

A modulált elektro-hipertermia által indukált daganatkárosodás mechanizmusa C26 colorectalis tumor modellekben

Doktori tézisek

Vancsik Tamás

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Krenács Tibor, D.Sc., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Kenessey István, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Csonka Tamás, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kiss András, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Glasz Tibor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. László Lajos, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

1. Bevezetés

A modulált elektro-hipertermia (mEHT: másnéven „oncothermia”) egy nem-invazív komplementer kezelés a kemo- és radioterápiákhoz. Az mEHT 13.56 MHz-es rádiófrekvenciával létrehozott elektromágneses teret generál, amely azonnal képes penetrálni a daganatokba, ahol 42°C-on limitált hőmérsékleten hősokk- és stresszválaszt indukál a sejtekben. Az elektromos mező vélhetően a sejtmembránok lipid-raftjaival és receptormolekuláival is interaktál. Az mEHT tumor-szelektivitása a daganatok normálhoz szövetekhez viszonyított magasabb glükózfelvételén (az FDG-PET CT módszerhez is felhasználják), glükolízisén (Warburg effektus), extracelluláris ion-koncentrációján, valamint vezetőképességén alapul.

A loko-regionális mEHT kezelés kemo- és sugárterápiával való kombinációját már gliómák, lágyrész szarkómák, méhnyak, colorectalis és emlő daganatok esetében is alkalmazták. Az mEHT terápiákat több ország társadalombiztosítása is támogatja, ilyenek pl.: Németország, Svájc, Olaszország, Kanada, Dél-Korea és Japán. A módszer daganat-károsító hatásmechanizmusa és molekuláris háttere azonban nem teljesen tisztázott, így ezek jobb megértése érdekében *in vitro* és *in vivo* modelleket állítottunk be.

A C26 egér eredetű agresszív colorectalis adenocarcinoma sejtvonalat választottuk az mEHT tanulmányozására, mivel a colorectalis tumorok világszerte a legsúlyosabb malignitások közé tartoznak. Évente több mint 1,2 millió új beteget jegyeznek, és még távoli áttétek hiányában is a műtéti eltávolítás után az esetek legalább 50%-ban relapszus történik. Sajnos azonban a diagnózis időpontjában már a páciensek 20%-ában találhatóak metasztázisok. Bár az 5 éves túlélés a lokalizált daganatokkal rendelkezőknél 90% feletti, ez hirtelen lecsökken 12% alá azokban a betegekben, akikben a tumorok áttétet adtak.

A doktori értekezés munkájában C26 sejtvonalon vizsgáltuk az mEHT hatására létrejövő sejt stresszt, apoptózist és sérülés-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP) molekuláris hátterét. *In vitro* modellen kombináltuk az mEHT-t doxorubicin kezeléssel (Dox), egy antraciklin anti-tumor antibiotikummal, amelyet gyakran használnak első-vonalbeli kemoterápiaként. A tumorokat mind a proliferáló sejtek DNS hibajavításának gátlásán, mind pedig reaktív oxigéngyök képzés révén képes károsítani, bár használata a kardiotoxicitás veszélyét hordozza. A kombinált alkalmazás célja volt, hogy a Dox tumor-ellenes hatását segítse, ami lehetővé tenné a készítmény alacsonyabb koncentrációban való használatát és a mellékhatások csökkentését.

Az mEHT-val való előkezelésről leírták, hogy elősegíti a tumor-antigénnel aktivált dendritikus sejtekkel végzett immunterápiát, amely támogatja a T-sejt, makrofág és eozinofil

leukocita inváziót a daganatokba. Ezért a C26 allograft modellen teszteltük az mEHT lehetséges immun promótáló hatását, amely a távoli tumorok károsodásához is hozzájárulhat.

Az mEHT hatás-mechanizmusának jobb megértése segítheti a kemo- és sugár-terápiákkal, esetleg célzott onkoterápiákkal való hatékonyabb kombinációk megtervezését.

2. Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki az mEHT indukált tumor-károsodás molekuláris háttér-mechanizmusának vizsgálatát C26 colorectalis adenocarcinoma sejtvonalon, tekintettel:

- Az mEHT által kiváltott sejt-stresszre és –halálra *in vitro*.
- A doxorubicin önmagában és mEHT-val kombinált tumorsejt-pusztító hatására *in vitro*.
- Az mEHT indukált sejt-stresszre és programozott sejthalálra immunkompetens BALB/c egerek C26 tumor allograftjaiban.
- Az *in vitro* és *in vivo* modellek kompatibilitására.
- A DAMP jelátviteli molekulák tér és időbeli expressziójára a loko-regionális mEHT kezelést kapott tumorokban.
- Az immunsejtek megjelenésére a kezelt tumorokban és azok körül, valamint ezek kapcsolatára a daganat-károsodásra, azaz az mEHT szisztémás tumor-ellenes hatására.

3. Módszerek

Sejt tenyésztés: Az *in vitro* és *in vivo* kísérleti modellekhez egyaránt C26 egér colorectalis adenocarcinoma sejtvonalat használtunk.

***In vitro* doxorubicin és modulált elektro-hipertermia kezelések:** A fedőlemezekre növesztett szubkonfluens sejtkultúrákat 2x30 percig, 120 perc szünettel, 42°C-os mEHT-val kezeltük két párhuzamos kondenzorlemez között egy Lab-EHY 100 készülékkel. A második kezelés után a sejtenyészeteket friss médiumba helyeztük, ami kombinált kezelés esetén a 1 µM doxorubicint is tartalmazott (Dox+mEHT). Az mEHT-val nem kezelt kontrol tenyészetek is friss médiumba kerültek, míg a doxorubicin monoterápia (Dox) esetén ugyancsak 1 µM doxorubicint adtunk a tápközeghez.

qRT-PCR: Az mRNS mintákat 1, 3, 9, 24 órával az mEHT kezelés után kivontuk és kvantitatív RT-PCR segítségével mértük az RpLp0 (háztartási gén), PUMA, BAX, BAK1, XIAP, BCL-2, BCL-XL és P21 célgének expresszióját. A vizsgált géntermékek mennyiségét az RpLp0-hoz viszonyított szorzófaktorként adtuk meg, amelyet $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszerrel definiáltunk.

Életképesség és doxorubicin felvétel mérések: A resazurin-rezorufin konverzió alapuló viabilitás méréseket 24 és 48 órával a kezelések után hajtottuk végre. A Dox felvétel meghatározásához 24 órával az mEHT kezelés után mintákat gyűjtöttünk a sejtenyészetek médiumából és fluoreszcens intenzitásukat 530/590 és 570/590 nm (excitációs/emissziós) szűrőpárok segítségével fluoriméteren mértük.

Apoptotózis-nekrózis arány meghatározása: 24 órával a kezelést követően a felülúszók és a sejt kultúrák begyűjtésre kerültek. Az apoptotikus és nekrotikus frakció azonosítására FITC-Annexin V (zöld) és propidium-jodid (piros) jelölést használtunk, majd a mintákat áramlásos sejtszámlálóval analizáltuk.

Sejtciklus és szubG₁ frakció analízis: A sejtciklusban bekövetkezett változásokat és az apoptózis terminációjának vizsgálatát egyaránt propidium-jodid festéssel és áramlásos sejtszámlálóval végeztük.

Polarizált membrán festés: A mitokondriális membrán-integritás méréséhez 3,3'-dihexiloxakarbocianin jodid (DiOC₆) festés nyomán áramlásos sejtszámlálót használtunk.

Immunfestés áramlásos sejtszámláláshoz: 24 órával az mEHT kezelést követően a felülúszókat és a sejteket begyűjtöttük, majd Bürker-kamrában számoltuk. A sejtek paraformaldehides fixálását és permeabilizálását Alexa Fluor® 488 konjugált nyúl monoklonális foszfo-Akt^{Ser473}, konjugátlan hasított kaszpáz-8^{Asp387} vagy foszfo-p53^{Ser15} ellenanyagokkal történő immunjelölés követett. A fluoreszcensen nem jelölt ellenanyagokat Alexa Fluor 488® konjugált nyúl IgG antitesttel detektáltuk. A negatív kontrollokon elsődleges immunjelölés nem volt.

Immuncitokémia, hematoxin-eozin festés és képanalízis: Paraformaldehid-fixált és permeabilizált sejt kultúrákon hematoxin-eozin és immunfestés történt a következő célfehérjékre: kalretikulin, hasított kaszpáz-3, Hsp70, foszfo-H2AX^{Ser139} és p53. A detekcióhoz immunfluoreszcenciát és kromogén reakciót használtunk. A fedőlemezre növesztett kultúrákat tárgylemezre fedtük, majd digitalizáltuk a Quant center szoftverrel végzett kiértékeléshez.

