

Kísérletes agymetasztázisok vaszkularizációjának vizsgálata

Doktori értekezés

Bugyik Edina

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Paku Sándor, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Banczerowski Péter, c. egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Krizbai István, tudományos főmunkatárs, D.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter egyetemi tanár,
az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Réz Gábor egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Lotz Gábor egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
II. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR.....	6
II.1. A tumorindukált angiogenezis jelentősége	6
II.2. Angiogenezis formák	6
II.2.1. Primer daganatok és metasztázisok	6
II.2.2. Bimbózó angiogenezis.....	8
II.2.3. Intusszuszeptív angiogenezis.....	9
II.2.4. Glomeruloid angiogenezis	11
II.2.5. Vaszkuláris mimikri	12
II.3. Az angiogenezis molekuláris háttere	13
II.4. Az extracelluláris mátrix szerepe az angiogenezisben.....	15
II.4.1. A sebgyógyulás	16
II.4.2. Az agy extracelluláris mátrixa.....	17
II.5. Angiogenezis az agyban	18
II.6. A tumorszerkezet és az ereződés összefüggése	20
III. CÉLKITŰZÉSEK	23
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
IV.1. Állatkísérletek	24
IV.1.1. Kísérleti állatok.....	24
IV.1.2. Sejtvonalak.....	24
IV.1.3. A metasztázisok létrehozása	26
IV.1.4. Sebgyógyulás vizsgálata	26
IV.1.5. Mintavétel	26
IV.2. A minták feldolgozása	27
IV.2.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok	27
IV.2.2. Az erekben történő proliferáció BrdU beépülésen alapuló vizsgálata..	29
IV.2.3. Morfometria	29
IV.2.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok	30
IV.3. Molekuláris biológiai módszerek	31
IV.3.1. Western-blot.....	31
IV.3.2. RNS izolálás	33
IV.3.3. Reverz transzkripció	33
IV.3.4. QRT-PCR analízis	34

IV.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalban	36
IV.4.1. Transzfekció.....	36
IV.4.2. Az E-cadherin csendesítés sikerességének ellenőrzése immuncitokémiával.....	37
IV.4.3. Az E-cadherin csendesített sejtek felszaporítása	37
IV.4.4. Az E-cadherin csendesítés sikerességének ellenőrzése Western-blottal38	
IV.4.5. Az E-cadherin csendesített sejtekkel történő in vivo kísérletek	38
IV.5. Statisztikai analízis	38
V. EREDMÉNYEK.....	39
V.1. Kísérletes agymetasztázisok ereződésének vizsgálata morfológiai módszerekkel	39
V.1.1. A tumorok növekedési mintázatai.....	39
V.1.2. A tumornövekedés során az agyparenchimában bekövetkező változások	41
V.1.3. A C38 tumor morfológiája különböző szöveti/szervi lokalizációkban..	49
V.1.4. Morfometriai vizsgálatok	52
V.2. Molekuláris biológiai módszereken alapuló vizsgálatok	56
V.2.1. mRNS szintű vizsgálatok	56
V.2.2. Fehérje szintű vizsgálatok	59
V.3. A sebgyógyulás vizsgálata.....	59
V.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalban.....	63
V.4.1. A csendesítés sikerességének ellenőrzése	63
V.4.2. Az E-cadherin csendesített sejtekkel történő in vivo vizsgálatok.....	64
VI. MEGBESZÉLÉS	67
VII. KÖVETKEZTETÉSEK	75
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	76
IX. IRODALOMJEGYZÉK	77
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	89
X.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények	89
X.2. Egyéb témában megjelent közlemények	89
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	91

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC: avidin-biotin komplex
ANG: angiopoietin
bFGF: bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BrdU: bróm-dezoxi-uridin
BSA: szarvasmarha szérum albumin
cDNS: komplementer DNS
Cy5: cianinszármazék
DAB: *diaminobenzidine*
DAPI: diamino-fenilindol
DEPC: dietil-pirokarbonát
DES: dezmin
dH₂O: desztillált víz
DNS: dezoxiribonukleinsav
dNTP: dezinukleotid-trifoszfát
E.coli: Escherichia coli baktérium
ECL: *enhanced chemiluminescence*
ECM: extracelluláris mátrix
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
EMA: epiteliális membrán antigén
EMT: epiteliális-mezenchimális transzdifferentiáció
FBS: fétális szarvasmarha szérum
FGF: fibroblaszt növekedési faktor
FITC: fluoreszcein izotiocianát
GA: glutáraldehid
GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GFAP: gliális fibrilláris savas fehérje
H&E: hematoxilin-eozin
HCl: sósav
i.p.: intraperitoneális
IFN: interferon

IL: interleukin
K₄[Fe(CN)₆]: kálium-ferrocianid (sárga vérlúgsó)
LB: *lysogeny broth*
MMP: mátrix-metalloproteáz
mRNS: hírvivő RNS
Na₃VO₄: nátrium-ortovanadát
NaCl: nátrium-klorid
NG2: kondroitin szulfát proteoglikán neuronális/gliális 2
OD: optikai denzitás
PBS: foszfát pufferelt sóoldat
PDGF: vérlemezke eredetű növekedési faktor
PEI: *polyethyleneimine*
PFA: paraformaldehid
PVDF: polivinil-difluorid
QRT-PCR: kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
RNS: ribonukleinsav
RT: reverz transzkripció
SCID: *severe combined immunodeficiency*
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
shRNS: rövid hajtű (*short hairpin*) RNS
SMA: α -simaizom aktin
TGF- β : transzformáló növekedési faktor β
TRITC: tetrametil rodamin izotiocianát
TSP: trombospondin
VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VEGFR: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor
VPF: *vascular permeability factor*
VVO: vezikulo-vakuoláris organellumok

II. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

II.1. A tumorindukált angiogenesis jelentősége

Már 1971-ben felvetették annak a lehetőségét, hogy a tumornövekedés új erek képződését igényli (1). Ennek bizonyítékait Judah Folkman fogalmazta meg 1989-ben. Megfigyelte, hogy a tumorok vaszkularizáció előtt lassan növekednek, majd az érhálózat megjelenése után már exponenciális növekedést mutatnak, amiből arra következtetett, hogy a tumorok növekedése angiogenesis függő (2), és felvetette, hogy a tumor növekedésének gátlása esetleg az angiogenesis gátlásán keresztül is elérhető. Az angiogenesis tehát egy lehetséges terápiás célpontként is értelmezhető (3). A célzott daganatterápiával foglalkozó kutatások eredményeként számos szer jutott el a klinikai kipróbálás I.-II. fázisába. A leggyakoribb célpontok a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) és kettős típusú receptora (VEGFR-2). A jelenlegi VEGF és VEGFR ellenes terápiák a betegek egy részében meghosszabbították a progressziómentes- és átlagos túlélést. Ezen sikerek mellett azonban olyan tapasztalatok is voltak, melyek további kutatásokat szorgalmaznak, hiszen számos esetben rezisztencia kialakulását tapasztalták, vagy azt, hogy a preklinikai kutatások által jósolt hatékonyság a klinikai alkalmazásban nem jelentkezett (4). A glioblasztómákra jellemző a magas VEGF expresszió, így ezeknél a betegeknél a VEGF gátló kezelésekkel átmenetileg visszaszorítható volt a tumornövekedés (5). Agymetasztázissal küzdő betegeknél a hagyományos kezelési módszerekkel (ezek között hatékonyabb a sugárterápia) elért 6-8 hónapos átlagos túlélés (6) a célzott kezelés használatával 6-16 hónapra emelhető (7). Leenders és mtsai. kísérletes állatmodellben mutatták be, hogy a VEGFR-2 ellenes (ZD6474- Vandetanib) kezeléssel hatékonyan gátolták ugyan az angiogenesis, a tumor további terjedése azonban nem állt le (8).

II.2. Angiogenesis formák

II.2.1. Primer daganatok és metasztázisok

Mivel a különböző szövetek és szervek kötőszövetének és kapillárisálózatának szerkezete eltérő, felmerül, hogy másképp zajlik bennük a tumorindukált angiogenesis is (9-10). A primer tumorok kialakulásának helyén

általában nagy mennyiségű kötőszövet található (11, 12). A metasztázisképzés fő szervei (máj, agy, tüdő) kevés kötőszövetet, viszont nagy mennyiségű kapillárist tartalmaznak (13, 14).

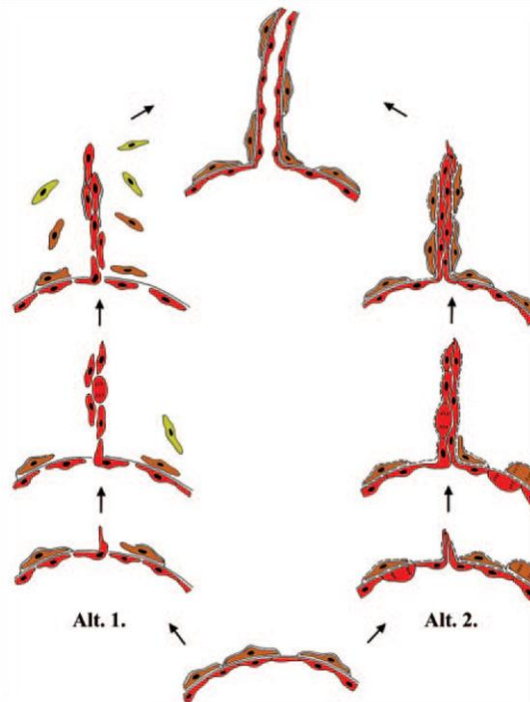
Monsky és mtsai. humán emlő karcinóma sejteket (ZR-75-1) oltottak primer (emlő) és metasztatikus (agy) helyekre a mikrokörnyezeti hatások vizsgálatának céljából. Eredményeik szerint a primer tumorok erei nagyobb permeabilitást mutattak, az angiogenezis (érendzítés alapján) pedig kifejezettebb volt a metasztatikus tumorokban, ezek az erek azonban nem voltak áteresztők (15). Ebből arra következtettek, hogy a mikrokörnyezet befolyásolja a primer tumorok és metasztázisok vaszkularizációját, a vizsgált esetben az agyi mikrokörnyezet gátolja a permeábilis erek kialakulását, ugyanakkor pro-angiogén hatású.

Egyre több irodalmi adat utal arra, hogy neoangiogenezis helyett a meglévő erek inkorporációja fontos szerepet játszhat a tumorok fejlődésében (16-19). Ez a folyamat a szaknyelvben „*vascular co-option*” néven terjedt el. 1987-ben vetették fel először, hogy a tumor a meglévő erek bekebelezésével tesz szert vérellátásra (16). Ez a nézet sokáig a háttérben maradt, később azonban egyre több kutatócsoport foglalkozott ezzel a lehetőséggel. Döme és mtsai. melanómás betegek mintáiban, valamint rágcsáló modellben mutatták ki, hogy a meglévő és az újonnan képződött erek bekebelezése szerepet játszik a tumorok növekedésében (17). Pezzella és mtsai. nem kissejtes tüdőrákokból származó humán minták vizsgálatával kimutatták, hogy a nagy sűrűségű kapilláris hálózattal rendelkező tüdőben a tumorok neovaszkularizáció nélkül is növekedhetnek. Az angiogén típusú fészkes, papilláris és diffúz növekedési formák mellett elkülönítettek egy feltehetően nem angiogén, más néven alveoláris növekedési formát (18). A neovaszkularizáció nélküli növekedés tehát a kötőszövet hiánya mellett a sűrű kapilláris hálózat miatt is különösen igaz lehet a metasztázisképzés fő szerveire (máj, agy, tüdő). Ezt támasztja alá az előbbi tanulmány, illetve Paku és mtsai. megfigyelései is, melynek megfelelően májmetasztázisok vaszkularizációja során a fuzionált szinuszoidok inkorporációja történik meg (13). Holash és mtsai. szerint az inkorporáció csak a tumornövekedés kezdeti szakaszára korlátozódik, ezt szekunder avaszkuláris állapot után robusztus angiogenezis követi (19).

Kötőszövetes környezetben az angiogenezisnek két fő formája van, ezek az ún. „*sprouting*”, vagy bimbózó és az intussuszceptív angiogenezis. Mindkét folyamat alapvetően endotélsejt proliferációval járó érdenzitás növekedést jelent. A bimbózó angiogenezist gyakran használják az angiogenezis szinonímájaként.

II.2.2. Bimbózó angiogenezis

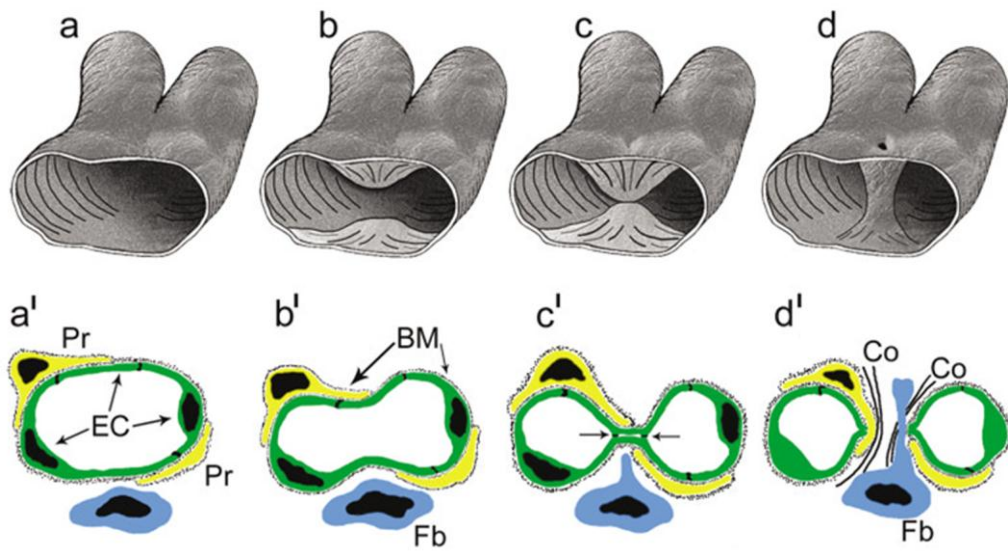
A folyamatnak két alternatíváját ismerjük. Ausprunk és Folkman modellje szerint a bazális membrán lokális degradációját követően az endotélsejtek közötti sejtkapcsoló struktúrák felbomlanak, ezáltal a sejtek elvesztik polaritásukat. A továbbiakban az endotélsejtek proliferációja, vándorlása, majd az új lumen kialakítása következik be. Az új kapilláris bazális membránjának depozíciója ezt követően indul meg (20, 21). Egy másik modellben a bazális membrán elektrondenzitása megváltozik, így az konvencionális elektronmikroszkópos vizsgálatokkal nem detektálható. Immunelektronmikroszkópos vizsgálatokkal azonban kimutatható három komponens: laminin, kollagén IV., valamint fibronektin. A bazális membrán megváltozásával egyidejűleg egy endotélsejt migrációja indul meg a környező kötőszövetbe, úgy, hogy a sejtek közötti kapcsolatok nem bomlanak fel. Az endotélsejtek tehát bazális-luminális polaritásukat megtartva vándorolnak a kötőszövetbe, miközben résszerű lument formálnak, mely folytonos a kiindulási ér lumenével. Fontos, hogy a bazális membrán csupán a migráló endotélsejt csúcsi részén nincs jelen, annak depozíciója az új ér képződésével folyamatosan történik (1. ábra) (20, 22).



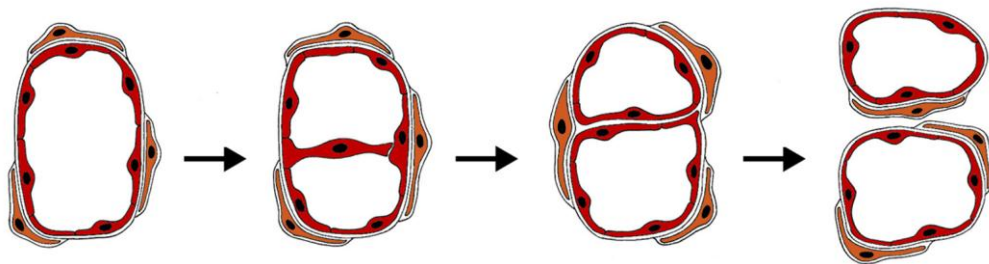
1. ábra: Bimbózó („sprouting”) angiogenezis (Forrás:20). A bimbózó angiogenezis két alternatívája. Endotélsejt (piros), pericita (barna), fibroblaszt/csontvelői eredetű sejt (zöld). Alt.1 (21) és Alt.2 (22) közötti fontos különbség, hogy az elsőben a polaritásukat elvesztett endotélsejtek vándorlása, és a lumen kialakítása után kezdődik a bazális membrán szintézis, míg a második esetben a kötőszövetbe vándorló endotélsejtek polaritásukat megtartják, a bazális membrán csak a migráló sejt csúcsi részén degradálódik, depozíciója az új ér kialakulásával folyamatosan történik.

II.2.3. Intussuszeptív angiogenezis

Az úgynevezett intussuszeptív angiogenezis tulajdonképpen az érlumen kettéosztódását jelenti. Az intussuszeptív angiogenezisnek is több formáját írták már le. A Burri és mtsai. által leírt modell szerint az érlumen betüremkedésében a periciták és fibroblasztok játszanak szerepet. A szemközti endotélsejtek közötti kapcsolat kialakulása után a sejtek közötti kapcsolatok átrendeződnek, a kialakult kétrétegű endotél és a bazális membrán perforációja történik meg. Ebbe a perforált részbe fibroblasztok vándorolnak be, ami ezáltal egy intraluminális oszloppá szélesedik ki. A bevándorolt sejtek kötőszövetet szintetizálnak, így az oszlop tovább növekszik, stabilizálódik, végül két különálló lumen képződik (2. ábra). A folyamat előnye a bimbózással szemben, hogy gyors, jelentős felületnövelést eredményez, és a kialakult kapilláris hálózat kevésbé áttersztő (23). Az intussuszeptív angiogenezis másik lehetősége szerint transzluminális endotélhíd keletkezése az első lépés. Ezt követi a sejt-sejt közötti kapcsolatok átrendeződése, és transzluminális oszlop kialakulása (20) (3. ábra).



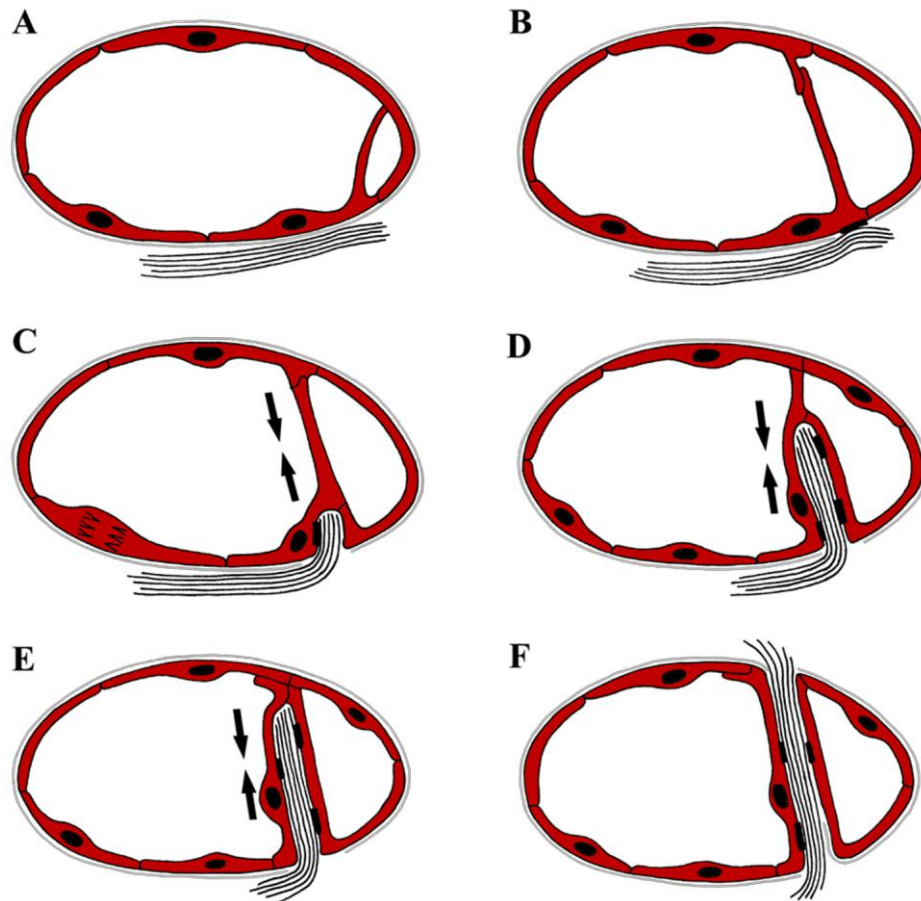
2. ábra: Intussuszceptív angiogenezis 1 (Forrás:23). Pr: pericita, EC: endotélsejt, BM: bazális membrán, Fb: fibroblaszt, Co: kollagén. A szemközti érfalak betüremkedése és a sejtek közötti kapcsolatok átrendeződése történik meg. Az érfal perforálódik, fibroblasztok vándorolnak be, a kialakult oszlopot a fibroblasztok által termelt kollagén tartalmú mátrix stabilizálja.



3. ábra: Intussuszceptív angiogenezis 2 (Forrás:20). Endotélsejt (piros), pericita (barna), bazális membrán (szürke). Ebben a formában transzluminális endotélhid kialakulásával indul a folyamat. A sejtkapcsolatok átrendeződésével és kötőszövetes oszlop kialakulásával fejlődik be az érlumen kettéosztódása.

A kötőszövetes oszlopok intussuszceptív angiogenezis során való kialakulásának új formáját írta le munkacsoportunk (12). Szubkután növekvő tumorokban az intraluminális endotélhid kialakulása után az endotélhidat képző sejt hozzákapcsolódik egy közeli kollagéneköteghez. Az endotélsejtek húzóereje révén a kollagéneköteg átjut az ér ellenkező oldalára. A folyamat során az endotélsejtek polaritása nem változik meg. A kialakult elemi oszlop csupán egy kollagénekötegből és az azt körülvevő endotélsejtekből áll. Fibroblasztok, periciták vándorolnak be a kollagénekötegebe, és az oszlop további növekedése az érlumen kettéosztásához

vezet. Fontos különbség az előbbiekhöz képest, hogy az oszlopban a kötőszövet nem utólag képződik a fibroblasztok szintetikus aktivitása következtében, hanem egy meglévő kollagénköteg transzportja történik meg az érlumenen keresztül (4. ábra). A folyamat inverz bimbózásnak is tekinthető.

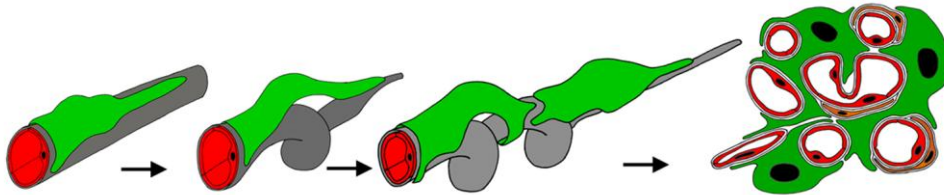


4. ábra: Inverz bimbózás (Forrás:12-átszínezve). Endotélsejt (piros), bazális membrán (szürke), kollagénköteg (fekete vonalak). **(A)** Intraluminális endotélhid alakul ki. Az endotélhid áthelyeződhet, azaz növekszik a távolság, így több sejt is részt vehet a folyamatban. **(B)** A hidat alkotó sejt bazális membránja fokálisan eltűnik, a sejt egy kollagénköteghez kapcsolódik. **(C, D)** Az endotélsejtek által kifejtett húzóerő a lumen másik oldaláig juttatja a kollagénköteget. **(E)** A sejtek bazális-luminális polarizációja megmarad. **(F)** A kialakult oszlop egyetlen kollagénkötegből és az azt körülvevő endotélsejtekből áll. Az oszlop további növekedésében a fibroblasztok, periciták bevándorlása, és extracelluláris mátrix termelése játszik szerepet.

II.2.4. Glomeruloid angiogenesis

A makroszkóposan a vese glomerulusaihoz hasonló rendezetlen vaszkuláris struktúrák, a glomeruloid testek elsősorban glioblasztómában, illetve más, többek

között rossz prognózisú emlőtumороkban fordulnak elő. Egér fülben indukált (24) glomeruloid testek kialakulása során gyorsan proliferáló, a lumenbe, és az extravaszkuláris mátrixba törő, gyengén CD31 pozitív sejtek komprimálják a kiindulási ert. Végül a kezdeti nagy lument több kisebbre osztják fel, endotélsejt markerek expressziója és bazális membrán depozíciója kezdődik meg (24, 25). A glomeruloid angiogenesis egy másik modelljében az extravazált tumorsejtek erősen tapadnak a kapillárisok bazális membránjának külső felszínéhez, és feltehetően húzóerejük eredményeképp alakulnak ki a glomeruloid testet felépítő érhurkok. A meglévő érrendszer egyszerű átrendeződése történik meg az endotélsejtek minimális proliferációja mellett (5. ábra) (14, 20).



5. ábra: Glomeruloid angiogenesis (Forrás:20). Endotélsejt (piros), bazális membrán (szürke), tumorsejt (zöld), pericita (barna). Extravazációt követően a tumorsejtek szorosan az ér bazális membránjának külső felszínéhez tapadnak. A tumorsejt húzóerejének köszönhetően egy hurok jelenik meg a kapillárison. A proliferáló tumorsejtek tovább húzzák a kapillárist, ami további hurkokat eredményez, valamint a kapilláris glomeruloid testen kívüli részének elvékonyodását. Az utolsó kép egy glomeruloid test keresztmetszetét mutatja.

II.2.5. Vaszkuláris mimikri

Az említett angiogenesis formákon kívül beszélhetünk még vaszkuláris mimikriéről. Humán melanóma minták vizsgálatával, valamint in vitro modell használatával kimutatták, hogy a tumorsejtek fenotípusa megváltozik, endotélsejtre jellemző TIE-1 expressziót mutathatnak, és ők maguk alkotják az „érfalat”. A folyamat az agresszív tumorsejtek jellemzője. A vaszkuláris mimikri eredményeképp kialakult mikrocirkuláció a tumorsejtek által mediált, és feltehetően független a tumorprogresszió alatti angiogén mechanizmusoktól (26).

II.3. Az angiogenezis molekuláris háttere

Miután Folkman megfogalmazta, hogy a tumorok angiogenezis függőek, a tumorok növekedését a vérrellátás kialakulásának megakadályozásával próbálták meggátolni. Ehhez az angiogenezisben részt vevő mediátorok, egymást keresztező szabályozó útvonalak megismerése elengedhetetlen. Ezeket a mediátorokat a tumorsejtek, endotélsejtek és a környező stróma sejtei szekretálják. Megkülönböztetünk pro- és anti-angiogén faktorokat. A legismertebb pro-angiogén faktorok a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), angiopoietinek (ANG), transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β), bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF). Az anti-angiogén hatású faktorok között a legjelentősebbek a trombospondin-1,-2 (TSP-1,-2), interleukin-1 (IL-1), interferon- γ (IFN- γ) (27).

A két legfontosabb angiogén faktor a VEGF és a PDGF. Ezek közül a VEGF-A egy heparin-kötő glikoprotein, mely az ereket alkotó sejtekre jellemző tirozin-kináz receptoron keresztül (VEGFR) hat. A tumorsejtek által szekretált 34-42 kDa-os fehérje korábbi elnevezése a „*Vascular Permeability Factor*” (VPF). Mivel a VPF szelektív endotél mitogén, később a „*Vascular Endothelial Growth Factor*” (VEGF) elnevezést kapta (28). Egyik első szerepét a vezikulo-vakuoláris organellumok (VVO) indukciója kapcsán írták le. A VVO az endotélsejtekre jellemző vakuoláris rendszer, mely a makromolekulák extravazációjának elsődleges útvonalát adja (29). A VEGF fiziológias folyamatok, mint az embrionális fejlődés, differenciáció szabályozásában is részt vesz (30), emellett daganatokban az egyik legfontosabb funkciója, hogy az angiogenezis serkentése révén a tumorprogressziót segíti elő (31, 32). Ezt alátámasztják Kim és mtsai. eredményei is, akik karotiszba történő oltással három cikluson keresztül szelektálták az agyban kolóniákat képző emlő karcinóma sejteket. A szelektált sejtek újra oltva nagyobb valószínűséggel képeztek agyi metasztázisokat. A sejtek felülúszóiban nagyobb mennyiségben találtak VEGF-A-t, valamint IL-8-at, ebből arra következtettek, hogy a VEGF-A expresszió befolyásolja a metasztázisképző képességet (33).

A PDGF családba négyféle, diszulfidhidakkal kapcsolódó homodimer PDGF-A-D, valamint egy heterodimer (PDGF-AB) tartozik. Ezek az izoformák

tirozin-kináz receptoraikon keresztül (PDGFR- α és - β) hatnak. A PDGFR- β általi jelátvitel fontos az erek, valamint a vesék és a fehér zsírszövet kialakulásában (34). A PDGF szekréció több sejttípusra jellemző, a pericitákra és endotélsejtekre is. Az endotélsejtek által termelt PDGF-B a periciták proliferációját, toborzását idézi elő, továbbá nélkülözhetetlen azoknak az érfalba való beépüléséhez is (35,36). Egyes tanulmányok szerint a PDGF jelátvitelnek fontos szerepe lehet a malignus folyamatokban, ugyanis bizonyos tumorokban a PDGF és PDGFR gének mutációit, megnövekedett expresszióját írták le (37). Mivel a megnövekedett PDGF/PDGFR autokrin módon növelheti a sejtproliferációt, a célzott terápiák között PDGF útvonalat gátló szerek is fejlesztés alatt állnak (34, 37). A PDGFR gátlók hatására a periciták leválnak az erekről, ami a tumor érhálózatának destabilizációjához vezet (38).

