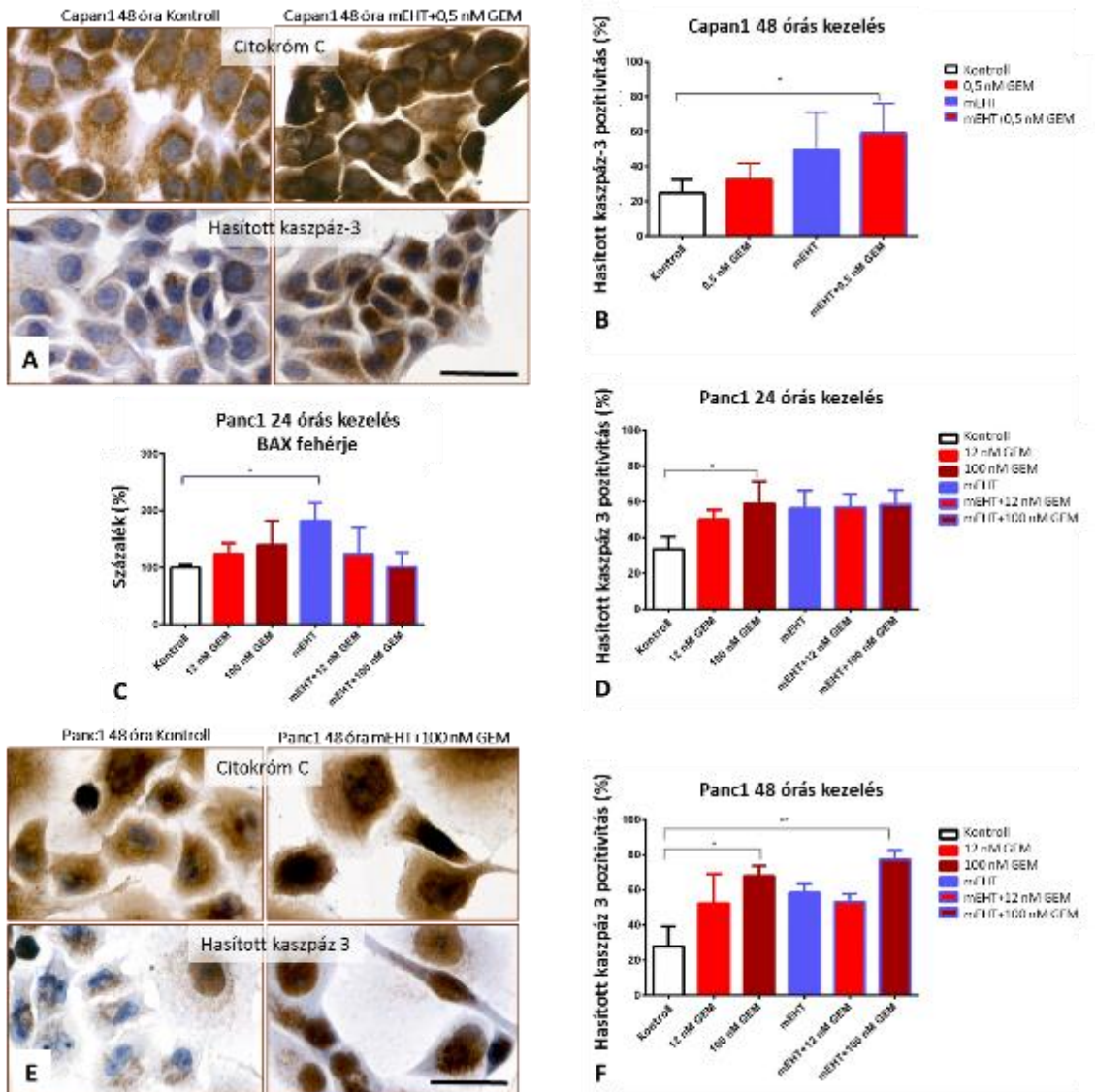


**9. Ábra:** Az apoptotikus sejtpopuláció arányának emelkedése és az élő sejtek arányának csökkenése tapasztalható a Capan1 sejtekben mEHT monoterápiát, illetve mEHT+GEM kombinációt követően 24, illetve 48 óra után. GEM monoterápia csak a 48 óráig kezelt sejtekben volt képes kiváltani szignifikáns apoptózis emelkedést (A-C). A Panc1 sejteken végzett statisztikai analízis szignifikánsan emelkedett apoptotikus és csökkent élő sejtet mutatott az mEHT kezelésben részesült csoportokban, úgy GEM terápiával kombinálva, mint anélkül, de csak 24 órával a hőkezelés után. A 48 órás mintavételeknél a hatás eltűnt (D,E). A diagrammon a \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  jelöl.

A radioterápiás kombinációkhoz hasonlóan elvégeztük a hasított kaszpáz-3 immuncitokémiai reakciót mEHT+GEM terápiát követően is mindkét sejtvonalon. Kiegészítettük továbbá a kaszpáz-3 aktiválásában szerepet játszó citokróm C és BAX fehérje expressziójának vizsgálatával. A szuszpenziós mEHT kezelés után 48 órával a Capan1 sejtekben statisztikailag szignifikáns hasított kaszpáz-3 emelkedést tapasztaltunk

a kontrollhoz képest (**10. Ábra A,B**). Panc1 sejtvonalnál a 24 órás mintavételkor szintén emelkedett hasított kaszpáz-3 magi pozitivitást mértünk az mEHT és a GEM monoterápiában részesülő csoportokban egyaránt, illetve a kombinált mEHT+12 nM és mEHT+100 nM csoportokban is a kontrollhoz képest. Ez az emelkedés csak a 100 nM GEM csoportban érte el a statisztikailag szignifikáns szintet nem parametrikus Kruskal-Wallis tesztet alkalmazva. 48 órával a hőkezelést követően a Capan1-hez hasonlóan szignifikáns volt a hasított kaszpáz-3 emelkedés az mEHT+ 100 nM GEM csoportban a kontrollhoz képest, sőt a 100 nM GEM monoterápiát követően megmaradt a szignifikánsan emelkedett magi pozitivitás (**10. Ábra E,D**).

A citokróm C és BAX fehérjék szemikvantitatív analízisét is elvégeztük mEHT kezelést követően kombinációban vagy önmagában, mindkét sejtvonalon. WES analíziseink jelentős BAX pro-apoptotikus fehérje emelkedést mutattak az mEHT monoterápiával kezelt Panc1 sejtvonalon 24 órával a kezelés után. Bár a citokróm C mennyiségileg nem mutatott különbséget a csoportok között, de immuncitokémiai vizsgálattal mindkét sejtvonalon 48 órával az mEHT kezeléseket követően észrevettük, hogy a kontroll sejtekben a granularitást mutató mintázat diffúz citoplazmatikus pozitivitássá alakul az mEHT+GEM kezelt sejtekben (**10. Ábra A,E**).



**10. Ábra:** Hasított kaszpáz-3 pozitív sejtmagok számának szignifikáns emelkedése látható kettős kezelt Capan1 sejtekben 48 órával az mEHT kezelés után a kontroll csoporthoz viszonyítva ( $p = 0,046$ ). Mindeközben a granulált jellegű citokrom C fehérje a kombinált kezelést követően diffúz citoplazmatikus jelleget ölt (A,B). A Panc1 sejteken elvégzett proapoptotikus BAX fehérje szemikvantitatív analízise szignifikáns emelkedést mutatott az mEHT kezelt sejtekben a kontrollhoz képest ( $p = 0,029$ ) 24 órával a kezelés után, ugyanakkor a hasított kaszpáz-3 nem törvényszerűen követte ezt a mintázatot: több kaszpáz-3 pozitív sejtmagot számoltunk szinte az összes kezelést követően, azonban szignifikanciát a 100 nM GEM terápia érte el a kontrollhoz képest ( $p = 0,048$ ) (C,D). A 48 óras mintavételeknél, a 100 nM GEM monoterápia, még mindig szignifikánsan magasabb hasított kaszpáz-3 pozitivitást eredményezett a kontrollhoz képest ( $p = 0,028$ ),

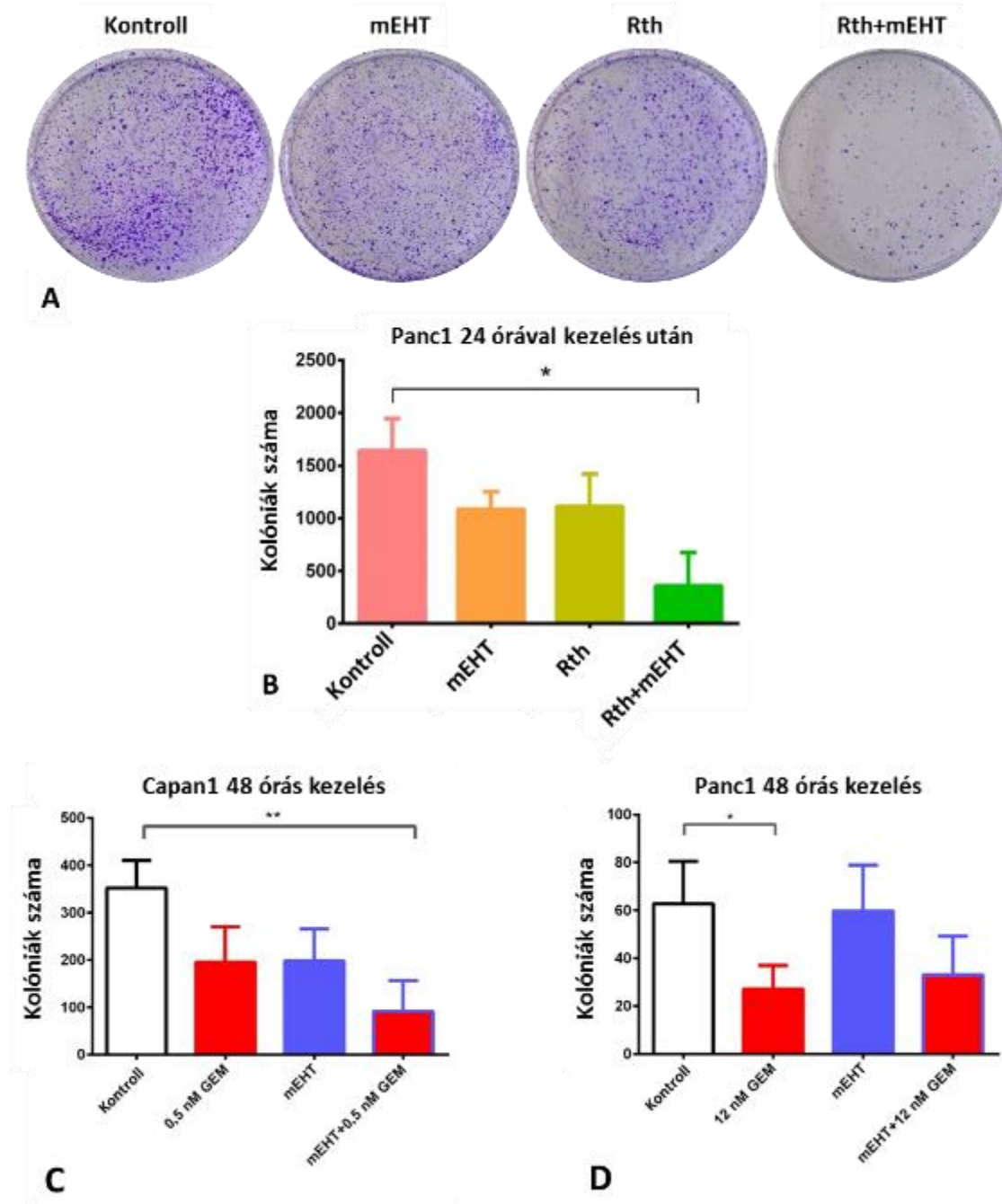
azonban mEHT kezelést követően a hatás intenzívebbnek tűnik, itt a szignifikanciát mutató  $p$  értéke: 0,0013. A Capan1 esetében megfigyelt citokróm C diffúz citoplazmatikus elhelyezkedése a Panc1 sejtekben is látható 48 órás mintavételek során (**E,F**).

#### 4.3 Az mEHT radio- és kemoterápiával kombinálva képes csökkenteni a kolóniaképző sejtek arányát

A daganatok radio- és kemorezisztenciájának kialakulásában nagy szerepet játszanak az úgynevezett tumor ős-/progenitor sejtek. A tumorsejtek között „dormant” állapotban lévő daganatsejtek, melyek képesek repopulálni a daganatszövetet. Ezek a sejtek alacsony reprodukciós rátával rendelkeznek, rezisztens szubklónokat tudnak létrehozni, melyek ellenállóbbak lesznek egy adott kemoterápiás családra vagy radioterápiával szemben. *In vitro* körülmények között a CSC-kre jellemző, hogy egysejtes szuszpenzióból 10-14 nap alatt képesek több mint 50 sejtes különálló kolóniákat kialakítani.

Letapadó Panc1 sejt kultúrákat kezeltünk 60 perc mEHT-val, besugárzást követően. A megkezelt sejtekből egysejtes szuszpenziót képeztünk és  $10^4/10\text{ml}$  sejtszámban 100 mm-es Petri csészékben 8 napig inkubáltuk. Fixálás és kristályibolya festést követően megszámloltuk a legalább 50 sejtes kolóniákat. Méréseink alapján az mEHT és 2 Gy besugárzás monoterápiában enyhe kolóniaszám csökkenést okozott a kontrollhoz képest, azonban amikor a két eljárást kombinációban alkalmaztuk, akkor a kolóniaszám csökkenés statisztikailag szignifikáns volt (**11. Ábra A,B**).





