

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

1. Bevezetés - Irodalmi háttér

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. A mirigyhámból kiinduló malignus tumorokat pancreas duktális adenocarcinomáknak (PDAC) nevezzük, melyek az összes hasnyálmirigy daganat 85%-át teszik ki. A PDAC-ben szenvedő betegek kilátása igen rossz, az egy illetve öt éves átlag túlélés 24%, illetve alig több mint, mint 10%. A 100 000 lakosra számolt új megbetegedések száma, illetve éves halálozások adatai szerint Magyarország vezető pozíciót foglal el világviszonylatban mindkét nemnél. A PDAC-k 90%-a sporadikusan fordul elő, etiológiai háttérében főleg külső hatások játszanak nagy szerepet: dohányzás, alkohol, bizonyos táplálkozási szokások, obezitás de előfordulhat foglalkozási körökben is: fémfeldolgozással, gyomirtókkal vagy klórozott szerves vegyületekkel dolgozó egyéneknél.

A PDAC-at 4 hasnyálmirigy-rák megalapozó „driver” génhiba jellemezi: *KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* és *SMAD4*. A *KRAS* gén aktivációja a kifejlett daganatok 92%-ban fellelhető, de már a pancreas intraepitheliális neoplasiákban (PanIN), vagyis a prekursor léziókban is kimutatható. A *KRAS* fehérje a MAPK/ERK jelút szigálközvetítésében játszik jelentős szerepet és ezáltal részt vesz a sejt differenciáció és migráció szabályozásában. A tumorszupresszor géneként számontartott *CDKN2A* mutációja szintén megfigyelhető előrehaladott PanIN tumorokban. Az általa kódolt p16^{INK4A} fehérje a genetikailag nem megfelelő osztódást meggátolja és szenescenciát (tartós osztódásgátlást) idéz elő. Másik tumorszupresszor génmutáció a *TP53* inaktivációja, mely a PDAC-k 75%-ában van jelen. A *TP53*-ban misszenz pontmutációk alakulnak ki, melyek aminosav szubsztitúciót eredményeznek és az így keletkezett inaktív p53 fehérje nem képes ellátni funkcióit. A *SMAD4* gén az előzőhöz hasonlóan, a daganatképződés utolsó fázisában jelenik meg.

Szövettanilag a daganatképződés több lépéses folyamat, mely során először acináris- duktális metaplázia jön létre, amit morfológiailag egy hyperplastikus szöveti struktúra követ (PanIN-1A és PanIN-1B). Az apoptózis gátlását elősegítő génhibák kialakulását követően atípusos hyperplasia és/vagy alacsony grádusú dysplasia jelenik meg (PanIN-2), ez később „high grade” dysplasia, illetve „in situ” carcinoma kialakulásához vezethet (PanIN-3). A betegek nagy része (80-85%) lokálisan előrehaladott, nem ritkán már távoli áttétek jelenléte mellett kerül diagnosztizálásra. 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. A daganatok számos esetben incidentálisan kerülnek felfedezésre más okból elvégzett hasi ultrahang vagy computer tomográfias vizsgálat során. Amennyiben célzottan készül képalkotó eljárás, úgy főleg az endoszkópiával kombinált ultrahang vizsgálat előnyös, mely megengedi a szövettani vagy citológiai mintavételt is. A stádiumbesorolás és rezekabilitás megítélésében a computer tomográfia és mágneses rezonancia bír hatalmas jelentőséggel, azonban magas költségük 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, így nem csak a szűrési programok kidolgozása kulcsfontosságú, hanem a neoadjuváns kezelések hatékonyságának javítása is igen nagy jelentőségű.

Kezelési lehetőségek közül a sebészi kimetszés az egyetlen kuratív lehetőség. 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. 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. Az adjuváns terápiát klasszikus módon kemo- és/vagy radioterápiával végzik és akár 6 hónapon át tartó kezelést jelenthet. Az Amerikai Egyesült Államokban kidolgozott protokollok a radioterápiát kombinálják gemcitabin vagy 5-fluorouracil készítménnyel, 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. Az inoperábilis tumorok kezelési stratégiája palliatív jellegű. A cél a beteget életben tartani a lehető leghosszabb ideig, a lehető legjobb általános állapotban. 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. Ezekre a szerekre sajnos sok esetben, rezisztencia alakul ki. A kezeléseik során kisselektálódott tumorsejt szubklónok között feltételezhetően a tumor progenitor sejtek a legpotensebbek kemo- és radiorezisztens kolóniák létrehozására. Ezek olyan „dormant” sejtek, melyek megtartották őssejt jellemzőiket és képesek az aszimmetrikus önmegújító osztódásra, magas daganat kiváltó potenciáljuk van, könnyen adaptálódnak és antiapoptotikus mechanizmusaik