Az ANG-1 az endotélsejt specifikus tirozin-kináz receptorát (TIE-2) aktiválja, mely megnövekedett endotélsejt túlélést és az érhálózat stabilizációját eredményezi. Az ANG-1 tumorokban betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott. Bár a legtöbb irodalmi adat arra utal, hogy az ANG-1 pro-angiogén (39, 40), egyes tanulmányok szerint az ANG-1 magas expressziója gátolja az angiogenezist, ezáltal a tumornövekedést (41, 42). Machein és mtsai. patkány gliómasejtekben transzfekcióval ANG-1 vagy ANG-2 amplifikációt hoztak létre. Az ANG-1 felülregulációja több, elágazásokat tartalmazó, pericitákkal borított intratumorális eret eredményezett. Az ANG-2 felülregulált tumorok kisebbek voltak az üres vektort tartalmazó sejtek tumorainál is, és ezek a tumorok aberráns ereket tartalmaztak (43).

A TGF- β a tumor progresszió kezdeti szakaszában tumor szupresszorként, később promóterként működik. Pro-angiogén hatása a VEGF expresszió stimulációjában nyilvánul meg (44, 45). Mezenchimális sejtek és endotélsejtek közötti kapcsolat aktiválja a TGF- β -t. Az aktív TGF- β gátolja az endotélsejtek proliferációját, segíti a mezenchimális sejtek pericita irányú differenciációját (46).

A bFGF in vitro kísérletek alapján elősegíti az endotélsejtek plazminogén aktivátor, valamint kollagenáz termelését, ezáltal az extracelluláris mátrix (ECM) degradációját. Emellett képes indukálni a vaszkuláris sejtek proliferációját, migrációját, valamint a kapillárisok kialakulását (47).

Az anti-angiogén elemek között a trombospondinok hatása elsősorban a tumor mikrokozonyezetét érinti. A TSP-1 és -2 a VEGF antagonistájaként gátolja a VEGF felszabadulását és az általa szabályozott jelátviteli utakat. Az anti-angiogén hatás másik fontos közvetítője a CD36, melynek integrin β 1-el történő asszociációja TSP-1-en keresztül VEGFR foszforilációt gátol (48).

Az IFN- γ , TNF- α és IL-1 az endotélsejtek proliferációját szinergisztikusan gátolják. Kimutatták, hogy IFN- γ és IL-1 kombinációja a bFGF által indukált angiogenezist gátolja, az FGF receptorok kifejeződésének csökkentésével (49).

II.4. Az extracelluláris mátrix szerepe az angiogenezisben

A mikrokozonyezet jelentős szereppel bír a daganatok kialakulásában, terjedésében. Ennek egyik eleme az extracelluláris mátrix (ECM), egy komplex, számos funkciót ellátó biológiai rendszer, melynek főbb komponensei különböző kollagének, lamininek, fibronektin és heparán-szulfát proteoglikánok. Az ECM a sejtek felé túlélési szignálokat közvetíthet, fontos a differenciált állapot, szöveti funkció fenntartásában (50-52).

Az ECM gátolhatja, vagy elősegítheti a sejtek migrációját. A jelátviteli folyamatokat is módosíthatja bizonyos komponensei által (53). Ilyenek többek között a heparán-szulfát proteoglikánok, az ECM azon komponensei, melyek köthetik a VEGF molekulát, ezáltal nem csak annak a hatóanyagok számára való elérhetőségét, de az aktivitását is módosíthatják (54).

Az irodalomban bizonyos ECM komponensek, többek között a fibronektin angiogenezist befolyásoló hatása ismert. A sebgyógyulásban és tumoros elváltozásokban megfigyelhető fibronektin/fibrin tartalmú mátrix az endotélsejtek kemoattraktánsa, in vitro dózis függő módon befolyásolja a kapillárisok elongációját (55). Egy ismert fragmentje (III₁-C), az ún. „*anastellin*” viszont anti-angiogén hatású (56).

A kollagén I.-et az endotélsejtek migrációjának és az új erekké való összeépülésének egyik fontos irányítójaként írták le. Szarvasmarha aorta endotélsejtekkel végzett in vitro kísérletek arra utalnak, hogy „*sprouting*” angiogenezis során kollagén I. termelés indukálódik az endotélsejtekben (57, 58). További irodalmi adatok szerint más, nem fibrilláris kollagének angiogenezisben

betöltött szerepe emelendő ki, azonban ez lehet angiogenezist serkentő és gátló is: a mátrix-metalloproteázok általi hasítás a kollagének különböző irányú funkcióit indukálhatja, mint például a kollagén IV. MMP-2 általi hasítása olyan rejtett epitópot tárhat fel, mely angiogenezist serkentő. Bizonyos kollagén IV. fragmentumok (arrestin ($\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$), canstatin ($\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$), tumstatin ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$)) viszont angiogenezist gátló szereppel bírnak (59).

II.4.1. A sebgyógyulás

A szövetek sérülésekor a sérült erekből fibrinogén jut a környezetbe, a véralvadás során fibrin alakul ki. Ezt követően gyulladásosejtek infiltrálják az átmeneti mátrixot. Amennyiben nagyobb, kiterjedt sérülésről van szó, kötőszövettel való helyettesítés történik, mely új erek képződését, fibroblaszt migrációt és proliferációt, ECM termelést, és a fibrózis szövet reorganizációját foglalja magába. 3-5 nappal a sérülést követően megjelenik a gyógyulásra jellemző granulációs szövet. Hisztológiai képét laza szerkezetű mátrixba ágyazott proliferáló fibroblasztok, új, vékony falú kapillárisok, kevés kollagén és gyulladásosejtek jellemzik (60).

A sebgyógyulás során megfigyelhető érzékszervi forma a már korábban ismertetett bimbózó angiogenezis. A seb extracelluláris mátrixa jelentősen befolyásolhatja az angiogenezist, részben az integrin receptor expresszió szabályozásával. Az endotélsejteken megjelenő $\alpha v\beta 3$ integrin receptor a bimbózó ér vezető élének endotélsejtjén fejeződik ki és kapcsolódik a seb mátrixában található ligandjához (fibronektin/fibrin) (61).

A fibroblasztok általi ECM termelést elsősorban a gyulladásosejtekből és az aktivált endotélsejtekből származó PDGF, bFGF és TGF- β indukálja. A folyamat előrehaladtával az angiogenezis és a mátrix termelés mértéke csökken, a granulációs szövetből inaktív fibroblasztokat, sűrűn elhelyezkedő kollagénrostokat és egyéb ECM elemeket, kevés eret tartalmazó seb keletkezik (60).

Dvorak és mtsai. vetették fel, hogy a tumor nem gyógyuló sebnek tekinthető (62), mivel a tumorban található mátrix hasonló összetételű, mint amit sebgyógyulásban láthatunk. A fibronektin/fibrin tartalmú ideiglenes mátrixot a tumorokban és sebekben is kevés kollagént tartalmazó granulációs szövet váltja fel (63). A mátrix kialakulásának módja részben eltérő. A fent említett sebgyógyulással

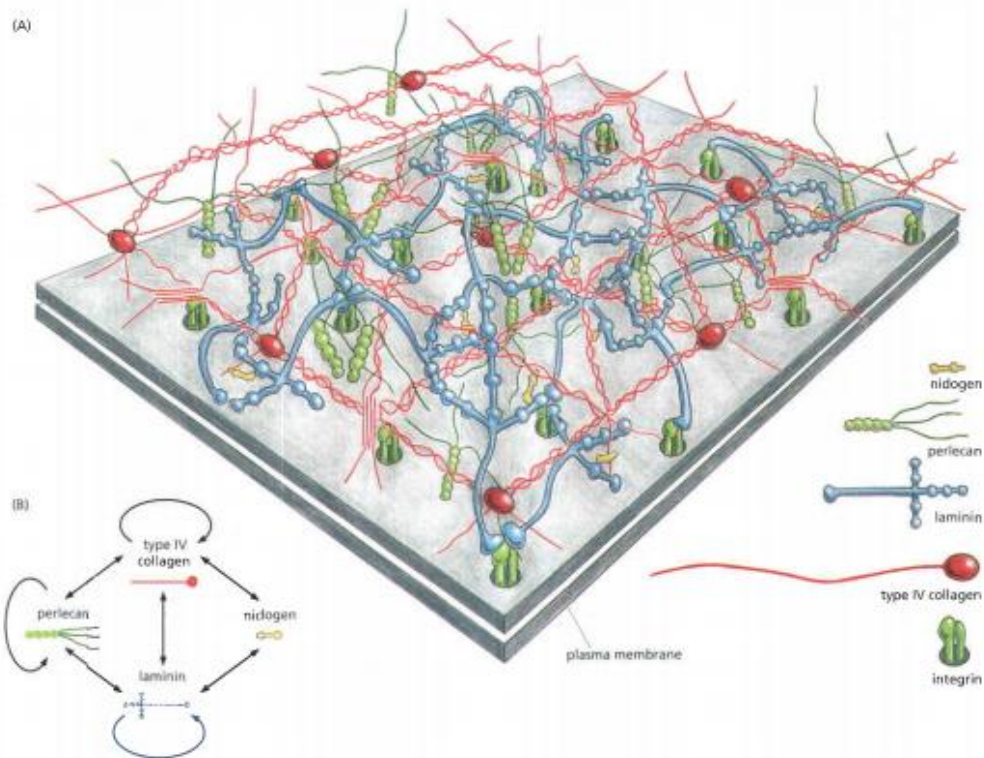
ellentétben, a tumorban a VEGF a plazmában levő fibrinogén extravazációját segíti elő az erek permeabilitásának növelésével, ami fibrin depozíciót eredményez. A későbbiekben a kollagéntartalmú mátrix termelése a tumorban is az aktivált fibroblasztok által történik (64).

II.4.2. Az agy extracelluláris mátrixa

Az agy extracelluláris mátrixában nagy mennyiségben található kondroitin szulfát proteoglikánok (verzikán, brevikán, aggregán, neurokán), hialuronán, tenascinek (65).

Az angiogenezisben szerepet játszó ECM elemek közül a kollagének kis mennyiségben találhatóak a felnőtt agyban. Kollagén I. kizárólag az arteriolák falában, illetve az agyhártyákban van jelen. Kollagén IV. található (66). A fibronektin az idegrendszer fejlődésében alapvető fontosságú, elősegíti az idegsejtek különböző kortikális régiókba való migrációját (67), valamint az axonális fejlődést és szinapszisformálást a fejlődő agyban (68). Ugyanakkor a felnőtt agyban a fibronektin már nincs jelen (69-71). A laminin a bazális membrán fő komponense. Rágcsálók cerebellumának tanulmányozásával kimutatták, hogy a neuronok migrációjának vezetése által fontos szerepe van az idegrendszer fejlődésében. Ahogy ennek a folyamatnak vége, a laminin expressziója csökken, ezt követően csak az erek bazális membránjában figyelhető meg (72, 73).

A bazális membrán egy speciális extracelluláris mátrix, a legtöbb szövetben megtalálható az epiteliális-mezenchimális határvonalon. A bazális membrán, mint nevéből is adódik, a sejtek bazális oldalán helyezkedik el, maguk a sejtek termelik. Három réteget különítjük el: (a) *lamina lucida* (b) *lamina densa*, (c) *lamina reticularis*. Komponensei többek között laminin, kollagének, heparán-szulfát proteoglikánok, nidogén (74, 75). Az egymáshoz kapcsolódó laminin molekulák alkotják a bazális membrán sejt felőli réteget, melyhez a sejtek elsősorban integrinokkal kapcsolódnak. A laminin és kollagén két egymástól független hálót alkotnak, melyeket nidogén köt össze, valamint köztük helyezkedik el a többi bazális membrán komponens (74) (6.ábra).

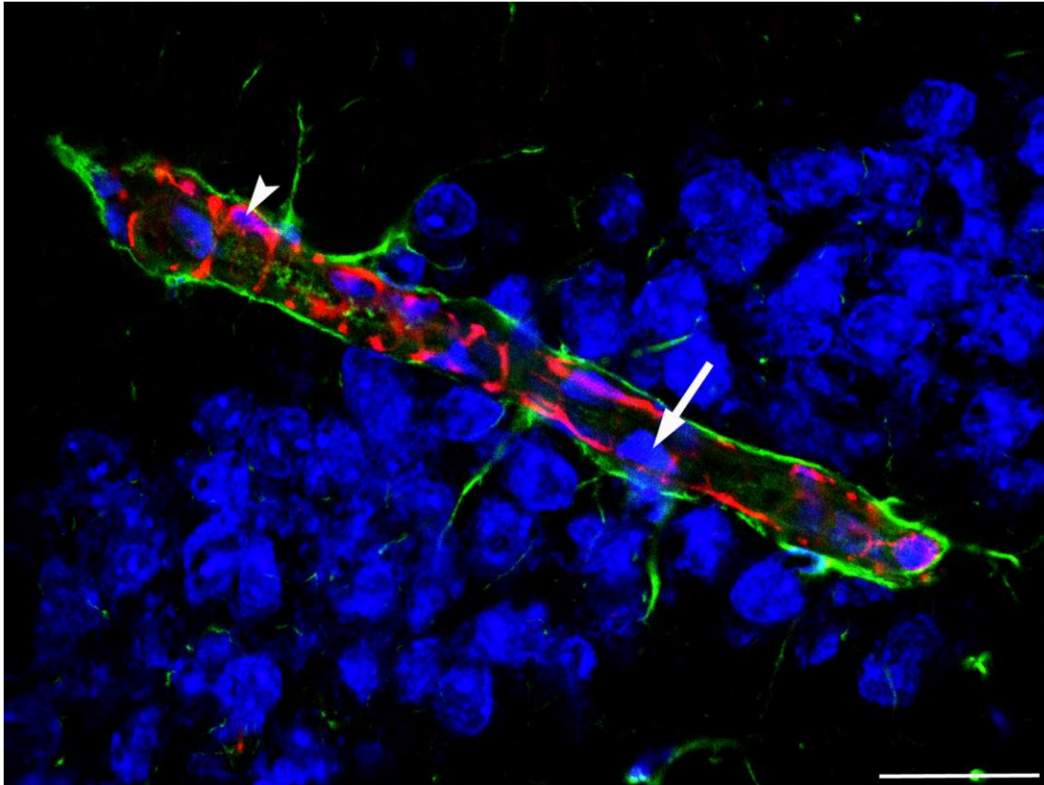


6. ábra: A bazális membrán. (Forrás: 74 (19. fejezet 1167. oldal)) A bazális membrán szerkezete. A sejt integrin receptorokon keresztül kapcsolódik az egyik fő alkotórészéhez, a lamininhez. A sejttől távolabb eső bazális membrán réteget IV.-es típusú kollagén alkotja. A kollagént és a laminint nidogén köti össze.

II.5. Angiogenesis az agyban

Az agy embrionális fejlődése során az angiogenezist a VEGF-A, VEGFR-1 és VEGFR-2, valamint az angiopoietin receptorok, a TIE-1 és TIE-2 szabályozza. Ezen faktorok expressziós szintje a felnőtt agyban fiziológiás körülmények között alacsony. Az endotélsejtek vér-agy gát fenotípusát (komplex „tight junction”-ok, kevés vezikula, specializált transzport) a lokális agyi mikroenvironment indukálja (76).

Az agyi metasztázisok kialakulásának feltétele a tumorsejtek vér-agy gáton való átjutása. A vér-agy gát fontos barrier funkciót lát el. Alkotóelemei között vannak az agyi endotélsejtek, periciták, asztrociták, idegvégződések (77) (7. ábra). A vér-agy gáton való átjutást in vitro, melanóma sejteken vizsgálva kimutatták, hogy a tumorsejtek a környezetükbe szekretált zselatin bontó szerin-proteázokkal bontják meg a vér-agy gát integritását (78), ezáltal képesek extravazációra az agyban is.



7. ábra: A vér-agy gát felépítése. A dezmin (piros) jelöléssel láthatók az érfalat alkotó endotélsejtekhez (nem jelölt) szoros közelségben levő periciták. A GFAP (zöld) az asztrociták nyúlványait jelölik, látható, amint szorosán körbefonják az ér felületét. A TOTO-3 (kék) a sejtmagokat jelöli, ez megmutatja az endotélsejteket (nyíl), illetve látható, hogy egy pericita mag (nyílhegy) is került a metszési síkba. Egység: 25 μ m.

Bizonyos vizsgálatok kimutatták, hogy az agy sérülése esetén neurogenesis és angiogenesis indukálódik. Az angiogenesisnek agyi infarktushoz is fontos szerepet tulajdonítanak, mivel a trauma utáni nagyobb mértékű angiogenesis korrelált a hosszabb túléléssel (79). Patkány fokális agyi ischemia modellben kimutatták, hogy megfelelő idő eltelte után (24óra) alkalmazott VEGF kezelés csökkenti a lézió méretét, neurogenesiset és angiogenesiset segít elő. Az infarktust követő azonnali VEGF kezelés viszont ödémát, és vérzést okoz (80).

Az agytumороk között a glioblasztóma egy igen agresszív, az agyszövetből kiinduló daganat, melyben a magas intratumorális érdenzitás rossz prognózissal jár. Ennek oka a rendkívül gyors, infiltratív növekedés, valamint a robusztus angiogenesis (81). A glioblasztómában gyakori a glomeruloid testek kialakulása. Ezeknek a struktúráknak a képződéséről még kevés információnk van, a Döme és mtsai. által leírt, korábban már említett mechanizmus csak egy lehetséges modellje az ilyen testek létrejöttének (14). Stiver és mtsai. rágszáló modellben azt találták,

hogy vírusvektorral az agyba bevitt VEGF-A glomeruloid képződést indukált (82). Az agresszív glioblasztóma sejtek nagy mennyiségű VEGF-et bocsátanak a környezetükbe, mely parakrin hatással az endotélsejtek migrációját, proliferációját serkenti. Emiatt a VEGF gátlása hatásos terápiának ígérkezett, így több VEGF és VEGFR gátlót kipróbáltak már glioblasztómák kezelésében is (83, 84). Bevacizumab kezelésre adott válaszként a tumorsejtek infiltratív, az erek mentén való terjedést mutattak. A vizsgálatok azt is felvetették, hogy későbbi stádiumban a tumor fenntarthatja az angiogenezist más növekedési faktor útvonalon keresztül, azaz VEGF-től függetlenül (84).

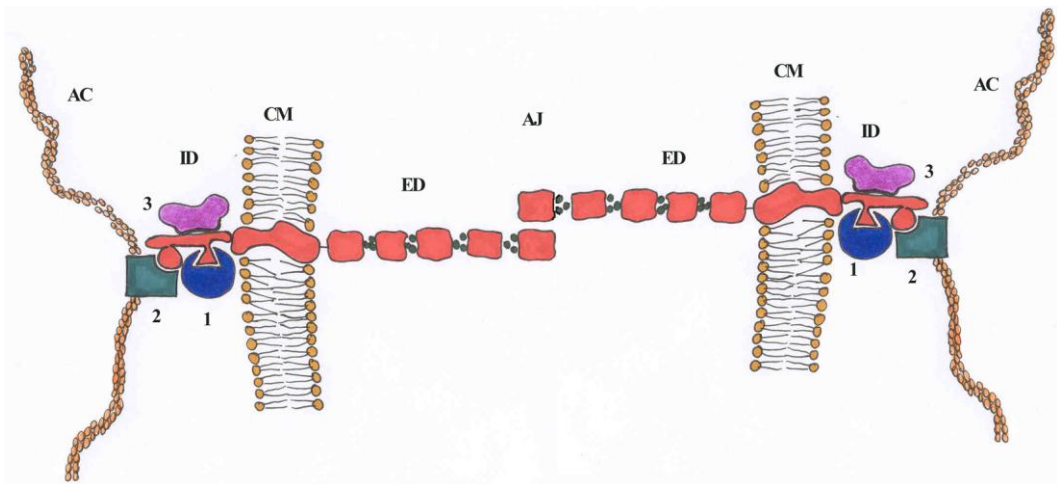
II.6. A tumorszerkezet és az ereződés összefüggése

A szolid tumorokat tumorsejtek, extracelluláris mátrix és sejtes kötőszöveti elemek építik fel. Ezeknek a komponenseknek az aránya és térbeli eloszlása adja a tumorok szerkezetét. Vermeulen és mtsai. a tumorszerkezet vizsgálatával három növekedési mintázatot írtak le májmetasztázisokban (85). A tumorok szerkezeti elemeit és viszonyát a környező parenchimával paraffinos metszeteken vizsgálták, hematoxin-eozin festést, retikulín festést, és különböző immunhisztokémiai jelöléseket (Ki-67, CD31, SMA, CK18 kaspáz hasítóhelye) alkalmaztak. A „*replacement*” növekedési típusnál elmosódott tumor-májparenchima határvonal látható, és a májszerkezet enyhe kötőszövet felszaporodás mellett megtartott. Az ún. „*pushing*” és „*desmoplastikus*” növekedést mutató tumorokra a májszerkezet torzulása jellemző. A „*pushing*” típusban a tumor határvonala éles, körülötte komprimált májparenchima látható. A „*desmoplastikus*” növekedési típusban széles kötőszövetes szaporulat választja el a tumor szélét a májszövetről. Meghatározták az érdenzitást, a proliferáló endotélsejtek, és apoptotizáló tumorsejtek számát. Szemben a „*replacement*” növekedési mintázattal, az endotélsejtek proliferációja és az apoptózis mértéke a „*pushing*” növekedésű tumorokban volt a legmagasabb, az érdenzitás pedig a legalacsonyabb (85).

A tumorok szerkezetét, növekedési mintázatát ezeken felül befolyásolhatja a tumorsejtek differenciációs foka is. A differenciált tumorok a kiindulási szövetre jellemző morfológiai képet mutatnak. A differenciálatlan tumoroknál a kiindulási szövet morfológiai jellegek alapján esetenként nem meghatározható (86).

Kolorektális karcinóma, illetve ductális emlő karcinóma esetén egy fontos jellemző a mirigyes szerkezet megléte vagy hiánya. A tumorprogresszió során a sejtek fokozatosan dedifferenciálódhatnak, ennek egy gyakran tanulmányozott folyamata az epiteliális-mezenchimális transzdifferentiáció (EMT), ami az embrionális fejlődés során is jól ismert folyamat. Ez a folyamat leegyszerűsítve az epiteliális markerek elvesztéséből és mezenchimális markerek megjelenéséből áll. Daganatok esetében az EMT folyamatát az inváziós és metasztázisképző képesség megemelkedésével hozták kapcsolatba, így a kutatások egyik központi kérdésévé vált (87, 88). Szabályozása még nem teljesen tisztázott, a benne szerepet játszó egyik legfontosabbnak vélt és legtöbbet vizsgált elem az E-cadherin transzmembrán glikoprotein.

A cadherineket alkotó fehérjecsaldába számos homofil transzmembrán glikoprotein tartozik, melyek Ca^{2+} -függő módon szabályozzák a sejt-sejt adhéziót. A cadherin családon belül több alcsoport található, melyek közül az I-es típusú cadherineket közé tartozik az E-cadherin (8. ábra). Ez a legrégebben leírt (89) cadherin, ami az „E” előtagot az epiteliális szóból kapta (90).



8. ábra: Az E-cadherin vázlatos felépítése. Forrás: (91). A pirossal jelölt rész az E-cadherin molekula. AJ: adherens junkció, ED: extracelluláris domén, CM: citoplazma membrán, ID: intracelluláris domén, AC: Aktin citoszkeleton. Az E-cadherin interakciós partnerei, a (1) β -catenin, α -catenin (2) és p120 (3) is láthatók.

Az E-cadherin expressziója befolyásolja a tumorsejtek közötti kapcsolat erősségét, ezáltal a tumorok szerkezeti kohézióját. Ezt támasztja alá, hogy az E-cadherin elvesztése és a daganat progressziója között szoros kapcsolat van (92). Állatkísérletekkel is demonstrálták ennek fontosságát. Az E-cadherin negativitás

fokozta az adenóma-adenokarcinóma átmenetet (93), a normálnál magasabb expressziója viszont gátolta a progressziót (94).

Az E-cadherin expressziót szabályozó egyik legfontosabb transzkripciós faktor a TWIST-1, ami más transzkripciós faktorok mellett csökkenti az E-cadherin expressziót, megjelenik a vimentin intermedier filamentum, ami a mezenchimális transzdifferentiáció jele (95). Az E-cadherin expressziójának csökkenése más útvonalakon keresztül is megvalósulhat (többek között TGF- β , FGF által szabályozott jelátvitel), mely ugyancsak indukálhat EMT-t (90). Onder és mtsai. az E-cadherin elvesztését követően találtak TWIST-1 felülregulációt, ami arra utal, hogy az E-cadherin elvesztése saját represszorainak indukációjával járhat (96). Más E-cadherin represszorok is ismertek, melyek közvetlenül az E-cadherin promóteréhez kötve befolyásolhatják a transzkripciót. Ezek ún. cink-ujj transzkripciós faktorok, a SNAIL, Slug, ZEB-1, ZEB-2 (97).

Az E-cadherin fehérjének a tumorokban a fentebbieknek megfelelően invázió és metasztázis gátló szerepet tulajdonítottak, elvesztését a tumorok metasztázisképző képességével is kapcsolatba hozták (98), azonban a kérdés, hogy az E-cadherin hogyan befolyásolja a tumorprogressziót, még sok feltáratlan részletet hagyott maga után.

III. CÉLKITŰZÉSEK

1. Agymetasztázisok vaszkularizációs mechanizmusának meghatározása öt különböző szöveti eredetű tumorsejtvonal esetében.
2. A különböző tumorok növekedési mintázatának hatása az agymetasztázisok vaszkularizációjára.
3. Angiogenesis faktorok és receptoraik in vitro és in vivo expressziójának RNS és fehérje szintű analízise, illetve ezek összefüggésének vizsgálata az agymetasztázisok vaszkularizációjával.
4. Az E-cadherin csendesítés hatása az agymetasztázisok növekedési mintázatára és vaszkularizációjára.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Állatkísérletek

IV.1.1. Kísérleti állatok

A kísérletekhez a Semmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet állatházi tenyészetéből származó, standard körülmények között tartott 8 hetes C57Bl/6 hím egereket használtunk, melyek súlya a kísérlet kezdetekor 25 és 30g között volt. A humán sejtvonalak oltásához hím SCID egereket használtunk, melyek súlya 20-25g volt. Az állatok a kísérlet során szükségletüknek megfelelően fogyasztottak rágcsáló tápot (Charles River) és csapvizet. A sötét-világos ciklusok 12 óránként váltakoztak. Intézetünk az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével rendelkezik (Ikt.sz.: 22.1/1159/3/2010). A tenyésztés és a kezelés során a Semmelweis Egyetem kísérleti állatok gondozására kidolgozott ajánlásait követtük.

IV.1.2. Sejtvonalak

A kísérletekhez egér C38 kolorektális karcinóma, humán HT25 kolorektális karcinóma, HT-1080 fibroszarkóma, H-1650 tüdő adenokarcinóma, valamint ZR-75-1 emlő karcinóma sejtvonalakat használtunk.

Az egér eredetű tumorsejtvonal fenntartása és előkészítése az oltásra:

A C38 sejtvonalat sorozatos, in vivo szubkután transzplantációval tartottuk fent, és az ezekből a tumorokból előkészített sejtek injektálásával hoztunk létre agymetasztázisokat. A szubkután fenntartott C38 tumorokat eltávolítottuk, szikével 1-2mm-es darabokra vágtuk, majd 0,7mg/ml kollagenáz IV. (Sigma-Aldrich, Kat.szám: C5138) jelenlétében (szérum-mentes RPMI-1640 médiumban (Sigma-Aldrich, Kat. szám: R8758)), 45 percen át 37°C-on, rázatás mellett inkubáltuk. Ezután a sejtszuspenziót négy réteg steril gézlapon átszűrtük, majd lecentrifugáltuk (10 perc, 800rpm, 4°C). A pelletet 10ml szérum-mentes RPMI-ben vettük fel, Bürker-kamra segítségével megszámloltuk a sejteket. Újabb centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, és a tömény sejtszuspenzióból oltottunk közvetlenül az egerek agyába.

Lentebb részletezett kísérletekhez (Western-blot, kvantitatív valós idejű PCR) a szubkután tumorból nyert minta nem megfelelő tisztaságú, így a szubkután tumorok egy részéből in vitro primer kultúrát hoztunk létre. Ez a sejttípus nehezen tenyészthető in vitro körülmények között, az irodalomban rá vonatkozó in vitro fenntartási protokoll nem ismeretes, A kísérletekhez szükséges sejtszám eléréséhez sikeresen dolgoztunk ki egy rövid távú tenyésztési protokollt.