**11. Ábra:** Radioterápiával és mEHT-val kezelt sejtkultúrákból végzett kolóniaképző próba. Az Rth+mEHT kezelt sejtek szignifikánsan kevesebb kolóniaképző sejtet tartalmaztak kezelést követően, mint a kontroll sejtek ( $p = 0,0195$ ) (A,B). Mikor 48 óras kemoterápiával kombináltuk az mEHT kezelést, a Capan1 esetében szintén a kombinált kezelés okozott szignifikánsan kevesebb kolónia számot a kontrollhoz képest, míg a Panc1 esetében, bár jelentősen csökkent az mEHT+GEM csoportban is az őssejt arány a

*kontrollhoz képest ( $p = 0,0042$ ), szignifikancia tesztünkön önmagában mégis csak a GEM monoterápia mutatott csökkenést ( $p = 0,04$ ) (C,D).*

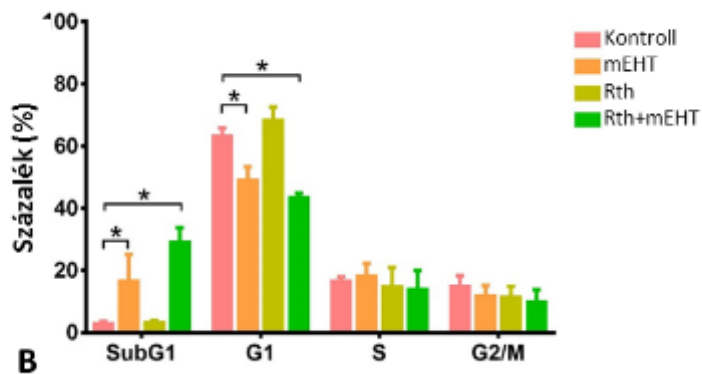
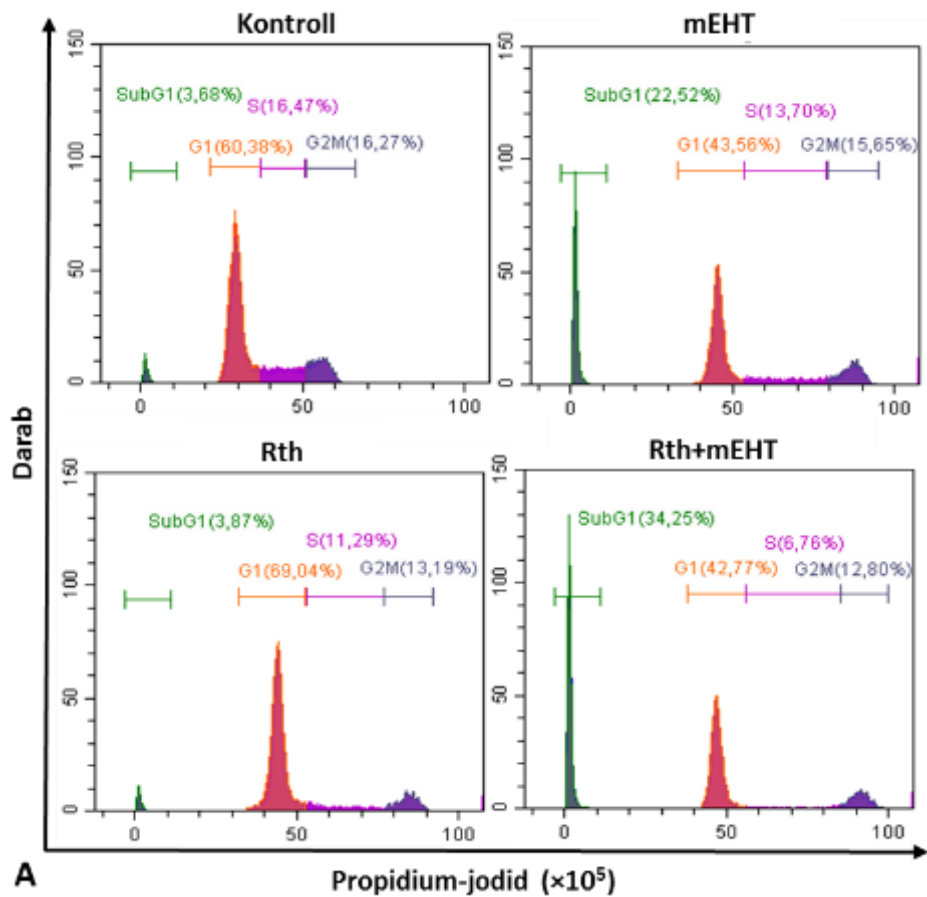
Hasonló elvet követtünk a Capan1 és újra a Panc1 sejt kultúrák szuszpenzióban való mEHT kezelését követően, azonban az egysejtes szuszpenziókhoz hozzáadtunk 48 órán keresztül 0,5 nM GEM-t Capan1 sejt vonal esetében, illetve 12 nM GEM-t Panc1 sejt vonal esetében. A 48 óra elteltével sejtenyészítő médiumot cseréltünk és további 12 napig inkubáltuk a sejteket. A fixálást és festést követően szintén megszámloltuk a több mint 50 sejtes kolóniákat. Alacsonyabb kolóniaképző sejtszámot detektáltunk az mEHT monoterápia esetében mindkét sejt vonalnál, azonban a különbség nem érte el a statisztikai szignifikanciát egyik sejt esetében sem. A Capan1 sejt vonalban a kombinált kezelés képes volt statisztikailag is szignifikáns csökkenést okozni a kolóniaképző sejtek arányában, míg Panc1 esetében csak a GEM monoterápia érte el ezt a szintet (**11. Ábra C,D**).

#### 4.4 Az mEHT képes blokkolni a sejt ciklust G1 illetve S és G2/M fázisban

##### 4.4.1 Az mEHT kezelés besugárzás után a SubG1 fázis frakció emelkedését okozza Panc1 sejtekben

Az mEHT-val és radioterápiával megkezelte sejteket sejt ciklus analízisnek vetettük alá. DNS jelölő PI festéket használtunk és az áramlási citometriával detektált jelerősség szerint elkülönítettük a SubG1, G1, S és G2/M replikációs fázisban lévő sejt populációkat. A letapadó Panc1 sejt kultúrán végzett méréseink alapján statisztikailag szignifikánsan megemelkedett az apoptózist jelölő SubG1 fázisban lévő sejtek aránya 24 órával mEHT és Rth+mEHT kezelése után a kontrollhoz képest, míg a csak besugárzott sejtekben ez a szubpopuláció nem mutatott jelentős változást. A SubG1 fázis emelkedésével egyidejűleg a G1 fázisban lévő sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent az mEHT-val kezelt csoportban a kontrollhoz képest. Az S és G2/M fázisban lévő sejtek aránya nem mutatott jelentős eltérést egyik kezelést követően sem (**12. Ábra**).

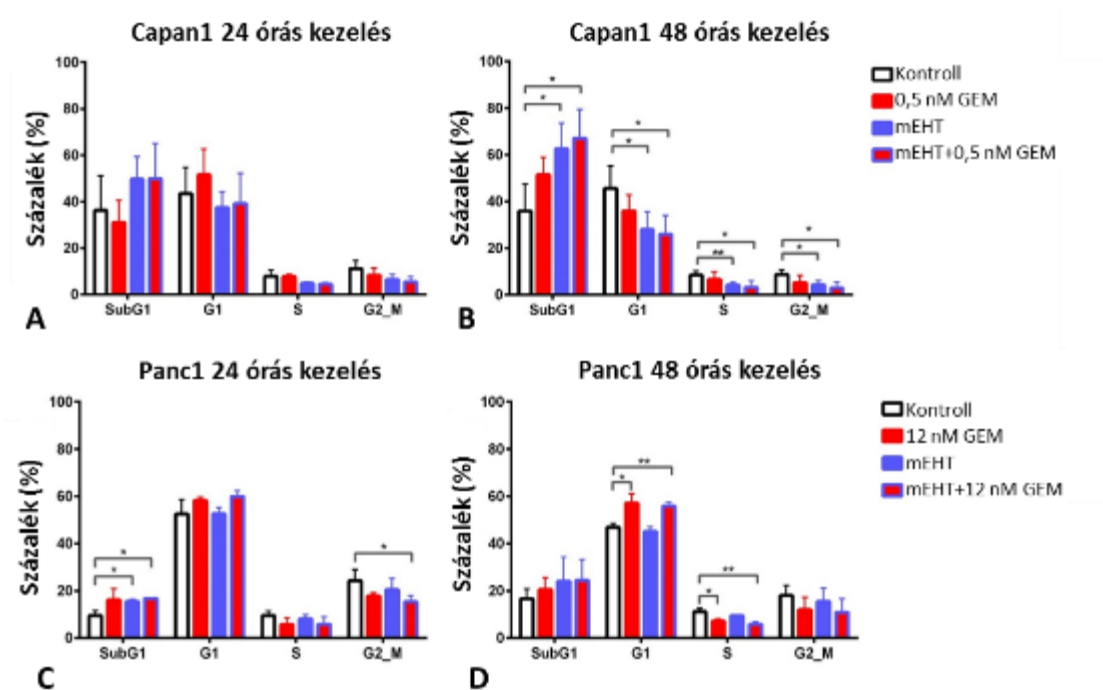




**12. Ábra:** Radioterápia és mEHT kezelést követően elvégzett sejtciklus analízisünk során szignifikánsan magasabb apoptózist jelölő SubG1 sejtpopulációt detektáltunk a kontrollhoz képest ( $p = 0,007$ ). Ugyanígy szignifikánsan magasabb volt a csak mEHT-val kezelt csoportban is a SubG1 fázis arány ( $p = 0,014$ ), melyet követett egy jelentős G1 csökkenés úgy mEHT monoterápiát követően ( $p = 0,012$ ), mint Rth+mEHT után ( $p = 0,005$ ).

#### 4.4.2 Kemoterápiával kombinálva az mEHT blokkolja a sejtek S illetve G2/M fázisba lépését

A Capan1 sejteket mEHT terápiát követően GEM kezelésnek vetettük alá. Bár sejtciklus vizsgálataink során a 24 órás mintavételek nem mutattak jelentős eltérést a csoportok között, a 48 órás mintavételeknél statisztikailag szignifikáns SubG1 emelkedést mértünk mEHT monoterápiával kezelt sejteken és az mEHT+GEM csoportban a kontrollhoz képest. Ezzel egyidejűleg a G1, S és G2/M fázisban lévő sejtek száma szignifikánsan lecsökkent az említett csoportokban a kontrollhoz viszonyítva. A Panc1 sejtvonal esetében szintén megfigyelhető volt a SubG1 fázisú sejtek számának emelkedése az mEHT és mEHT+GEM csoportokban a kontrollhoz képest, de a statisztikailag szignifikáns szintet ezúttal 24 óránál sikerült kimutatni. A korábban tapasztalt G1 fázis csökkenést mEHT monoterápiánál nem sikerült demonstrálni az új típusú applikátor használatakor, azonban szignifikánsan alacsonyabb G2/M fázisú sejtszámot mértünk 24 óránál és S fázist 48 óránál, a kettős kezelt sejtekben a kontrollhoz képest. Mindezek mellett, a GEM kezelést követően, a G1 blokk jelentős volt, szignifikánsan magasabb sejtszámot eredményezve 48 órás mintavételeink során úgy monoterápia, mint kombinált kezelést követően a kontroll csoporthoz képest (**13. Ábra**).

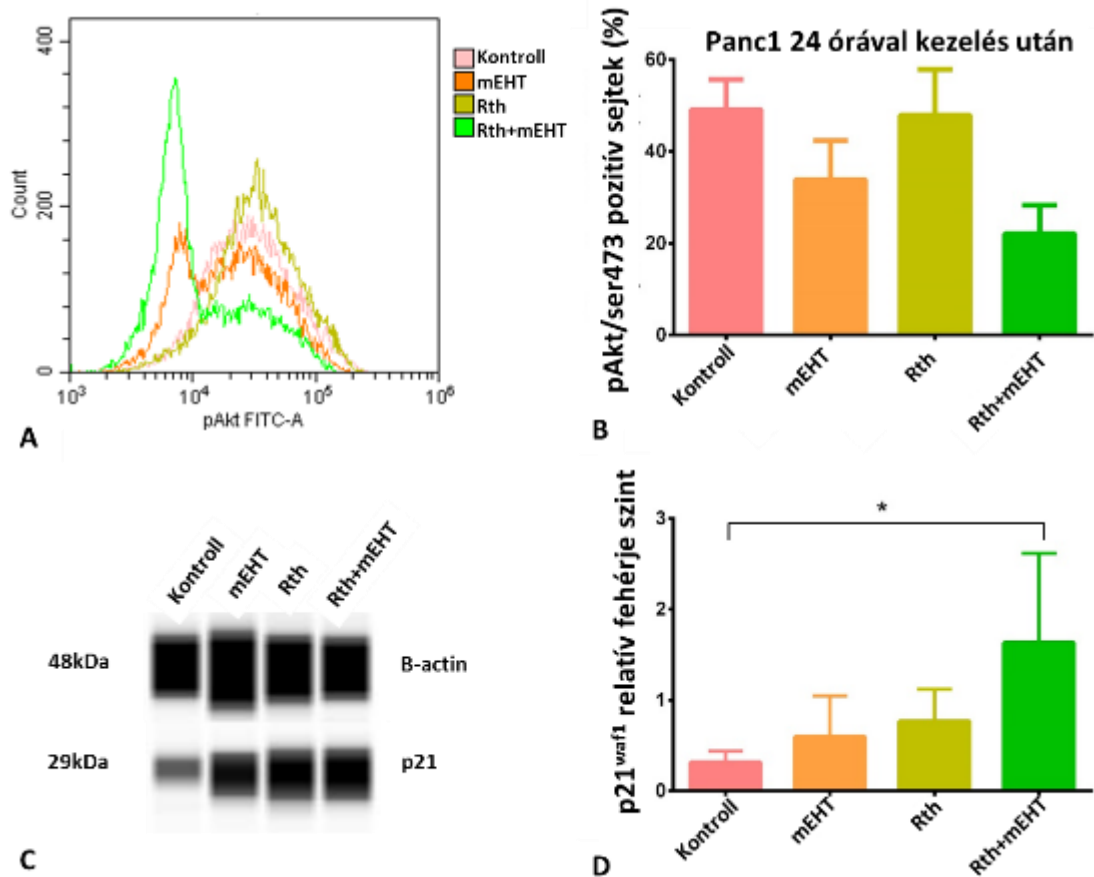


**13. Ábra:** Az apoptózis mérésekkel megegyezően, emelkedett SubG1 fázist mértünk mindkét sejtvonalban a kezeléseket követően. A *Capan1* sejtekben 24 óránál még nem, de 48 órás mintavétel során statisztikailag szignifikánsan magasabb volt az mEHT és mEHT+GEM kezelt csoportokban a SubG1 fázisú sejtek aránya kontrollhoz képest. Ezzel egyidejűleg a G1, S és G2/M fázisban lévő sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent az mEHT kezelt csoportokban a kontrollhoz képest. *Panc1* sejtvonalnál a SubG1 fázis szignifikáns emelkedése 24 óránál volt mérhető kontrollhoz képest és ezt követte a G2/M fázis csökkenése kettős kezelt csoportban. Az S fázis 48 óránál volt szignifikánsan kevesebb a GEM és mEHT+GEM kezelt csoportokban a kontrollhoz képest, amit egy G1 fázis emelkedéssel társult a GEM-el kezelt sejtekben. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.5 Az AKT és a p21<sup>waf1</sup> fehérjék szerepe a sejtciklusblokkban kezeléseket követően

##### 4.5.1 Radioterápiával kombinálva az mEHT p21<sup>waf1</sup> emelkedés során gátolja az AKT aktivációját

Fehérje szinten vizsgáltunk a sejtciklus regulátor fehérjék (CDK4, cyclin A, geminin, phospho-Akt/ser473 és p21<sup>waf1</sup>) kifejeződését, melyek közül a p21<sup>waf1</sup> és az aktivált AKT szerepe volt jelentős a sejtciklus változásokban. A besugárzott *Panc1* sejtek mEHT kezelését követően, a vizsgált AKT szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. Ezzel egyidejűleg a p21<sup>waf1</sup> fehérje mennyisége jelentősen megemelkedett a kettős kezelésnek alávetett sejtekben a kontrollhoz viszonyítva (**14. Ábra**).