általában felerősödtek. A rezisztencia mechanizmusokban a tumort körülvevő stromának is nagy szerepe van. A tápanyag koncentráció szabályozása, illetve a sejt-sejt közötti kapcsolatok kialakítása komplex mintázatokat hozhat létre egy daganaton belül és magas agresszivitással társulhat.

A terápiás hipertermia definíció szerint magas testhőt vagy egy betegséget kezelendő indukált lázat jelent. Az onkológiában főleg szolid daganatokra használt terápiás lehetőség, melynek célja a malignus tumorszövetek eradikálása a szervezetből. Ismert ugyanis, hogy a tumorsejtek sokkal érzékenyebbek a fizikai behatásokra (sugárzás vagy akár hőmérséklet ingadozás), mint a normál szöveti sejtek. A 39-45°C közötti terápiás hőmérséklet *in vitro* körülmények között akár önmagában is képes jelentős sejtkárosodást előidézni, azonban a klinikum jellemzően kiegészítő terápiaként használja akár kemo-, radio- vagy célzott terápiák mellett. A loko-regionális hőterápia célzottan kezeli a test egy kisebb régióját, de akár szelektíven a malignus daganatokra is tud fókuszálni. A modulált elekto-hipertermia (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. A malignus tumorok elektromos vezetőképessége általában jelentősen eltér a normál szövetekétől, így ha elektromágneses mező hatásának teszünk ki, akkor hatékonyan tudunk bennük – illetve azokból kialakított sejtenyészetekben – szelektív és kontrollált hőt generálni. Az elektromágneses tér a tumorszövetben feldúsul, így célzott hőkezelést tesz lehetővé, mindemellett pedig közvetlenül is hat a sejtmembrán lipid tutajokban koncentráció 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

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. A sugárterápia és mEHT kombinációjának vizsgálatai során Panc1 sejtvonalat használtunk, míg a kemoterápiás kísérleti sorozatunkhoz mindkét sejtvonalon elvégeztük a méréseinket. A sejtek a tenyésztés során, illetve a kemoterápiás kezeléseknél 37°C-on, 5% CO₂-dal dúsított inkubátorban voltak elhelyezve. A hőterápiás kezelés és a besugárzás ideje alatt szobahőmérsékleten, normál összetételű levegőn tartottuk őket.

Termoradioterápia kezeléseknél

A Panc1 sejtekből 24×40 mm-es steril fedőlemezekon növesztettünk konfluens sejtkultúrákat 24 óra alatt. Sugárterápiát egy GSR D1 gamma irradiátor készülékkel végeztük, mely Cs-137 izotópot használ és mintánként 2 Gy dózist alkalmaztunk. Az mEHT kezeléseknél egy 10 mm széles, 60 ml térfogatú üvegedényben történtek, mely a Lab-EHY 100 hipertermiás készülék kezelő edénye/küvetája volt. Az edény két hosszanti oldalán, egymással szembe egy-egy elektróda volt elhelyezve, az edényen belül pedig 2 optikai szenzor segítette a sejttenyésztő oldat hőmérsékletének monitorozását. A küvetába vertikálisan helyeztük el a fedőlemezeket, így az elektromos térre merőlegesen feküdtek egy rétegben a sejtek. Az 5 perces előmelegítési fázisban (20-25 W energia bevitellel) 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. A kombinált terápia során először besugaroztuk a sejteket, utána fél órán belül elkezdtük az mEHT kezelést is.