Kolóniaképző próba: 24 órával a kezelések után 6 lyukú szövettenyésztő edényekre ültettük 500 sejt/lyuk sűrűséggel a kultúrákat, majd további 10 napig növesztettük, majd fixálás és kristály-ibolya festést követően leszámoltuk a tumor-progenitor kolóniákat.

In vivo tumor modell: Immunkompetens 6 hetes nőtény BALB/c egerek mindkét femorális régiójába 0,1 ml térfogatban 10⁶ C26 sejtet szubkután injektáltunk. 2 hét múlva a szimmetrikusan elhelyezkedő tumorok átmérője elérte a kezelésekhez megfelelő hozzávetőlegesen 1,5 cm-t.

In vivo modulált elektro-hipertermiával és Marsdenia tenacissima extraktummal (MTE) való kezelés: A szimmetrikus C26 allograftok közül a jobb lábon elhelyezkedő

tumorok két párhuzamos elektromos kondenzátorlemez (elektród) által közrefogva egyszeri mEHT kezelést kaptak (mEHT_{jobb}). A bal láb tumorjai szolgáltak kezeletlen endogén kontrollként (mEHT_{bal}) és a szisztémás hatás vizsgálatának alapjául. Az mEHT_{jobb} intratumorális hőmérsékletét optikai hőszenzorral mértük és 42±0.5°C-os hőmérsékleten temperáltuk. A felső elektród alatti rész szubkután hőmérséklete kb. 40°C és a rektális hőmérséklet kb. 37°C volt a kezelések alatt. A klorogénsavban gazdag Marsdenia tenacissima növény extraktumáról (MTE) kimutatták, hogy növeli a tumorok kemo-szenzitivitását és elősegíti a T-sejt aktivációt. Az MTE-kezelt állatok 7.5 ml/kg MTE-t kaptak intraperitoneálisan. Az mEHT+MTE kombinált terápiát kapott állatoknál az MTE beadása 30 perccel követte az mEHT kezelést (ezen állatok mEHT kezeletlen és kezelt tumorai rendre: mEHT+MTE_{bal} és mEHT+MTE_{jobb}). Az ál-kezelésben részesült kontroll állatoknál reprodukáltuk az mEHT csoport kísérletes körülményeit azzal a különbséggel, hogy az elektromos kör kikapcsolt állapotban volt. A tumormintákat a kezeléseket követően a 12, 24, 48 és 72 óra múlva terminált állatokból gyűjtöttük be, melyeket formalinban fixáltunk, dehidratáltuk és paraffinba ágyasztuk.

Immunhisztokémia és TUNEL próba: Mind a teljes keresztmetszetek mind pedig a szöveti multiblokkokból (TMA) készült metszeteket felhasználtuk immunhisztokémiai vizsgálatokra a következő célfehérjék vizsgálatára: AIF, Bax, kalretikulin, CD3, hasított kaszpáz-3, hasított kaszpáz-8, citokróm-c, FoxP3, HMGB1, Hsp70, S100. A metszeteket digitalizáltuk és a Quant center szoftver moduljaival elemeztük.

Tumor károsodás mérése: A tumorok teljes keresztmetszetein hematoxin-eozin festést végeztünk majd digitális metszeteiken a színintenzitás alapján a daganatszövet teljes („whole”: W) és károsodott („damaged”: D) területének arányában kalkuláltuk a tumor destrukciós rátát (TDR=W/D).

Statisztikák: Az *in vitro* eredmények parametrikus értékeinek statisztikai analíziséhez független két-mintás t-tesztet használtunk a Microsoft Excel software Analysis ToolPak bővítménye segítségével. A nem-parametrikus változókhoz a Kuskal-Wallis teszt mellé páros összehasonlításra a Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk. Az *in vivo* kísérletek adataihoz nem-parametrikus analízist használtunk, majd Dunn post hoc tesztet Bonferroni korrekcióval.

4. Eredmények

4.1. *In vitro* mEHT monoterápia

Szub-konfluens C26 sejtkultúrákon 24 órával a 2x30 perces mEHT (42°C) kezelést követően a kalretikulin expressziója és membrán-relokalizációja az endoplazmás retikulumból szignifikánsan megemelkedett, továbbá a membránok hólyagosodása is megfigyelhető volt. Az erős Hsp70 pozitív festődést mutató sejtek száma is jelentősen megnőtt. A hasított kaszpáz-8 pozitív sejtfrakció medián intenzitása szignifikánsan megemelkedett, míg az intakt mitokondriális membránok jelölésére alkalmas polarizált membrán-festék, a DiOC6 fluoreszcens erőssége szignifikánsan csökkent az mEHT után.