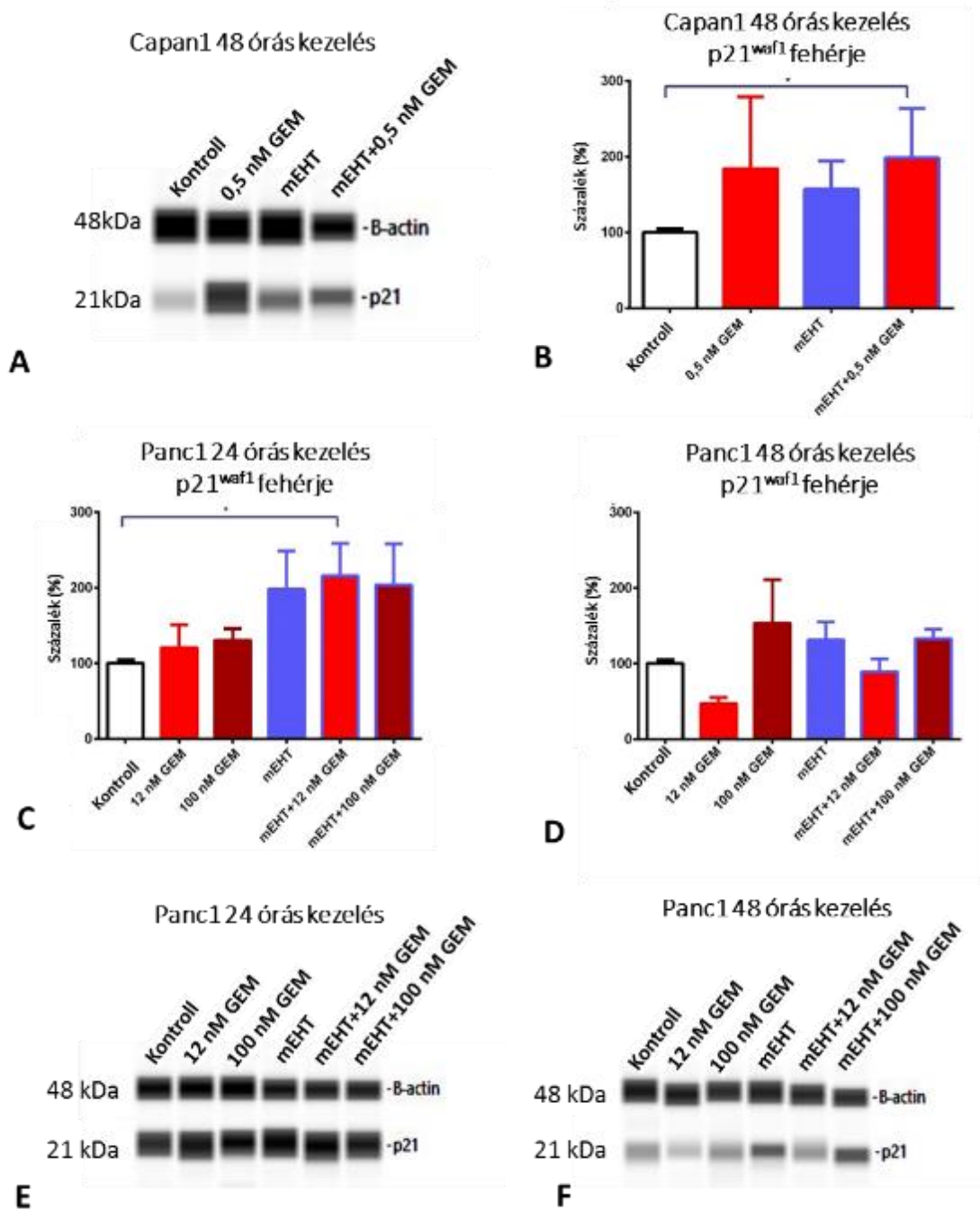


**14. Ábra:** Csökkent phospho-Akt/ser473 és emelkedett  $p21^{waf1}$  fehérje szintek 24 órával Rth+mEHT kezelések után. Áramlási citometriás méréseink során a Kruskal–Wallis statisztikai analízis szignifikáns különbséget mutatott a csoportok között ( $p = 0,015$ ) (A,B). A WES technikával detektált emelkedett  $p21^{waf1}$  fehérje expresszió Kruskal–Wallis teszttel szignifikáns különbséget mutatott ( $p = 0,049$ ) mely a Dunn-féle post-hoc teszttel az Rth+mEHT csoportban szignifikáns emelkedéssel járt a kontrollhoz képest ( $p = 0,045$ ) (C,D).

4.5.2 Az mEHT kemoterápiás kombináció során is emeli a  $p21^{waf1}$  fehérje szintet a sejtekben

A szuszpenziós mEHT rendszeren elvégzett kísérleteink, a kemoterápiás kezeléssel kombinálva, Capan1 sejtekben 48 óránál szintén szignifikánsan magasabb  $p21^{waf1}$  fehérje szinteket mutatott az mEHT+0,5 nM GEM kezelt csoportban a kontrollhoz képest. Panc1 sejtekben visszaigazoltuk a mEHT által okozott  $p21^{waf1}$  emelkedést 24 óránál, ami elérte a statisztikailag szignifikáns szintet mEHT+12 nM GEM esetében. A 48 órás Panc1

mintavételeknél ismételten megfigyelhető volt a hatás elhalványulása, jelentős  $p21^{waf1}$  emelkedés nem volt detektálható egyik kezelés során sem (15. Ábra).

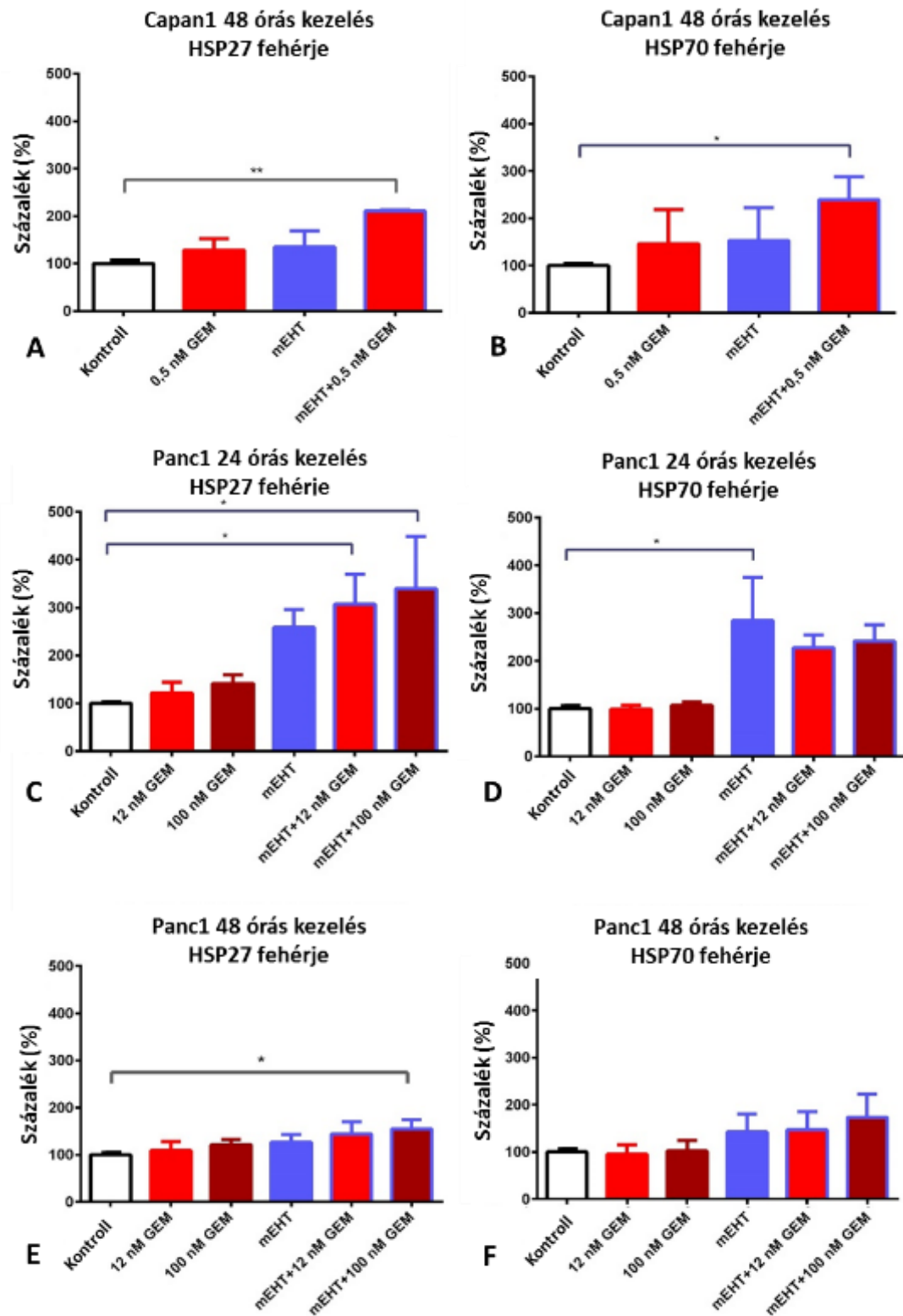


15. Ábra: Emelkedett  $p21^{waf1}$  fehérje szint detektálható Capan1 sejtekben 48 órával mEHT+GEM kezelés után a kontrollhoz képest ( $p = 0,03$ ) (A,B). Panc1 sejtekben a  $p21^{waf1}$  fehérje szintje szignifikánsan megemelkedett 24 órával mEHT+12 nM GEM kezelést követően a kontrollhoz képest ( $p = 0,023$ ) (C,E). 48 órás mintavételeink során a

*Kruskal-Wallis analízis szignifikáns különbséget detektált a csoportok között ( $p = 0,028$ ) emelkedett  $p21^{waf1}$  szinttel az mEHT és 100 nM GEM monoterápiák illetve a mEHT+GEM csoportokban (D,F).*

#### 4.6 Hősokk fehérje expresszió változása mEHT kezelést követően

Megvizsgáltuk Capan1 és Panc1 kezelt, illetve nem kezelt sejteinek a HSP27 és HSP70 szintjét. Capan1 sejtvonal esetében azt tapasztaltuk, hogy 24 óránál a kontroll sejtekhez képest, az mEHT+0,5 nM GEM kezelt csoportban a HSP27 és a HSP70 is legalább 2× magasabb szintet ért el. Hasonló módon, a Panc1 sejtekben mEHT kezelését követően 24 órával szignifikánsan magasabb HSP70 volt detektálható a kontrollhoz képest. A HSP27 szintje az mEHT+12 nM és 100 nM GEM csoportokban 3×-ra emelkedett, ami szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollban. Panc1 sejtvonalnál kíváncsiak voltunk a 48 órás mintavételekre is, és itt azt tapasztaltuk, hogy szinte normalizálódni látszott mindkét hősokk fehérje, kivéve az mEHT+100 nM GEM-ben, ahol a HSP27 szintje még mindig szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollcsoportban (**16. Ábra**).