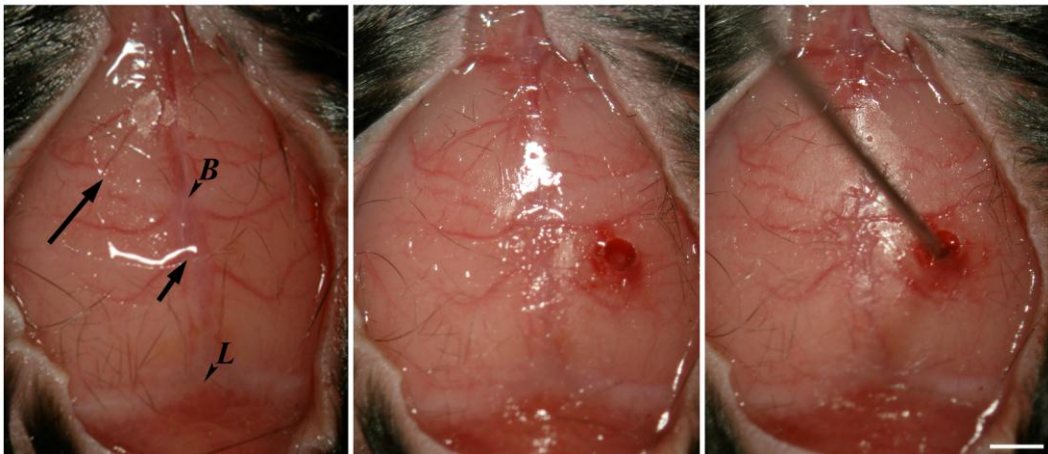
A szubkután fenntartott C38 tumort eltávolítottuk, szikével 1-2mm-es darabokra vágtuk. A darabokat 15ml 10% FBS-t (fetális szarvasmarha szérum, Sigma-Aldrich, Kat. szám: F4135) és gentamicint (Sandoz GmbH, OGYI-T-5087/02) tartalmazó RPMI-1640 médiumba tettük, alaposan összeráztuk, majd 4 réteg steril gézlapon átszűrtük. A kapott szuszpenziót lecentrifugáltuk (10 perc, 800rpm), majd 10ml tápfolyadékban reszuszpendáltuk. Számolást követően $2,5 \times 10^5$ db élő sejtet tettünk tápfolyadékot tartalmazó T25-ös tenyésztőedényekbe (Sarstedt, Kat. szám: 83.1810). Optimális körülmények között a tenyészetet 3 naponta passzáltuk. A T25-ös tenyésztőedény kb. 3×10^6 db-os sejtszám elérésekor vált konfluenssé. Passzáláskor legalább 5×10^5 sejtet hagyunk meg, mert az ennél kevesebb kiindulási sejtszám jelentősen lelassította a növekedést. Fontos volt szem előtt tartani, hogy a tenyészet ne szaporodjon túl. Az egyrétegű tenyészetben ekkor ugyanis sejtaggregátumok alakultak ki, melyek közepét az aggregátum nagy mérete miatt elhalt sejtek alkották. Ennek következtében a sejtek viabilitása jelentősen csökkent.

Humán eredetű sejtvonalak előkészítése az oltásra:

A tenyészetben tartott exponenciális növekedési fázisban levő HT25, HT-1080, H-1650, valamint ZR-75-1 sejteket 1x tripszin-EDTA-val (Sigma-Aldrich, Kat. szám: T4174) 5 percen át 37°C -on történő inkubálással vittük szuszpenzióba, majd a reakció leállításához 4ml RPMI-1640 (+10% FBS, +gentamicin) médiumot adtunk hozzájuk. Sejtszámolást, és centrifugálást (10 perc, 800rpm, 4°C) követően a sejteket szérum-mentes RPMI-1640-ben szuszpendáltuk és újabb centrifugálás után 100-150 μl szérum-mentes RPMI-ben vettük fel a pelletet. Az így előkészített szuszpenziót használtuk az oltás során.

IV.1.3. A metasztázisok létrehozása

Agymetasztázisok létrehozásához az egereket ketamin-xylazin (80:12mg/kg dózis, Sigma-Aldrich, Kat. szám: K113) intraperitoneális (i.p.) injekciójával altattuk. A fejbőr középvonalában hosszanti vágást ejtettünk, majd a jobb oldali parietális koponyaacsontot a koronavarrattól 2mm-re posterior, a nyílvarrattól 1-2mm-re laterálisan, a felszínen érmentes területen 21G tűvel (Braun) átfúrtuk (9. ábra). A sejteket lassan, 10 μ l-es Hamilton fecskendővel injektáltuk. Mindegyik sejttípus szuszpenziójából 2 μ l-t adtunk be. Ezáltal nagyságrendileg 10⁴ db élő C38 sejtet oltottunk be állatonként. A humán tumorok esetében a sejtszám 8-12x10⁵ db közé esett. A beadást követően a tűt 15-30 másodpercig a helyén tartottuk, hogy megelőzzük a sejtek hirtelen nyomásváltozás miatt történő kiáramlását a szűrőcsatornából. A bőrt a sebek zárására alkalmas kapasokkal bezártuk.



9. ábra: Az oltási folyamat. A struktúrák láthatósága érdekében a koponya teljes hosszában felvágtuk a bőrt. Tájékozási alapul a koronavarrat (nagy nyíl) és a nyílvarrat (kis nyíl) szolgált (B: Bregma, L: Lambda). A koponya átfúrását koronavarrattól 2mm-re posterior, a nyílvarrattól 1-2mm-re laterálisan végeztük el. Egység: 1mm.

IV.1.4. Sebgyógyulás vizsgálata

Az agyba történő direkt oltás által okozott történések vizsgálatára a metasztázisok létrehozásával azonos módon sebzést végeztünk, sejtek és szérumentes tápfolyadék beoltása nélkül.

IV.1.5. Mintavétel

A terminálás (cervikális diszlokáció) 7-10 nappal a C38 és HT-1080, illetve 21-28 nappal a HT25, H-1650, valamint ZR-75-1 sejtek oltását követően történt meg.

A sebgyógyulás folyamatának vizsgálatához az állatokat a sebzést követő 2., 3., 4., 5., 7., 9., 14. és 21. napon öltük le.

Az egerek agyát az eltávolítást követően folyékony nitrogénezen hűtött izopentánban (Sigma-Aldrich, Kat. szám: 270342) lefagyasztottuk. A mintákat felhasználásig -80°C -on tároltuk. A minták egy részét 10%-os pufferolt formalin oldatban fixáltuk.

IV.2. A minták feldolgoása

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetekből hematoxin-eozin (H&E) festett metszeteket készítettünk.

IV.2.1. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A mintákból $15\mu\text{m}$ -es fagyasztott metszeteket készítettünk (Shandon kriomikrotóm, 0620M) és toluidinkék 1%-os oldatával (Sigma-Aldrich, Kat. szám: 198161) megfestve ellenőriztük a tumorok elhelyezkedését. Kísérleteink során azok a minták lettek felhasználva, melyekben kizárólag az agy parenchimájára lokalizált, a kérgestestet (*corpus callosum*) nem érintő tumorok voltak azonosíthatók. A további vizsgálatokra készített metszeteket 10 percen át -20°C -on fixáltuk metanolban, majd PBS-ben mostuk 3x5 percig. A kísérletek során indirekt immunhisztokémiai módszert alkalmaztunk, melyben elsődleges ellenanyaggal (1. táblázat) történő 60 perces inkubáció és PBS-es mosás után 30 perc fluorokrómmal jelölt másodlagos ellenanyaggal (2-3. táblázat) történő inkubáció szerepel. Egy esetben használtunk ún. direkt jelölt ellenanyagot (panCK-FITC) a humán tumorok lokalizációjának meghatározásához. Szükség esetén a sejtmagok festését is elvégeztük. A használt elsődleges ellenanyagok és fluoreszcens festékek listáját az 1. táblázat mutatja. A metszeteket fluoreszcens vizsgálatokra alkalmas fedőanyaggal fedtük le (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Kat. szám: S3023). A mintákról konfokális mikroszkóppal (Bio-Rad MRC-1024) készítettünk képeket. A mérések pontossága érdekében azonos érdenzítású területekről kiinduló tumorokat vizsgáltunk.

1. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt elsődleges ellenanyagok és fluoreszcens festékek

Ellenanyag	Faj/klonalitás	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
BrdU	Egér monoklonális	BD Pharmingen	347580	1:50
CD31	Patkány monoklonális	BD Pharmingen	550275	1:50
CD49c	Egér monoklonális	Novocastra	NCL-CD49c	1:100
CK7	Egér monoklonális	Biogenex	MU255-UC	1:50
Claudin3	Nyúl poliklonális	Invitrogen	34-1700	1:50
Kollagén I.	Nyúl poliklonális	Chemicon	AB765P	1:100
Dezmin	Nyúl poliklonális	Lab Vision	RB-9014-P	1:200
E-cadherin	Egér monoklonális	Dako	M3612	1:100
EMA	Egér monoklonális	Novocastra	NCL-EMA	1:50
GFAP	Egér monoklonális	BD Pharmingen	556330	1:100
Laminin	Egér monoklonális	Millipore	MAB88918	1:50
Laminin	Nyúl poliklonális	Dako	Z0097	1:200
Laminin5	Nyúl poliklonális	Abcam	14509	1:50
panCK-FITC (MNF116)	Egér monoklonális	Dako	F0859	1:50
panCK (MNF116)	Egér monoklonális	Dako	M0821	1:100
SMA	Egér monoklonális	Dako	M0851	1:200
DAPI		Sigma-Aldrich	32670	1:100
Propidium-jodid		Invitrogen	P3566	1:500
TOTO-3		Invitrogen	T3604	1:500

2. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt másodlagos ellenanyagok

Ellenanyag	Faj/klonalitás	Gyártó	Kat. szám	Hígítás
FITC konjugált	Szamar poliklonális	Jackson Immunoresearch	715-095-150 711-095-152 712-095-150	1:200
TRITC konjugált	Szamar poliklonális	Jackson Immunoresearch	715-025-150 711-025-152	1:200
Cy5 konjugált	Szamar poliklonális	Jackson Immunoresearch	715-175-150 711-175-152	1:200

3. táblázat: Az immunhisztokémiai vizsgálatok során használt fluorokrómok tulajdonságai

Fluorokróm	Excitációs max.	Detektáló szűrők
FITC	494	522/32
TRITC	554	580/32
Cy5	650	680/32
TOTO-3	642	680/32
DAPI	359	455/30
Propidium-jodid	536	605/32

IV.2.2. Az erekben történő proliferáció BrdU beépülésén alapuló vizsgálata

Az állatoknak terminálás előtt egy órával 200mg/kg BrdU-t (bróm-dezoxi-uridin, Sigma-Aldrich, Kat. szám: B5002) adtunk intraperitoneálisan. A BrdU egy szintetikus timidin analóg, mely a sejtciklus S-fázisában levő sejtek újonnan szintetizálódott DNS-ébe épül be, így a megfelelő ellenanyag használatával kimutathatóvá válnak a proliferáló sejtek.

A mintákból 10µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket metanolban fixáltunk (10 percen át, -20°C-on). Fixálást és mosást követően a mintákat 2N HCl-ban inkubáltuk 10 percen át szobahőmérsékleten (a DNS denaturáció az ellenanyag bekötődésének feltétele).

A DNS-be beépült BrdU-t indirekt immunhisztokémiai reakcióval tettük láthatóvá. BrdU mellett laminin jelölést alkalmaztunk, a sejtmagok festésére DAPI-t (diamino-fenilindol) használtunk.

A metszeteket Nikon TE300 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, 100x-os objektív használatával. Intratumorálisan és peritumorálisan (a tumor szélétől számított 200µm = egy látótérnyi szélesség) az erek bazális membránját jelző laminin által meghatározott területen belül elhelyezkedő BrdU jelölt és jelöletlen sejtmagokat (endotélsejtek és periciták) számoltuk le. Tumortípusonként 3-6 állatból, állatonként 100-500 sejtet számoltunk le. A jelzési indexet a jelölt sejtek és az összes sejt hányadosa adta. A C38 esetében a tumorok perifériáján elhelyezkedő, a tumorra épp érintkező ereket külön kategóriában számoltuk.

IV.2.3. Morfometria

A mintákból sorozatmetszeteket készítettünk, és a tumorok legnagyobb kiterjedésénél készített metszeteket használtuk fel a mérésekhez. 4x-es objektívvel

készítettünk képeket, melyeken meghatároztuk a tumor által elfoglalt terület nagyságát (T , mm^2). Ebből kiszámoltuk az elváltozás elméleti átmérőjét (d , mm).

CD31 és laminin jelölt metszetekről 10x-es objektívvel készítettünk képeket, melyeken minden intratumorális és peritumorális (a tumor szélétől számított $200\mu\text{m}$ -en belül) ér figyelembe vételével meghatároztuk az érdenzitást (db/mm^2), érátmérőt (mm), valamint az erek elágazási pontjainak számát. Az érátmérő esetében a laminin által kirajzolt legkisebb kiterjedést használtuk. Az elágazási pontok számolásánál a peritumorális területeket vettük kontroll értékeknek, a más mintákban más metszési síkon történő mérésekből adódó hibalehetőségek kizárása miatt. Az eredményeket az intratumorális és peritumorális értékek hányadosa adta. Az érdenzitást és az érátmérőt kontroll (tumormentes) állatokból származó mintákon, valamint a sebgyógyulás vizsgálatához használt mintákon is meghatároztuk. A mérésekhez a Quick Photo Micro 2.2 szoftvert (Olympus) használtuk.

IV.2.4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok

A tumoros minták egy részét elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára készítettük elő. Ennek során az állatokat heparinos PBS után jégen hűtött 4% paraformaldehid (PFA, Reanal, Kat.szám: 25550-1-12-38), 1% glutáraldehid (GA, Merck: Kat. szám: 1121790025) oldattal perfundáltuk, majd a tumort tartalmazó szövetet pengével $1\text{-}2\text{mm}^3$ -es darabokra vágtuk. A mintákat 2 órán át a fixáló oldatban hagytuk 4°C -on. Ezt követően éjszakán át PBS-ben mostuk. A mintákat $5\text{mg}/\text{ml}$ kálium-ferrocianidot ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, sárga vérlúgsó) tartalmazó 1% ozmium-tetroxid oldatban (Sigma-Aldrich, Kat. szám: O5500) utófixáltuk 2 órán át. PBS után felszálló acetonsorban (50-70-90-100%, 30-30-30-3x30 perc) víztelenítettük. A beágyazáshoz SPURR gyantát használtunk (Spurr Low Viscosity Embedding Kit, Sigma-Aldrich, Kat.szám: EM0300). A gyanta éjszakán át 56°C -on polimerizálódott. Ezt követően a mintákból félvékony ($0,5\mu\text{m}$, Reichert OmU2 Mikrotóm, Ausztria), majd ultravékony ($70\text{-}100\text{nm}$, RMC MT-7 Ultramikrotóm, USA) metszeteket készítettünk. Az ultravékony metszetek vizsgálata Philips CM10 (Philips Research, Eindhoven, Netherlands) elektronmikroszkóppal történt.

IV.3. Molekuláris biológiai módszerek

IV.3.1. Western-blot

Mind az öt használt sejttípusból azonos módon készítettünk fehérje preparátumokat. A tenyészetben tartott exponenciális növekedési fázisban levő sejteket 1x tripszin-EDTA-val (Sigma-Aldrich, Kat. szám: T4174) 5 percen át 37°C-on történő inkubálással vittük szuszpenzióba, majd a reakció leállításához 4ml RPMI-1640 (+10% FBS, +gentamicin) médiumot adtunk hozzájuk. Sejtszámolást, és centrifugálást (10 perc, 800 rpm, 4°C) követően a sejteket először szérum-mentes RPMI-1640-ben, majd steril PBS-ben mostuk. A pelletet (kb. 10⁷ db sejt) 1ml lízispufferben vettük fel (10mmol/L Tris, pH 7.5, 1mmol/L EDTA, 150mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.5mmol/L Na₃VO₄, és proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich, Kat. szám: P8340)). 30 perces 4°C-on történő inkubációt követően a lizátumokat lecentrifugáltuk (15 perc, 13000rpm, 4°C). A felülúszókat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A preparátumok fehérjekoncentrációjának meghatározását Bradford-módszerrel végeztük (Bio-Rad, Kat. szám: 500-0202), BSA standard sort használtunk a kiértékeléshez. A mérés során a Bradford-reagenst desztillált vízzel 4:1 arányban hígítottuk. 990µl hígított reagenshez 10µl mintát adtunk, vak méréséhez pedig ugyanennyi vizet. Enyhe vortexelést követően a mintákat fotometriásan 595nm-en mértük le. Az eredmények alapján kiszámoltuk a vizsgált mintákban lévő fehérje mennyiséget.

A minták 200µl-éhez megfelelő mennyiségű 6x-os redukáló mintapuffert mértünk, és 10 percig 95°C-on inkubáltuk őket. További felhasználásig a mintákat -80°C-on tároltuk.

A poliakrilamid gélelektroforézishez (12,5%-os gél) használt puffer-rendszerek összetételét a 4. táblázat mutatja. A Bradford-módszerrel kapott eredmények alapján, a mintapuffer hozzáadása által okozott hígítást figyelembe véve azonos mennyiségű, 80µg fehérjét, illetve 2µl előre festett standardot használtunk (Precision Plus Dual Color Protein Standard; Bio-Rad, Kat. szám: 161-0374). Az elektroforézist konstans 200V feszültségen kb. 30 percig végeztük. A gélben levő, elektroforézissel szétválasztott fehérjéket elektroblottolással polivinil-difluorid (PVDF) membránra juttattuk át (Sequi-Blot PVDF Membrane, Bio Rad,

Kat. szám: 162-0184). A blottolást konstans 200mA áramerősség mellett két órán át végeztük.

4. táblázat: A poliakrilamid gélelektroforézis és elektroblottolás során használt puffer-rendszerek

Szeparáló gél puffere (pH= 8,8)	Koncentráló gél puffere (pH= 6,8)	Futtató puffer (5x-ös)	Blottoló puffer (3x-os)
118,39 g Tris-HCl	7,88 g Tris-HCl	Tris 45,3 g	Tris 5,65 g
2 g SDS	2 g SDS	Glicin 216 g	Glicin 27 g
dH ₂ O 500 ml-ig	dH ₂ O 100 ml-ig	SDS 15 g	dH ₂ O 1000 ml-ig
		dH ₂ O 3000 ml-ig	

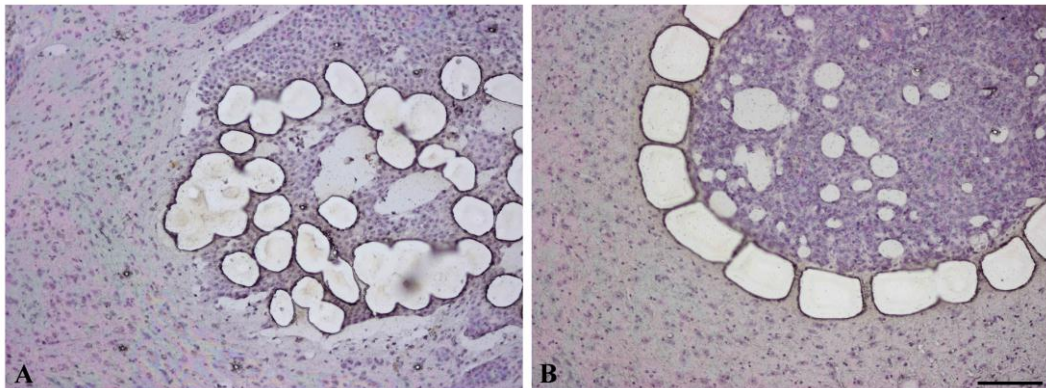
Ponceau (Sigma-Aldrich, Kat. szám: P7170) festéssel ellenőriztük a blottolás sikerességét. A festék PBS-el történő kimosását követően 5% zsírszegény tejporth tartalmazó PBS-el végeztünk blokkolást, éjszakán át 4°C-on. PBS-es mosás (3x5 perc) után primer ellenanyaggal (VEGF, 1:1000, Abcam, Kat.szám: ab46154, belső kontroll: β -actin, 1:200, Thermo Scientific, Kat. szám: RB-9421-P0) történő inkubáció (90 perc), PBS-es mosás (3x5 perc), majd biotinált anti-nyúl IgG (1:1000) következett (60 perc). 3x5 perc PBS után Avidin-Biotin kitet használtunk (Vectastain Elite ABC-Peroxidase Kit, Vector Laboratories, Kat. szám: PK-6100). Az utolsó mosást követően az előhívást ECL-reagens (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Kat. szám: 34077), majd DAB kit (Diaminobenzidine, Vector Laboratories, Kat. szám: SK-4105) segítségével végeztük.

Az ECL-reagenssel történő előhívást követően a kapott jeleket rögzítettük (Kodak IS4000MM Digital Imaging System) majd a Kodak Molecular Imaging Software 4.0.3 segítségével denzitometráltuk a képet. A program által az egyes csíkokhoz megadott intenzitásértékeket vettük figyelembe.

IV.3.2. RNS izolálás

Az *in vitro* fenntartott sejt kultúrák mindegyikéből RNS izolálásra is készítettünk elő mintákat. Minden esetben 1×10^6 db sejtől indultunk ki. Centrifugálás (10 perc, 800rpm) után kétszer steril PBS-el mostuk a sejteket, majd az RNS izolálást Trizolos módszerrel végeztük a gyártó ajánlása szerint (TRIzol, Invitrogen, Kat.szám:15596-018). Az RNS minőségét és mennyiségét Nanodrop ND1000 spektrofotométerrel ellenőriztük.

A tumorszövetet tartalmazó egér agyakból készített $15 \mu\text{m}$ -es fagyasztott metszeteket 10 percig metanolban fixáltuk -20°C -on. DEPC-vízzel (Dietil-pirokarbonát) történő mosás után 5 perc RNáz mentes hematoxilin festés következett, majd autoklávozott csapvízzel differenciáltunk. DEPC-vizes mosás után kiszárítottuk a metszeteket. Peritumorális (a tumor szélétől számított $200 \mu\text{m}$ -en belül eső terület), valamint intratumorális területeket mikrodisszekáltunk (PALM MicroBeam, Zeiss) (10. ábra). Összesen állatonként $180\text{-}250 \mu\text{m}^2$ -nyi területet gyűjtöttünk be, tumortípusonként 2 állat mintáit használtuk. Az RNS izolálást Ambion kit segítségével végeztük, a gyártó ajánlása szerint (RNAqueous-Micro Kit, Ambion, Kat.szám: AM1931).



10. ábra: Lézer mikrodisszekált minták. H-1650 tumorból készített metszet intratumorális szövet (A), valamint HT25 tumor metszetéből peritumorális szövet (B) mikrodisszekációját követő képek. Egység: $100 \mu\text{m}$ (A, B).

IV.3.3. Reverz transzkripció

A cDNS szintéziséhez a cDNA High Capacity Archive kit-et (Applied Biosystems, Kat.szám: 4368813) használtuk a gyártó ajánlása szerint. $1 \mu\text{g}$ RNS (lézer mikrodisszekációval nyert minták esetén a teljes izolált RNS mennyiség) kvantitatív konverzióját hajtottuk végre $100 \mu\text{l}$ végtérfogatban. A reakció a PE 2400 Gene Amp PCR készülékben zajlott – 10 perces 25°C -on történő inkubációt

követően – 120 percen keresztül, 37°C-on. A cDNS mintákat további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A reverz transzkripció reakcióelegy-összetételét az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat: A reverz transzkripció reakcióelegy-összetétele

Komponens	Bemérés
Random hexamer	10 µl
RNS templát	1 µg
dNTP mix (100 mM)	4 µl
RT Puffer (10x)	10 µl
Reverz transzkriptáz (50U/ µl)	5 µl
RNáz mentes H ₂ O	100 µl-ig

IV.3.4. QRT-PCR analízis

A tanulmányozott angiogenezis markerek szöveti expresszióját a vizsgálni kívánt mintákból RNS-izolálást és reverz transzkripciót követően kvantitatív valós idejű (*real-time*) PCR technikával határoztuk meg. A valós idejű PCR segítségével a polimeráz láncreakció minden egyes ciklusában meghatározható az addig keletkezett termék mennyisége. Az Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assay™ rendszerét használtuk. A kiértékeléshez a GAPDH háztartási gént választottuk referenciaként. Minden mintát triplikátumban futtattunk, 20µl reakciótérfogóban.

A TaqMan® detektálás során az egyes ciklusokban mért fluoreszcencia értéke arányos a keletkezett termék mennyiségével. Megrajzolható a reakció kinetikai görbéje, így meghatározhatjuk a vizsgált termék kiindulási mennyiségét. A kiértékeléshez az Abi Prism 7300 System Software-t használtuk.

A görbék analízisének először meghatároztunk egy, a reakciók exponenciális fázisába eső fluoreszcencia küszöbértéket. A program ezután automatikusan táblázatba foglalja azokat a ciklusszámokat, melyekben az adott reakció eléri a küszöbértéket. Ezeket a ciklusszám értékeket nevezzük C_T értéknek. A különböző próbákat ugyanahhoz a belső standardhoz viszonyítva a génexpressziós szinteket a ΔC_T módszerrel határoztuk meg.

Az általunk használt *TaqMan Gene Expression AssayTM* segítségével, a leggyakrabban vizsgált angiogén faktorok és receptoraik közül mi a 6. táblázatban felsoroltak expresszióját vizsgáltuk.

A reakcióelegy összetételét a 7. táblázat, a polimeráz láncreakció hőmérsékleti profilját pedig a 8. táblázat mutatja.

6. táblázat: A valós idejű PCR analízis során használt TaqMan próbák

Sejtvonal	C38	HT25, HT-1080, H-1650, ZR-75-1
Próba	VEGF-A (Mm01281449)	VEGF-A (Hs00173626)
	PDGF- β (Mm01298578)	PDGF- β (Hs00234042)
	ANG-1 (Mm01129232)	ANG-1 (Hs00162807)
	VEGFR-2 (Mm00440099)	VEGFR-2 (Mm00440099)
	PDGFR- β (Mm01262489)	PDGFR- β (Mm01262489)
	TIE-2 (Mm00443242)	TIE-2 (Mm00443242)

7. táblázat. A valós idejű PCR reakcióelegy összetétele

Komponens	Bemérés
TaqMan [®] Master Mix (2x)	10 μ l
Assay (primer és próba; 20x)	1 μ l
cDNS templát	70 ng
Desztillált víz	20 μ l-ig

8. táblázat. A valós idejű PCR hőmérsékleti profilja

Lépés	Hőmérséklet	Idő
Aktiváció	50 °C	2 perc
Kezdeti denaturáció	95 °C	10 perc.
Denaturáció	95 °C	15 mperc.
Anelláció-Extenzió	60 °C	1 perc.

} 50 ciklus

IV.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalonban

IV.4.1. Transzfecció

Az E-cadherin csendesítéshez egy gyári shRNS-t kódoló plazmidot használtunk (SureSilencing shRNA Plasmid for Human CDH1, SA Biosciences, Kat. szám: KH00135N), melynek szekvencia adatait a gyártó nem bocsátotta rendelkezésünkre.

A plazmidokat kompetens E.coli (JM-109) baktériumokban szaporítottuk fel. A kompetens E. coli sejteket a gyártótól érkezett plazmid 1µg-jával transzformáltuk hősokk segítségével (90mp, 42°C-on, 2 perc jégen). Kanamycint (0,1mg/ml) tartalmazó LB-agar lemezre való szélesztés után másnap 3 különálló baktériumkolóniát szaporítottunk frissen készített és autoklávozott, 10-10ml utólag hozzáadott kanamycint (0,1mg/ml) tartalmazó LB médiumban. A baktériumkultúrát éjszakán át 37°C-on rázatás mellett növesztettük. Steril lombikokban 200-200ml antibiotikus LB médiumba 5-5ml-t öntöttünk az éjszaka felszaporodott baktériumkultúrából, majd 37°C-on ráztuk. A baktériumok növekedését folyamatosan monitoroztuk az optikai denzitás (OD, 600nm) mérésének segítségével. Kontrollként üres LB médiumot használtunk.

A megfelelő OD (0,5) értékekkel rendelkező baktériumkultúrákból Quiagen kit segítségével plazmid midiprepet készítettünk, a gyártó ajánlása szerint (Quiagen Plasmid Midi Kit, Quiagen, Kat. szám: 12143). A plazmid DNS minőségét és mennyiségét Nanodrop ND1000 spektrofotométerrel ellenőriztük.

A transzfecciót sejt szelekciójához a plazmidról kapott információk alapján genetin szükséges (Geneticin® Selective Antibiotic (G418 Sulfate), Invitrogen, Kat. szám: 11811-031). A megfelelő szelekció érdekében előkísérletekkel meghatároztuk azt a dózist, mely mellett a plazmidot nem

tartalmazó HT25 sejtek 2-3 nap alatt elpusztultak. Kísérleteink során a következő dózisoskat próbáltuk ki: 0,25mg/ml, 0,5mg/ml, 0,75mg/l, 1mg/ml, 1,5mg/ml. Megfigyeléseinknek megfelelően a transzfektált sejtek szelekciójára alkalmas dózissnak a 0,75mg/ml bizonyult.

A plazmid DNS-t kémiai transzfekcióval (PEI, Polyethyleneimine, Sigma-Aldrich, Kat. szám: 764604) juttattuk be a HT25 sejtekbe. Ehhez a sejteket 6 lyukú tenyésztőedénybe (Sarstedt, Kat. szám: 83.1839.300) raktuk (4×10^4 db sejt/lyuk). Másnap szérum és antibiotikum mentes RPMI-1640 tápfolyadékban hígítottuk a plazmid DNS-t ($1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$), majd ehhez megfelelő mennyiségű 1mg/ml-es PEI törzsoldatot adtunk ($3 \mu\text{l}$ PEI/ $1 \mu\text{g}$ plazmid DNS). Enyhe szuszpendálás és 10 perces szobahőmérsékleten történő inkubáció után a sejtekről leszívtuk a tápfolyadékot, majd lyukanként 1ml friss 10%FBS-t és gentamicint tartalmazó RPMI-1640-et mértünk rájuk. Lyukanként $100 \mu\text{l}$ összekevert transzfekciós folyadékot csepegtettünk a sejtekhez. 24 órás inkubációt követően ezt friss tápfolyadékra cseréltük, majd a szelekciót a 2. napon kezdtük meg a 0,75mg/ml dózissal geneticinnel ($100 \text{mg}/\text{ml}$ -es törzsoldat).

IV.4.2. Az E-cadherin csendesítés sikerességének ellenőrzése immuncitokémiával

A transzfekció sikerességének ellenőrzésére immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk. A vad típusú és az E-cadherin csendesített sejteket fedőlemezekre növesztettük, majd ezeken végeztük el az indirekt immunhisztokémiai reakciót (1. táblázat).

IV.4.3. Az E-cadherin csendesített sejtek felszaporítása

Monoklonális E-cadherin csendesített HT25 sejtvonal létrehozása érdekében a transzfektált sejteket 96 lyukú tenyésztőedénybe tettük úgy, hogy lyukanként 1 db sejt legyen. Az ennek megfelelő lyukakat megjelöltük, végül a morfológiai jellemzők alapján 3 klónt választottunk ki további fenntartásra.