Termokemoterápia kezeléseknél

Panc1 és Capan1 sejteket vizsgáltunk mEHT és gemcitabin (GEM) kombinációs kezelést követően 24, illetve 48 órával. A kezeléseket ezúttal a Lab-EHY 200 laboratóriumra fejlesztett hipertermiás készülékkel és a hozzá tartozó szuszpenziós aplikátorral végeztük. A konfluens sejtkultúrákat tripszinnel leoldottuk a tenyésztő edény aljáról és számolást követően 10⁶ sejt/1,5 ml szuszpenziót készítettünk. Kezelő zsákba pipettáztunk 1,5 ml szuszpenziót,

lezártuk és belemerítettük a készülék desztillált vízzel telt küvetájába. 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. A kezelést követően a szuszpenziót kihígítottuk a kívánt sejtkoncentrációra és tenyésztő edényekbe ültettük ki a mintavételek idejéig. Kemoterápiás kezeléseinkhez egy 1000 μM -os törzsoldatot készítettünk, melyhez a GEM-et neutrális foszfát pufferolt sóoldatban (PBS) oldottuk fel. A kísérletek során ezt tovább hígítottunk a sejttenyésztő médiumban a megfelelő koncentrációra. Kettős kezeléseknél az mEHT kezelést követően a sejteket tartalmazó szuszpenzióba adagoltuk a GEM-et, és így inkubáltuk a sejteket további 24, 48 vagy 72 órán keresztül.

Élő sejtek arányának vizsgálata

Az mEHT kezeléseknél 24 órával a sejtekhez tripszint adagoltunk, míg le nem váltak a fedőlemezről, majd szérumban tartalmú médiummal a reakciót leállítottuk és a szuszpenzióból 20 μl -nyit elegyítettünk 5 μl tripánkék festékkel. Mikroszkóp alatt, Bürker-kamrában megszámoltuk az élő sejteket a kontroll, az Rth, az mEHT és az Rth+mEHT csoportokban.

Sejtmorfológia és immuncitokémia

A fedőlemezen végzett kezeléseket követően a hematoxilin-eozin (H&E) festést és az immuncitokémiai reakciókat közvetlenül a fedőlemezeire növesztett sejteken végeztük. A szuszpenzióban kezelt sejteket a kezelés után 6 lyukú sejttenyésztő edényekbe osztottuk szét, melyek tartalmaztak egy-egy steril 18 \times 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 fedőlemezeire 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. Morfológiai vizsgálatainkhoz a fixálást követően a sejteket hematoxilinnal festettük 2 percig, melyet 5 percig derítettünk csapvízzel, ezután pedig szintén 2 percig eozin festéket tettünk a tenyészetekre.

Az immuncitokémiai vizsgálatainkhoz a fixálást követően először az endogén peroxidázokat blokkoltuk, majd a sejtmembránok permeabilizálását és a nem specifikus fehérjék blokkolását végeztük el. Az 1% BSA-ban hígított elsődleges antitestekkel (hasított kaszpáz-3, citokróm C) 2 órán keresztül inkubáltuk a mintákat, ami után a mintákat nyúl IgG-t felismerő, kecskében termelt polimer-peroxidáz konjugátummal jelöltük. A chromogén reakciót DAB chromogén/hidrogén-peroxid szubsztrát kittel végzett előhívással tettük láthatóvá, majd 3x3 perces mosás után hematoxilinnal magfestést is végeztünk. Az elkészült reakciókat tartalmazó fedőlemezeket víztelenítettük és tárgylemezekre borítva fedtük le. A reakciókat digitalizáltuk, a hasított kaszpáz-3 reakciót QuantCenter képanalízis szoftver segítségével kvantifikáltuk.

Sejtvitalitás elemzés resazurin próbával

Kontroll és mEHT kezelt sejteket ültettünk ki 96 lyukú sejttenyésztő edénybe 10^4 sejt/200 μ l koncentrációban lyukanként. A médiumba 0-tól 100 μ M GEM-t adagoltunk soronként a sejtekhez, majd azokat 24, 48 és 72 órán keresztül inkubálva tenyésztettük. A resazurin sót 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 megmértük az átalakított resorufin jelintenzitást és a kontroll csoporthoz viszonyítva határoztuk meg a sejtek éltkéességét.

Áramlási citometria mérések

A kezeléseket követően először begyűjtöttük a sejtek felülúszóját és utána a letapadt sejteket tripszines kezeléssel oldottuk le a fedőlemezekről, vagy a sejttenyésztő edény aljáról. A sejtciklus méréseinkhez a sejt pelletet -12°C -on etanollal fixáltuk egy éjszakán át. Mosási lépés után RNaseA-t és propidium-jodidot (PI) elegyítettünk PBS-be és 4°C -on 60 percig inkubáltuk. Az apoptotikus és nektrotikus sejtek jelölésére Alexa Fluor 647 Annexin V fehérjét és PI festéket hígítottunk 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. Tween-20 tartalmú PBS-el permeabilizáltuk, monoklonális, phospho-Akt specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk a sejteket, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 488-al konjugált kecske anti-nyúl IgG-t használtunk. Az inkubációs és mosási lépéseket követően a méréseinket CytoFLEX Flow Cytometer áramlási citométerrel és a hozzá tartozó CytExpert software-el végeztük.