16. Ábra: Hősokkfehérjék WES analízise. Capan1 sejtekben a HSP27 és HSP70 fehérjék szignifikáns emelkedést mutattak 48 órával mEHT + 0,5 nM GEM kezelés után a

*kontrollhoz képest ( $p < 0,01$  illetve  $p = 0,036$ ) (A,B). A HSP27 szignifikánsan emelkedett volt Panc1 sejtekben is 24 órával mEHT + 12 nM GEM és mEHT + 100 nM GEM kezeléseket követően ( $p = 0,046$  és  $p = 0,023$ ) (C). Az mEHT + 100 nM GEM kezelés szintén szignifikánsan magasabb HSP27 szintet okozott, 48 órával kezelés után a kontrollhoz viszonyítva ( $p = 0,014$ ) (E) A Panc1 sejtek emelkedett HSP70 szintje 24 óránál csak mEHT monoterápiát követően volt statisztikailag szignifikáns ( $p = 0,046$ ) (D) mely különbség el is tűnt a 48 órás mintavételek idejére (F).*



## 5. Megbeszélés

Az onkológiai kezelések irányelve manapság leginkább a személyre szabott terápiát és a több célpontot támadó kombinációs kezeléseket részesíti előnyben. Több malignus daganat esetében, mint például a krónikus limfocitás leukémia vagy a BRAF mutációt hordozó melanoma, az új típusú célzott terápiák és immunterápiás készítmények többszörösen felülmúlják a klasszikus kemoterápiák által nyújtott túlélési rátákat (176, 177). Hasnyálmirigy daganatokban azonban az ígéretes kezdeti eredményeket nem követte áttörés, melynek okaként a tumor stroma erős immunszuppresszív hatását, illetve a célozható biomarkerek ismeretének hiányát tartják (178). Így napjainkban is a PDAC-ban szenvedő betegek kezelési protokollját klasszikus kemoterápiák és esetleg radioterápiás kezelések alkotják (67). A betegek túlélési esélyei azonban még így is alig 10% feletti 5 év után (2), így a szupportív kezelések egyre fontosabb szerepet töltenek be. A modern hipertermiás készülékek fejlesztésével és a fókuszáltabb hőleadás következtében, az mEHT is előtérbe került, mint kiegészítő terápia PDAC-ban.

Munkacsoportunk intenzíven tanulmányozza az mEHT molekuláris hatásait monoterápiában, illetve kemoterápiás ágensek kíséretében is (179). Korábban leírtuk a Lab-EHY 100-as készülékkel végzett kísérleteink során, hogy a hőterápia ezen szelektív formája már önmagában is képes jelentős apoptózist indukálni *in vivo* egér colorectalis carcinoma (CRC) tumorgraftokban (84, 85, 180). Megfigyeltük továbbá *in vitro* körülmények között, hogy a C26 tumorsejtek doxorubicin és mEHT kombinációs kezelését követően csökkent antiapoptotikus XIAP, BCL-2 és BCL-XL mRNS szinteket, ugyanakkor magas BAX és PUMA proapoptotikus marker expressziót mutatnak (181).

Jelen dolgozatunkban radio- és kemorezisztens PDAC sejtvonalon teszteltük az mEHT proapoptotikus hatását kombinációs kezelési modelleken. Kísérleteink első fázisában teszteltük az mEHT monoterápia által okozott citotoxikus hatást a kiválasztott kemo- és radiorezisztens sejtvonalon. A már leírt C26 egér CRC sejtvonalon elvégzett kísérleteinkből kiindulva, 60 perc hipertermia kezelést alkalmaztunk a letapadt Panc1 sejteken. Elhagyva a 30 perc utáni 2 órás „pihenő” időintervallumot, itt 60 perc megszakítás nélküli kezelésnél értük el a ~50%-os viabilitás csökkenést a sejteken. Letesztelve az új típusú Lab-EHY 200 elektro-hipertermiás készülék hatásfokát, megállapíthatjuk, hogy a szuszpenzióban kezelt Panc1 sejteket akár 3× kisebb

energiabevitteléssel is ugyanolyan 42°C-os hőmérsékleten tudtuk tartani, ami szintén jelentős sejtleletképeség csökkenést okozott. A két kísérleti modellünkben így a bevitt energia változó volt, azonban a célhőmérsékletet következetesen a magas láztartományban tartottuk. A loko-regionális hipertermia jelentősen eltér a radioablációs technikától, ahol a szöveteket >55°C-os hőmérséklettel destruálják, és ahol a nekrozis dominál (182).

Az mEHT terápia okozta citotoxicitást megvizsgáltuk szimultán radioterápia kezeléssel kombinálva is. A Panc1 sejtvonal irodalomban leírt magas radiorezisztenciáját mi is tapasztaltuk (175, 183), hiszen monoterápiában a 2 Gy sugárdózis nem okozott szignifikáns viabilis sejtpopuláció csökkenést a tesztelt csoportban. Kombinált kezeléseink azonban megnövelték a pusztult sejtek arányát 24 órával az mEHT kezelést követően a kontroll csoporthoz képest. Mindezek mellett apoptózisra jellemző sejtmorfológiai elváltozások is láthatóak voltak, például sejtmag töredezés és a kromatin kondenzációja.

Hasonló morfológiai elváltozásokat tapasztaltunk, mikor az mEHT kezelést GEM kezeléssel egészítettük ki. A kiválasztott GEM-rezisztens Panc1 és GEM-érzékeny Capan1 sejtek, méréseink során is 200×-os különbséget mutattak az LD20-at okozó GEM koncentrációban (174).

A kiválasztott mEHT, sugár- és kemoterápiás dózissal kezelt sejtkultúrákban megmértük az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát 24, illetve 48 óra után. A Capan1 sejtek mEHT monoterápiát és mEHT+GEM kombinált kezelést követően is, magasabb Annexin V/PI (apoptózis/nekrozis) kettősjelölt pozitív sejtpopulációt tartalmaztak, mint a kontroll csoport 24 órával a kezelést követően. A 48 órás mintavételeknél a különbség még intenzívebbé vált, a kombinált kezelés hosszabbtávú hatékonyságát bizonyítva. Mindez megegyezik az SW1990 GEM-érzékeny PDAC sejtvonalon leírtakkal, ahol közel 50%-os apoptózist mértek 42°C-os hypoxiás külső forrásból származó hipertermia és GEM kezelés után 48 órával (184). A terápia rezisztens Panc1 sejtek apoptózis dinamikája ezzel ellentétben sokkal diszkrétebb volt. Monoterápiában a hipertermia nem okozott jelentősebb apoptózis emelkedést a kontroll csoporthoz képest. Amikor azonban sugárterápiát követően alkalmaztuk az mEHT kezelést, illetve mikor 24 óra GEM kezelés követte az egy óra hipertermiát, akkor az áramlási citometria méréseken szignifikánsan

magasabb programozott sejtelhalást detektáltunk a kezelt csoportokban a kontrollhoz viszonyítva. Egy német kutatócsoport a GEM-érzékeny és GEM-rezisztens sejtek különböző válaszreakcióját figyelte meg mágnepartikulumokkal indukált hipertermia és GEM kezelés kombinációját követően *in vitro* és *in vivo*. Hasonlóan az általunk detektált magasabb apoptózishoz, a terápiák kumulált hatását írták le Panc1 és BxPC3 sejtekben, magasabb kaszpáz-3 és kaszpáz-7 aktivitás mellett a 48 órás mintavételeken (185).

Egy korábbi áttekintő tanulmányunkból kiderült, hogy az mEHT okozta programozott sejthalál több útvonalon is létrejöhet, attól függően, hogy a daganatsejtek milyen genetikai eltéréseket hordoznak, illetve, hogy milyen egyéb környezeti hatások érik a hipertermia kezelés mellett (179). *TP53* vad, illetve mutáns CRC modellekben eltérő programozott sejthalál útvonalak dominálhatnak (7, 9). *TP53* mutáns HT29 sejtvonallal létrehozott *in vivo* tumor modellben az apoptózis indukáló faktor-1 (AIF-1) (7), míg a *TP53* vad C26-os sejtvonal tumormodelljében a kaszpáz-függő útvonal aktiválásának dominanciáját figyeltük meg mEHT kezelés hatására (9). Mindkét útvonal aktiválása főként a mitokondriumokból a sejtmagba transzlokálódó AIF-1, illetve az onnan felszabaduló citokróm C indukálta hasított kaszpáz-3 enzim hatására indította el a sejtmagi DNS fragmentációját és az endonukleázok aktiválását (84, 85, 186-188). Jelen tanulmányunkban azt tapasztaltuk, hogy akár radioterápiával, akár GEM kezeléssel kombináltuk az mEHT kezelést, az mitokondriális citokróm C kiáramlást/felszabadulást okozott, ami végül a hasított/aktivált kaszpáz-3 felülregulálása révén vezetett a sejtek apoptózisához. A sejtmagi hasított kaszpáz-3 pozitivitás mellett szignifikánsan magasabb pro-apoptotikus BAX fehérje szintet is detektáltunk a Panc1 sejtekben 24 órával az mEHT monoterápia kezelést követően. Mindez alátámasztja azt elképzelésünket, hogy a radiofrekvenciás tér közvetítésével működő mEHT hőterápia főként a mitokondrium külső membránjában hoz létre irreverzibilis stressz hatást, vagyis ilyenkor elsősorban az intrinsic kaszpáz-függő útvonal aktiválása vezet végül a tumorsejtek programozott halálához.

A piknotikus, apoptotikus testek fokozott megjelenését is igazoltuk, amit a SubG1 frakció emelkedése jelzett az mEHT, Rth+mEHT és mEHT+GEM kezelt csoportokban a kontrollokhöz képest, úgy a Capan1, mint a Panc1 sejtekben. Mindezek mellett szignifikáns S és G2/M frakció csökkenést is megfigyeltünk a kezeléseket követően. Legkifejezettebben a GEM-érzékeny sejtekben csökkent a replikációs ciklusban

résztevő sejtek aránya 48 órás kezelést követően. Azonban kombinált kezeléssel a GEM-rezisztens Panc1 sejtekben is szignifikánsan kevesebb G2/M sejtet mértünk 24 óránál, illetve S fázisban levő sejtet 48 óránál a kontrollhoz viszonyítva. Egy kísérlet során, SW1990 hasnyálmirigy daganatsejtekben szintén S fázis blokádot figyeltek meg hipertermia kezelést követően, amit a survivin szint csökkenésével magyaráztak (184). Egy nem-kissejtes tüdődaganat sejtvonalon végzett *in vitro* és *in vivo* kísérlet sorozatban már 3 órával a hipertermia kezelés után megfigyelték annak GEM-szenzitizáló hatását, ugyancsak az S- és G2/M-fázis frakciók jelentős csökkenése mellett (189). A magas apoptózis és alacsony mitotikus index mellett aktivált kaszpáz-3 emelkedést is igazoltak a kombinált kezelést követően. Érdekes módon a G1 fázisban lévő sejtek aránya elletétesen mozgott mEHT hatására a kemorezisztens és kemoszenzitív sejtekben. A kombinált kezelés hatására felgyülemlett G1 fázisban a sejtek száma Panc1 és BZT-T33 GEM-rezisztens sejtkultúrákban, míg a P15 és Capan1 PDAC sejtekben a replikációs ciklus még G1 előtt megakadt (190). Feltételezéseink szerint a CDK gátló p21<sup>waf1</sup> fehérjének tulajdonítható jelentős szerep a sejtciklus blokádjában, hiszen ahogy korábbi CRC kísérletinkben is megfigyeltük (181, 191), úgy itt is jelentős p21<sup>waf1</sup> fehérjeszint emelkedés volt igazolható Rth+mEHT és mEHT+GEM kezeléseket után is. WES méréseink nem igazoltak CDK4 vagy cyclin A emelkedést, ami szinkronban van a mások által leírt p21<sup>waf1</sup> blokáddal okozta inkább cyclin B1 és CDK1 csökkenéssel nem-kissejtes tüdődaganat sejtvonalakon (192).

A terápiákkal szembeni rezisztenciában jelentős szerepet játszó CSC-k csökkenését igazolni tudtuk kolóniaformáló próbánkkal. Monoterápiát követően csak enyhe számban csökkentek a CSC-k, de az Rth+mEHT és az mEHT+GEM csoportoknál Panc1 és Capan1 sejtekben is szignifikánsan kevesebb kolóniát számoltunk. Ennek megfelelően arra a következtetésre jutottunk, hogy az indukált sejthalál nem csak a replikációban lévő sejteket, de a repopulációra képes prekursor-/őssejt típusú tumorsejteket is érinti.

A hősokk fehérjék (HSP-k) olyan „chaperon” molekulák, melyek a sejtet érő stressz következtében módosult konformációjú, ezzel párhuzamosan csökkent funkciójú, sérült fehérjéket felismerik és igyekeznek a funkcionális konformációt védeni, vagy visszaállítani (193). Amennyiben a sérülés visszafordíthatatlan, úgy segédkeznek a protein degradációban. Tanulmányozásuk során több HSP-ről is kiderült, hogy biomarkerként is jól használhatók bizonyos daganattípusokban, például a HSP27 PDAC

esetekben prognosztikus és prediktív markerként is használható (194). Megfigyelték ugyanis, hogy amennyiben a HSP27 mennyiségét emelni tudjuk PDAC sejtekben úgy érzékenyebbé válnak GEM terápiára *in vitro* körülmények között. Sőt összefüggést találtak a PDAC-s esetek HSP27 és GEM rezisztenciája között is (190, 195). Az általunk használt hipertermiás mEHT készülékkel a kontrollhoz képest 2-3× magasabb HSP27 és HSP70 fehérje szintet tudunk előidézni Capan1 sejtekben 48 óránál, Panc1 sejtekben pedig 24 óránál. Azokban a tumorsejtekben pedig, ahol konstitucionálisan magas a HSP70 vagy HSP90 szintje, már célzott HSP inhibitorokkal jelentős tumorsejt destrukciót értek el kísérletes körülmények között (196, 197).