A 3 klónból immuncitokémiai reakció alapján a 3.-at választottuk ki a további kísérletek elvégzésére.

IV.4.4. Az E-cadherin csendesítés sikerességének ellenőrzése Western-blottal

Az immuncitokémiai vizsgálatok mellett Western-blottal is ellenőriztük az E-cadherin (1. táblázat) expressziójának változását. A vad típusú és az E-cadherin csendesített sejtekből a fent leírtaknak megfelelően fehérje preparátumokat készítettünk. A korábban leírt Western-blot protokollt használtuk. Belső kontroll: β -actin.

IV.4.5. Az E-cadherin csendesített sejtekkel történő in vivo kísérletek

Az immuncitokémia és Western-blot alapján megfelelőnek minősülő E-cadherin csendesített HT25 klónt felszaporítottuk, és kísérletes agymetasztázisokat hoztunk létre a korábban leírt módon. Kontroll kísérletnek vad típusú HT25 sejtekkel is oltottunk.

Az állatok terminálása 28 nappal a tumorsejtek oltását követően történt, i.p. (200mg/kg) BrdU injekció után egy órával.

A megfelelő immunhisztokémiai és morfológiai vizsgálatokat a vad típusú és az E-cadherin csendesített sejtek tumorain is elvégeztük. Vizsgálataink során a tumorok növekedési mintázatát (panCK-FITC), az intratumorális érdenzitást (CD31, laminin), érátmérőt (CD31, laminin), és az ereket alkotó sejtek proliferációs rátáját (BrdU, laminin, DAPI) mértük le.

IV.5. Statisztikai analízis

Kétmintás t-próba csak akkor végezhető el, ha a két mérés eredményének varianciája (szórásnégyzete) között nincs jelentős eltérés. Ennek megállapítására F-próbát végeztünk. Valamennyi esetben kimutattuk, hogy nincs szignifikáns eltérés a mérések varianciái között. A mérések statisztikai kiértékeléséhez tehát kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Szignifikancia szint: eredményeinket $p < 0,05$ értékek esetén tartottuk szignifikánsnak.

V. EREDMÉNYEK

V.1. Kísérletes agymetasztázisok ereződésének vizsgálata morfológiai módszerekkel

V.1.1. A tumorok növekedési mintázatai

Ötféle sejtvonal esetében vizsgáltuk meg kísérletes agymetasztázisok vaszkularizációját. A tumorsejteket közvetlenül az agy parenchimájába oltottuk, hogy a tumorok elérhessék az angiogenezis megindulásához („*angiogenic switch*”) szükségesnek gondolt 1-2mm-es méretet. Sorozatmetszetek segítségével meghatároztuk a tumorok elméleti átmérőjét. A kapott értékek alapján a tumorok átmérői minden esetben elérték a szükséges méretet (9. táblázat).

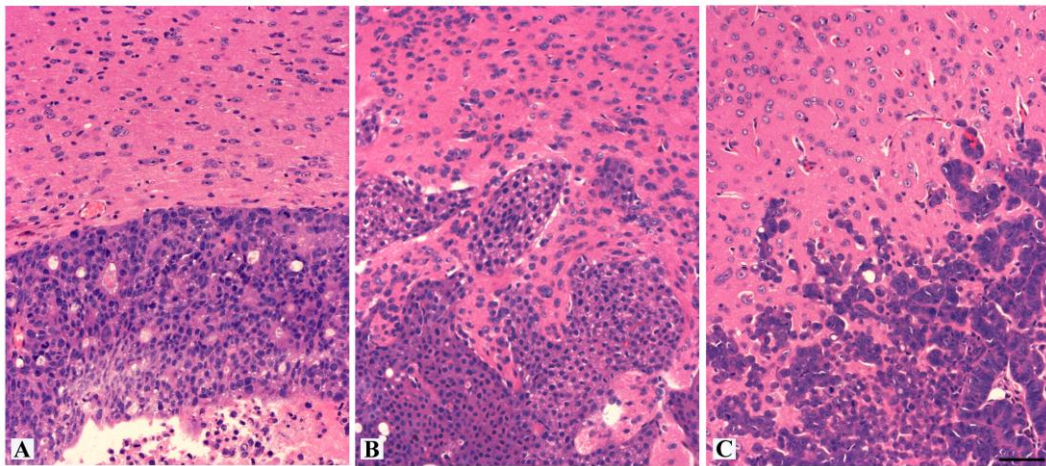
9. táblázat: A mérésekhez kiválasztott tumorok mérete. Az értékek: átlag±szórás.

Sejtvonal	C38	HT25	H-1650	Zr-75-1	HT-1080
Állatszám	6	4	4	4	5
Tumorméret (mm ²)	6±3,4	2±1,4	2,7±1,1	2,3±0,4	3,1±2,1
Tumorátmérő (mm)	2,6±0,7	1,5±0,6	1,6±0,4	1,7±0,2	1,9±0,7

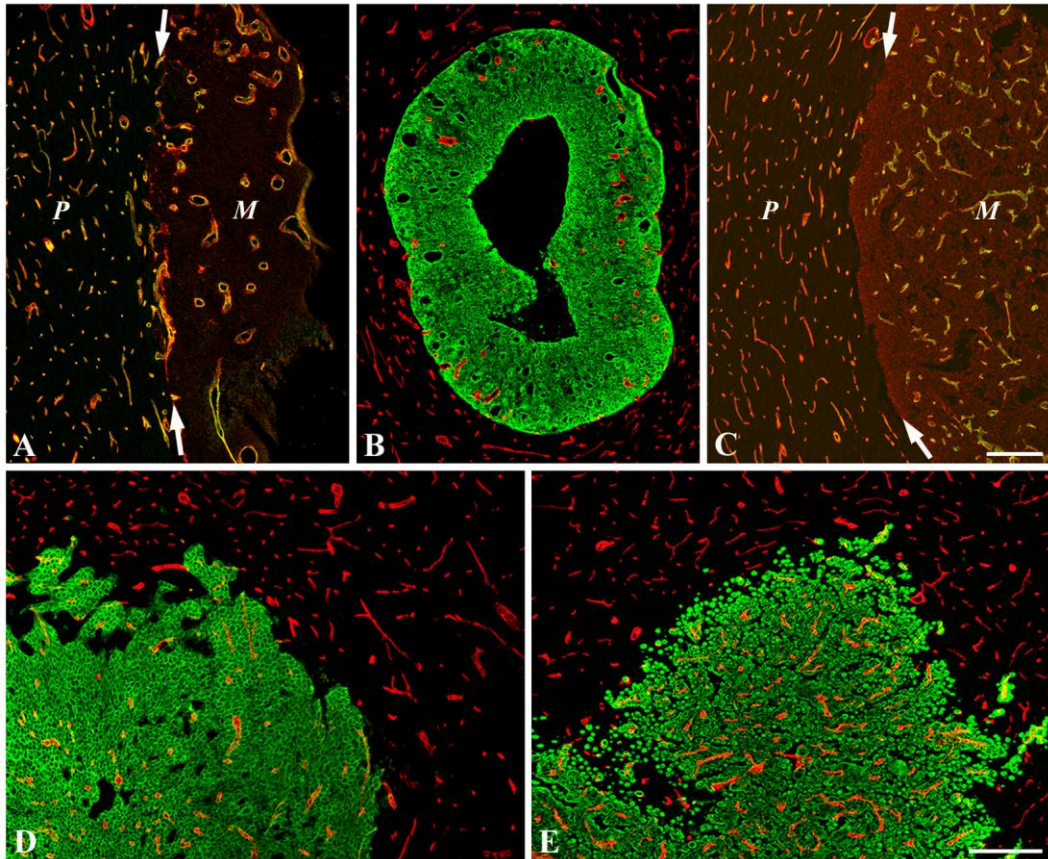
Az agymetasztázisokat H&E festett metszetek átnézeti képei alapján soroltuk különböző növekedési mintázatú osztályokba. Különböző antigénekre jelölt fluoreszcens metszeteken a tumor és az agyszövet struktúráinak viszonyát állapítottuk meg. Az öt tumorsejtvonal közül kettő (HT25, ZR-75-1) mutat valamely citokeratin intermedier filamentumra pozitivitást, így ezen antigén segítségével a tumorsejtek megjelölhetők. Az általunk használt panCK ellenanyag olyan epitópot ismer fel, mely a legtöbb humán epiteliális szövetben jelen van. A H-1650 tumorsejteket integrin $\alpha 3$ (CD49c) jelöléssel tettük láthatóvá. Az integrin $\alpha 3$ egy transzmembrán glikoprotein, mely elsősorban endotél- és epitélsejteken, dermális fibroblasztokon expresszálódik. Az említett fehérjék és laminin kombinált jelölését végeztük el. A laminin a bazális membránban található, segítségével láthatóvá válnak a vérerek. A C38, valamint a HT-1080 tumorsejtek által termelt

lamininnek köszönhetően ezek a tumorok csupán a laminin egyedüli jelölésével láthatóvá váltak. Ezekben az esetekben a laminint CD31-el kombináltuk. A CD31 (PECAM-1) egy adhéziós molekula, mely az endotélsejtek közötti intercelluláris kapcsolatok fő eleme.

A vizsgált tumorok közül a két kolorektális karcinóma, azaz a C38, valamint a HT25 sejtvonal, illetve a HT-1080 fibroszarkóma tumorai ún. „*pushing*” típusú növekedést mutattak. Ennek jellemzője az éles tumor-parenchima határvonal, és az egymással szoros kapcsolatban növekvő tumorsejtek. A H-1650, illetve a ZR-75-1 tumorok invazívabb növekedési mintázatúak voltak. A H-1650 esetében kohezív sejtcsoportok türemkedtek az agy parenchimájába, így ezt a karéjózott növekedési mintázatot a „*pushing*” és az invazív növekedés közötti átmeneti formának tekintjük. A ZR-75-1 tumorai esetében egyenként elszórt, kerek sejtek voltak láthatók a tumor széli részén. A növekedési mintázatok 3 fő típusát már H&E festett metszeteken is megfigyelhetjük (11. ábra). Ugyanezek a növekedési mintázatok jól megfigyelhetők a fluoreszcensen jelölt, fagyasztott metszetekről készített képeken is, valamint látható, hogy a tumorok eltérő mennyiségű és méretű eret tartalmaznak (12. ábra).



11. ábra: H&E festett metszetek. Az általunk elkülönített három növekedési típus jól felismerhető. **(A)** A „*pushing*” típusú tumor (HT25) esetében éles tumor-parenchima határvonal, **(B)** az átmeneti (karéjózott) formánál (H-1650) megfigyelhetők a parenchimába törő nagyobb sejtcsoportok, **(C)** az invazív növekedési mintázatot mutató tumornál (ZR-75-1) a tumor szélén szétszórtan terjedő tumorsejtek figyelhetők meg. Egység: 50 μ m **(A-C)**.



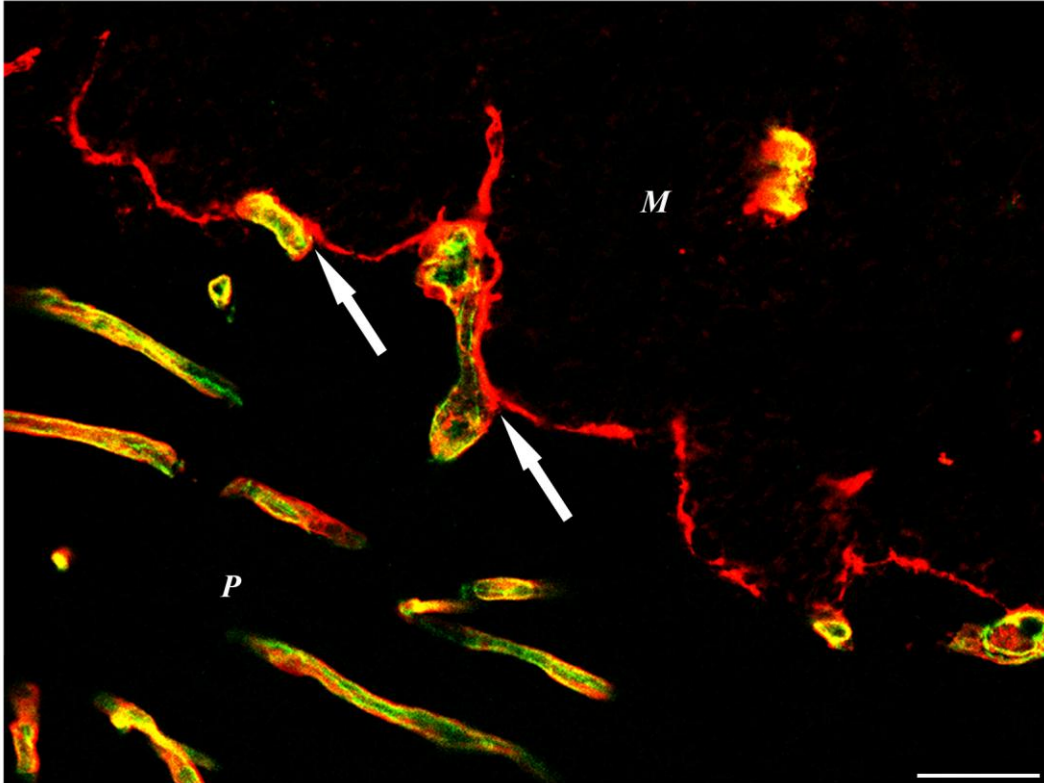
12. ábra: A különböző tumorok növekedési mintázatai fluoreszcens jelöléssel. (A) A C38 metasztázisban (*M*, a kép jobb oldalán) az endotélsejtek CD31 (zöld) és az erek bazális membránjában megtalálható laminin (piros) jelölése kevés dilatált intratumorális eret mutat. Az agy parenchimáját *P*, tumor-parenchima határvonalat nyilak jelzik. **(B)** A HT25 tumorsejtek panCK (zöld), az erek laminin (piros) jelzése jól mutatja a „pushing” típusú növekedésre jellemző éles tumor-parenchima határvonalat. Az intratumorális erek itt is tágultak. **(C)** *P*=parenchima, *M*=metasztázis. A HT-1080 tumor a kép jobb felében látható. A CD31 (zöld) laminin (piros) jelölés számos elágazást tartalmazó kapilláris hálózatot mutat. A tumorsejtek által termelt laminin miatt ebben az esetben is látható az éles tumor-parenchima határvonal (nyilak). **(D)** A H-1650 tumorsejteket jelöli az integrin $\alpha 3$ (zöld), az ereket a laminin (piros) mutatja. Az érdenzitás alacsonyabb a környező parenchimához képest, az erek valamivel tágabbak. A tumorra jellemzőek a szélén elhelyezkedő invazív, de a tumor központi részével kapcsolatban álló sejtcsoportok. **(E)** A ZR-75-1 tumorsejtek panCK (zöld), az erek laminin (piros) jelölése kompakt központi részt, és a tumorszáron egyenként szétszórt sejteket mutat. Az intratumorális erek nem tágultak. Egység: 200 μ m **(A-E)**.

V.1.2. A tumornövekedés során az agyparenchimában bekövetkező változások

Különböző immunhisztokémiai jelölésekkel és elektronmikroszkópos vizsgálat segítségével jellemeztük a tumornövekedés során az agy parenchimájában bekövetkező morfológiai változásokat. Ehhez az asztrocitákat a rájuk jellemző intermedier filamentum, a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) jelölésével azonosítottuk. Az erek jelölésére CD31-et és/vagy laminint használtunk. A pericitáknak specifikus markere nem ismert, de az azonosításukra elfogadott a

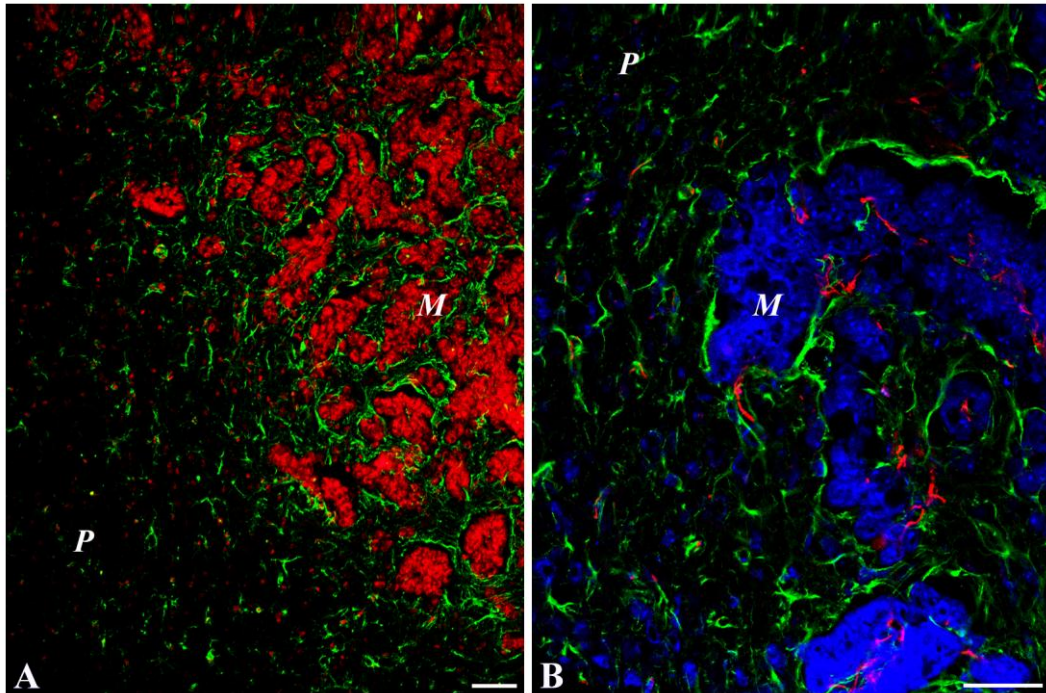
dezmin (DES), neuronális-gliális fehérje (NG2), és az α -simaizom aktin (SMA) is (99). Ezek közül a dezmin jelölését választottuk a periciták azonosítására. Szükség esetén magfestést is alkalmaztunk.

Eredményeink szerint a „*pushing*” típusú növekedési mintázatban az agy parenchimáját a tumor elnyomja, míg az erek inkorporálódnak a tumorba (13. ábra).



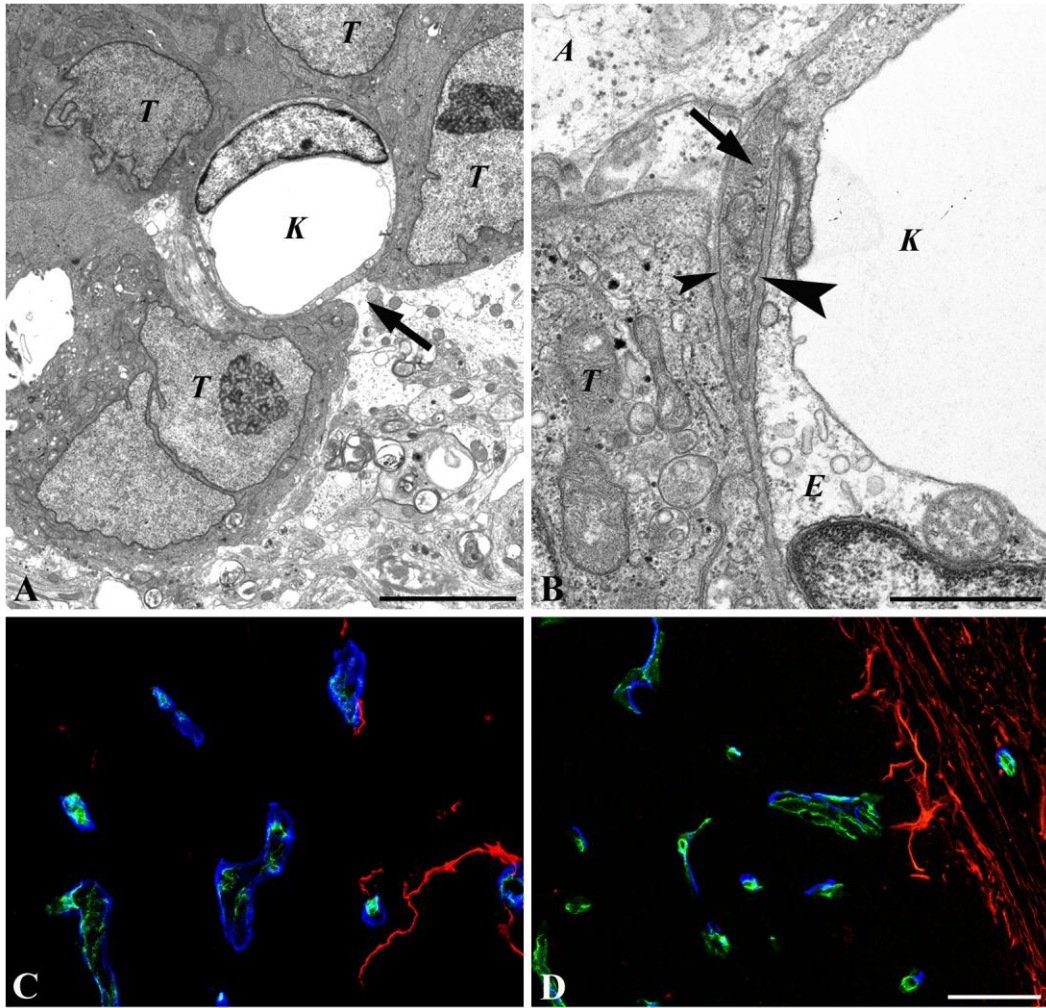
13. ábra: Ér inkorporáció. A C38 tumor felszínét a tumorsejtek által szintetizált bazális membránban található laminin (piros) jelölése rajzolja ki. A tumor a kép jobb felső részét foglalja el (*M*), az ép parenchima (*P*) a bal alsó részt tölti ki. A laminin az erek bazális membránjában is megtalálható, így az erek ott találhatók, ahol a lamininen belül CD31 (zöld) is megfigyelhető. Látható, amint a tumoralábbal érintkező éret a tumor szélét kirajzó laminin részben körbeöleli (nyilak). Egység: 50 μ m.

Az asztrocitákat a tumorsejtek mindegyik vizsgált tumortípusban leválasztották az erek felszínéről. Az invazív ZR-75-1 emlőkarcinóma tumorain belül figyelhető meg a legtöbb asztrocita (14. ábra, 15. ábra A). A többi tumorban csak kevés ilyen sejt látható (15. ábra C).



14. ábra: Asztrociták a ZR-75-1 tumorban. (A, B) A tumort (*M*) a propidium-jodid (piros) és TOTO-3 (kék) magfestés rajzolja ki a képek jobb felében. *P* a parenchimát jelöli. **(A)** A GFAP (zöld) az asztrocitákat mutatja, jól látható, hogy a tumor területén az invazív tumorszigetek között jelentős mennyiségű asztrocita van. **(B)** A dezmin (piros) a pericitákat mutatja a tumorszigetek (TOTO-3 (kék)) közepén levő erek (nem jelölt) felszínén. A dezmin mellett GFAP (zöld) jelölést is alkalmaztunk, így látható, hogy ezek nem kolokalizálnak, tehát különböző sejteket jelölnek. Egység: 50 μ m **(A, B)**.

A bazális membránnal fedett dezmin pozitív periciták azonban az erekhez kapcsolódva maradtak. Az ereket a pericitákkal a felszínükön kebelezték be a tumorok, tehát ezek a sejtek megtartották eredeti helyzetüket a saját, valamint az endotélsejt bazális membránja között (15. ábra B, D).



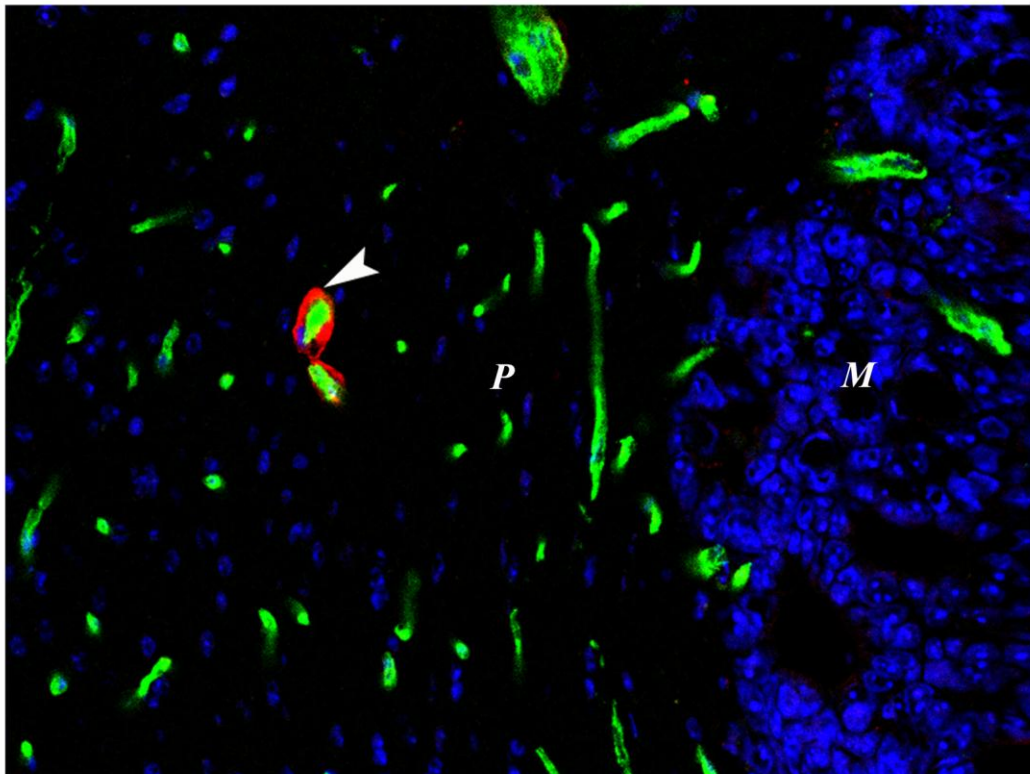
15. ábra: Az asztrociták és a periciták lokalizációja a különböző tumorokban. (A) A ZR-75-1 tumorsejtek szorosan kapcsolódnak a kapillárisokhoz (*K*). A tumorsejtek mellett az asztrociták nyúlványai is kapcsolatban maradnak a kapillárisok felszínével (nyíl). **(B)** A tumorsejt (*T*) az asztrocitához (*A*) hasonlóan a kapilláris (*K*) bazális membránjához kapcsolódik. A pericita (nyíl) megtartja eredeti helyzetét a saját (kis nyílhegy) és a kapilláris bazális membránja (nagy nyílhegy) között. Az *E* endotélséjtet jelöl. **(C)** A H-1650 tumorban a CD31 (zöld) pozitív ér külső részén levő laminin (kék) mutatja, hogy az intratumorális erek bazális membránnal fedettek. Kevés GFAP (piros) pozitív sejt inkorporálódott. **(D)** A HT-1080 tumor (sötét rész) területén láthatóak a CD31-el (zöld) megfestett erek a desmin (kék) pozitív periciták. GFAP (piros) pozitív sejtek kiszorultak a tumorból, csak a tumor felszínén láthatók. Egység: 5 μ m (**A**), 1 μ m (**B**), 50 μ m (**C**, **D**).

Az angiogenesis legjobban ismert formái a bimbózó és az ún. intussuszceptív angiogenesis, kollagén, illetve fibronectin/fibrin tartalmú kötőszövetes mátrixot igényel. Fiziológiásan az agyban ezek csekély mértékben fordulnak elő, emiatt megkérdőjeleződik az említett angiogenesis formák jelentősége az agymetasztázisok vaszkularizációjában. Patológiás körülmények között az aktivált periciták és fibroblasztok által termelt SMA, valamint kollagén tartalmú mátrix biztosíthatja a tumorsejtek számára a daganatos progressziót

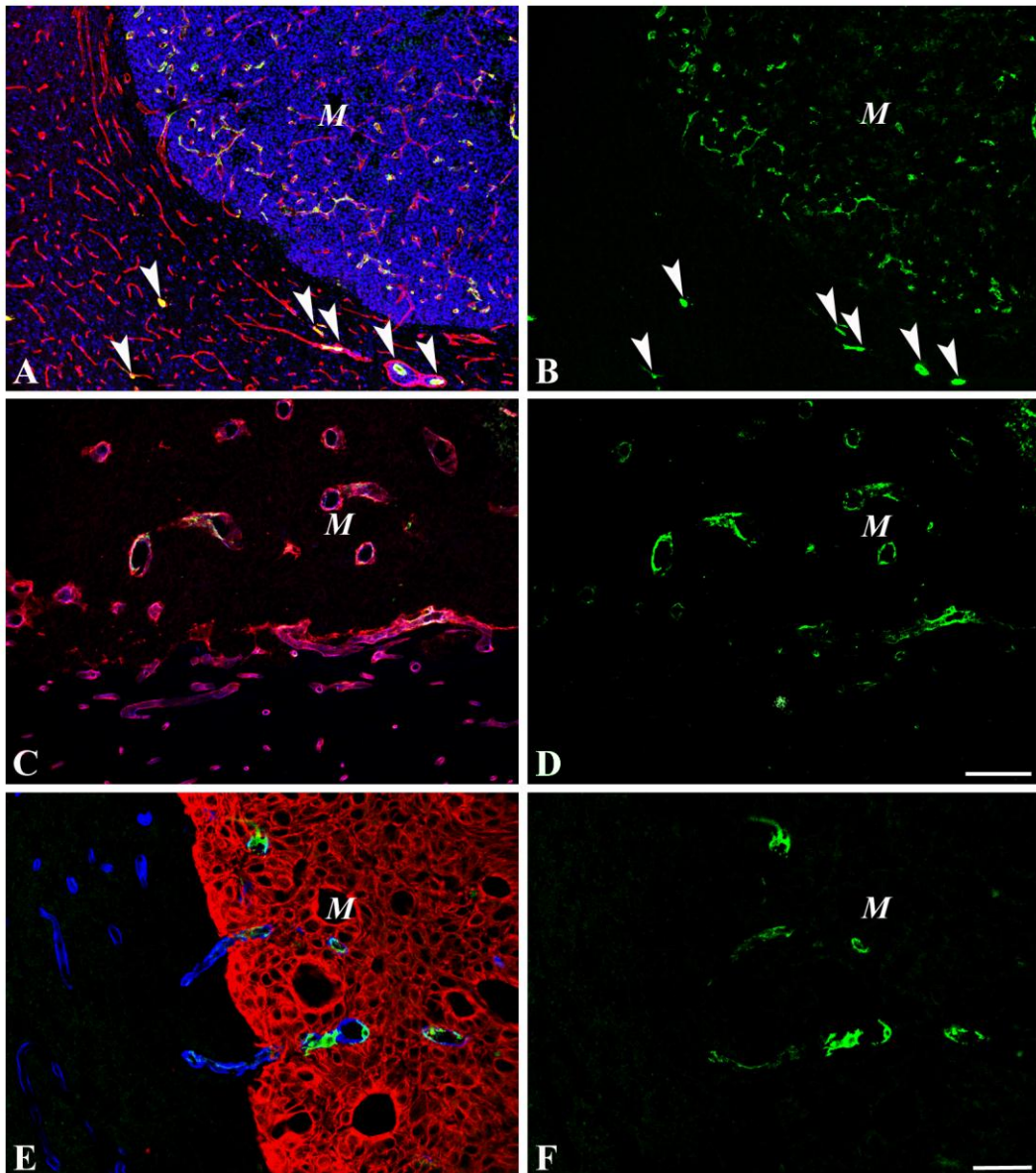
elősegítő mikrokörnyezetet. Az említett feltételek meglétének vagy hiányának vizsgálatára SMA és kollagén I. jelölését végeztük el. A fibronectin ugyan szerepet kap az idegrendszer fejlődésében, mégis a felnőtt agyban tulajdonképpen nincs jelen (70, 71).