Kapilláris Western blot (WES)

A letapadt sejtekből 24 és 48 órával az mEHT kezeléseket követően fehérje extrakciót végeztünk. A WES készüléket és az ajánlott 12-230 kDa-os Jess/Wes szeparációs csomagot a gyártó által javasolt protokoll szerint használtuk. BAX, p21^{waf1}, HSP27 és HSP70 elsődleges ellenanyagokat futtató pufferrel hígítottuk a megfelelő koncentrációjúra. Detektáló reagensként a gyártó saját peroxidáz-enzimmel konjugált anti-nyúl és anti-egér immunglobulin reagenseit használtuk. A méréseket alapbeállításokon végeztük, kiértékelésük a készülékbe épített szoftver segítségével történt, ahol az eredmények optimalizálása érdekében mindegyik fehérjére külön expozíciós időt tudtunk választani.

Kolónia formáló próba

A daganatok rezisztenciájában jelentős szerepet játszó tumor progenitor sejtek egyik tulajdonsága, hogy kísérletes körülmények között akár egysejtes szuszpenzióból is képesek kolóniákat létrehozni. A legelterjedtebb *in vitro* vizsgálati módszer ezen sejtarány megállapítására a kolónia formáló próba, amikor alacsony számban kiültetett sejteket minimum egy hétig 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 készítettünk egy 10^3 sejt/ml szuszpenziót, amiből 100 mm átmérőjű Petri csészékbe összesen 10^4 sejtet ültettünk ki. 8 nap elteltével a kolóniákat az edény aljához fixáltuk majd 0,1%-os kristályibolya oldattal festettük meg és manuálisan számoltuk. Amikor a szuszpenziós mEHT aplikátort használtuk, akkor a sejtek kiültetését közvetlenül az mEHT kezelést követően végeztük el. Itt Panc1 sejtvonalnál 10^3 sejt/2 ml, Capan1 sejtnél pedig 10^4 sejt/2 ml koncentrációjú volt a sejtsuszpenzió, amit mind a két sejtvonal esetében 6 lyukú sejtenyésző edényre ültettünk ki. 14 nap elteltével a kolóniákat az edények aljához fixáltuk, festettük és manuálisan számoltuk.

Statisztikai analízis

Minden kísérletünket legalább 3 alkalommal végeztük el és a legtöbb esetben minimum 3 párhuzamos minta értékeit vizsgáltuk. Statisztikai analíziseink során Kruskal-Wallis próbát végeztünk, kiegészítve Dunn-féle post hoc teszttel, továbbá T-próbát vagy ANOVA tesztet alkalmaztunk. Az elemzéseket GraphPad Prism szoftver csomaggal készítettük.

4. Eredmények

Az mEHT citotoxikus hatása PDAC-ben

A mono- illetve radioterápiás kombináció jelentősen csökkenti az élő sejtek arányát

Panc1 sejtvonalat használtunk a régi típusú mEHT (Lab-EHY 100) készülékkel, ahol fedőlemezsre növesztett konfluens sejtkultúrát vetettünk alá különböző kezelési időtartamoknak. A kezelt sejtkultúrákat kontroll csoporthoz hasonlítottuk, melyet a kezelés ideje alatt 37°C-on tartottunk. A sejtkultúrákat tartalmazó üveglemezeinken megfigyeltük, hogy már 30 perc mEHT monoterápia képes volt a sejtek számát csökkenteni a kontrollhoz képest. Minél hosszabb ideig tartott a hipertermia, annál kisebb volt a letapadt sejtek aránya, továbbá a legalább 60 percet tartó kezeléseknél alávett csoportokban megjelentek az apoptózisra jellemző piknotikus, töredezett sejtmagok. Ezen megfigyeléseinket követően, a 60 perces kezelést választottuk standard mEHT terápiának és kombináltuk radioterápiával. 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 azt tapasztaltuk, hogy az 60 perces mEHT radioterápiát követően vagy anélkül, az élő sejtek arányát szignifikánsan lecsökkentette a kontrollhoz képest.