## 6. Következtetések

Munkánk célja az mEHT kezelés hatásának vizsgálata volt radio- illetve kemorezisztens PDAC sejtvonalakon önmagában vagy kombinált kezelések alkalmával. Az eredményeinkből levonható alábbi következtetések új megfigyeléseknek tekinthetők:

- A korszerű hipertermiás készülékeket használva, fókuszáltan tudunk  $\sim 42^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten tumorsejtkárosodást kiváltani PDAC sejtekben *in vitro*. Az mEHT kezelés már monoterápiában is jelentős életképesség csökkenést okoz rövidtávon radio- és kemoterápiára ellenálló Panc1 sejtekben, továbbá gemcitabin érzékeny Capan1 sejtekben is.
- Mindkét sejtvonalban az mEHT-val kombinált radioterápia és kemoterápia is jelentősen intenzívebb életképesség csökkenést és apoptózist eredményezett, mint e kezelési formák bármelyike monoterápiában.
- Mindkét sejtvonalban a kezelések a mitokondriumból citokróm C felszabadulást okoztak, ami aktiválta a végrehajtó kaszpáz-3 enzimfehérjét és a sejtek apoptózisához vezetett. Ezt mEHT kezelés után a hasított/aktivált kaszpáz-3 pozitív tumorsejtmagok, illetve a szub-G1 frakció mennyiségének szignifikáns emelkedésével igazoltuk immuncitokémiai, illetve áramlási citometriai módszerrel, ami kombinált kezelések után még markánsabban jelentkezett.
- GEM-érzékeny Capan1 sejtvonalban mEHT+GEM kombinált kezelés után emelkedett apoptózist mértünk a tumorsejt replikáció és G1 fázis sejtfrakció csökkenése mellett. Panc1 sejtekben a megkezdett replikációt a kezelések G1 fázisnál blokkolták, ami a ciklinfüggő kináz gátló p21<sup>waf1</sup> fehérje expresszió emelkedése mellett az S és G2/M sejtciklus frakciók csökkenését eredményezte.
- PDAC tumorokban a hőshockfehérje (HSP27 és HSP70) expresszió mEHT kezelés okozta 2-3×-os emelkedése lehetőséget kínál célzott HSP elleni terápiára, ami tovább támogatja GEM kezelés hatékonyságát és így a rezisztencia kivédését.

## 7. Összefoglalás

A hasnyálmirigyrákban szenvedő betegek 5 éves túlélése alig éri el a 10%-ot, ami az egyik legrosszabb kimenetelű rákos megbetegedésnek számít. A kemo- és radioterápiás kezelések mellett az új típusú immunterápiák és/vagy célzott terápiák sem nyújtottak jelentős javulást a betegség kimenetelében.

Munkacsoportunk intenzíven tanulmányozza az mEHT kiegészítő terápiás lehetőség okozta citotoxikus hatásokat különböző malignus daganatsejt populációkon. Korábbi megfigyeléseinket – ahol egér colorectalis carcinoma sejtvonalon 2×30 perc mEHT jelentős apoptózis indukciót tapasztaltunk *in vitro* és *in vivo* is – folytattuk jelen dolgozatunkban pancreas duktális adenocarcinoma (PDAC) sejteken.

Megvizsgáltunk két különböző *in vitro* kezelő készüléket ahol a beállítások megengedték hogy kisebb energiafelhasználással tudjunk fókuszáltabban 42°C-os hőmérsékletet teremteni. Mindkét eljárással kombinációban vizsgáltuk az mEHT hatásait radio- és kemoterápia mellett és megfigyeltük az mEHT támogató hatását mindkét klasszikus terápia mellett, hiszen jelentősen meg tudta emelni a kaszpáz-függő programozott sejthalál arányt a kontroll csoportokhoz képest. Az mEHT támogatni tudta a gemcitabin hatását mint sejtciklus blokkoló, hiszen a proliferációs S és G2/M fázisban lévő sejtek aránya jelentős csökkenést mutatott a két terápia együttes használatát követően úgy kemoszenzitív sejtekben, mint a kemorezisztensekben. Besugárzást követően szintén támogató hatása volt az mEHT-nak, SubG1 fázis szignifikáns emelkedését segítve és a G1 fázis csökkenést erősítve a kontroll csoporthoz képest. Eredményeink szerint ezen sejtciklus regulálás főleg a p21<sup>waf1</sup> fehérje szint emelkedésével és az AKT aktiváció gátlásán keresztül jött létre a kettőskezelt csoportokban.

Feltételezésünk szerint a kemo- és radioszenzitizálásban a hősokkfehérjéknek is jelentős szerepük van. Megfigyeléseink szerint az mEHT akár 3× magasabb HSP27 és HSP70 szintet tudott eredményezni a kemoszenzitív sejtekben 48 óránál a kemorezisztensekben pedig 24 órával a kezelés után.

Mindezek alapján az mEHT kiegészítő terápiás lehetőségként hasnyálmirigy daganatokban is okkal merül fel és jelentőséggel bír a használata olyan tumorok esetében is, ahol a radioterápiára és kemoterápiára már rezisztencia alakult ki.

## 8. Summary

Pancreatic cancer is one of the most fatal malignant tumors worldwide. The 5-years survival rate is around 10%. This poor outcome rate is present also when immune- or target therapies are used in combination with classic chemotherapy drugs.

Our research team studies the cytotoxic effect of modulated electro-hyperthermia (mEHT) on different malignant cell types. Here we tested these cell death effects on chemo- and radiotherapy-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines.

We tested two different mEHT applicators, where the newer setup was more userfriendly and enabled a more focused energy input at ~42°C temperature. We found a remarkable cytotoxic effect after treatments in both of the cell lines, even when mEHT monotherapy was applied. When we combined the hyperthermia with radiotherapy or chemotherapy, the results showed elevated apoptosis and fewer living cells 24 or 48 hours after treatments. The mEHT supported the effects of gemcitabine in both Capan1 chemosensitive and Panc1 chemoresistant cell lines regarding the cell cycle block. We found significantly reduced S and G2/M phases in the double-treated groups compared to the control. The Panc1 is known to be radioresistant too, thus we combined the mEHT with radiotherapy on the cells and we observed higher SubG1 phase and reduced amount of G1 cells when compared to the Rth treated and control groups. As we measured the amount of p21<sup>waf1</sup> protein and the phosphorylated AKT level, we concluded that these two may be responsible for the cell cycle blocks. The amount of p21<sup>waf1</sup> increased significantly after combinations and the activated AKT level was reduced at the same time after treatments.

We suppose a sensitizing effect of the heat shock proteins for chemotherapies and radiotherapy too and thus our analyses included HSP27 and HSP70 level measurement. The chemosensitive Capan1 cells expressed high protein levels at 48 hours, the Panc1 showed the same tendency 24 hours after mEHT treatment.

In conclusion the mEHT should be considered as a complementary therapy in case of radio- or chemoresistant pancreatic adenocarcinoma tumor types.



## 9. Irodalomjegyzék

1. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, Washington KM, Carneiro F, Cree IA. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-188.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021.
3. Huang J, Lok V, Ngai CH, Zhang L, Yuan J, Lao XQ, Ng K, Chong C, Zheng ZJ, Wong MCS. Worldwide Burden of, Risk Factors for, and Trends in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. 2021;160(3):744-754.
4. Cancer IAfRo. Data Visualization Tools for Exploring the Global Cancer Burden 2021 [cited 2022 05.15]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
5. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 2016;55(9-10):1158-1160.
6. Matsubayashi H, Takaori K, Morizane C, Maguchi H, Mizuma M, Takahashi H, Wada K, Hosoi H, Yachida S, Suzuki M, Usui R, Furukawa T, Furuse J, Sato T, Ueno M, Kiyozumi Y, Hijioka S, Mizuno N, Terashima T, Mizumoto M, Kodama Y, Torishima M, Kawaguchi T, Ashida R, Kitano M, Hanada K, Furukawa M, Kawabe K, Majima Y, Shimosegawa T. Familial pancreatic cancer: Concept, management and issues. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(6):935-948.
7. Brune KA, Lau B, Palmisano E, Canto M, Goggins MG, Hruban RH, Klein AP. Importance of age of onset in pancreatic cancer kindreds. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(2):119-126.
8. Ushio J, Kanno A, Ikeda E, Ando K, Nagai H, Miwata T, Kawasaki Y, Tada Y, Yokoyama K, Numao N, Tamada K, Lefor AK, Yamamoto H. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Epidemiology and Risk Factors. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2021;11(3).
9. Principe DR, Rana A. Updated risk factors to inform early pancreatic cancer screening and identify high risk patients. *Cancer Lett*. 2020;485:56-65.

10. Bekkali NLH, Oppong KW. Pancreatic ductal adenocarcinoma epidemiology and risk assessment: Could we prevent? Possibility for an early diagnosis. *Endoscopic ultrasound*. 2017;6(Suppl 3):S58-s61.
11. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World journal of oncology*. 2019;10(1):10-27.
12. Tulassay Zsolt LK, Zalatnai Attila. A hasnyálmirigy daganatai: *Medicina Könyvkiadó Zrt.*; 2014.
13. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(1):11-22.
14. O'Bryan JP. Pharmacological targeting of RAS: Recent success with direct inhibitors. *Pharmacol Res*. 2019;139:503-511.
15. Storz P, Crawford HC. Carcinogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2020;158(8):2072-2081.
16. Grant TJ, Hua K, Singh A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in molecular biology and translational science*. 2016;144:241-275.
17. Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, Swisa A, Condiotti R, Granit RZ, Nevo Y, Fixler Y, Shreibman D, Zamir A, Tornovsky-Babeay S, Dai C, Glaser B, Powers AC, Shapiro AMJ, Magnuson MA, Dor Y, Ben-Porath I. p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nature medicine*. 2016;22(4):412-420.
18. Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*. 2006;127(2):265-275.
19. Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer research*. 1998;58(20):4740-4744.
20. Wood LD, Hruban RH. Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer J*. 2012;18(6):492-501.
21. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok CY, Jia M, De T, Teague JW, Stratton MR, McDermott

U, Campbell PJ. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D805-811.

22.Visani M, Acquaviva G, De Leo A, Sanza V, Merlo L, Maloberti T, Brandes AA, Franceschi E, Di Battista M, Masetti M, Jovine E, Fiorino S, Pession A, Tallini G, de Biase D. Molecular alterations in pancreatic tumors. *World journal of gastroenterology*. 2021;27(21):2710-2726.

23.Miyazaki T, Ohishi Y, Miyasaka Y, Oda Y, Aishima S, Ozono K, Abe A, Nagai E, Nakamura M, Oda Y. Molecular Characteristics of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas with High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) Are Different from Those without High-Grade PanIN. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2017;84(4):192-201.

24.Hsieh YY, Liu TP, Chou CJ, Chen HY, Lee KH, Yang PM. Integration of Bioinformatics Resources Reveals the Therapeutic Benefits of Gemcitabine and Cell Cycle Intervention in SMAD4-Deleted Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Genes*. 2019;10(10).

25.Wang F, Xia X, Yang C, Shen J, Mai J, Kim H-C, Kirui D, Kang Ya, Fleming JB, Koay EJ, Mitra S, Ferrari M, Shen H. SMAD4 Gene Mutation Renders Pancreatic Cancer Resistance to Radiotherapy through Promotion of Autophagy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(13):3176-3185.

26.Stoica A-F, Chang C-H, Pauklin S. Molecular Therapeutics of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Targeted Pathways and the Role of Cancer Stem Cells. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2020;41(12):977-993.

27.de Juan C, Sanchez M, Miquel R, Pages M, Ayuso JR, Ayuso CJCPiDR. Uncommon tumors and pseudotumoral lesions of the pancreas. 2008;37(4):145-164.

28.Wang L, Xie D, Wei D. Pancreatic Acinar-to-Ductal Metaplasia and Pancreatic Cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2019;1882:299-308.

29.Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJA. Pancreatic

Intraepithelial Neoplasia: A New Nomenclature and Classification System for Pancreatic Duct Lesions. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2001;25(5).

30.Guilmette JM, Nosé V. Neoplasms of the Neuroendocrine Pancreas: An Update in the Classification, Definition, and Molecular Genetic Advances. *Advances in Anatomic Pathology*. 2019;26(1).

31.Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP. Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1):16022.

32.Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*. 2014;371(11):1039-1049.

33.Schima W, Böhm G, Rösch CS, Klaus A, Függer R, Kopf H. Mass-forming pancreatitis versus pancreatic ductal adenocarcinoma: CT and MR imaging for differentiation. *Cancer Imaging*. 2020;20(1):52-52.

34.Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *Jama*. 2021;326(9):851-862.

35.Tummers WS, Willmann JK, Bonsing BA, Vahrmeijer AL, Gambhir SS, Swijnenburg R-J. Advances in Diagnostic and Intraoperative Molecular Imaging of Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2018;47(6):675-689.

36.Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Annals of surgery*. 1996;223(3):273-279.

37.Cloyd JM, Katz MH, Prakash L, Varadhachary GR, Wolff RA, Shroff RT, Javle M, Fogelman D, Overman M, Crane CH, Koay EJ, Das P, Krishnan S, Minsky BD, Lee JH, Bhutani MS, Weston B, Ross W, Bhosale P, Tamm EP, Wang H, Maitra A, Kim MP, Aloia TA, Vauthey JN, Fleming JB, Abbruzzese JL, Pisters PW, Evans DB, Lee JE. Preoperative Therapy and Pancreatoduodenectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: a 25-Year Single-Institution Experience. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2017;21(1):164-174.

- 38.Murphy JE, Wo JY, Ryan DP, Jiang W, Yeap BY, Drapek LC, Blaszkowsky LS, Kwak EL, Allen JN, Clark JW, Faris JE, Zhu AX, Goyal L, Lillemoe KD, DeLaney TF, Fernández-Del Castillo C, Ferrone CR, Hong TS. Total Neoadjuvant Therapy With FOLFIRINOX Followed by Individualized Chemoradiotherapy for Borderline Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2018;4(7):963-969.
- 39.Khorana AA, Mangu PB, Berlin J, Engebretson A, Hong TS, Maitra A, Mohile SG, Mumber M, Schulick R, Shapiro M, Urba S, Zeh HJ, Katz MHG. Potentially Curable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. 2017;35(20):2324-2328.
- 40.Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges. *Gastroenterology*. 2019;156(7):2024-2040.
- 41.Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic Adenocarcinoma. 2014;371(11):1039-1049.
- 42.Soweid AM. The borderline resectable and locally advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: Definition. *Endoscopic ultrasound*. 2017;6(Suppl 3):S76-s78.
- 43.Loehrer PJ, Sr., Feng Y, Cardenes H, Wagner L, Brell JM, Cella D, Flynn P, Ramanathan RK, Crane CH, Alberts SR, Benson AB, 3rd. Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(31):4105-4112.
- 44.Rich TA, Winter K, Safran H, Hoffman JP, Erickson B, Anne PR, Myerson RJ, Cline-Burkhardt VJ, Perez K, Willett C. Weekly paclitaxel, gemcitabine, and external irradiation followed by randomized farnesyl transferase inhibitor R115777 for locally advanced pancreatic cancer. *OncoTargets and therapy*. 2012;5:161-170.
- 45.Yeo CJ, Abrams RA, Grochow LB, Sohn TA, Ord SE, Hruban RH, Zahurak ML, Dooley WC, Coleman J, Sauter PK, Pitt HA, Lillemoe KD, Cameron JL. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: postoperative adjuvant chemoradiation improves survival. A prospective, single-institution experience. *Annals of surgery*. 1997;225(5):621-633; discussion 633-626.