Vizsgálataink szerint a kollagén I. az arteriolák falában található, az agy sűrű érhalózatának kapillárisaiban nem. Emellett intratumorálisan kollagén tartalmú extracelluláris mátrix depozíció nem figyelhető meg az erek körül (16. ábra).

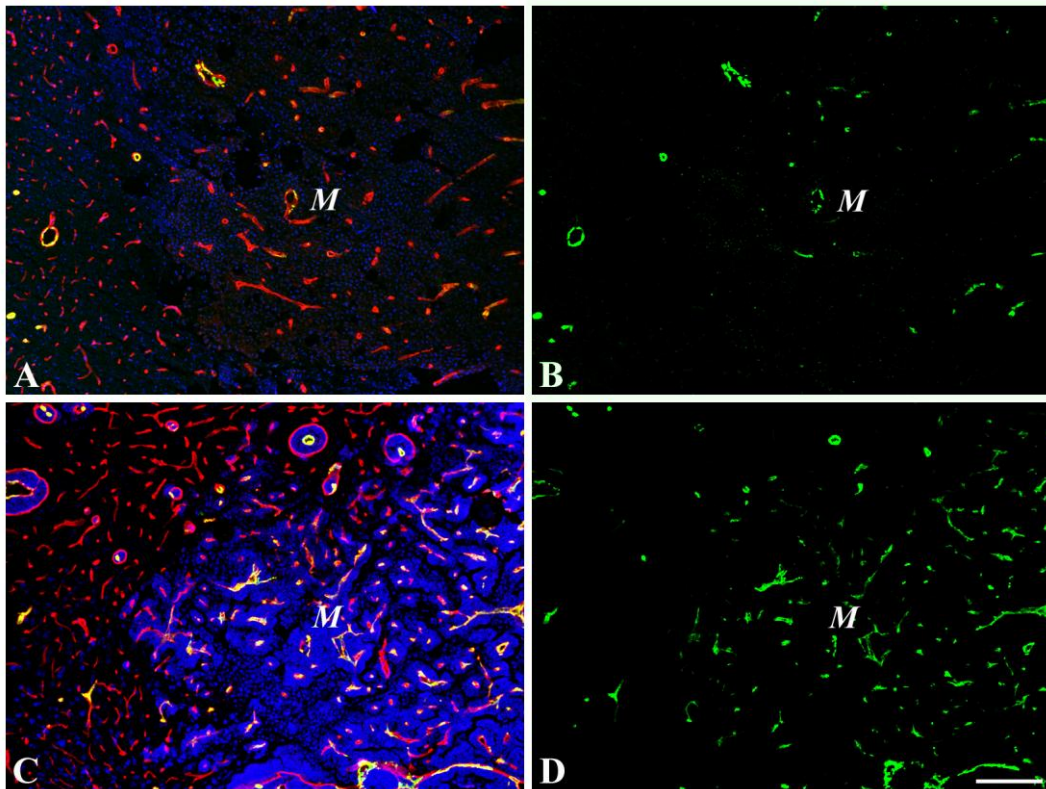
Az intratumorális ereken SMA-t expresszáló sejtek találhatóak (17.,18. ábra).



16. ábra: Kollagén I. a tumorban és az agy parenchimájában. Az angiogenesishez szükséges kollagéntartalmú mátrix hiánya látható a HT25 tumorban (*M*), ahol a CD31 (zöld) az ereket, a TOTO-3 (kék) a sejtmagokat jelöli. Az agyban (*P*) igen kevés kollagén I. (piros) található, főleg az arteriolák falában (nyílhegy) figyelhető meg. Egység: 50 μ m.

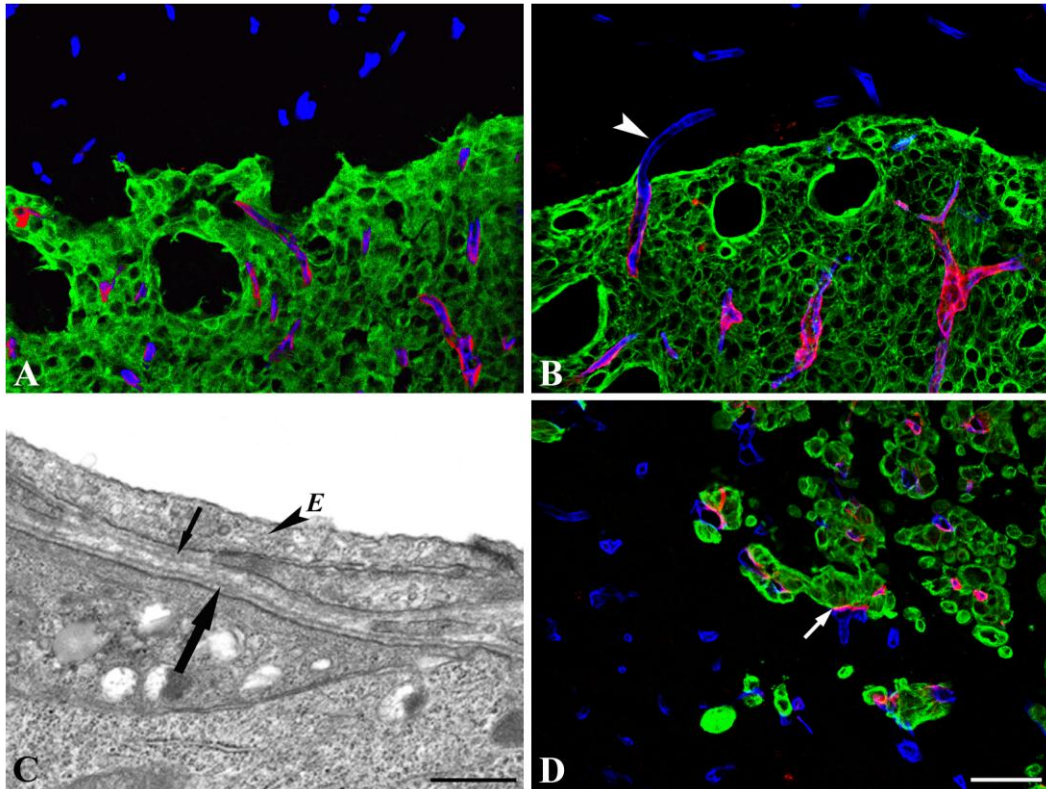


17. ábra: SMA expresszió a „pushing” növekedési mintázatot mutató tumorokban. (A-F) A metasztázis helyét *M* jelöli. **(A, B)** HT-1080 tumorról készült kis nagyítású kép. **(A)** A TOTO-3 sejtmag jelölés megmutatja a tumor tömeget a kép jobb felső felében. Az ereket laminin (piros) jelöli. Az agyban csak az arteriolák SMA (zöld) pozitívak (nyílhegyek). **(B)** A könnyebb értelmezhetőség érdekében a zöld csatorna kiemelésével látható, hogy az intratumorális erek többsége SMA pozitív. Különösen erős jelzés látható a metasztázis periferiáján. **(C, D)** C38 agymetasztázis. **(C)** A kép felső részén látható a tumor, alul pedig az agy parenchimája. Az ereket laminin (piros), CD31 (zöld) jelzi. Az intratumorális erek jelentős tágulata figyelhető meg. **(D)** SMA (kék) expresszió figyelhető meg az intratumorális, és a tumor periferiáját érintő erekben. **(E, F)** HT25 tumor. A panCK (piros) mutatja a tumor tömeget, a laminin (kék) az ereket. Az SMA (zöld) csak az intratumorális erekben pozitív. Egység: 200µm **(A-D)**, 50µm **(E, F)**.



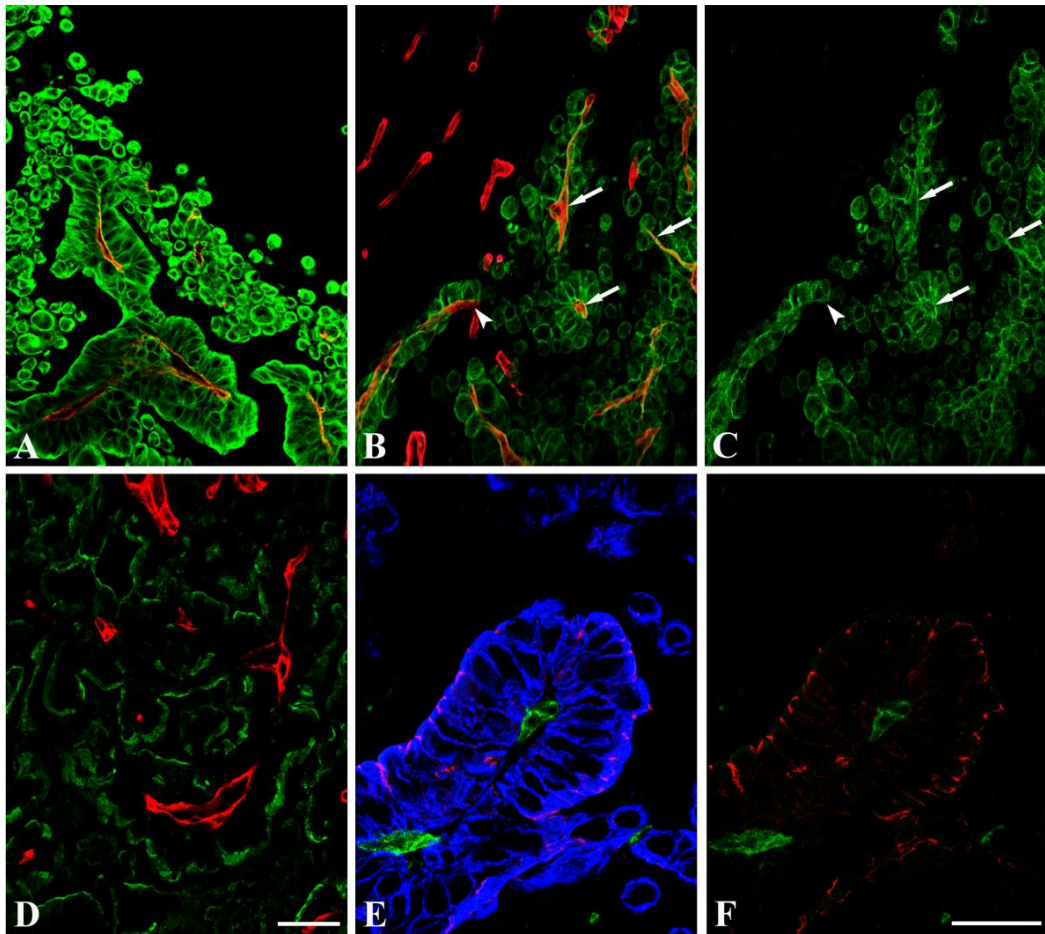
18. ábra SMA expresszió az átmeneti növekedési mintázatot mutató és az invazív tumorban. (A, B) H-1650 tumor. TOTO-3 (kék) mutatja a sejtmagokat, a tumor (*M*) a kép nagyrészét elfoglalja, bal oldalon látható az ép parenchima részlete. Laminin (piros) mutatja az ereket, melyek egy része intratumorálisan SMA (zöld) pozitív. Peritumorálisan csupán az arteriola SMA pozitív. **(C, D) ZR-75-1 tumor.** A TOTO-3 (kék) mutatja a tumorsejtek elhelyezkedését (*M*), a laminin (piros) pedig az ereket. Valamennyi intratumorális ér SMA (zöld) pozitív. Egység: 200 μ m **(A-D)**.

A tumorsejtek a növekedés során az agy parenchimáját elnyomják, az ereket inkorporálják, így azok egyfajta szubsztrátként szolgálnak a tumorsejtek számára. Ahogy a tumorsejtek az erek bazális membránjával kapcsolatba kerülnek, saját bazális membránt szintetizálnak az ér bazális membránjának felszínére (19. ábra). A humán-specifikus monoklonális laminin ellenanyaggal kizárólag a humán sejtek által termelt laminin vizsgálható, így biztosan kideríthető az újonnan szintetizált bazális membrán eredete.



19. ábra: A humán tumorsejtek laminint szintetizálnak a bekebelezett erek felszínére. (A) A H-1650 és (B) HT25 tumorsejteket a panCK (zöld) jelöli, az ereket a monoklonális anti-humán laminin (piros), valamint a poliklonális laminin (kék). (A, B) Látható az intratumorális erek bazális membránjára szintetizált humán laminin. A humán laminin az erek tumorba való bekebelezést követően kerül azok felszínére. (B) A HT25 tumorból készült képen látható egy részlegesen bekebelezett ér (nyílhegy), melynek felszínén pontosan addig terjed a humán laminin, amilyen mélyen az ér a tumorban helyezkedik el. (C) A ZR-75-1 tumorról készült elektronmikroszkópos kép mutatja, hogy megtalálható a tumor saját bazális membránja (nagy nyíl) közvetlenül az ér bazális membránja (kis nyíl) mellett. Az *E* az endotélsejtet jelöli. (D) Fluoreszcens immunhisztokémiával kimutatható, hogy a poliklonális lamininnal (kék) jelölt ereknek csak a panCK (zöld) jelzett tumorsejtek felőli oldalán található meg a humán laminin (piros) (nyíl). Egység: 50 μ m (A, B, D), 1 μ m (C).

A tumorsejtek erek bazális membránjához való kapcsolódásának következményei a legérdekesebbek a ZR-75-1 emlőkarcinóma esetében. A szétszórt, kerek tumorsejtek a parenchimában a kapillárisok felszínéről leválasztják az asztrocitákat, és kapcsolatba kerülnek a bazális membránnal. Ez a kontaktus a tumorsejteket differenciálódásra készítette, így integrin $\alpha 3$ és laminin5 bazális, valamint claudin3 és epiteliális membrán antigén (EMA) apikális expresszióját mutatták (20. ábra).

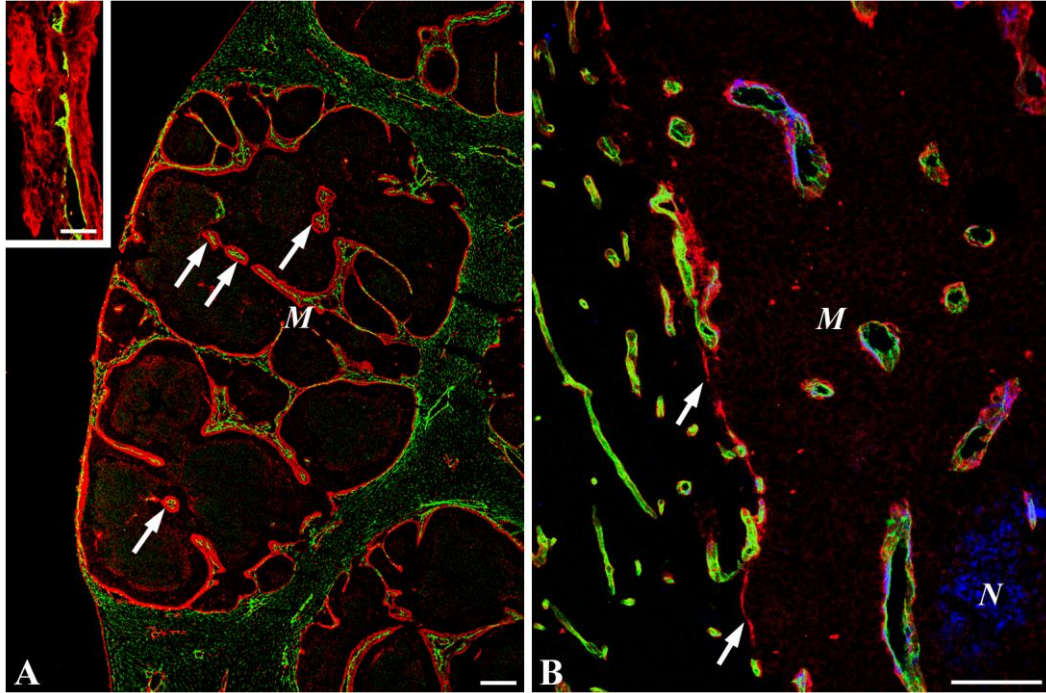


20. ábra: Az erekhez való kapcsolódás hatása a tumorsejtek differenciációs állapotára. (A-F) ZR-75-1 tumor. (A) A tumorsejteket panCK (zöld) jelöli. A tumorsejt differenciáció egyik jele, hogy a laminin5 (piros) az erek felszínén, azaz a tumorsejtek bazális oldala felől mutatható ki. A laminin5 (piros) csak az intratumorális erekben van jelen. A környező agyállományban (sötét terület) szintén találhatóak erek, de a laminin5 ellenanyag humán-specifikus, így nem festi az egér laminint. **(B)** Az integrin $\alpha 3$ (zöld) a tumorsejteket, a laminin (piros) az ereket mutatja. A tumorsejtek az integrin $\alpha 3$ -mal kapcsolódnak az általuk szintetizált bazális membránhoz. A nyilak mutatják a laminin és az integrin $\alpha 3$ kolokalizációját. **(C)** Az integrin $\alpha 3$ lokalizációja jobban megfigyelhető a zöld csatorna képén. Az integrin $\alpha 3$ jelölés így kirajzolja az erek külső felszínét (nyilak). Egy olyan ér is látható, amely csak részlegesen fedett tumorsejtekkel (nyílhegy). Az integrin ennek az érnek csak a tumorsejtekkel fedett oldalán jelenik meg. **(D)** A tumorsejtek differenciálódásának jele az EMA (zöld) apikális expressziója. Az ereket laminin (piros) jelöli. A tumorsejtek az erek és az apikális festődés között helyezkednek el, nem jelöltük őket. **(E)** A CD31 (zöld) jelölt ér felületén elhelyezkedő tumorsejtek CK7 (kék) pozitívak. A claudin3 (piros) a tumorsejtek apikális felszínén jelenik meg. **(F)** A claudin3 (piros) apikális expressziója jobban látható a tumorsejteket mutató kék csatorna kivonásával. Egység: 50 μ m (A-D), 25 μ m (E, F).

V.1.3. A C38 tumor morfológiája különböző szöveti/szervi lokalizációkban

A munkacsoport korábbi kísérletei során, C38 tumorok májmetasztázisainak vizsgálatakor felfigyelt arra, hogy a metasztázisokban sajátos szerkezetű kötőszövetes oszlopok jönnek létre (21. ábra). Ezek az oszlopok egy

centrálisan elhelyezkedő, bazális membránnal fedett érből, az azt körülvevő kötőszövetből (SMA pozitív sejtek kollagén I-et tartalmazó mátrixba ágyazva), valamint az erre szintetizált, tumorsejt eredetű bazális membránból álltak. A C38 tumorsejtvonal agymetasztázisaiban azonban nem fordultak elő ilyen kötőszövetet tartalmazó oszlopok (21. ábra).

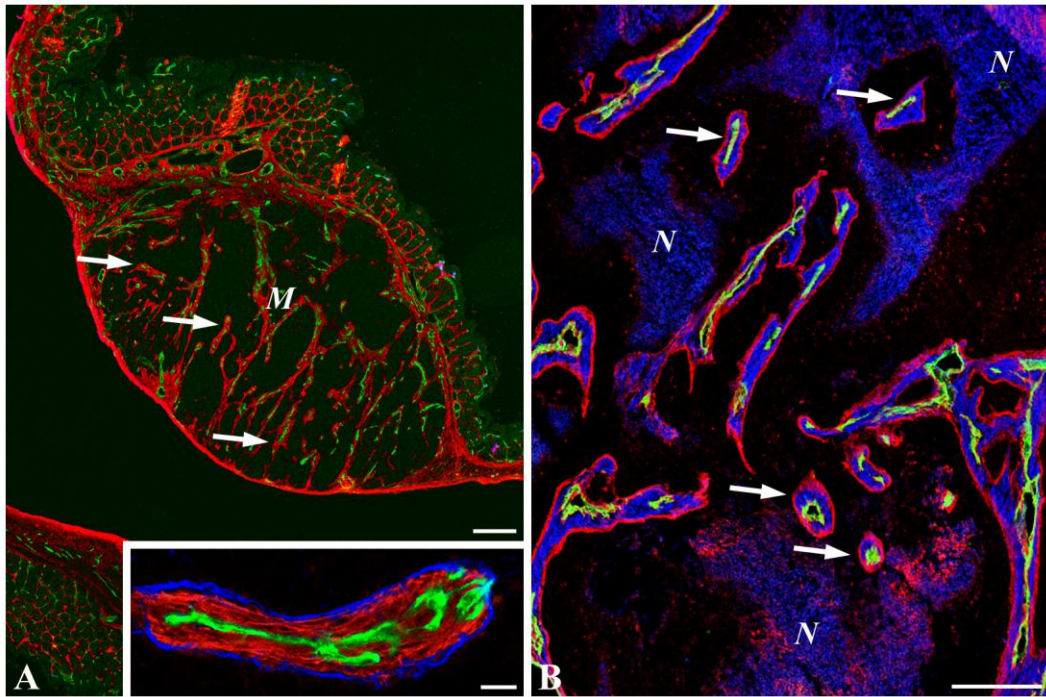


21. ábra: C38 metasztázisok szerkezete májban és agyban. (A) Májmetasztázis (M). A CD31 jelzés (zöld) kirajolja a szinuszoidokat a májparenchimában, és az intratumorálisan elhelyezkedő ereket. Látható, hogy az intratumorális kötőszövetes oszlopok (nyilak) felszíne tumorsejt eredetű lamininnel fedett. A beillesztett kép egy intratumorális centrális eret tartalmazó oszlopot mutat, mely kollagént I-et tartalmaz (CD31, zöld) (kollagén I., piros). **(B)** A C38 agymetasztázis (M) a kép jobb oldalán helyezkedik el. A daganatszövet határát a tumorsejtek által termelt laminin (piros) (nyilak) rajzolja ki. SMA (kék) csak az inkorporált erek felszínén található, a pericitákat jelöli, nem látható az SMA-t expresszáló, kötőszövetet szintetizáló sejtek felszaporodása. Az ereket az endothelsejtek CD31 (zöld) jelölése mutatja. Az anti-egér szekunder ellenanyag nem specifikus jelölése a tumor területén található nekrotikus részt (N) is megmutatja. Egység: 200µm (A, B), 25µm (A beillesztett).

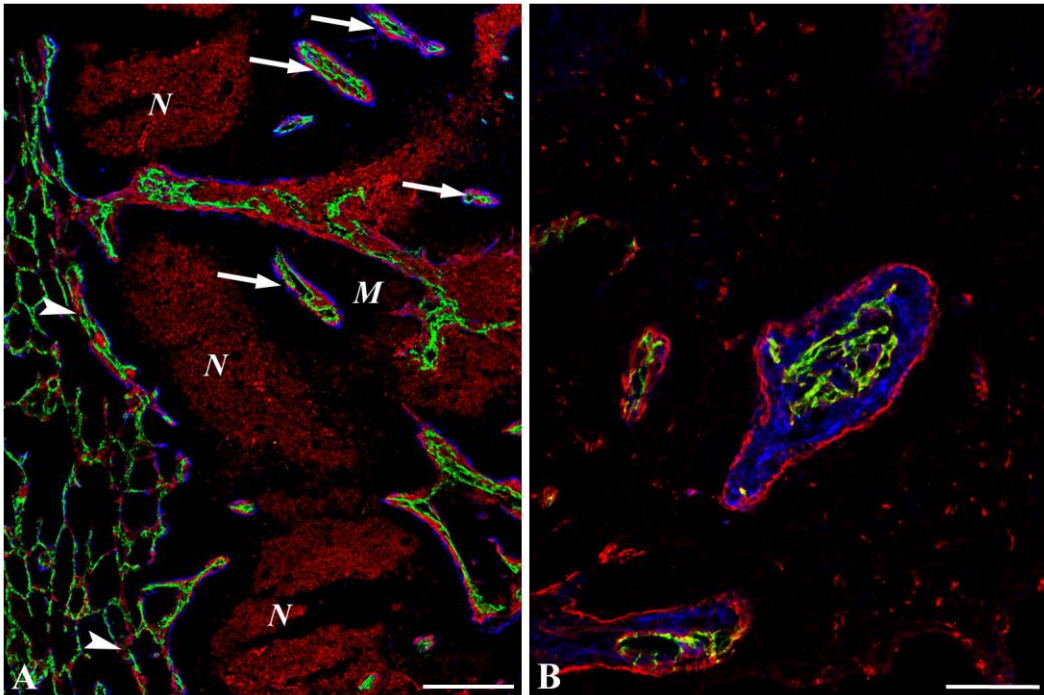
Annak eldöntésére, hogy az oszlopok megjelenése a májmetasztázisokban a máj mikrokörnyezetének hatása-e, további vizsgálatokat végeztünk. A C38 sejtek különböző helyekre történő oltásával azt találtuk, hogy a szervi lokalizációtól függetlenül (szubkután tumorokban, bélfalban növesztett tumorokban, valamint tüdőmetasztázisokban (nem publikált adatok)) is megtalálhatók a kötőszövetes oszlopok (22., 23. ábra). A C38 tumor növekedése során a környező ereket és az azokat körülvevő, kötőszövetet szintetizáló sejteket bekebelezi és saját bazális

membránt szintetizál a bekebelezett struktúrák felszínére. Miután a tumorba bekerült fibroblasztok már a tumor felszínén a tumor nyomásának vagy más a tumor által termelt faktoroknak a hatására aktiválódtak (miofibroblasztok), azok ECM termelése révén a tumor, valamint az ér bazális membránja közötti rész kiszélesedik.

Az agy parenchimája ebből a szempontból speciális helynek számít, itt ugyanis nem találhatók fibroblasztok. Ennek megfelelően a bekebelezett ereket közvetlenül a tumorsejtek veszik körül, a már említett struktúrából így hiányzik a kötőszövetet tartalmazó réteg. Viszont a kötőszövetes oszlopok még az agytumorsejtekben is megjelentek, ha a növekvő tumorok elérték a fibroblasztokat is tartalmazó felszíni rétegeket (agyhártyák) (23. ábra).



22. ábra: A C38 tumorok különböző szervi lokalizációban hasonló szerkezetet mutatnak 1. (A) A C38 sejtek bélfalban növekvő tumorában (*M*) számos kötőszövetes oszlop (nyilak) látható (CD31 (zöld) és laminin (piros)). A beillesztett kis kép egy oszlop részletesebb szerkezetét mutatja. A középen elhelyezkedő ér a CD31 (zöld) pozitívitás jelzi, amit SMA-t (piros) tartalmazó réteg vesz körül, melyet a tumor által szintetizált laminin (kék) határol. **(B)** A szubkután növekvő tumorról készült felvételen a fekete színű területen található az élő tumorszövet, melyben több olyan struktúra látható, mely centrálisan elhelyezkedő ér (CD31, zöld) tartalmaz (nyilak). Az ér SMA (kék), valamint laminin (piros) veszi körül. A daganat területén az anti-egér szekunder ellenanyag nem specifikus jelölése a nekrotikus részt (*N*) is megmutatja. Egység: 500 μ m **(A)**, 25 μ m **(A beillesztett)**, 200 μ m **(B)**.



23. ábra: A C38 tumorok különböző szervi lokalizációban hasonló szerkezetet mutatnak 2. (A) A tüdőmetasztázisban (*M*) szintén láthatóak a kötőszövetet tartalmazó oszlopok (nyilak). A nekrotikus terület (*N*) az előbbieken látott okból szintén láthatóvá válik. A tumor (fekete rész) a kép bal oldali részében levő alveolusokat is kitölti, ezen a területen nekrosis jele nem látható, az SMA (piros) pozitív sejtek felszaporodása itt kezdődik meg (nyílhegyek). Az SMA pozitív sejtek nagyobb mértékű megjelenése az alveolusokat már nem tartalmazó tumortömegben látható. A tumor belsejében számos, egy vagy több centrális eret (CD31, zöld) tartalmazó kötőszövetes oszlop látható, melyek lamininnal (kék) fedettek (nyilak). **(B)** A kép egy olyan C38 agymetasztázist mutat, mely elérte az agy felszínét. Az ereket (CD31, zöld) SMA (kék) pozitív sejtek veszik körül. Ezek a sejtek már nem csak periciták, hanem az agyfelszínről származó aktivált fibroblasztok, melyek kötőszövetet termelnek. A struktúrát a tumor eredetű laminin (piros) határolja. Egység: 200 μ m **(A)**, 50 μ m **(B)**.