Gemcitabinnal kombinálva a mEHT csökkenti a PDAC sejtek életképességét

Az új típusú Lab-EHY 200 készülékkel szuszpenzió formájában kezeltük a sejteket 60 perc mEHT-val, 2-3 W energiabevitelrel Panc1 kemoterápiára rezisztens és Capan1 kemoterápiára érzékeny 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. 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.

Az mEHT kaszpáz-függő apoptózist okoz PDAC sejtekben

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

Áramlási citometriával elkülönítettük az élő, korai és késői apoptózisban lévő sejteket, továbbá a nekrosis következtében keletkezett sejtörmelékét. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az mEHT és Rth+mEHT csoportokban mérsékelten megemelkedett az apoptózis aránya a kontroll és az Rth csoportokhoz képest, mely emelkedést főleg a korai apoptózisban lévő sejtek száma okozta. Ezek után korábbi eredményeinkre alapozva, immuncitokémiai eljárással *in situ* vizsgáltuk a kaszpázfüggő apoptózis mértékét a hasított/aktivált kaszpáz-3 fehérje expressziójának kimutatásával, 24 órával a kezeléseket után. Szignifikánsan magasabb hányadban találtunk sejtmagi pozitívítást az Rth+mEHT csoportban úgy a kontrollhoz ($p = 0,047$), mint a sugárterápiában részesült csoporthoz képest ($p = 0,028$).

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

Elvégeztük az áramlási citometriás méréseinket Panc1 és Capan1 sejtuszpenziókon alkalmazott mEHT kezelést követően is. 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. 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. 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. 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 pozitivitas. A citokróm C és BAX fehérjék szemikvantitatív analízisét is elvégeztük, ahol jelentős BAX proapoptotikus fehérje emelkedést találtunk 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.

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

Letapadó Panc1 sejtkultúrákat kezeltünk 60 perc mEHT-val, besugárzást követően. 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. Hasonló elvet követtünk a Capan1 és újra a Panc1 sejtkultúrák szuszpenzióban való mEHT kezelését követően: az egysejtes szuszpenziókhoz hozzáadtunk 0,5 nM illetve 12 nM GEM-t 48 órán keresztül. A GEM kezelés elteltével sejtenyészítő médiumot cseréltünk és további 12 napig inkubáltuk a sejteket. Alacsonyabb kolóniaképző sejtszámot detektáltunk az mEHT monoterápia esetében mindkét sejtvonalnál a kontrollhoz viszonyítva, azonban a különbség nem érte el a statisztikai szignifikanciát egyik sejt esetében sem. A Capan1 sejtvonalban a kombinált kezelés képes volt statisztikailag is szignifikáns csökkenést okozni a kolóniaképző sejtek arányában a kontroll csoporthoz képest.

Az mEHT képes blokkolni a sejtciklust G1 illetve S és G2/M fázisban

A letapadó Panc1 sejtkultúrán 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. 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 sejszámot mértünk 24 óránál és S fázist 48 óránál, a kettős kezelt sejtekben a kontrollhoz képest.

Az AKT és a p21^{waf1} fehérjék szerepe a sejtciklusblokkban kezeléseket követően

Radioterápiával kombinálva az mEHT p21^{waf1} emelkedés során gátolja az AKT aktivációját

Fehérje szinten vizsgáltunk a sejtciklus regulátor fehérjék (cyclin dependens-kináz 4, cyclin A, geminin, phospho-Akt/ser473 és p21^{waf1}) kifejeződését, melyek közül a p21^{waf1} 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^{waf1} fehérje mennyisége jelentősen megemelkedett a kettős kezelésnek alávetett sejtekben a kontrollhoz viszonyítva.

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 ismételt megfigyelhető volt a hatás elhalványulása, jelentős p21^{waf1} emelkedés nem volt detektálható egyik kezelés során sem.

Hősokk fehérje expresszió változása mEHT kezelést követően

Megvizsgáltuk Capan1 és Panc1 kezelt, illetve nem kezelt sejtjeinek a HSP27 és HSP70 szintjét. Capan1 sejtvonalon 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.

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 p21waf1 fehérje expresszió emelkedése mellett az S és G2/M sejtciklus frakciók csökkenését eredményezte.
- PDAC tumorokban a hősokkfehérje (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. Saját publikációk jegyzéke

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)

A disszertációhoz 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)

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.

A disszertációhoz nem kapcsolódó 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

8. 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 kudarcokban 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 labortechnikákat elsajátítani továbbá, hogy barátságával és jóságával 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 sejttenyésztőben 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.