- 46.Hammel P, Huguet F, van Laethem J-L, Goldstein D, Glimelius B, Artru P, Borbath I, Bouché O, Shannon J, André T, Mineur L, Chibaudel B, Bonnetain F, Louvet C. Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;315(17):1844-1853.
- 47.Chauffert B, Mornex F, Bonnetain F, Rougier P, Mariette C, Bouché O, Bosset JF, Aparicio T, Mineur L, Azzedine A, Hammel P, Butel J, Stremstoerfer N, Maingon P, Bedenne L. Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. Definitive results of the 2000-01 FFCD/SFRO study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2008;19(9):1592-1599.
- 48.Klaiber U, Hackert T. Conversion Surgery for Pancreatic Cancer—The Impact of Neoadjuvant Treatment. 2020;9.
- 49.Faris JE, Blaszkowsky LS, McDermott S, Guimaraes AR, Szymonifka J, Huynh MA, Ferrone CR, Wargo JA, Allen JN, Dias LE, Kwak EL, Lillemoe KD, Thayer SP, Murphy JE, Zhu AX, Sahani DV, Wo JY, Clark JW, Fernandez-del Castillo C, Ryan DP, Hong TS. FOLFIRINOX in locally advanced pancreatic cancer: the Massachusetts General Hospital Cancer Center experience. *The oncologist*. 2013;18(5):543-548.
- 50.Védie AL, Neuzillet C. Pancreatic cancer: Best supportive care. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*. 2019;48(3 Pt 2):e175-e185.
- 51.Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;364(19):1817-1825.
- 52.Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine*. 2013;369(18):1691-1703.

53. Tempero MA, JotNCCN. NCCN guidelines updates: pancreatic cancer. 2019;17(5.5):603-605.
54. Singh RR, O'Reilly EM. New Treatment Strategies for Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Drugs*. 2020;80(7):647-669.
55. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(2):81-94.
56. Seufferlein T, Ettrich TJ. Treatment of pancreatic cancer-neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC). *Translational gastroenterology and hepatology*. 2019;4:21-21.
57. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*. 2017;23(10):1124-1134.
58. Srivastava AK, Banerjee A, Cui T, Han C, Cai S, Liu L, Wu D, Cui R, Li Z, Zhang X, Xie G, Selvendiran K, Patnaik S, Karpf AR, Liu J, Cohn DE, Wang Q-E. Inhibition of miR-328-3p Impairs Cancer Stem Cell Function and Prevents Metastasis in Ovarian Cancer. 2019;79(9):2314-2326.
59. Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sciences*. 2019;234:116781.
60. Bocci F, Gearhart-Serna L, Boareto M, Ribeiro M, Ben-Jacob E, Devi GR, Levine H, Onuchic JN, Jolly MK. Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment. 2019;116(1):148-157.
61. Aiello NM, Maddipati R, Norgard RJ, Balli D, Li J, Yuan S, Yamazoe T, Black T, Sahmoud A, Furth EE, Bar-Sagi D, Stanger BZ. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Developmental cell*. 2018;45(6):681-695.e684.
62. Joseph JP, Harishankar MK, Pillai AA, Devi A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. *Oral oncology*. 2018;80:23-32.
63. Ireland L, Santos A, Ahmed MS, Rainer C, Nielsen SR, Quaranta V, Weyer-Czernilofsky U, Engle DD, Perez-Mancera PA, Coupland SE, Taktak A, Bogenrieder T, Tuveson DA, Campbell F, Schmid MC, Mielgo A. Chemoresistance in Pancreatic Cancer

Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. *Cancer research*. 2016;76(23):6851-6863.

64.Shukla SK, Purohit V, Mehla K, Gunda V, Chaika NV, Vernucci E, King RJ, Abrego J, Goode GD, Dasgupta A, Illies AL, Gebregiworgis T, Dai B, Augustine JJ, Murthy D, Attri KS, Mashadova O, Grandgenett PM, Powers R, Ly QP, Lazenby AJ, Grem JL, Yu F, Matés JM, Asara JM, Kim JW, Hankins JH, Weekes C, Hollingsworth MA, Serkova NJ, Sasson AR, Fleming JB, Oliveto JM, Lyssiotis CA, Cantley LC, Berim L, Singh PK. MUC1 and HIF-1alpha Signaling Crosstalk Induces Anabolic Glucose Metabolism to Impart Gemcitabine Resistance to Pancreatic Cancer. *Cancer cell*. 2017;32(1):71-87.e77.

65.Lytle NK, Ferguson LP, Rajbhandari N, Gilroy K, Fox RG, Deshpande A, Schürch CM, Hamilton M, Robertson N, Lin W, Noel P, Wartenberg M, Zlobec I, Eichmann M, Galván JA, Karamitopoulou E, Gilderman T, Esparza LA, Shima Y, Spahn P, French R, Lewis NE, Fisch KM, Sasik R, Rosenthal SB, Kritzik M, Von Hoff D, Han H, Ideker T, Deshpande AJ, Lowy AM, Adams PD, Reya T. A Multiscale Map of the Stem Cell State in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cell*. 2019;177(3):572-586.e522.

66.Dauer P, Nomura A, Saluja A, Banerjee S. Microenvironment in determining chemoresistance in pancreatic cancer: Neighborhood matters. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al]. 2017;17(1):7-12.

67.Brunner TB, Haustermans K, Huguet F, Morganti AG, Mukherjee S, Belka C, Krempien R, Hawkins MA, Valentini V, Roeder F. ESTRO ACROP guidelines for target volume definition in pancreatic cancer. *Radiotherapy and Oncology*. 2021;154:60-69.

68.Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW. A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(12):1200-1210.

69.Buss EJ, Kachnic LA, Horowitz DP. Radiotherapy for locally advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Seminars in oncology*. 2021;48(1):106-110.



70. Azad A, Yin Lim S, D'Costa Z, Jones K, Diana A, Sansom OJ, Kruger P, Liu S, McKenna WG, Dushek O, Muschel RJ, Fokas E. PD-L1 blockade enhances response of pancreatic ductal adenocarcinoma to radiotherapy. *2017;9(2):167-180.*
71. Brunner TB, Scott-Brown M. The role of radiotherapy in multimodal treatment of pancreatic carcinoma. *Radiation Oncology. 2010;5(1):64.*
72. Ohuchida K, Mizumoto K, Murakami M, Qian LW, Sato N, Nagai E, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M. Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer research. 2004;64(9):3215-3222.*
73. Schwartz DL, Bankson JA, Lemos R, Jr., Lai SY, Thittai AK, He Y, Hostetter G, Demeure MJ, Von Hoff DD, Powis G. Radiosensitization and stromal imaging response correlates for the HIF-1 inhibitor PX-478 given with or without chemotherapy in pancreatic cancer. *Molecular cancer therapeutics. 2010;9(7):2057-2067.*
74. Morgan MA, Parsels LA, Kollar LE, Normolle DP, Maybaum J, Lawrence TS. The combination of epidermal growth factor receptor inhibitors with gemcitabine and radiation in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2008;14(16):5142-5149.*
75. Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, McKenna WG, Muschel RJ. HIV protease inhibitors block Akt signaling and radiosensitize tumor cells both in vitro and in vivo. *Cancer research. 2005;65(18):8256-8265.*
76. Morgan MA, Parsels LA, Zhao L, Parsels JD, Davis MA, Hassan MC, Arumugarajah S, Hylander-Gans L, Morosini D, Simeone DM, Canman CE, Normolle DP, Zabludoff SD, Maybaum J, Lawrence TS. Mechanism of radiosensitization by the Chk1/2 inhibitor AZD7762 involves abrogation of the G2 checkpoint and inhibition of homologous recombinational DNA repair. *Cancer research. 2010;70(12):4972-4981.*
77. Suzuki M, Anko M, Ohara M, Matsumoto KI, Hasegawa S. Radiation-Induced Autophagy in Human Pancreatic Cancer Cells is Critically Dependent on G2 Checkpoint Activation: A Mechanism of Radioresistance in Pancreatic Cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics. 2021;111(1):260-271.*

78. Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, Bollag G, McBride W, Wu L. CSF1R Signaling Blockade Stanches Tumor-Infiltrating Myeloid Cells and Improves the Efficacy of Radiotherapy in Prostate Cancer. 2013;73(9):2782-2794.
79. Chen MF, Hsieh CC, Chen WC, Lai CH. Role of interleukin-6 in the radiation response of liver tumors. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;84(5):e621-630.
80. Yang X, Lu Y, Hang J, Zhang J, Zhang T, Huo Y, Liu J, Lai S, Luo D, Wang L, Hua R, Lin Y. Lactate-Modulated Immunosuppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells Contributes to the Radioresistance of Pancreatic Cancer. 2020;8(11):1440-1451.
81. Habash RWY. Therapeutic hyperthermia. *Handbook of clinical neurology*. 2018;157:853-868.
82. Hegyi G, Szasz O, Szasz A. Oncothermia: a new paradigm and promising method in cancer therapies. *Acupuncture & electro-therapeutics research*. 2013;38(3-4):161-197.
83. Ahmed K, Zaidi SF, Mati Ur R, Rehman R, Kondo T. Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *Journal of thermal biology*. 2020;91:102615.
84. Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Jeney A, Krenacs T. DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2014;190(9):815-822.
85. Vancsik T, Kovago C, Kiss E, Papp E, Forika G, Benyo Z, Meggyeshazi N, Krenacs T. Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. *Journal of Cancer*. 2018;9(1):41-53.
86. Datta NR, Ordóñez SG, Gaipf US, Paulides MM, Crezee H, Gellermann J, Marder D, Puric E, Bodis S. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: recent advances and promises for the future. *Cancer treatment reviews*. 2015;41(9):742-753.
87. Hurwitz MD. Hyperthermia and immunotherapy: clinical opportunities. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2019;36(sup1):4-9.

- 88.Datta NR, Rogers S, Klingbiel D, Gómez S, Puric E, Bodis S. Hyperthermia and radiotherapy with or without chemotherapy in locally advanced cervical cancer: a systematic review with conventional and network meta-analyses. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2016;32(7):809-821.
- 89.Lee SY, Fiorentini G, Szasz AM, Szigeti G, Szasz A, Minnaar CA. Quo Vadis Oncological Hyperthermia (2020)? *Frontiers in oncology*. 2020;10:1690.
- 90.Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, Brace CL, Ivkov R, Grüll H, ter Haar G, Wust P, Crezee J. Heating technology for malignant tumors: a review. *International Journal of Hyperthermia*. 2020;37(1):711-741.
- 91.Lassche G, Crezee J, Van Herpen CML. Whole-body hyperthermia in combination with systemic therapy in advanced solid malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019;139:67-74.
- 92.Janssen CW, Lowry CA, Mehl MR, Allen JJ, Kelly KL, Gartner DE, Medrano A, Begay TK, Rentscher K, White JJ, Fridman A, Roberts LJ, Robbins ML, Hanusch KU, Cole SP, Raison CL. Whole-Body Hyperthermia for the Treatment of Major Depressive Disorder: A Randomized Clinical Trial. *JAMA psychiatry*. 2016;73(8):789-795.
- 93.Hanusch K-U, Janssen CW. The impact of whole-body hyperthermia interventions on mood and depression – are we ready for recommendations for clinical application? *International Journal of Hyperthermia*. 2019;36(1):572-580.
- 94.Raouf M, Cisneros BT, Corr SJ, Palalon F, Curley SA, Koshkina NV. Tumor selective hyperthermia induced by short-wave capacitively-coupled RF electric-fields. *PloS one*. 2013;8(7):e68506.
- 95.Alshaibi HF, Al-Shehri B, Hassan B, Al-Zahrani R, Assiss T. Modulated Electrohyperthermia: A New Hope for Cancer Patients. *Biomed Res Int*. 2020;2020:8814878-8814878.
- 96.Bhatt A, de Hingh I, Van Der Speeten K, Hubner M, Deraco M, Bakrin N, Villeneuve L, Kusamura S, Glehen O. HIPEC Methodology and Regimens: The Need for an Expert Consensus. *Annals of surgical oncology*. 2021;28(13):9098-9113.

97. González-Moreno S, González-Bayón LA, Ortega-Pérez G. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique. *World J Gastrointest Oncol.* 2010;2(2):68-75.
98. Follette C, Liebscher S, Mouw T, Al-Kasspoles M. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) and Cytoreductive Surgery (CRS) for Colorectal Cancer: Potential for Individualized Care, Review of Current Treatment Trends, Recent Advancements, and a Look into the Future. *Current Colorectal Cancer Reports.* 2019;15(1):36-44.
99. Dellinger TH, Han ES. State of the Science: The role of HIPEC in the treatment of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology.* 2021;160(2):364-368.
100. Brind'Amour A, Webb M, Parapini M, Sidéris L, Segedi M, Chung SW, Chartier-Plante S, Dubé P, Scudamore CH, Kim PTW. The role of intraperitoneal chemotherapy in the surgical management of pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review. *Clinical & experimental metastasis.* 2021;38(2):187-196.
101. Yurttas C, Horvath P, Fischer I, Meisner C, Nadalin S, Königsrainer I, Königsrainer A, Beckert S, Löffler MW. A Prospective, Phase I/II, Open-Label Pilot Trial to Assess the Safety of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy After Oncological Resection of Pancreatic Adenocarcinoma. *Annals of surgical oncology.* 2021;28(13):9086-9095.
102. Calixto GMF, Bernegossi J, De Freitas LM, Fontana CR, Chorilli M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. 2016;21(3):342.
103. Johannsen M, Thiesen B, Wust P, Jordan A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *International Journal of Hyperthermia.* 2010;26(8):790-795.
104. Kneidl B, Peller M, Winter G, Lindner LH, Hossann M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *International journal of nanomedicine.* 2014;9:4387-4398.
105. Borys N, Dewhirst MW. Drug development of lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin: Combining hyperthermia and thermosensitive drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;178:113985.