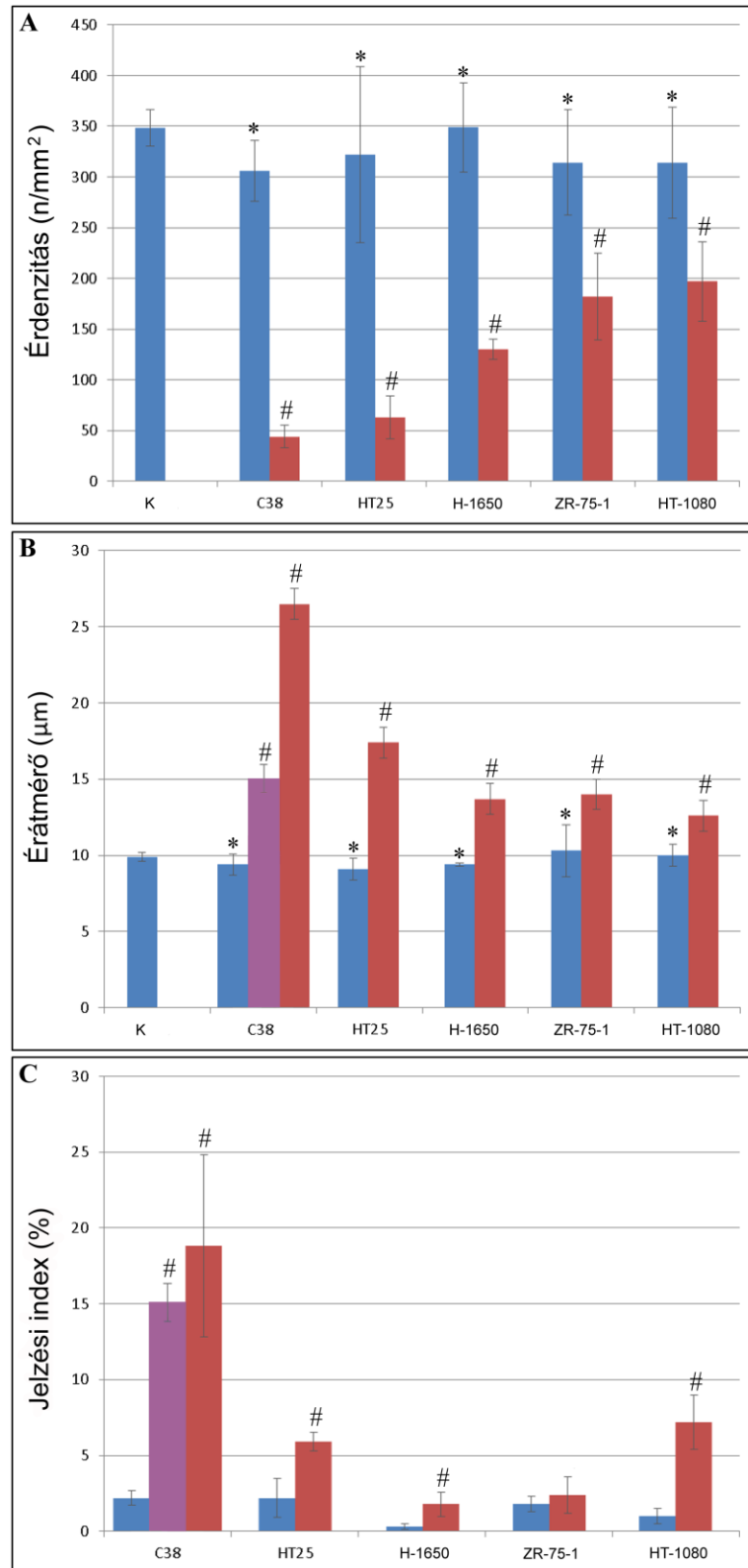
V.1.4. Morfometriai vizsgálatok

Az angiogenesis jele az érdenzitás növekedése, endotélproliferáció, valamint az erek tágulása a peritumorális területen. A morfometriás mérések során tehát meghatároztuk az érdenzitást a tumorban (intratumorális), illetve a tumor szélétől számított 200 μ m távolságig a parenchimában (peritumorális).

A peritumorális területeken nem volt érdenzitásbeli növekedés a kontroll (tumormentes) állatokhoz képest (24. ábra). Mindegyik vizsgált tumor esetében a peritumorális területekhez képest csökkent az intratumorális érdenzitás.

Az erek tágulása nem volt megfigyelhető a peritumorális részeken. Egy kivétel volt, a C38 kolorektális karcinóma, ahol a tumor felszínével érintkező erek már számottevően tágultak a peritumorális értékekhez képest (24. ábra).

Az intratumorális erek átmérői mindegyik tumorban szignifikánsan magasabbak voltak a környező parenchimához képest, de számottevő emelkedést csak a két kolorektális karcinóma esetében mutatott. Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy az intratumorális ereket alkotó sejtek BrdU beépülés alapján meghatározott jelzési indexe csak a „*pushing*” típusú növekedést mutató tumoroknál emelkedett számottevően. A jelzési index a C38 esetében a tumor felszínével éppen érintkező erekben is magasabb volt. A két invazív tumorban (ZR-75-1, H-1650) a jelzési indexek mérsékelten alacsony szinten maradtak. A peritumorális erek jelzési indexe elhanyagolhatóan alacsony volt minden tumortípusnál (24. ábra).



24. ábra: Mofrometriai analízis. (A) Érdenzítés (n/mm²), **(B)** Érátmérő (µm), **(C)** Jelzési index (%). Kontroll állatok (K) és peritumorális (a tumor szélétől számított 200µm-en belül) (kék oszlopok), ill. intratumorális (piros oszlopok) területek értékei. A C38 esetében a tumorral éppen érintkező erek külön kategóriát alkotnak (lila oszlopok). A „* „ jel esetén

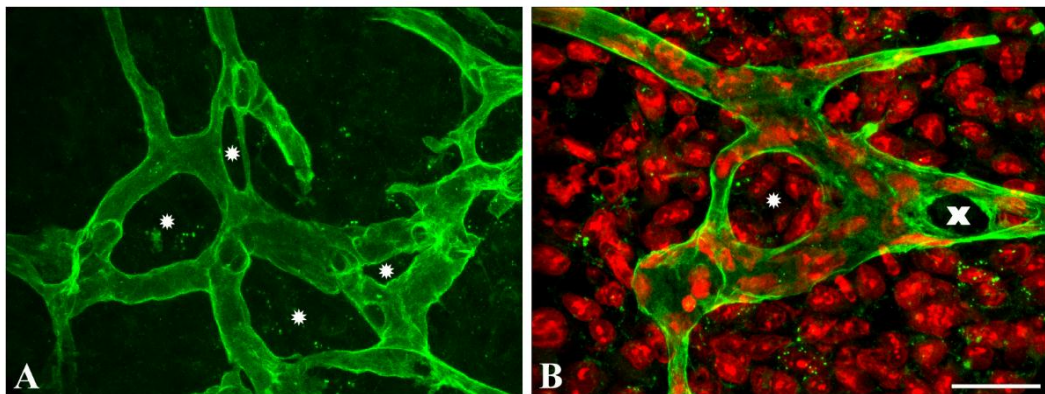
nincs szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest, a „#” jel szignifikáns eltérést mutat ($p < 0,05$) a peri- és intratumorális erek között. Az értékek: átlag \pm szórás.

A HT-1080 tumorban, ami szintén „*pushing*” típusú növekedést mutatott, a magas jelzési index nem társult az erek nagymértékű dilatációjával. Az erek átmérője elhanyagolható mértékben növekedett. Megfigyeltük azonban, hogy az erek elágazási pontjainak száma szignifikánsan magasabb volt, mint a többi tumorban (10. táblázat).

10. táblázat: Az elágazási pontok száma a különböző tumorok erein. A „*” jel szignifikáns eltérést ($p < 0,05$) mutat a HT-1080 és a többi tumor között. Az értékek: átlag \pm szórás.

Sejtvonal	C38	HT25	H-1650	Zr-75-1	HT-1080
Elágazási pontok (n/mm ²)	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,7	0,9 \pm 0,5	4,1 \pm 1,8 *

Ezt magyarázza az a megfigyelésünk, hogy a HT-1080 tumorokban az intusszusceptív angiogenezisre emlékeztető folyamat játszódik le. A folyamat során transzluminális oszlopok keletkeznek az erekben, melyek kötőszövet helyett tumorsejteket tartalmaznak (25. ábra).

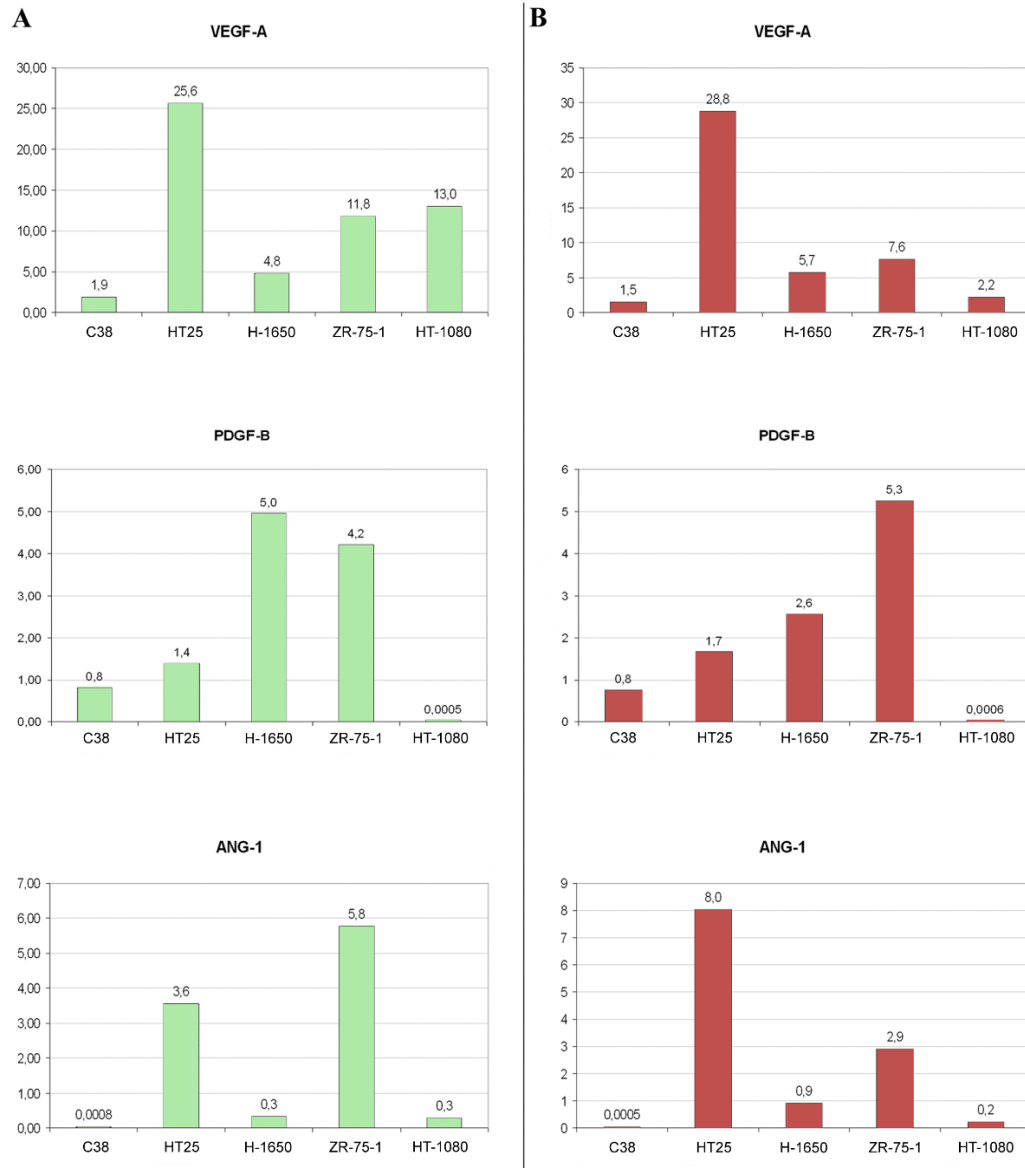


25. ábra: Intusszusceptív-szerű folyamat HT-1080 tumorban. (A) Az érhálózatot laminin (zöld) jelöli. A kép 32 optikai réteg összeillesztésével készült. Látható, hogy több intraluminális oszlop képződött (csillagok). Ezek a helyeken az ér lumene kettéosztódott. **(B)** Számos tumorsejt látható az intraluminális oszlopon belül. Az x-el jelölt fekete terület, ahol nincsenek sejtmagok, nem egy oszlopot, hanem egy erről a területről kiinduló eret mutat. A sejtmagokat propidium-jodid (piros) jelöli. Egység: 25 μ m (A, B).

V.2. Molekuláris biológiai módszereken alapuló vizsgálatok

V.2.1. mRNS szintű vizsgálatok

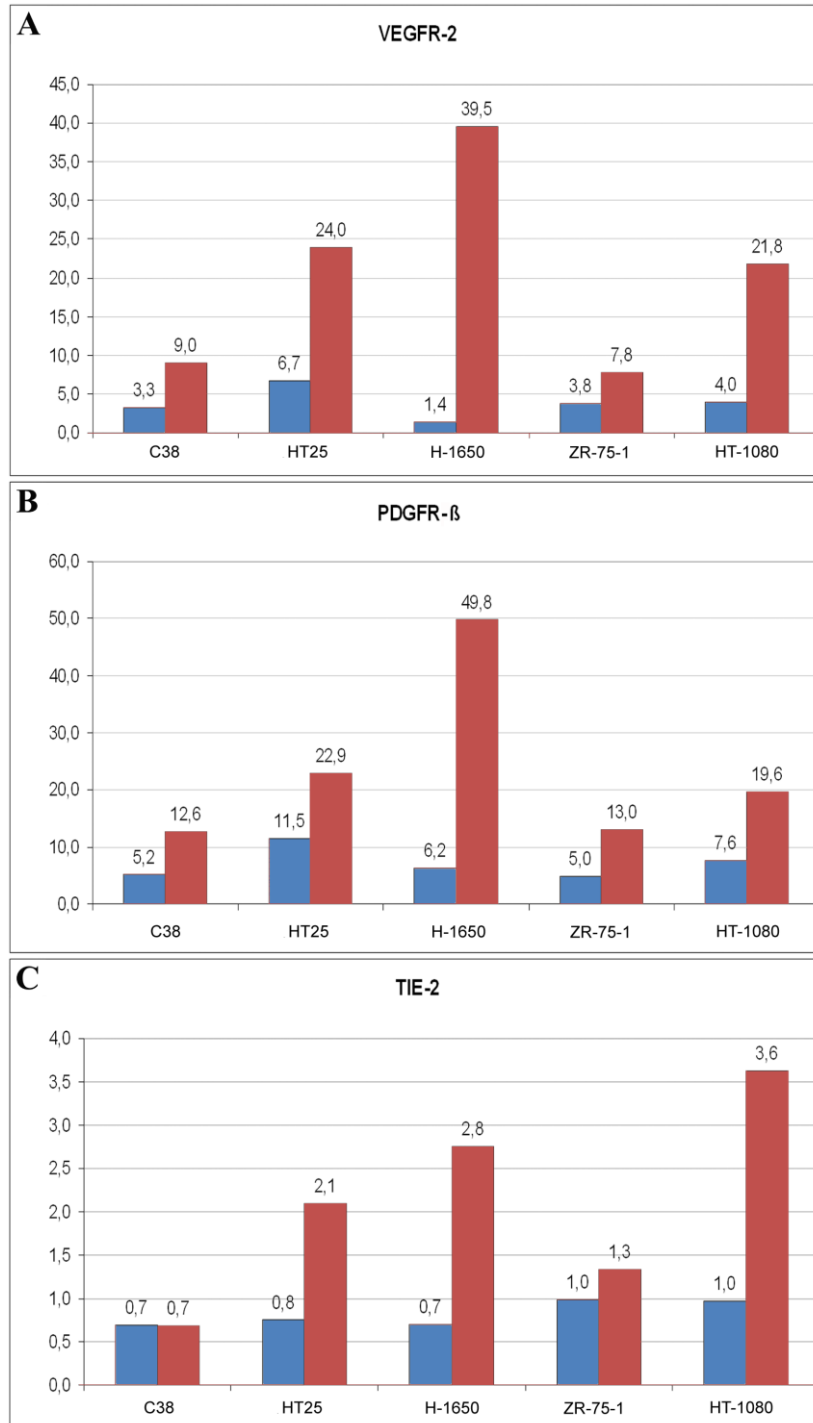
A legismertebb angiogén faktorok kísérletes agymetasztázisok vaszkularizációs folyamatában betöltött szerepét kvantitatív valós idejű PCR (QRT-PCR) analízissel vizsgáltuk. A VEGF-A, PDGF-B és ANG-1 relatív expresszióját határoztuk meg az 5 tumorsejtvonalban, valamint mikrodisszekált intratumorális területeken. Az mRNS expresszió a sejtvonalak és a tumor minták között jól korrelált. Érdekes módon a C38 egér kolorektális karcinóma és a HT-1080 humán fibroszarkóma sejtek mutatták a legalacsonyabb intratumorális angiogén faktor szintet, ugyanakkor ezekben volt a legmagasabb a BrdU beépülés alapján mért jelzési index az erekben. A HT25 mikrodisszekált intratumorális mintában volt a legmagasabb VEGF-A és ANG-1 expresszió. A PDGF-B-t illetően a ZR-75-1 intratumorális mintákban volt a legmagasabb az mRNS expressziós szint (26. ábra).



26. ábra: Az angiogén faktorok expressziójának QRT-PCR alapú vizsgálata. (A) VEGF-A, PDGF-B és ANG-1 relatív expressziós értékei a sejtvonalakban, valamint **(B)** mikrodisszekált intratumorális területeken. Az „y” tengely tetszőlegesen választott mértékegység.

Az angiogén faktor receptor expresszió vizsgálatánál a VEGFR-2, PDGFR- β és a Tie-2 mRNS szintet határoztuk meg a mikrodisszekált intra- és peritumorális mintákban. A receptor expresszió minden esetben magasabb volt intratumorálisan (27. ábra).

További összefüggések nem voltak kimutathatók. Az intratumorális angiogén faktor, illetve angiogén faktor receptor szintek, valamint a sejtlizátumokban talált VEGF-A fehérje expressziók nem korreláltak az intratumorális erek proliferációs indexével.

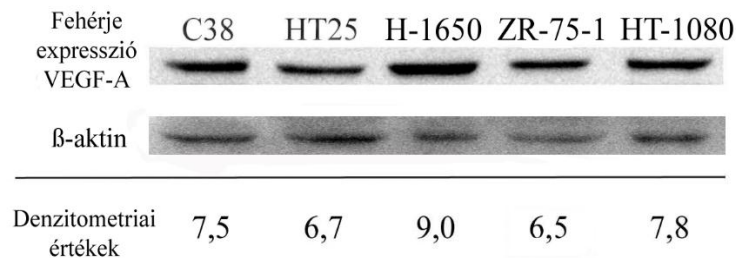


27. ábra: Az angiogén faktor receptorok expressziójának QRT-PCR alapú vizsgálata. A (A) VEGFR-2, (B) PDGFR-β és a (C) TIE-2 relatív expressziós szintjei mikrodisszekált peritumorális (a tumor szélétől számított 200µm-en belül) (kék oszlopok), valamint mikrodisszekált intratumorális mintákban (piros oszlopok). Az „y” tengely tetszőlegesen választott mértékegység.

V.2.2. Fehérje szintű vizsgálatok

Mivel nem minden mRNS íródik át és válik funkcionális fehérjévé, az mRNS szintből nem következtethetünk pontosan a vizsgált molekula tényleges szerepére. A fehérje szintű vizsgálatok jobban tükrözik a lezajló biológiai folyamatokat.

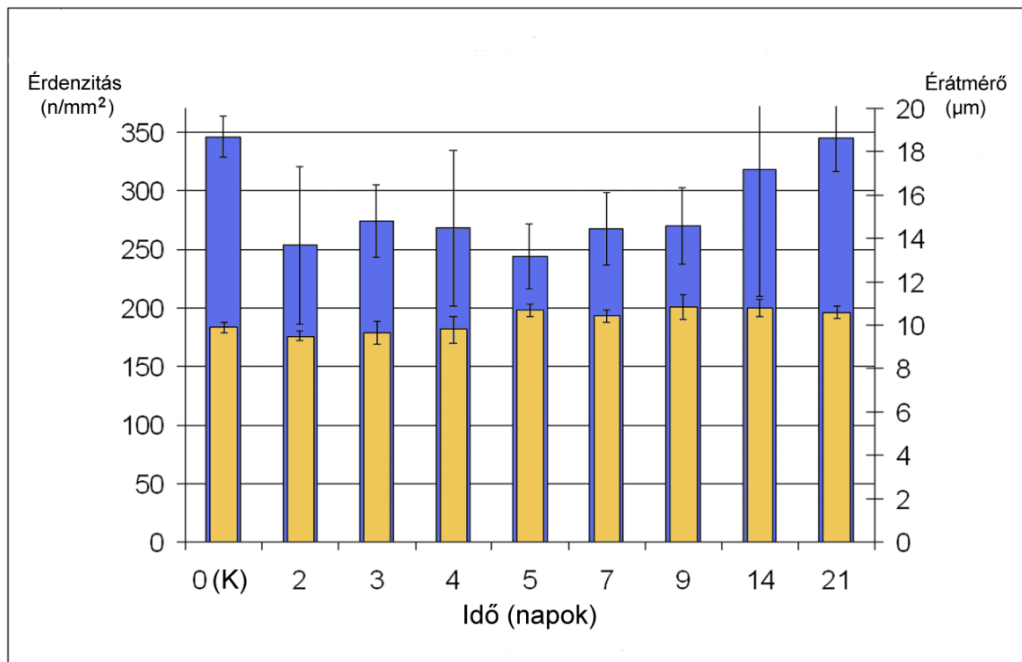
A VEGF-A esetében fehérje expressziós szintet vizsgáltunk a tenyésztett sejtek mintáiból Western-blottal. Az mRNS expressziótól eltérően a fehérje expresszió csak kis különbségeket mutatott a sejtvonalak között (28. ábra). A QRT-PCR, valamint a sejtproliferációs vizsgálatok eredményeivel összevetve nem találtunk korrelációt.



28. ábra: Western-blot. A VEGF-A (42kDa) fehérje szintű vizsgálata a sejtvonalakban. Kontroll: β-actin (42kDa). A VEGF expresszió a H-1650 tumorsejtekben a legmagasabb. Tetszőlegesen választott mértékegység.

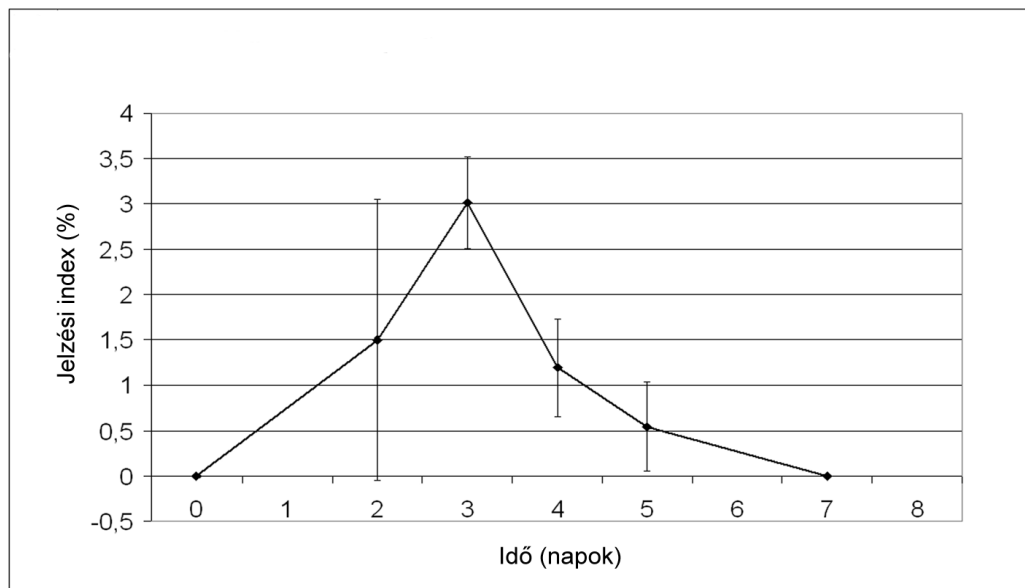
V.3. A sebgyógyulás vizsgálata

Az agyba történő direkt oltás következményei befolyásolhatják a kísérletes agymetasztázisok vizsgálatának eredményeit. Így a csupán a sebzésből eredő változások feltárásához sebgyógyulási kísérleteket is végeztünk. Ezeket a mintákat a tumorok esetében már ismertett szempontok alapján értékeltük. Nem észleltünk érdenzítés növekedést a seben belül vagy körülötte egyik vizsgált időpontban sem. Az érdenzítások szignifikánsan alacsonyabbak voltak a 9. napig, majd elérték a kontroll értéket, az érátmérők nem változtak a kontroll agyban mértékhez képest (29. ábra).



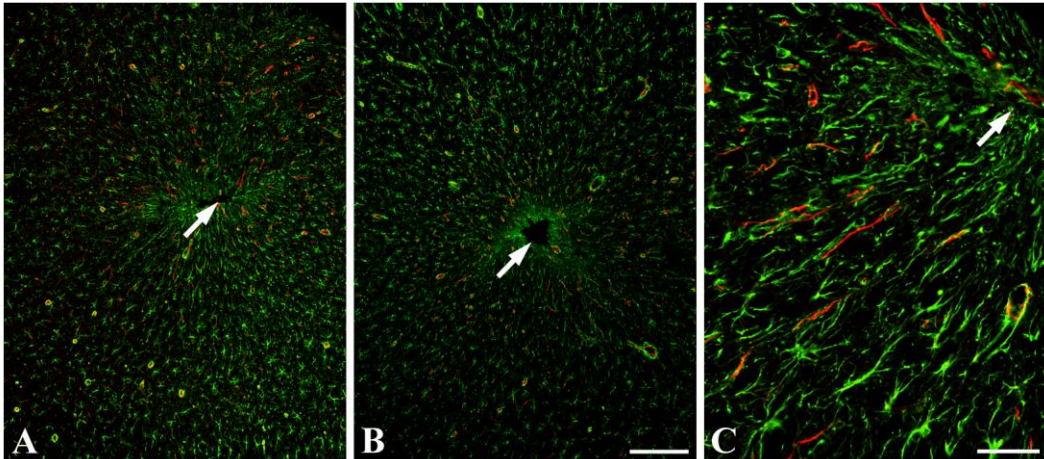
29. ábra: Morfometriai vizsgálatok sebgyógyulás alatt. Nem volt szignifikáns érdenzítésbeli (kék oszlopok) különbség a kontroll (K) állatok agyszövetében mért adatokhoz képest 2, 3, 4, 5, 7 és 9 nap után. Az érátmérő (sárga oszlopok) a sebgyógyulás alatt nem változott jelentősen. Az értékek: átlag±szórás.

Proliferáló vaszkuláris sejteket a 2. és 5. nap között találtunk, melynek maximuma a 3. naphál volt, de ez a jelzési index emelkedés nem tekinthető jelentősnek (30. ábra).

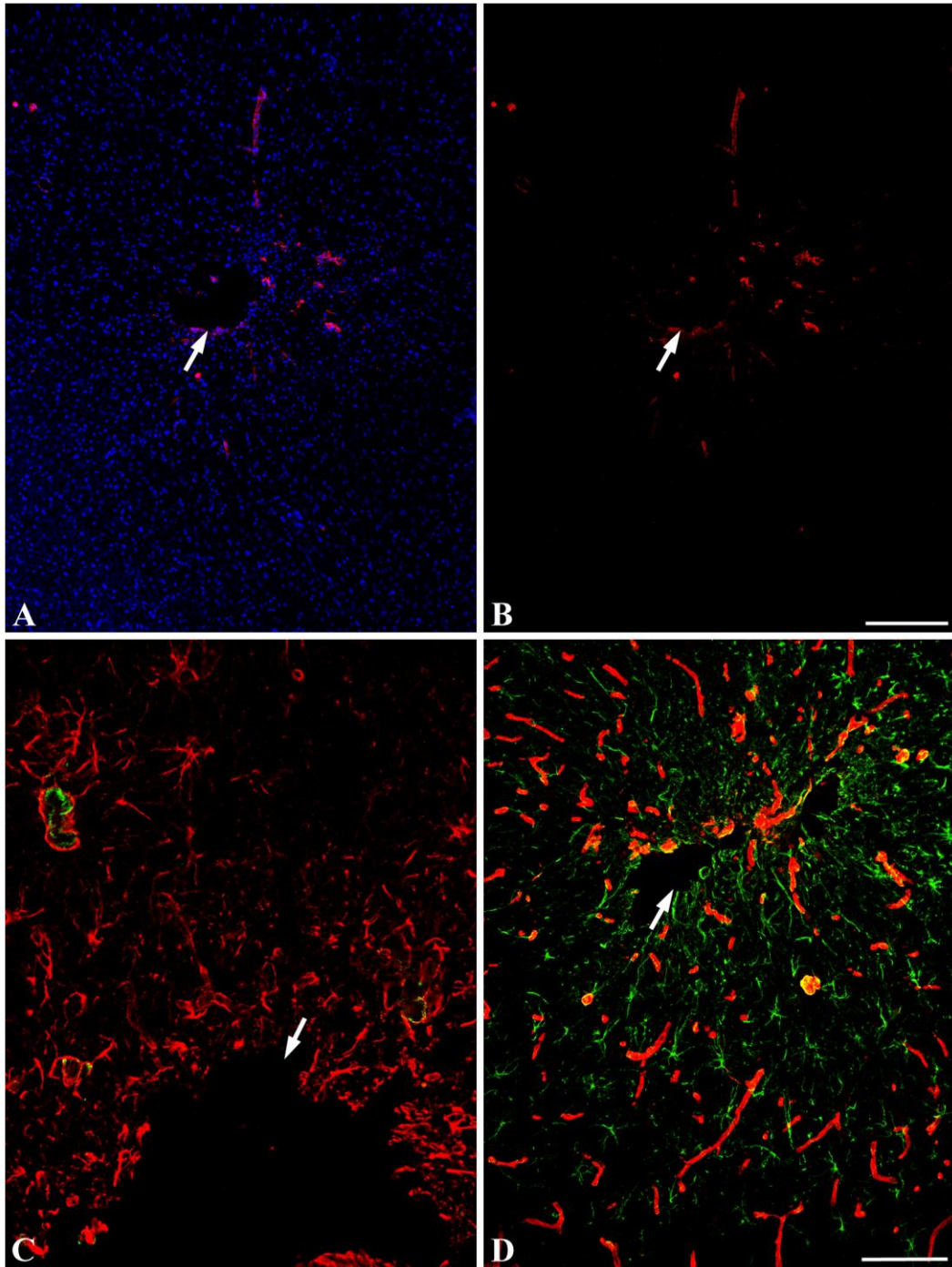


30. ábra: Az ereket alkotó sejtek proliferációja sebgyógyulás alatt. A legtöbb proliferáló sejt a 3. naphál figyelhető meg. Az értékek: átlag±szórás.