- 106.Kok HP, Navarro F, Strigari L, Cavagnaro M, Crezee J. Locoregional hyperthermia of deep-seated tumours applied with capacitive and radiative systems: a simulation study. *International Journal of Hyperthermia*. 2018;34(6):714-730.
- 107.Mouratidis PXE, Rivens I, Civale J, Symonds-Taylor R, ter Haar G. 'Relationship between thermal dose and cell death for "rapid" ablative and "slow" hyperthermic heating'. *International Journal of Hyperthermia*. 2019;36(1):228-242.
- 108.Müller S, Riedmüller R, van Oosterhout A. Rivaling paradigms in psychiatric neurosurgery: adjustability versus quick fix versus minimal-invasiveness. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2015;9.
- 109.Payne M, Bossmann SH, Basel MT. Direct treatment versus indirect: Thermo-ablative and mild hyperthermia effects. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2020;12(5):e1638.
- 110.Tydings C, Sharma KV, Kim A, Yarmolenko PS. Emerging hyperthermia applications for pediatric oncology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020;163-164:157-167.
- 111.Li Z, Li Q, Wang X, Chen W, Jin X, Liu X, Ye F, Dai Z, Zheng X, Li P, Sun C, Liu X, Zhang Q, Luo H, Liu R. Hyperthermia ablation combined with transarterial chemoembolization versus monotherapy for hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer medicine*. 2021;10(23):8432-8450.
- 112.De Haas-Kock DFM, Buijsen J, Pijls-Johannesma M, Lutgens L, Lammering G, Maastricht G, De Ruyscher DKM, Lambin P, van der Zee J. Concomitant hyperthermia and radiation therapy for treating locally advanced rectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2009(3).
- 113.Zagar TM, Oleson JR, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Craciunescu OI, Blackwell KL, Prosnitz LR, Jones EL. Hyperthermia combined with radiation therapy for superficial breast cancer and chest wall recurrence: A review of the randomised data. *International Journal of Hyperthermia*. 2010;26(7):612-617.
- 114.Maluta S, Kolff MW. Role of Hyperthermia in Breast Cancer Locoregional Recurrence: A Review. *Breast care (Basel, Switzerland)*. 2015;10(6):408-412.

115. Franckena M, Lutgens LC, Koper PC, Kleynen CE, van der Steen-Banasik EM, Jobsen JJ, Leer JW, Creutzberg CL, Dielwart MF, van Norden Y, Canters RA, van Rhoon GC, van der Zee J. Radiotherapy and hyperthermia for treatment of primary locally advanced cervix cancer: results in 378 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;73(1):242-250.
116. Lutgens L, van der Zee J, De Ruyscher DM, Lambin P, Platt J. Combined use of hyperthermia and (chemo)radiation therapy for treating locally advanced cervix carcinoma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010(3).
117. Burchardt E, Roszak A. Hyperthermia in cervical cancer - current status. *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*. 2018;23(6):595-603.
118. Yang Y, Zhang L, Zhang Y, Huo W, Qi R, Guo H, Li X, Wu X, Bai F, Liu K, Qiao Y, Piguet V, Croitoru D, Chen H-D, Gao X-H. Local Hyperthermia at 44°C Is Effective in Clearing Cervical High-Risk Human Papillomaviruses: A Proof-of-Concept, Randomized Controlled Clinical Trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73(9):1642-1649.
119. Minnaar CA, Kotzen JA, Naidoo T, Tunmer M, Sharma V, Vangu M-D-T, Baeyens A. Analysis of the effects of mEHT on the treatment-related toxicity and quality of life of HIV-positive cervical cancer patients. *International Journal of Hyperthermia*. 2020;37(1):263-272.
120. Minnaar CA, Kotzen JA, Ayeni OA, Naidoo T, Tunmer M, Sharma V, Vangu MD, Baeyens A. The effect of modulated electro-hyperthermia on local disease control in HIV-positive and -negative cervical cancer women in South Africa: Early results from a phase III randomised controlled trial. *PloS one*. 2019;14(6):e0217894.
121. Shimomura O, Oda T, Hashimoto S, Doi M, Hiroshima Y, Numajiri H, Takahashi K, Furuya K, Miyazaki Y, Owada Y, Ogawa K, Ohara Y, Hisakura K, Akashi Y, Enomoto T, Sakurai H. Survival impact on triple-modal strategy comprising hyperthermia, external radiation, and chemotherapy for unresectable locally advanced (UR-LA) pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgical Oncology*. 2021;37:101542.

122.Rogers SJ, Datta NR, Puric E, Timm O, Marder D, Khan S, Mamot C, Knuchel J, Siebenhüner A, Pestalozzi B, Guckenberger M, Bodis S, Riesterer O. The addition of deep hyperthermia to gemcitabine-based chemoradiation may achieve enhanced survival in unresectable locally advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Clinical and Translational Radiation Oncology*. 2021;27:109-113.

123.Petenyi FG, Garay T, Muhl D, Izso B, Karaszi A, Borbenyi E, Herold M, Herold Z, Szasz AM, Dank M. Modulated Electro-Hyperthermic (mEHT) Treatment in the Therapy of Inoperable Pancreatic Cancer Patients—A Single-Center Case-Control Study. 2021;9(4):81.

124.Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem B-C, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner C-M, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch K-W, Dürr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay J-Y, Hohenberger P. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *The Lancet Oncology*. 2010;11(6):561-570.

125.Wessalowski R, Schneider DT, Mils O, Friemann V, Kyrilopoulou O, Schaper J, Matuschek C, Rothe K, Leuschner I, Willers R, Schönberger S, Göbel U, Calaminus G. Regional deep hyperthermia for salvage treatment of children and adolescents with refractory or recurrent non-testicular malignant germ-cell tumours: an open-label, non-randomised, single-institution, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(9):843-852.

126.Board PDQPTE. Childhood Extracranial Germ Cell Tumors Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.

127.Lo Curto M, Lumia F, Alaggio R, Cecchetto G, Almasio P, Indolfi P, Siracusa F, Bagnulo S, De Bernardi B, De Laurentis T, Di Cataldo A, Tamaro P. Malignant germ cell tumors in childhood: results of the first Italian cooperative study "TCG 91". *Medical and pediatric oncology*. 2003;41(5):417-425.

128.Kantidze OL, Velichko AK, Luzhin AV, Razin SV. Heat Stress-Induced DNA Damage. *Acta naturae*. 2016;8(2):75-78.

129.Roti Roti JL. Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication. *International Journal of Hyperthermia*. 2007;23(1):3-15.

130.Luzhin AV, Avanesyan B, Velichko AK, Shender VO, Ovsyannikova N, Arapidi GP, Shnaider PV, Petrova NV, Kireev, II, Razin SV, Kantidze OL. Chromatin Trapping of Factors Involved in DNA Replication and Repair Underlies Heat-Induced Radio- and Chemosensitization. *Cells*. 2020;9(6).

131.Oei AL, Vriend LEM, Crezee J, Franken NAP, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiation Oncology*. 2015;10(1):165.

132.El-Awady RA, Dikomey E, Dahm-Daphi J. Heat effects on DNA repair after ionising radiation: hyperthermia commonly increases the number of non-repaired double-strand breaks and structural rearrangements. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):1960-1966.

133.Krawczyk PM, Eppink B, Essers J, Stap J, Rodermond H, Odijk H, Zelensky A, van Bree C, Stalpers LJ, Buist MR, Soullié T, Rens J, Verhagen HJM, O'Connor MJ, Franken NAP, ten Hagen TLM, Kanaar R, Aten JA. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(24):9851-9856.

134.Forika G, Balogh A, Vancsik T, Zalatnai A, Petovari G, Benyo Z, Krenacs T. Modulated Electro-Hyperthermia Resolves Radioresistance of Panc1 Pancreas Adenocarcinoma and Promotes DNA Damage and Apoptosis In Vitro. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(14).

135.Krenacs T, Meggyeshazi N, Forika G, Kiss E, Hamar P, Szekely T, Vancsik T. Modulated Electro-Hyperthermia-Induced Tumor Damage Mechanisms Revealed in Cancer Models. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(17):6270.

136.Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 1994;65(1):27-33.

137.Chio IIC, Jafarnejad SM, Ponz-Sarvise M, Park Y, Rivera K, Palm W, Wilson J, Sangar V, Hao Y, Öhlund D, Wright K, Filippini D, Lee EJ, Da Silva B, Schoepfer C,



Wilkinson JE, Buscaglia JM, DeNicola GM, Tiriack H, Hammell M, Crawford HC, Schmidt EE, Thompson CB, Pappin DJ, Sonenberg N, Tuveson DA. NRF2 Promotes Tumor Maintenance by Modulating mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell*. 2016;166(4):963-976.

138.Chio IIC, Tuveson DA. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med*. 2017;23(5):411-429.

139.Huang G, Pan S-T. ROS-Mediated Therapeutic Strategy in Chemo-/Radiotherapy of Head and Neck Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5047987-5047987.

140.Wang H, Jiang H, Van De Gucht M, De Ridder M. Hypoxic Radioresistance: Can ROS Be the Key to Overcome It? *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):112.

141.Song CW, Park H, Griffin RJ. Improvement of tumor oxygenation by mild hyperthermia. *Radiat Res*. 2001;155(4):515-528.

142.Kim W, Kim MS, Kim HJ, Lee E, Jeong JH, Park I, Jeong YK, Jang WI. Role of HIF-1 $\alpha$  in response of tumors to a combination of hyperthermia and radiation in vivo. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2018;34(3):276-283.

143.Li Q, Hang L, Jiang W, Dou J, Xiao L, Tang X, Yao Y, Wang Y. Pre- and post-irradiation mild hyperthermia enabled by NIR-II for sensitizing radiotherapy. *Biomaterials*. 2020;257:120235.

144.Oei AL, Kok HP, Oei SB, Horsman MR, Stalpers LJA, Franken NAP, Crezee J. Molecular and biological rationale of hyperthermia as radio- and chemosensitizer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020;163-164:84-97.

145.Gabano E, Colangelo D, Ghezzi AR, Osella D. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2008;102(4):629-635.

146.Ramajayam KK, Wolfe AM, Motamarry A, Nahhas GJ, Yost J, Yost MJ, Haemmerich D. Untargeted Large Volume Hyperthermia Reduces Tumor Drug Uptake From Thermosensitive Liposomes. *IEEE Open J Eng Med Biol*. 2021;2:187-197.

147. Tsang YW, Chi KH, Huang CC, Chi MS, Chiang HC, Yang KL, Li WT, Wang YS. Modulated electro-hyperthermia-enhanced liposomal drug uptake by cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:1269-1279.
148. Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 1999;15(5):345-370.
149. Vujaskovic Z, Kim DW, Jones E, Lan L, McCall L, Dewhirst MW, Craciunescu O, Stauffer P, Liotcheva V, Betof A, Blackwell K. A phase I/II study of neoadjuvant liposomal doxorubicin, paclitaxel, and hyperthermia in locally advanced breast cancer. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. 2010;26(5):514-521.
150. Jin HB, Lu L, Xie L, Yang JF, Zhang XF, Ma SL. Concentration changes in gemcitabine and its metabolites after hyperthermia in pancreatic cancer cells assessed using RP-HPLC. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24:30-30.
151. Liu R, Chen Y, Liu G, Li C, Song Y, Cao Z, Li W, Hu J, Lu C, Liu Y. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis*. 2020;11(9):797-797.
152. Kurokawa H, Matsui H. The Cytotoxicity of Doxorubicin Can Be Accelerated by a Combination of Hyperthermia and 5-Aminolevulinic Acid. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(10):1531.
153. Rajaei Z, Khoei S, Mahdavi SR, Ebrahimi M, Shirvalilou S, Mahdavian A. Evaluation of the effect of hyperthermia and electron radiation on prostate cancer stem cells. *Radiation and environmental biophysics*. 2018;57(2):133-142.
154. Liu D, Hong Y, Li Y, Hu C, Yip T-C, Yu W-K, Zhu Y, Fong C-C, Wang W, Au S-K, Wang S, Yang M. Targeted destruction of cancer stem cells using multifunctional magnetic nanoparticles that enable combined hyperthermia and chemotherapy. *Theranostics*. 2020;10(3):1181-1196.
155. Sadhukha T, Niu L, Wiedmann TS, Panyam J. Effective Elimination of Cancer Stem Cells by Magnetic Hyperthermia. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(4):1432-1441.

156. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* 1927;8(6):519-530.
157. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
158. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Journal of physiology.* 2021;599(6):1745-1757.
159. Govoni M, Rossi V, Di Stefano G, Manerba M. Lactate Upregulates the Expression of DNA Repair Genes, Causing Intrinsic Resistance of Cancer Cells to Cisplatin. *Pathology oncology research : POR.* 2021;27:1609951.
160. Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H, Schmidt K, Willson JK, Markowitz S, Zhou S, Diaz LA, Jr., Velculescu VE, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science (New York, NY).* 2009;325(5947):1555-1559.
161. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research.* 2004;64(11):3892-3899.
162. Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS letters.* 2000;468(1):53-58.
163. Icard P, Shulman S, Farhat D, Steyaert JM, Alifano M, Lincet H. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug Resist Updat.* 2018;38:1-11.
164. Bhattacharya B, Mohd Omar MF, Soong R. The Warburg effect and drug resistance. *Br J Pharmacol.* 2016;173(6):970-979.
165. Song CW, Lyons JC, Griffin RJ, Makepeace CM, Cragoe EJ, Jr. Increase in thermosensitivity of tumor cells by lowering intracellular pH. *Cancer research.* 1993;53(7):1599-1601.