A seb összehúzódásának folyamata során GFAP pozitív sejtek seb körüli mérsékelt felszaporodása történt meg. A GFAP pozitivitás oka az aktiválódott periciták általi expresszió is lehetne, de a dezmin és GFAP jelölések nem kolokalizáltak egymással (31. ábra). SMA-t expresszáló sejtek felszaporodását, és/vagy kollagént tartalmazó extracelluláris mátrix lerakódást nem találtunk sem a seb területén, sem pedig a környező szövetben (32. ábra).



31. ábra: A sebgyógyulás immunhisztokémiai vizsgálata 1. (A) A sebzést követő 5. napon vett minta 10x-es nagyítással. **(B)** A sebzést követő 7. napon vett minta 10x-es nagyítással. **(A, B, C)** Az asztrociták (GFAP, zöld) jelölése megmutatja a seb helyét (nyíl). A pericitákat dezminnel (piros) jelöltük. A seb közvetlen környezetében több GFAP pozitív sejt figyelhető meg. **(C)** Az 5. napon vett minta 40x-es nagyításával jól látható, hogy a dezmin pozitív sejtek a GFAP pozitív sejtek szoros közelségében helyezkednek el, a két jelölés azonban nem kolokalizál. Egység: 200 μ m **(A, B)**, 50 μ m **(C)**.

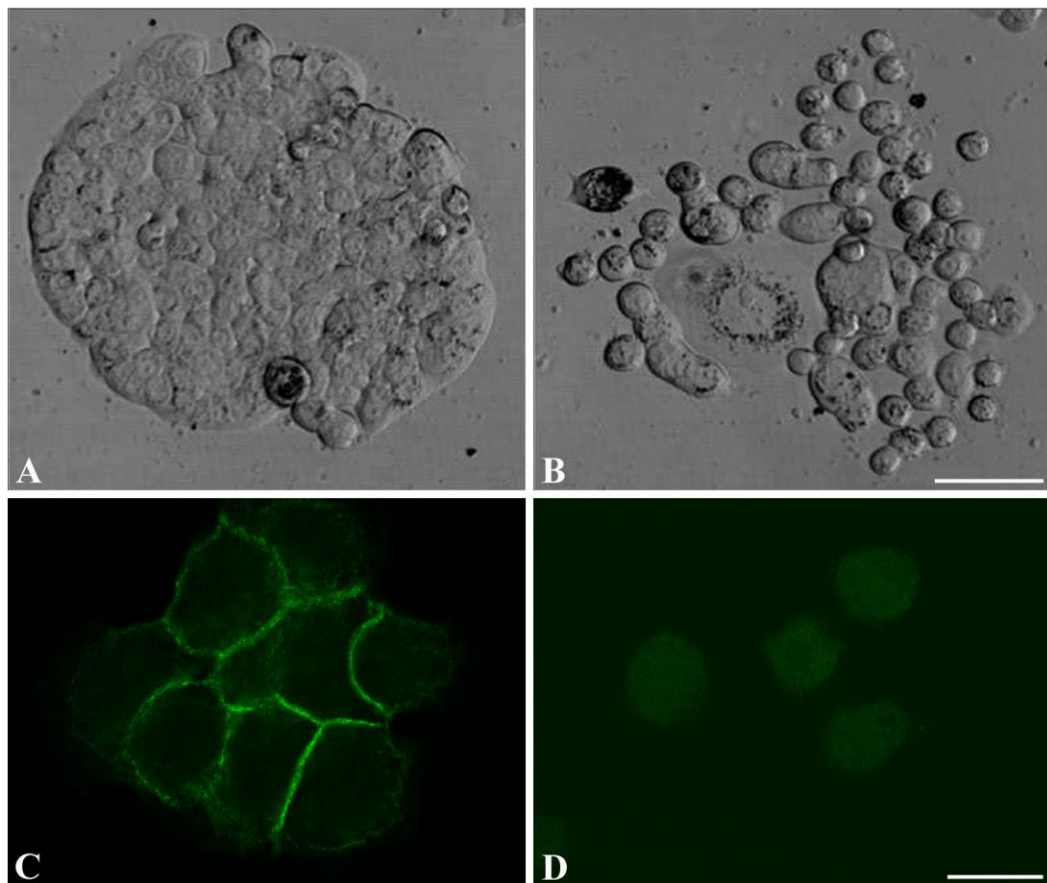


32. ábra: A sebgyógyulás immunhisztokémiai vizsgálata 2. (A, B) A sebzést követő 5. napon vett minták. **(A)** A seb helyét (nyíl) jól kirajzolja a sejtmagok jelölése (TOTO-3, kék). Nem figyelhető meg SMA-t expresszáló sejtek jelentős felszaporodása (piros). **(B)** kép csak az SMA jelzést mutatja. **(C, D)** A sebzést követő 21. napon vett minták. **(C)** Kollagén I. (zöld), valamint az asztrociták GFAP (piros) jelölése mutatja, hogy csak az arteriola falában van kollagén. A seb a kép alsó részén helyezkedik el (nyíl). **(D)** Mérsékelten megnövekedett mennyiségű asztrocita (GFAP (zöld)) látható a seb körül. Az erek laminin (piros) jelölésével látható, hogy az érdenzítés és az érátmérő a normálisnak megfelelő. Egység: 200 μ m **(A, B)**, 50 μ m **(C, D)**.

V.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalban

V.4.1. A csendesítés sikerességének ellenőrzése

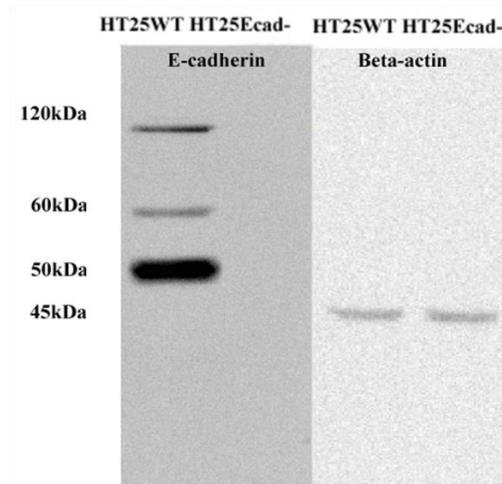
A transzfekciót követően az antibiotikumos szelekción átesett sejteken az E-cadherin csendesítés eredményességét immuncitokémiai vizsgálatokkal igazoltuk, monoklonális tenyészetet hoztunk létre 96 lyukú plate-re kirakott sejtekből induló tenyésztéssel. Összesen 3 klón további fenntartását és szaporítását végeztük el. Már fáziskontraszt-mikroszkópban látható volt a sejtek eltérő viselkedése. Míg a vad típusú HT25 sejtek koherens csoportokat alkotva nőttek, az E-cadherin csendesített sejtek tenyészetében kerek, egymással nem kapcsolódó, szétszórtan növekvő sejteket láthattunk. Az immuncitokémiai reakció alátámasztotta, hogy az E-cadherin csendesítés sikeres volt (33. ábra). Az immuncitokémiai reakció alapján további kísérletekre a 3. klónt választottuk ki.



33. ábra: Az E-cadherin csendesítés. Fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel (A) a vad típusú HT25 sejtekről és (B) az E-cadherin csendesített sejtekről. A fenotípusos különbség jól látható. Míg (A) a vad típusú sejtek koherens csoportot alkotva nőnek, addig (B) az E-cadherin csendesített sejtek egymással való kapcsolatai megszűnnek, lekerekedett, elszórtan növekvő sejteket láthatunk. E-cadherin immuncitokémia (C) a vad típusú, és (D) az E-cadherin csendesített HT25 sejteken. (C) A vad típusú esetében jól látható a pozitív

reakció, a sejt-sejt közötti kapcsolatok kirajzolódása. Ezzel szemben **(D)** az E-cadherin csendesített sejteknél még jelerősítéssel is csak nem specifikus jelölés látható. Egység: 50 μ m **(A, B)**, 20 μ m **(C, D)**.

A továbbiakban Western-blottal igazoltuk, hogy az E-cadherin fehérje nem mutatható ki a csendesített sejtvonalban (34. ábra).

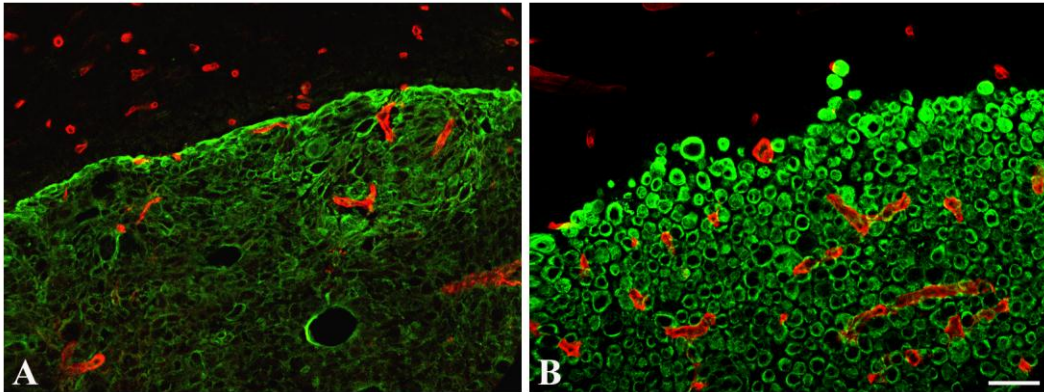


34. ábra: Western-blot. Az E-cadherin különböző méretű fragmentjeit kizárólag a vad típusú sejtekben láthatjuk: 120kDa a teljes E-cadherin, az 50kDa extracelluláris degradációs fragmentet jelöl. Egy 60kDa-os immunreaktív csík szintén látható. Belső kontrollként β -actin-t (45kDa) használtunk.

V.4.2. Az E-cadherin csendesített sejtekkel történő in vivo vizsgálatok

Az E-cadherin fontos szereppel bír a daganatos sejtek inváziós készségének befolyásolásában. Fontos kérdés tehát, hogy az E-cadherin elvesztése milyen hatással van a daganatok növekedésére. Az shRNS-el történő E-cadherin csendesítés stabil konstrukciója a sejtek in vivo viselkedésének vizsgálatára is alkalmas. Az in vivo vizsgálatokhoz létrehozott kísérletes agymetasztázisok mintáiból készített metszeteken immunhisztokémiai jelöléseket végeztünk. A panCK-FITC, laminin kettős jelöléssel a tumorok növekedési mintázatát vizsgáltuk. Eredményeink szerint a HT25 sejtvonal két variánsa között növekedésbeli eltérés figyelhető meg. A vad típusú HT25 sejtek tumorai a korábban is látott ún. „*pushing*” típusú növekedés jellemzőit mutatták. Éles tumor-parenchima határvonal, illetve egymás szoros közelségében növekvő sejtek alkotta tumor látható. Ezzel szemben az E-cadherin csendesített sejtek tumoraiban a sejtek

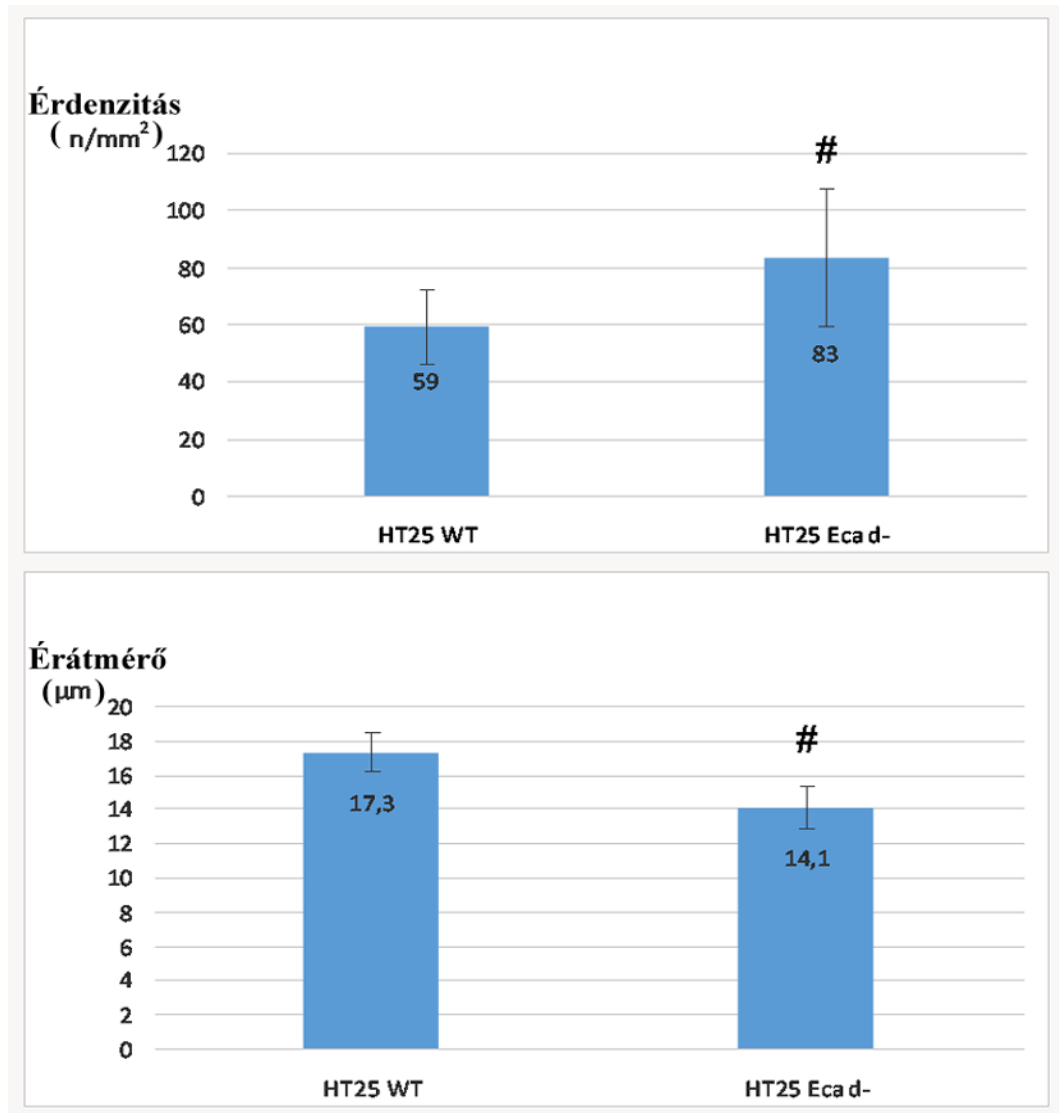
közötti kapcsolat hiánya miatt a tumor fellazult, széli részét, egyesével elhelyezkedő kerek sejtek jellemzik (35. ábra).



35. ábra: Az E-cadherin csendesítés hatása a tumor növekedési mintázatára. (A, B) A tumorsejtek panCK (zöld) és az erek laminin (piros) jelölése. **(A)** A vad típusú HT25 sejtek a korábbinak megfelelő „pushing” típusú tumorokat alakítottak ki éles tumor-parenchima határvonallal. **(B)** Az E-cadherin csendesített sejtek tumoraiban fellazultak a sejt-sejt közötti kapcsolatok, a tumor szélén elszórt, kerek sejtek láthatók. Egység: 50 μ m **(A, B)**.

További vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak, hogy a növekedési mintázat változása mennyiben befolyásolja a tumorok érződésének mértékét. A morfometriai vizsgálatok során az intratumorális érdenzitást és az érátmérőt határoztuk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy az E-cadherin csendesített sejtek tumoraiban szignifikánsan magasabb volt az érdenzitás és alacsonyabb az érátmérő az eredeti sejtvonal tumoraihoz képest ($p \leq 0,05$) (36. ábra).

Az intratumorális ereket alkotó sejtek proliferációs rátája a vad típusú HT25 tumoraiban mértékhez képest ($6,27 \pm 1,05\%$) szignifikánsan ($p \leq 0,05$) alacsonyabb volt az E-cadherin csendesített sejtek tumoraiban ($3,32 \pm 0,79\%$).



36. ábra: Morfometriai analízis a HT25 vad típusú és E-cadherin csendesített tumorokon. Az E-cadherin csendesített sejtek tumoraiban szignifikánsan (#, $p < 0,05$) magasabb volt az érdenzítés és alacsonyabb az érátmérő az eredeti sejtvonal tumoraihoz képest. Az értékek: átlag \pm szórás.

VI. MEGBESZÉLÉS

A primer tumorok, de főleg a metasztázisok kezelése ma is az orvostudomány legnagyobb kihívásai közé tartozik. Az agymetasztázisok a tumoros megbetegedések magas mortalitású, rossz prognózisú csoportjába tartoznak. A daganatos betegek 20-40%-ában jelenik meg agyi metasztázis, ezek között magasabb rizikójú csoportba tartoznak a tüdőben, emlőben levő primer tumorokkal rendelkezők, valamint a melanómás esetek (100). Az agymetasztázis kialakulása során az extravazációt követően a tumorsejtek a kapilláris falának külső oldalához tapadnak, majd proliferálnak (14). Bár az agyi mikrokörnyezetben igen kevés migrációra/letapadásra alkalmas kötőszöveti elem (kollagének, fibronectin) található (101), az agy előnyös hely a tumorok számára, hiszen a vér-agy gát miatt a legtöbb kemoterápiás szer nem jut célhoz. Az ismert alapvető neoangiogenesis formák (bimbózó és intusszuszeptív angiogenesis) kollagén/fibronectin/fibrin tartalmú extracelluláris mátrixot igényelnek, ami amellet, hogy az agy az egyik legsűrűbben kapillarizált szervünk, megkérdőjelezi ezeknek az angiogenesis formáknak a szerepét az agymetasztázisok ereződésében (18).

A megfelelő terápiás eljárások fejlesztéséhez elengedhetetlen a metasztázisok kialakulásának, növekedési folyamatának pontosabb ismerete. Célunk volt tehát, különböző szervi eredetű és differenciáltsági fokú tumorok növekedési mintázatának, érhálózatuk kialakulásának részletes elemzése az agyban.

Ötféle sejtvonal felhasználásával vizsgáltuk meg a kísérletes agymetasztázisok vaszkularizációját. A metasztázisok mérete elérte az 1-2mm-es átmérőt, ami az irodalmi adatok szerint szükséges az angiogenesis megindulásához (2).

Széles körben elfogadott, hogy az agyban is fennállhat olyan állapot (infarktus, trauma következtében meginduló sebgyógyulás), amelynek során angiogenesis játszódik le (79, 80, 102). Angiogenesis emellet tumoros elváltozásokban is leírtak már az agyban (33, 43). Olyan tanulmányokat is találhatunk, melyekben az érdenzítás csökkenését (103, 104), illetve az agydaganatok ér inkorporációval történő vaszkularizációját figyelték meg (8, 105). Azonban ezekben a tanulmányokban a tapasztalt inkorporáció az angiogenesis

gátlása miatti alternatív vaszkularizációs mechanizmusként jelent meg, nem pedig, mint alapmechanizmus. Korábban láthattuk, hogy Holash és mtsai. szerint az inkorporáció csak a tumornövekedés kezdeti szakaszára korlátozódik, ezt szekunder avaszkuláris állapot után robusztus angiogenezis követi (19). Korábbi eredményeink szerint a tumornövekedés későbbi szakaszában sem figyelhető meg új erek képződése májmetasztázisok környezetében (106), valamint a tüdőben (nem publikált adat). Jelen kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált kísérletes agymetasztázisokban, illetve a kontrollként használt sebgyógyulások mintákban nincs morfológiai jele bimbózó vagy intusszusceptív angiogenezisnek. Hiányoznak az angiogenezis alapvető jelei, a peritumorális értágulás, endotélproliferáció és érdenzitás növekedés. Az angiogenezis hiányát bizonyító másik jelenség, hogy a tumorokban az érdenzitás minden esetben kisebb, aminek oka a normál érhálózat tumornövekedés következtében történő „kihígulása”. Angiogenezis helyett tehát a tumorok a meglévő erek bekebelezésével tesznek szert saját vérellátásra. A tumorok erek bekebelezésével való éreződése, mint korábban is láthattuk, más esetekben már ismert jelenség, azonban az erek tumorba való bekerülésének lépései még nem teljesen tisztázottak (107, 108).

Vermeulen és mtsai. (85) által májmetasztázisokban leírt „*pushing*” és „*replacement*” típusúhoz hasonló növekedési formákat figyeltünk meg az agymetasztázisok esetében is. Három fő növekedési típust különítettünk el: (a) „*pushing*”: HT25, C38, HT-1080, (b) átmeneti (karéjzott): H-1650, (c) invazív: ZR-75-1. A növekedési mintázatok morfológiai jellegek (tumor-parenchima határvonal, érdenzitás, érátmérő) alapján különíthetők el. A morfometriai vizsgálatok alapján összefüggés volt a tumorok növekedési mintázata és a vaszkuláris felépítése között. A „*pushing*” típusú növekedésre éles tumor-parenchima határvonal jellemző, ezek a tumorok kevesebb eret inkorporáltak, melyek jobban dilatáltak voltak. Az átmeneti, karéjzott formánál a tumor központi részével kapcsolatban levő invazív sejtesoportokat láthatunk, nagyobb mértékű az erek inkorporációja, és ezek az erek mérsékelten dilatáltak. Az invazív típusra jellemzőek a tumor széli részén egyesével szétszórt sejtek, nagyobb intratumorális érdenzitás. Az erek ebben az esetben is csak mérsékelt dilatációt mutatnak. Ez az eredmény jól korrelált a BrdU inkorporáció alapján mért proliferációs rátával, azaz

a dilatáltabb ereket tartalmazó tumorok mintáiban magasabb volt az ereket alkotó sejtek proliferációja a kevésbé dilatált ereket tartalmazókéhoz képest. A vaszkuláris sejtek proliferációja feltehetően a meglévő erek dilatációjára fordítódott, nem pedig új erek képződésére. Ennek oka pedig a megfelelő mátrix hiányában keresendő. A HT-1080 esetében figyeltük meg azt, hogy a magas proliferáció a másik két „*pushing*” típusú tumorhoz képest kevésbé dilatált erekkel társult. Ebben az esetben a proliferáció az ebben a tumorban megfigyelt intussuszceptív-szerű folyamat sejtzsükségletének fedezésére fordítódott. Az intussuszceptív angiogenezis jele olyan kollagéntartalmú oszlopok megjelenése az érlumenben, melyek növekedése később az érlumen kettéosztódását eredményezi. Ahogy korábban láthattuk, a Burri és mtsai. által leírt modellben a periciták és fibroblasztok nyomóerejének következménye az érfal betüremkedése (23). Azonban a sejtek nyomóerőt kevésbé, inkább húzóerőt képesek kifejteni (12), ami a tumorokban változhat: a tumorsejtek a tumornövekedés során benyomhatják a kapillárisok szemközti falát, ezzel megindítva a lumen kettéosztásának folyamatát.

Paku és mtsai. C38 májmetasztázisokban jellegzetes szerkezetű struktúrák kialakulásáról számoltak be. Ezek egy centrálisan elhelyezkedő, bazális membránnal fedett eret, az azt körülvevő kötőszövetes részt (SMA pozitív sejtek kollagén I-et tartalmazó mátrixba ágyazva), valamint az erre szintetizált, tumorsejt eredetű bazális membránt tartalmazó oszlopok voltak (13). A C38 tumorsejtvonal agymetasztázisaiban azonban ilyen struktúrák nem alakultak ki, ami a kötőszövetet szintetizálni képes sejtek hiányának tudható be az agyparenchimában. C38 tumorokat hoztunk létre szubkután szövetben, bélfalban, valamint tüdőben, és azt tapasztaltuk, hogy a májban talált struktúra mindegyik szövettípus tumorában megjelent (nem publikált adatok). További vizsgálataink során kötőszövetes oszlopokat tartalmazó agymetasztázisokat is találtunk, ezek azonban kizárólag olyan mintákban voltak jelen, melyekben a tumorok elérték az agyfelszínt. Eredményeink szerint a különböző szervekben növekvő C38 tumorok egyforma növekedési mintázata a kötőszöveti elemek tumorsejtek általi aktivációjának eredménye lehet. Az általunk vizsgált ötféle sejtvonal metasztázisaiban intratumorálisan az erek nagyrésze SMA pozitív sejtekkel fedett volt. Feltételezhetően a tumorsejtek kitapadása az erekhez, az erekre mechanikai hatást

fejt ki és erre válaszul a periciták SMA-t expresszálnak, azonban kötőszövetes mátrixot nem termelnek. Az agyban kollagén I. csak az arteriolák falában volt megfigyelhető, intratumorális kollagén depozíció nem történt. Kötőszövetet termelő sejt felszaporodását, kötőszövet termelését tehát nem lehetett megfigyelni sem az agytumorokban, sem pedig sebgyógyulás során. Ez ellentmondásban van azzal a tanulmánnyal, melyben autopsziás esetekben kollagén III. perivaszkuláris jelenlétét figyelték meg a tumorokban (109). A kollagén tartalmú mátrix megjelenésének egyik lehetséges oka, hogy a vizsgált humán tumorok hosszas növekedésük során elérhették azokat a helyeket (agyhártyák), ahol kollagéntermelő sejtek is jelen vannak. Egy másik magyarázat lehet az extracelluláris mátrix nagyobb mennyiségű megjelenésére a periciták leválása az erekről és transzdifferentiációja kollagéntermelő sejtekké (110). Erre utaló jel kísérletesen nem volt megfigyelhető, a periciták az erek felszínéhez közel maradtak, intakt bazális membránnal fedve, ehhez kapcsolódva láthattuk a tumorsejteket.

Korábbi eredmények szerint kísérletes májmetasztázisokban szintén a meglévő erek bekebelezése történik meg. Ennek legfontosabb lépése az endotélsejtek leválasztása bazális membránjukról, illetve a szinuszoidok fúziója a tumor-májszövet határán (111). Az erek környező szövetből történő efféle izolációja az agyban is megfigyelhető volt. Az agytumorokba fokozatosan, a tumornövekedéssel párhuzamosan kerülnek be az erek, az asztrociták tumorsejtek általi leválasztása után. Az agyparenchima megtartottságának mértékét a GFAP immunfluoreszcens jelölésével vizsgáltuk. A „*pushing*” típusú tumorokban a GFAP pozitív asztrocitákat csaknem teljesen kiszorították a tumorsejtek. Az átmeneti formánál intratumorális asztrociták továbbra sem voltak nagy mennyiségben láthatók, de a tumorszéli invazív sejtcsoportok között megfigyelhetőek. Az invazív tumor esetében a tumorsejtcsoportok között mindenhol láthatók asztrociták. A tumorsejtek ebben az esetben is csaknem az összes asztrocitát leválasztják az erekről, de leválasztás után azok nem szorulnak ki a tumorból, így láthatunk intratumorálisan több GFAP pozitív sejtet.

A parenchima erekről történő leválasztásának oka lehet, hogy a tumorsejtek számára az egyedüli megtapadásra alkalmas szubsztrát a kapillárisok bazális membránja (66). A kapcsolódást követően a tumorsejtek a saját bazális

membránjukat szintetizálják az ér bazális membránjára. Eredményeink szerint ez a bazális membrán depozíció folyamatosan, az erek tumorba való bekerülésével párhuzamosan zajlik, tehát a tumor által termelt depozit pontosan addig kimutatható, amilyen mélyen az ér a tumorban helyezkedik el. Ez az újonnan szintetizált bazális membrán laminin5-öt tartalmaz, és a tumorsejtek integrin $\alpha 3$ -al kapcsolódnak hozzá.

Az említett bazális membrán depozíció által a tumorsejtek polarizálódnak/differenciálódnak. Ez a folyamat az emlő karcinóma sejtek esetében a legkifejezettebb. A parenchimában terjedő sejtek az erekkel való kapcsolódást követően differenciált, mirigyszerű struktúrát alakítanak ki integrin $\alpha 3$ és laminin5 bazális, valamint claudin3 és epithelialis membrán antigén (EMA) apikális expressziójával.