- 166.Szasz A, Szasz N, Szasz O. *Oncothermia: principles and practices*: Springer Science & Business Media; 2010.
- 167.Grimnes S, Martinsen ØG. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*: Elsevier Ltd.; 2015.
- 168.Miklavčič D, Pavšelj N, Hart FX. *Electric Properties of Tissues*. Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering.
- 169.Mátay G, Zombory LJK. *A rádiófrekvenciás sugárzás élettani hatásai és orvosbiológiai alkalmazásai*. 2000.
- 170.Zou Y, Guo Z. A review of electrical impedance techniques for breast cancer detection. *Medical engineering & physics*. 2003;25(2):79-90.
- 171.O'Rourke AP, Lazebnik M, Bertram JM, Converse MC, Hagness SC, Webster JG, Mahvi DM. Dielectric properties of human normal, malignant and cirrhotic liver tissue: in vivo and ex vivo measurements from 0.5 to 20 GHz using a precision open-ended coaxial probe. *Physics in medicine and biology*. 2007;52(15):4707-4719.
- 172.Ahmad MA, Natour ZA, Mustafa F, Rizvi TA. Electrical Characterization of Normal and Cancer Cells. *IEEE Access*. 2018;6:25979-25986.
- 173.Hossain S. Biodielectric phenomenon for actively differentiating malignant and normal cells: An overview. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2020;39(2):89-96.
- 174.Funamizu N, Lacy CR, Kamada M, Yanaga K, Manome Y. MicroRNA-200b and -301 are associated with gemcitabine response as biomarkers in pancreatic carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2019;54(3):991-1000.
- 175.Shibamoto Y, Kubota T, Kishii K, Tsujitani M. Radiosensitivity of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo, and the effect of a new hypoxic cell sensitizer, doranidazole. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2000;56(2):265-270.
- 176.Kikushige Y. Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *J Clin Exp Hematop*. 2020;60(4):146-158.
- 177.Sun J, Carr MJ, Khushalani NI. Principles of Targeted Therapy for Melanoma. *The Surgical clinics of North America*. 2020;100(1):175-188.

- 178.Henriksen A, Dyhl-Polk A, Chen I, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews*. 2019;78:17-30.
- 179.Krenacs T, Meggyeshazi N, Forika G, Kiss E, Hamar P, Szekely T, Vancsik T. Modulated Electro-Hyperthermia-Induced Tumor Damage Mechanisms Revealed in Cancer Models. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(17).
- 180.Andocs G, Meggyeshazi N, Balogh L, Spisak S, Maros ME, Balla P, Kiszner G, Teleki I, Kovago C, Krenacs T. Upregulation of heat shock proteins and the promotion of damage-associated molecular pattern signals in a colorectal cancer model by modulated electrohyperthermia. *Cell stress & chaperones*. 2015;20(1):37-46.
- 181.Vancsik T, Forika G, Balogh A, Kiss E, Krenacs T. Modulated electro-hyperthermia induced p53 driven apoptosis and cell cycle arrest additively support doxorubicin chemotherapy of colorectal cancer in vitro. *Cancer medicine*. 2019;8(9):4292-4303.
- 182.Fallahi H, Prakash P. Antenna Designs for Microwave Tissue Ablation. *Critical reviews in biomedical engineering*. 2018;46(6):495-521.
- 183.Verovski VN, Van den Berge DL, Soete GA, Bols BL, Storme GA. Intrinsic radiosensitivity of human pancreatic tumour cells and the radiosensitising potency of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *Br J Cancer*. 1996;74(11):1734-1742.
- 184.Jin H, Zhao Y, Yang J, Zhang X, Ma S. Hyperthermia enhances the sensitivity of pancreatic cancer SW1990 cells to gemcitabine through ROS/JNK signaling. *Oncology letters*. 2018;16(5):6742-6748.
- 185.Sanhaji M, Göring J, Couleaud P, Aires A, Cortajarena AL, Courty J, Prina-Mello A, Stapf M, Ludwig R, Volkov Y, Latorre A, Somoza Á, Miranda R, Hilger I. The phenotype of target pancreatic cancer cells influences cell death by magnetic hyperthermia with nanoparticles carrying gemcitabine and the pseudo-peptide NucAnt. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2019;20:101983.
- 186.Yang KL, Huang CC, Chi MS, Chiang HC, Wang YS, Hsia CC, Andocs G, Wang HE, Chi KH. In vitro comparison of conventional hyperthermia and modulated electro-hyperthermia. *Oncotarget*. 2016;7(51):84082-84092.
- 187.Jeon TW, Yang H, Lee CG, Oh ST, Seo D, Baik IH, Lee EH, Yun I, Park KR, Lee YH. Electro-hyperthermia up-regulates tumour suppressor Septin 4 to induce apoptotic

cell death in hepatocellular carcinoma. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group.* 2016;32(6):648-656.

188.Kumari A, Iwasaki T, Pyndiah S, Cassimere EK, Palani CD, Sakamuro D. Regulation of E2F1-induced apoptosis by poly(ADP-ribosyl)ation. *Cell death and differentiation.* 2015;22(2):311-322.

189.Vertrees RA, Das GC, Popov VL, Coscio AM, Goodwin TJ, Logrono R, Zwischenberger JB, Boor PJ. Synergistic interaction of hyperthermia and Gemcitabine in lung cancer. *Cancer biology & therapy.* 2005;4(10):1144-1153.

190.Guo Y, Ziesch A, Hocke S, Kampmann E, Ochs S, De Toni EN, Göke B, Gallmeier E. Overexpression of heat shock protein 27 (HSP27) increases gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells through S-phase arrest and apoptosis. *J Cell Mol Med.* 2015;19(2):340-350.

191.Besztercei B, Vancsik T, Benedek A, Major E, Thomas MJ, Schvarcz CA, Krenács T, Benyó Z, Balogh A. Stress-Induced, p53-Mediated Tumor Growth Inhibition of Melanoma by Modulated Electrohyperthermia in Mouse Models without Major Immunogenic Effects. *International journal of molecular sciences.* 2019;20(16).

192.Zhao Y-Y, Wu Q, Wu Z-B, Zhang J-J, Zhu L-C, Yang Y, Ma S-L, Zhang S-R. Microwave hyperthermia promotes caspase-3-dependent apoptosis and induces G2/M checkpoint arrest via the ATM pathway in non-small cell lung cancer cells. *International journal of oncology.* 2018;53(2):539-550.

193.Kakkar V, Meister-Broekema M, Minoia M, Carra S, Kampinga HH. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Dis Model Mech.* 2014;7(4):421-434.

194.Drexler R, Wagner KC, Kuchler M, Feyerabend B, Kleine M, Oldhafer KJ. Significance of unphosphorylated and phosphorylated heat shock protein 27 as a prognostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2020;146(5):1125-1137.

195.Schäfer C, Seeliger H, Bader DC, Assmann G, Buchner D, Guo Y, Ziesch A, Palagyi A, Ochs S, Laubender RP, Jung A, De Toni EN, Kirchner T, Göke B, Bruns C, Gallmeier

E. Heat shock protein 27 as a prognostic and predictive biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cell Mol Med.* 2012;16(8):1776-1791.

196.Ghadban T, Dibbern JL, Reeh M, Miro JT, Tsui TY, Wellner U, Izbicki JR, GÜngör C, Vashist YK. HSP90 is a promising target in gemcitabine and 5-fluorouracil resistant pancreatic cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death.* 2017;22(3):369-380.

197.Lee SH, Lee EJ, Min KH, Hur GY, Lee SH, Lee SY, Kim JH, Shin C, Shim JJ, In KH, Kang KH, Lee SY. Quercetin Enhances Chemosensitivity to Gemcitabine in Lung Cancer Cells by Inhibiting Heat Shock Protein 70 Expression. *Clinical lung cancer.* 2015;16(6):e235-243.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1 A disszertációhoz kapcsolódó elsőszerzős közlemények

**1. Forika, G.,** Balogh, A., Vancsik, T., Zalatnai, A., Petovari, G., Benyo, Z., & Krenacs, T. (2020). Modulated Electro-Hyperthermia Resolves Radioresistance of Panc1 Pancreas Adenocarcinoma and Promotes DNA Damage and Apoptosis In Vitro. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5100. IF: 5,924 (2020)

**2. Forika, G.,** Kiss, E., Petovari, G., Danko, T., Gellert, A. B., & Krenacs, T. (2021). Modulated Electro-Hyperthermia Supports the Effect of Gemcitabine Both in Sensitive and Resistant Pancreas Adenocarcinoma Cell Lines. *Pathology oncology research : POR*, 27, 1610048. IF: 3,201 (2020)

### 10.2 A disszertáció témájához közvetlenül nem kapcsolódó társszerzős közlemények

**1.** Vancsik, T., Kovago, C., Kiss, E., Papp, E., **Forika, G.,** Benyo, Z., Meggyeshazi, N., & Krenacs, T. (2018). Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. *Journal of Cancer*, 9(1), 41–53. IF: 4,407 (2020)

**2.** Vancsik, T., **Forika, G.,** Balogh, A., Kiss, E., & Krenacs, T. (2019). Modulated electro-hyperthermia induced p53 driven apoptosis and cell cycle arrest additively support doxorubicin chemotherapy of colorectal cancer in vitro. *Cancer medicine*, 8(9), 4292–4303. IF: 4,452 (2020)

**3.** Krenács, T., Meggyesházi, N., Kővágó, C., Kiss, É., **Forika, G.,** Balogh, A., & Vancsik, T. (2019). A modulált elektrohipertermia (mEHT) indukálta tumorkárosodás mechanizmusa kolorektális karcinóma modellben. *Magyar onkologia*, 63(4), 359–364. IF: 0,23 (2021)

**4.** Dank, M., Balogh, A., Benedek, A., Besztercei, B., Danics, L., **Forika, G.,** Garay, T., Hamar, P., Karászi, Á., Kaucsár, T., Kiss, É., Krenács, T., Major, E., Mohácsi, R., Portörő, I., Ruisanchez, É., Schvarcz, C., Szász, M. A., Mbuotidem, T. J., Vancsik, T., ... Benyó, Z. (2019). Elektromágneses daganatterápiás készülék preklinikai és klinikai vizsgálatai, valamint műszaki továbbfejlesztése: tapasztalatok szolid tumorokkal. *Magyar onkologia*, 63(4), 354–358. IF: 0,23 (2021)



5. Krenacs, T., Meggyeshazi, N., **Forika, G.**, Kiss, E., Hamar, P., Szekely, T., & Vancsik, T. (2020). Modulated Electro-Hyperthermia-Induced Tumor Damage Mechanisms Revealed in Cancer Models. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6270. IF: 5,924 (2020)

### 10.3 Könyvfejezet

Szasz AM, Arkosy P, Arrojo EE, Bakacs T, Balogh A, Barich J, Borbenyi E, Chi KH, Csozsi T, Daniilidis L, Douwes F, Eller YG, Fiorentini G, **Forika G**, Herzog A, Kleef R, Krenacs T, Lee SY, Minnaar CA, Ou J, Pang CLK, Papastravrou A, Parmar G, Szentmartony Gy, Szigeti GyP, Van Gool S, Wust P, Dank M. (2020). Guidelines for local hyperthermia treatment in oncology. Challenges and Solutions of Oncological Hyperthermia, Cambridge Scholars, Newcastle upon Tyne, 32-71.

### 10.4 A disszertációtól független társzerzős közlemények

1. Kiss, E., **Forika, G.**, Mohacsi, R., Nemeth, Z., Krenacs, T., & Dank, M. (2021). Methyl-Donors Can Induce Apoptosis and Attenuate Both the Akt and the Erk1/2 Mediated Proliferation Pathways in Breast and Lung Cancer Cell Lines. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3598. IF: 5,924 (2020)

2. Kiss, E., **Forika, G.**, Dank, M., Krenacs, T., & Nemeth, Z. (2022). Methyl Donors Reduce Cell Proliferation by Diminishing Erk-Signaling and NFkB Levels, While Increasing E-Cadherin Expression in Panc-1 Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2546. IF: 5,924 (2020).

Összesített IF: 36,216 melyből elsőszerzős: 9,125

## 11. Köszönetnyilvánítás

Ennek a dolgozatnak a megszületését rengeteg ember segítette, akiknek itt néhány sorban (bár többet érdemelnének) szeretném kifejezni a hálámat és megköszönni munkájukat.

Hálával tartozom Dr. Matolcsy András professzornak, hogy Intézetében lehetőséget adott arra, hogy tudományos munkát végezhessenek.

Szintén nagyon hálás vagyok Dr. Krenács Tibor kutatóprofesszornak, hiszen már medika koromban támogatta a kutatói pályámat, szakmai és anyagi háttérrel biztosított munkáimhoz és fáradhatatlanul igazgatta előremeneteletemet.

Köszönettel tartozom kolleganőmnek Kiss Évának a türelméért, a szakmai segítségéért, barátságáért, hogy társam volt a sikerekben és kudarokban egyaránt.

Köszönöm Dr. Vancsik Tamásnak a sok oktatást, szakmai támogatását, vidám barátságát, továbbá Dr. Balogh Andreának, hogy látta bennem a lehetőséget.

Köszönöm Mártainé Balogh Évának, hogy megosztotta velem tudását, hogy türelemmel és kitartással segített a labor technikákat elsajátítani továbbá, hogy barátságával és jószágával életet vitt a laboratórium falai közé.

Köszönöm az Oncotherm vezetőségének, különösen Dr. Szász András professzornak és mérnöki csapatának, hogy eszközökkel és tudással támogatták a kutatásomat.

Hálás vagyok a Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden munkatársának, akik szakmai támogatást nyújtottak a doktoranduszi éveim alatt, különösen Dankó Titanillának, a sejtenyésztőben nyújtott segítségéért és Dr. Krencz Ildikónak, hogy elvállalta a dolgozatom házbírálatát.

Szüleimnek és bátyámnak tartozom a legtöbb hálával, hiszen bátorságot öntöttek belém, amikor elbizonytalanodtam, lelki támaszt nyújtottak, mikor feladni akartam, és mert a távolságtól nem rettentek meg és szeretetükről mindig biztosítottak.