A molekuláris biológiai módszerekkel kapott eredményeink szerint az ereket alkotó sejtek proliferációs rátája nem korrelált a tumorsejtekben (in vitro) és a mikrodisszekált intratumorális mintákban (in vivo) mért PDGF-B, VEGF-A és ANG-1 mRNS expressziókkal. A VEGF-A fehérje expressziót vizsgálva sem találtunk összefüggést. Az említett faktorok receptainak mRNS expressziójában viszont növekedést figyeltünk meg az intratumorális területeken az összes tumortípusban. Valószínűsítjük tehát, hogy az angiogén faktorok szerepe az új erek képződése helyett a meglévő erek tágulásának, valamint a tágult erek stabilizációjának elősegítésében rejlik. Ennek megfelelően az intratumorális receptor expressziók növekedése kapcsolatba hozható a PDGF-B és Ang-1 érstabilizáló hatásával (112).

Az anti-angiogén terápiák jósolta nagy előrelépés csak kis részben valósult meg. A fentiek szerint ennek az oka lehet, hogy azok a feltételek, melyekre alapozzák ezeket a terápiákat, bizonyos tumorokban nem teljesülnek: vizsgálataink azt mutatják, hogy nincs angiogenezis, és csupán az intratumorális angiogén faktor receptor szintek magasak. Így a VEGF/PDGF jelátvitel gátlása nem feltétlenül vezet az intratumorális erek destabilizációjához. Ezt támasztja alá az is, hogy különböző kezelésekkel ugyan sikeresen növelték az átlagos túlélési időt, de ezt a késleltetést követően a tumorok sok esetben újra progressziót mutattak (113). A kezelések ilyen értelemben vett kudarcának felvetésünkön kívül több oka lehet.

Feltételezték a tumorok anti-angiogén terápiához való adaptációját, rezisztencia kialakulását, az angiogenezist gátló terápiák hatására alternatív útvonalakon történő vaszkularizációs mechanizmusok használatát (114).

Korábban esett szó a tumorok növekedési mintázata és a vaszkularizáció jellege közötti összefüggésről. Már Pezzella (18, 115) és Vermeulen (85) tanulmányaiban is láthattunk utalást arra, hogy a növekedési mintázat meghatározhatja a vaszkuláris struktúrát. A különböző növekedési típusok kialakulásának oka tisztázatlan. Vizsgálataink szerint a mintázatot a környezetüket befolyásoló képességük révén elsősorban maguk a tumorsejtek határozzák meg. Az erek bekebelezésének mértéke függhet a tumor differenciáltságától. Ennek megfelelően a jól differenciált HT25 sejtvonal „*pushing*” növekedési típust mutat, míg tumor szélén, a parenchimában szétszórt differenciálatlan sejteket tartalmazó ZR-75-1 tumorai invazív növekedésűek. A növekedési mintázat és a differenciáció közötti kapcsolat részletesebb vizsgálatára E-cadherin csendesítéssel létrehoztuk egy differenciált sejtvonal (HT25) más differenciáltsági fokú változatát. Így megvizsgálhattuk, hogy a növekedési mintázatban megfigyelt különbség a tumorsejtek sajátosságaiból, vagy a tumor differenciáltsági fokából ered. Már *in vitro* azt tapasztaltuk, hogy az E-cadherin elvesztését követően a sejtek lekerekedtek, és szétszórtan, egymáshoz nem kapcsolódva növekedtek. Az shRNS-el történő stabil E-cadherin csendesítés lehetővé tette az *in vivo* vizsgálatokat is. A fent említett eredményeknek megfelelően a kevésbé differenciált tumorok (E-cadherin csendesített) széli részükön szétszórt, kerek sejteket tartalmaztak. A vad típusú HT25 tumorokban mért érdenzitáshoz képest az E-cadherin csendesített tumorokban mért nagyobb érdenzitás intenzívebb inkorporációra utal. Ennek megfelelően az érátmérő az E-cadherin csendesített tumorokban alacsonyabb volt. Az ereket alkotó sejtek proliferációs rátája is alacsonyabbnak bizonyult, ami alátámasztja korábbi felvetésünket, mely szerint az intenzívebb bekebelezés nem teszi szükségessé az erek tágulásával történő felületnövelést. Összességében tehát azt mondhatjuk, hogy a tumor differenciáltsági foka összefüggésben van az ereződés mértékével és az intratumorális erek proliferációs rátájával. Az ugyanazon sejt két különböző változatának vizsgálatával kapott eredmények szignifikánsnak bizonyultak, de az eredmények között a vártnál kisebb mértékű volt a különbség. A

tumor szélén elhelyezkedő sejtek morfológiája (lekerekedett, gömb alakú sejtforma) a nyúlványok hiánya miatt nem felel meg az invazív, migráló sejt morfológiájának (116,117). Az invazív tumorsejtek a migráció során különböző integrineken keresztül (118) kapcsolódnak a kötőszöveti mátrixhoz és jellegzetes elnyúlt formát vesznek fel. Az agyban megfigyelt gömb alak kialakulásának oka az lehet, hogy az asztrociták és idegsejtek nem szubsztrátjai a tumorsejteknek, így azok a kollagén és fibronektin tartalmú mátrix hiányában nem képesek a környező szövetrel adhezív kontaktus kialakítására. Ennek megfelelően morfológiai szempontból az invazív fenotípus a ZR-75-1 sejteknél sem jelent meg, így a sejtalakból a HT25 E-cadherin csendesített sejtek agytumorainál sem látható egyértelműen, hogy a tumorsejtek invazívabbá váltak-e. Az erek inkorporációjának emelkedése azonban azt mutatja, hogy a csendesített sejtvonal nagyobb mértékben képes az asztrociták leválasztására az erekről, ami mégis az invazív képesség valamilyen szintű emelkedésére utal. Eredményeink tehát alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, hogy az E-cadherin elvesztése ugyan egy alacsonyabb differenciáltsági fok elérését eredményezi, de még nem elegendő az invazív jelleg kialakításához (119). Ezt alátámasztja az a tanulmány is, melyben transzgen egereken vizsgálták az E-cadherin elvesztésének következményeit, és azt találták, hogy prekancerózus léziók megjelenését indukálja, azonban nem elegendő a malignus transzformációhoz (120). Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a TWIST-1 transzkripciós faktornak fontos szerepe lehet az invazív forma kialakításában (96, 121, 122). Emlőrákokban kimutatták, hogy a magas TWIST-1 expresszió az infiltratív tumorokra jellemző, E-cadherin elvesztése mellett (122). Az E-cadherin expresszió szabályozása mellett a TWIST-1 az AKT-2 kináz aktivitásának növelésével a migráció elősegítésében is szerepet játszhat (122, 123). A jelátviteli utak komplexitását mutatja az a megfigyelés is, mely szerint a TWIST-1 felülregulációja volt megfigyelhető E-cadherin elvesztését követően. Eszerint bizonyos esetekben az E-cadherin elvesztése saját represszorainak indukciójával járhat. Így ez egy öngerjesztő szignalizációs hurok, mely stabilizálhatja, és fenntarthatja az EMT által indukált mezenchimális állapotot (96). További terveink között szerepel a HT25 sejtvonal két változatának további módosítása: TWIST-1 szekvenciát tartalmazó plazmid vektor transzfekciója, stabil transzfektánsok

létrehozása után monoklonális tenyészetek indítása a TWIST-1 hatásainak in vitro és in vivo vizsgálatára.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A vizsgált kísérletes agymetasztázisok környezetében nem figyelhető meg bimbózó angiogenezis, a tumorok a meglévő erek bekebelezésével tettek szert saját vérellátásra.
2. A tumorszerkezet vizsgálata során három növekedési típust különítettünk el: „*pushing*”, átmeneti (karéjzott) és invazív forma.
3. Az agymetasztázisok intratumorális érdenzitása összefüggést mutatott a tumorok növekedési mintázatával. A kompakt szerkezetű differenciáltabb tumorok kevesebb eret inkorporáltak, mint a lazább szerkezetű differenciálatlanabb tumorok. Az intratumorális erek átmérője és a vaszkuláris sejtek proliferációja fordított arányú összefüggést mutatott az érdenzitással.
4. Eredményeink szerint nincs korreláció az erek proliferációs rátája és a VEGF-A mRNS-, illetve fehérje-, valamint a PDGF-B, és ANG-1 mRNS expressziók között. A PDGFR- β , TIE-2 és VEGFR-2 mRNS expressziója az intratumorális területeken az összes tumortípusban növekedett, mely arra utal, hogy a vizsgált faktorok nem az érképződésben, hanem inkább az intratumorális erek stabilizációjában játszanak szerepet.
5. A tumorok differenciáltsági foka szoros összefüggésben van a kialakított növekedési mintázattal. Ugyanazon sejtvonal alacsonyabb differenciáltsági fokú változatának tumoraiban a magasabb érdenzítés a vaszkuláris sejtek alacsonyabb proliferációs rátájával, és alacsonyabb érátmérővel párosul.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A legtöbb irodalmi adat szerint az angiogenezis elengedhetetlen a primer tumorok, valamint a metasztázisok növekedésének fenntartásához. Munkánk során 5 különböző szöveti eredetű sejtvonal kísérletes agymetasztázisaiban vizsgáltuk a vaszkularizáció folyamatát. Angiogenezisre utaló jelet nem figyeltünk meg a peritumorális zónában, a tumorok a meglévő erek bekebelezésével tettek szert saját vérellátásra. Az érdenzitás alacsonyabb, az érátmérő és az ereket alkotó sejtek proliferációja magasabb volt az intratumorális területeken mindegyik tumorban. Összefüggést figyeltünk meg a kialakított növekedési mintázat, valamint a vaszkularizáció között. A kevesebb eret bekebelező „pushing” típusú tumorokban nagyobb érátmérő, és az endotélsejtek és periciták magasabb proliferációs rátája volt megfigyelhető a többi tumorhoz képest. Az erek megtartották normál struktúrájukat, miközben a felszínükről a tumorsejtek leválasztották az asztrócitákat. A tumorok a pericitákkal együtt kebelezték be az ereket. A HT-1080 tumorokban intusszuszeptív angiogenezisre utaló struktúrákat figyeltünk meg, melyek kialakulását kötőszövetet termelő sejtek hiányában a tumorsejtek indukálták. A növekedési mintázat és a vaszkularizáció közötti összefüggés pontosabb megismeréséhez a HT25, és E-cadherin csendesített HT25 sejtekkel végeztünk vizsgálatokat. Az E-cadherin csendesítés önmagában nem elegendő az invazív forma eléréséhez. Az eredményeink a különböző eredetű és differenciáltsági fokú tumorokkal végzett kísérletekkel összhangban azt mutatják, hogy ugyanazon sejtvonal alacsonyabb differenciáltsági fokú képviselője által alkotott tumorokban a magasabb érdenzitás alacsonyabb érátmérővel és az ereket alkotó sejtek alacsonyabb proliferációjával párosul. A tumor differenciáltsági foka tehát szorosan összefügg a kialakított növekedési mintázattal és az intratumorális vaszkuláris struktúrával.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285:1182-6.
2. Folkman J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 82:4-6.
3. Folkman J, Ingber D. (1992) Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 3:89-96.
4. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. (2013) Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*, 123:3190-200. doi: 10.1172/JCI70212. Epub 2013 Aug 1.
5. Gerstner ER, Batchelor TT. (2012) Antiangiogenic therapy for glioblastoma. *Cancer J*, 18:45-50. doi: 10.1097/PPO.0b013e3182431c6f.
6. Borgelt B, Gelber R, Kramer S, Brady LW, Chang CH, Davis LW, Perez CA, Hendrickson FR. (1980) The palliation of brain metastases: final results of the first two studies by the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 6:1-9.
7. Lin NU. (2014) Targeted therapies in brain metastases. *Curr Treat Options Neurol*, 16:276. doi: 10.1007/s11940-013-0276-z.
8. Leenders WP, Küsters B, Verrijp K, Maass C, Wesseling P, Heerschap A, Ruitter D, Ryan A, de Waal R. (2004) Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin Cancer Res*, 10:6222-30.
9. Coomber BL, Yu JL, Fathers KE, Plumb C, Rak JW. (2003) Angiogenesis and the role of epigenetics in metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 20:215-27.
10. Fidler IJ. (2001) Angiogenic heterogeneity: regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, 93:1040-1.
11. Hlushchuk R, Riesterer O, Baum O, Wood J, Gruber G, Pruschy M, Djonov V. (2008) Tumor recovery by angiogenic switch from sprouting to intussusceptive angiogenesis after treatment with PTK787/ZK222584 or ionizing radiation. *Am J Pathol*, 173:1173-85.
12. Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. (2011) A new mechanism for pillar formation during tumor-

- induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*, 179:1573-85.
13. Paku S, Kopper L, Nagy P. (2005) Development of the vasculature in "pushing-type" liver metastases of an experimental colorectal cancer. *Int J Cancer*, 115:893-902.
 14. Döme B, Tímár J, Paku S. (2003) A novel concept of glomeruloid body formation in experimental cerebral metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62:655-61.
 15. Monsky WL, Mouta Carreira C, Tsuzuki Y, Gohongi T, Fukumura D, Jain RK. (2002) Role of host microenvironment in angiogenesis and microvascular functions in human breast cancer xenografts: mammary fat pad versus cranial tumors. *Clin Cancer Res*, 8:1008-13.
 16. Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC, Simpson JG. (1987) Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol*, 151:323-32.
 17. Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J. (2002) Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol*, 197:355-62.
 18. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F. (1997) Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*, 151:1417-23.
 19. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284:1994-8.
 20. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170:1-15.
 21. Ausprunk DH, Folkman J. (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 14:53-65.

22. Paku S, Paweletz N. (1991) First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab Invest*, 65:334-46.
23. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. (2004) Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*, 231:474-88.
24. Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, Feng D, Eckelhoefer IA, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. (2001) Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am J Pathol*, 158:1145-60.
25. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. (2010) Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*, 36:321-31.
26. Andrew J. Maniotis, Robert Folberg, Angela Hess, Elisabeth A. Seftor, Lynn M.G. Gardner, Jacob Pe'er, Jeffrey M. Trent, Paul S. Meltzer, Mary J. C. Hendrix. (1999) Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry *Am J Pathol*, 155:739-52.
27. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. (2003) Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, 22:6549-56.
28. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. (1991) Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med*, 174:1275-8.
29. Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM. (1992) Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest*, 67:596-607.
30. Ferrara N, Davis-Smyth T. (1997) The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev*, 18:4-25.
31. Mattern J, Koomägi R, Volm M. (1996) Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer*; 73:931-4.

32. Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA, Gurina OI. (2013) VEGF in tumor progression and targeted therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 13:423-43.
33. Kim LS, Huang S, Lu W, Lev DC, Price JE. (2004) Vascular endothelial growth factor expression promotes the growth of breast cancer brain metastases in nude mice. *Clin Exp Metastasis*, 21:107-18.
34. Pietras K, Sjöblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A. (2003) PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*, 3:439-43.
35. Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE. (2000) Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull*, 51:363-9.
36. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. (2003) Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest*, 112:1142-51.
37. Heldin CH. (2013) Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*, 11:97. doi: 10.1186/1478-811X-11-97.
38. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. (2003) Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*, 111:1287-95.
39. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. (1998) Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282:468-71.
40. Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY. (1999) Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res*, 58:224-37.
41. Ahmad SA, Liu W, Jung YD, Fan F, Wilson M, Reinmuth N, Shaheen RM, Bucana CD, Ellis LM. (2001) The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res*, 61:1255-9.
42. Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD, Ellis LM: (2003) Angiopoietin-1 Inhibits Vascular Permeability, Angiogenesis, and Growth of Hepatic Colon Cancer Tumors. *Cancer Res*, 63:3370-7.

43. Machein MR, Knedla A, Knoth R, Wagner S, Neuschl E, Plate KH. (2004) Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model. *Am J Pathol*, 165:1557-70.
44. Kaminska B, Wesolowska A, Danilkiewicz M. (2005) TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis. *Acta Biochim Pol*, 52:329-37.
45. Pardali E, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. (2009) *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14:4848-61.
46. Beck L Jr, D'Amore PA. (1997) Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J*, 11:365-73.
47. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:7297-301.
48. Lawler PR, Lawler J. (2012) Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2:a006627. doi: 10.1101/cshperspect.a006627.
49. Norioka K, Mitaka T, Mochizuki Y, Hara M, Kawagoe M, Nakamura H. (1994) Interaction of interleukin-1 and interferon-gamma on fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Jpn J Cancer Res*, 85:522-9.
50. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126:677-89.
51. Lutolf MP, Gilbert PM, Blau HM. (2009) Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*, 462:433-41.
52. Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, Sacco A, Leonardi NA, Kraft P, Nguyen NK, Thrun S, Lutolf MP, Blau HM. (2010) Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*, 329:1078-81.
53. Lu P, Weaver VM, Werb Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196:395-406.
54. Ton NC, Jayson GC. (2004) Resistance to anti-VEGF agents. *Curr Pharm Des*, 10:51-64.

55. Nicosia RF, Bonanno E, Smith M. (1993) Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*, 154:654-61.
56. Ambesi A, McKeown-Longo PJ. (2009) Anastellin, the angiostatic fibronectin peptide, is a selective inhibitor of lysophospholipid signaling. *Mol Cancer Res*, 7:255-65.
57. Iruela-Arispe ML, Hasselaar P, Sage H. (1991) Differential expression of extracellular proteins is correlated with angiogenesis in vitro. *Lab Invest*, 64:174-86
58. Fouser L, Iruela-Arispe L, Bornstein P, Sage EH, (1991) Transcriptional activity of the alpha 1(I)-collagen promoter is correlated with the formation of capillary-like structures by endothelial cells in vitro. *J Biol Chem*, 266:18345-51.
59. Mott JD, Werb Z. (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*, 16:558-64.
60. Kumar, Vinay, Cotran, Ramzi S, Robbins, Stanley L. Robbins Basic Pathology, 7th Edition, Elsevier-Health Sciences Divisio, (2002) ISBN: 0721692745
61. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. (2000) Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 5:40-6.
62. Dvorak HF. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315:1650-9.
63. Dvorak HF, Form DM, Manseau EJ, Smith BD. (1984) Pathogenesis of desmoplasia. I. Immunofluorescence identification and localization of some structural proteins of line 1 and line 10 guinea pig tumors and of healing wounds. *J Natl Cancer Inst*, 73:1195-205.
64. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF. (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev*, 12:303-24.
65. Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. (2008) Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*, 130:635-53.

66. Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R. (2009) The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS One*, 4:e5857. doi: 10.1371/journal.pone.0005857.
67. Sheppard AM, Brunstrom JE, Thornton TN, Gerfen RW, Broekelmann TJ, McDonald JA, Pearlman AL. (1995) Neuronal production of fibronectin in the cerebral cortex during migration and layer formation is unique to specific cortical domains. *Dev Biol*, 172:504-18.
68. Einheber S, Schnapp LM, Salzer JL, Cappiello ZB, Milner TA. (1996) Regional and ultrastructural distribution of the alpha 8 integrin subunit in developing and adult rat brain suggests a role in synaptic function. *J Comp Neurol*, 370:105-34
69. Ruoslahti E. (1996) Brain extracellular matrix. *Glycobiology*, 6:489-92.
70. Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. (2004) Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, 36:1046-69.
71. Mäenpää A, Kovanen PE, Paetau A, Jääskeläinen J, Timonen T. (1997) Lymphocyte adhesion molecule ligands and extracellular matrix proteins in gliomas and normal brain: expression of VCAM-1 in gliomas. 94:216-25.
72. Liesi P. (1992) Neuronal migration on laminin involves neuronal contact formation followed by nuclear movement inside a preformed process. *Exp Neurol*, 117:103-13.
73. Wagner S, Gardner H. (2000) Modes of regulation of laminin-5 production by rat astrocytes. *Neurosci Lett*, 284:105-8.
74. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science; (2002) ISBN-978-0-8153-4105-5.
75. Erickson AC, Couchman JR. (2000) Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem*, 48:1291-306.
76. Risau W, Esser S, Engelhardt B. (1998) Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol Biol (Paris)*, 46:171-5.
77. Benarroch EE. (2012) Blood-brain barrier: recent developments and clinical correlations. *Neurology*, 78:1268-76.

78. Fazakas C, Wilhelm I, Nagyoszi P, Farkas AE, Haskó J, Molnár J, Bauer H, Bauer HC, Ayaydin F, Dung NT, Siklós L, Krizbai IA. (2011) Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One*, 6:e20758. doi: 10.1371/journal.pone.0020758. Epub Jun 2.
79. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 25:1794-8.
80. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*, 111:1843-51.
81. Takano S. (2012) Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. *Brain Tumor Pathol*, 29:73-86.
82. Stiver SI, Tan X, Brown LF, Hedley-Whyte ET, Dvorak HF. (2004) VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. Aug;63(8):841-55.
83. Gerstner ER, Chen PJ, Wen PY, Jain RK, Batchelor TT, Sorensen G. (2010) Infiltrative patterns of glioblastoma spread detected via diffusion MRI after treatment with cediranib. *Neuro Oncol*, 12:466-72.
84. de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, Piao Y, Eterovic K, Ji Y, Conrad CA. (2010) Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol*, 12:233-42.
85. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, Goovaerts G, Dirix LY, Van Marck E. (2001) Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol*, 195:336-42.
86. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, Maekawa K, Katsurada Y, Nakamura T, Mochizuki H, Yamamoto J, Hase K. (2012) New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*, 36:193-201.

87. Nakashima H, Hashimoto N, Aoyama D, Kohnoh T, Sakamoto K, Kusunose M, Imaizumi K, Takeyama Y, Sato M, Kawabe T, Hasegawa Y. (2012) Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Mol Carcinog*, 51:400-10.
88. Thiery JP, Sleeman JP. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7:131-42.
89. Takeichi M. (1977) Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol*, 75:464-74.
90. van Roy F, Berx G. (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65:3756-88.
91. Pećina-Slaus N. (2003) Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*, 3:17.
92. Birchmeier W, Behrens J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1198:11-26.
93. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. (1998) A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392:190-3.
94. Derksen PW, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, van Beijnum JR, Griffioen AW, Vink J, Krimpenfort P, Peterse JL, Cardiff RD, Berns A, Jonkers J. (2006) Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell*, 10:437-49.
95. Kang Y, Massagué J. (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118:277-9.
96. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, 68:3645-54.
97. Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L, Yang J. (2011) Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell*, 19:372-86.

98. Takeichi M. (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, 5:806-11.
99. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97:512-23.
100. Franceschi E, Scopece L, Gori S, Chiari R, Crino L. (2006) Primary and metastatic brain tumors. *Forum (Genova)*.;14(1):E2.
101. Novak U, Kaye AH. (2000) Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci*, 7:280-90.
102. Yu SW, Friedman B, Cheng Q, Lyden PD. (2007) Stroke-evoked angiogenesis results in a transient population of microvessels. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27:755-63.
103. Salhia B, Angelov L, Roncari L, Wu X, Shannon P, Guha A. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neoangiogenesis. *Brain Res*, 883:87-97.
104. Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD, Groothuis DR. (1999) Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc Res*, 58:312-28.
105. Küsters B, Leenders WP, Wesseling P, Smits D, Verrijp K, Ruiter DJ, Peters JP, van Der Kogel AJ, de Waal RM. (2002) Vascular endothelial growth factor-A(165) induces progression of melanoma brain metastases without induction of sprouting angiogenesis. *Cancer Res*, 62:341-5.
106. Dezso K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Paku S. (2009) Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol*, 175:835-43.
107. Eichler AF, Chung E, Kodack DP, Loeffler JS, Fukumura D, Jain RK. (2011) The biology of brain metastases-translation to new therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, 8:344-56.
108. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. (2007) Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*, 8:610-22.
109. Nakanishi H, Hosoda S, Takahashi Y, Goto S, Tamura J. (1989) Alteration of tumour cell arrangement related to connective tissue stroma in metastatic

- brain tumours. Histological and immunohistochemical studies of 68 autopsy cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 414:485-95.
- 110.** Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B, Rubin K. (1996) Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab Invest*, 74:452-66.
- 111.** Paku S, Lapis K. (1993) Morphological aspects of angiogenesis in experimental liver metastases. *Am J Pathol*, 143:926-36.
- 112.** Wakui S, Yokoo K, Muto T, Suzuki Y, Takahashi H, Furusato M, Hano H, Endou H, Kanai Y. (2006) Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis. *Lab Invest*, 86:1172-84.
- 113.** Kim WY, Lee HY. (2009) Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: mechanism and therapeutic intervention in brain tumors. *FEBS J*, 276:4653-64.
- 114.** Wong ET, Brem S. (2008) Antiangiogenesis treatment for glioblastoma multiforme: challenges and opportunities. *J Natl Compr Canc Netw*, 6:515-22.
- 115.** Sardari Nia P, Colpaert C, Vermeulen P, Weyler J, Pezzella F, Van Schil P, Van Marck E. (2008) Different growth patterns of non-small cell lung cancer represent distinct biologic subtypes. *Ann Thorac Surg*, 85:395-405.
- 116.** Friedl P, Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3:362-74.
- 117.** Geraldo S, Simon A, Elkhatib N, Louvard D, Fetler L, Vignjevic DM. (2012) Do cancer cells have distinct adhesions in 3D collagen matrices and in vivo? *Eur J Cell Biol*, 91:930-7.
- 118.** Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. (2006) Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119:3901-3.
- 119.** De Craene B, Berx G. (2013) Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 13:97-110.
- 120.** Mimata A, Fukamachi H, Eishi Y, Yuasa Y. (2011) Loss of E-cadherin in mouse gastric epithelial cells induces signet ring-like cells, a possible precursor lesion of diffuse gastric cancer. *Cancer Sci*, 102:942-50.

- 121.** Childs G, Segall JE. (2012) Twists and turns of invasion. *Nat Cell Biol*, 14:337-9.
- 122.** Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117:927-39.
- 123.** Cheng GZ, Zhang W, Wang LH. (2008) Regulation of cancer cell survival, migration, and invasion by Twist: AKT2 comes to interplay. *Cancer Res*, 68:957-60.

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

X.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Dezso K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Paku S. (2009) Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol*, 175:835-43.
2. Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. (2011) A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*, 179:1573-85.
3. Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, László V, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Klepetko W, Döme B, Paku S. (2011) Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70:979-91.

X.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. Turányi E, Dezso K, Bugyik E, Szurián K, Paku S, Nagy P. (2010) The primary mitogen (TCPOBOP)-induced hepatocyte proliferation is resistant to transforming growth factor- β -1 inhibition. *Liver Int*, 30:1505-10.
2. Bugyik E, Szende B. (2011) [Dr. Antal Genersich M. D. and the "Spis -- then and now"]. *Orv Hetil*, 152:236-7.
3. Bugyik E, Dezso K, Turányi E, Szurián K, Paku S, Nagy P. (2012) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene induces substantial hyperplasia in fibrotic mouse liver. *Int J Exp Pathol*, 93:125-9.
4. Dezső K, Papp V, Bugyik E, Hegyesi H, Sáfrány G, Bődör C, Nagy P, Paku S. (2012) Structural analysis of oval-cell-mediated liver regeneration in rats. *Hepatology*, 56:1457-67.
5. Hajósi-Kalcakosz S, Dezső K, Bugyik E, Bődör C, Paku S, Pávai Z, Halász J, Schlachter K, Schaff Z, Nagy P. (2012) Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is a reliable immunohistochemical marker to differentiate malignant and benign hepatic tumors. *Diagn Pathol*, 7:86.

6. Papp V, Rókus A, Dezső K, Bugyik E, Szabó V, Pávai Z, Paku S, Nagy P. (2014) Expansion of hepatic stem cell compartment boosts liver regeneration. *Stem Cells Dev*, 23:56-65.

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik segítségemre voltak PhD munkám során.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Paku Sándornak, akihez bármikor bizalommal fordulhattam, köszönöm a gyakorlati, és elméleti munkában nyújtott segítségét, támogatását, útmutató tanácsait.

Köszönöm Prof. Dr. Matolcsy András igazgató úrnak, hogy lehetővé tette, és támogatta kutatásaimat az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben. Köszönöm a Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskola volt, és jelenlegi vezetőjének, Prof. Dr. Kopper Lászlónak, és Prof. Dr. Kovalszky Ilonának ösztöndíjas éveim alatti nagylelkű támogatását.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Nagy Péternek a szakmai támogatásért, a májregeneráció témájában folyó színvonalas kutatásaiban való részvétel lehetőségéért. Köszönet illeti Dr. Dezső Katalint, aki szakmailag és barátilag is mellettem állt, nélkülözhetetlen segítséget nyújtott metodikai ismereteim bővítésében, szakmai fejlődésemben. Szabó Vanesszának köszönöm, hogy bizalmat, barátságot adott nekem a szakmai- és magánéletben, nap mint nap étellel töltötte meg a labort, kitartóan vizsgálta velem az angiogenezis rejtelmét.

Köszönöm az állatház munkatársainak, Sztodola Andrásnak, Borza Alexandra Mónikának az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott pótolhatatlan segítségüket, odaadó munkájukat.

Köszönöm Csorba Gézáné Marica lelkiismeretes munkáját, hogy mindig segített rajtam, legyen szó sejtekről, vagy bármi másról.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkaközösségének, különösen a hematopatológiai labor, valamint a molekuláris diagnosztikai labor valamennyi munkatársának, végtelen segítőkészségükért, mellyel sokszor megkönnyítették feladataim elvégzését, elősegítették munkám eredményességét. Külön köszönet illeti Dr. Zalatnai Attilát, amiért készséggel elvállalta a házi opponensi feladatkört.

Köszönetemet fejezem ki munkacsoportunk nélkülözhetetlen tagjainak, Dr. Tóvári Józsefnek, és Dr. Döme Balázsnak, valamint munkatársaiknak, akik folyamatosan segítettek munkám előrehaladását.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika, Sejtanalitika Laboratórium munkatársainak -különös tekintettel Kalmár Alexandrára- segítségét, akik nélkül nem tudtuk volna megvalósítani a lézer mikrodisszekciós vizsgálatokat.

Végezetül hálás köszönettel tartozom Családom minden tagjának, akik végtelen támogatással, odaadásukkal lehetővé tették, hogy az egyetem után is nyugodt körülmények között folytassam tanulmányaimat, és benyújthassam doktori értekezésemet.