Az mEHT monoterápia nagymértékű csökkenést okozott az anti-apoptotikus BCL-2, BCL-XL és XIAP mRNS szintekben 1 és 3 órával a kezelés után, míg a pro-apoptotikus BAX ugyancsak mérsékelte, de tartós emelkedést mutatott 1 és 9 óránál. A pro-apoptotikus PUMA és ciklin-függő kináz inhibitor P21 transzkripciója ugyancsak szignifikánsan megnőtt 1, 3 és 9 órával a kezelés után. Ezeket a változásokat a kezelt kultúrákban a hasított/aktivált kaszpáz-3 pozitív tumorsejtek denzitásának emelkedése kísérte.

A kolóniaképző próba segítségével megfigyeltük, hogy a tumor ősz/progenitor sejtekből formálódó kolóniák száma szignifikánsan csökkent az mEHT monoterápia után.

4.2. *In vitro* doxorubicin kezelés mEHT-val kombinálva

24 órával az mEHT-t követően a sejtek kontrollhoz viszonyított relatív életképessége 87.35±6.36%-ra csökkent, míg a Dox kezelés után 56.92±2.62%-ra és a kombinált protokoll nyomán 25.00±3.31%-ra redukálódott. 48 órával a kezeléseket után a sejt-viabilitás tovább csökkent 78.82±5.84%-ra az mEHT esetén, 29.06±1.89%-ra a Dox esetén és 13.17±2.48%-ra a kombinált kezelés után. A túlélő sejtek száma korrelált a resazurin próbával.

Az mEHT Dox-al való kombinációja a sejtenyészetek felülúszójában 0.70±0.07-szeres csökkenést okozott a doxorubicin koncentrációjában a Dox monoterápiához képest, ami a drog fokozott felvételére utalt.

A Dox 1 µM koncentrációban egyedül és mEHT-val kombinálva is a tumor progenitor kolóniák teljes eltűnését okozta.

A sejt-túléléshez köthető Akt kináz aktivációját a foszfo-Akt^{Ser473} pozitív sejt-frakcióval kvantitáltuk, amely erős csökkenő tendenciát mutatott mind az mEHT mind pedig a Dox+mEHT kezeléseket követően a kontrollhoz és a Dox-hoz képest. Ugyanekkor az aktivált tumor-szupresszor foszfo-p53^{Ser15} protein pozitív sejtpopulációk szignifikánsan megnövekedtek mindegyik kezelést követően. Ezekben a mintákban immuncitokémia

segítségével több olyan sejt volt megfigyelhető, amelyekben a p53 fehérje nuklerális transzlokációt mutatott, ez pedig a p53 funkcionális aktivációjára utalt.

Az mEHT monoterápia szignifikánsan megnövelte az apoptotikus sejtfrakció méretét ($14.53 \pm 2.99\%$) a kezeletlen kontroll kultúrákhoz képest ($1.94 \pm 0.36\%$). A Dox kezelés azonban nem okozott szignifikáns változást ($2.31 \pm 0.73\%$). Ez a megfigyelés összefüggésben állt azzal, hogy az mEHT+Dox kezelés hasonló változást okozott az apoptotikus sejtpopuláció arányában ($16.67 \pm 3.69\%$), mint az mEHT monoterápia. Nekrotikus sejtfrakciót a kontroll tenyészetekben is detektáltunk ($6.24 \pm 2.64\%$), amely nagyobb mértékben növekedett a Dox kezelés hatására ($11.18 \pm 1.50\%$), mint az mEHT ($9.84 \pm 1.25\%$) után és ez kumulálódott a kombinált kezelés hatására ($20.63 \pm 11.36\%$).

Az apoptózishoz köthető subG₁-fázisban detektálható fragmentált DNS tartalmú sejtfrakció $1.92 \pm 0.16\%$ -ról szignifikánsan megemelkedett $16.47 \pm 1.64\%$ -ra az mEHT, $3.13 \pm 0.94\%$ -ra a Dox és $17.27 \pm 2.99\%$ -ra a kombinált mEHT+Dox kezeléseket után. A DNS duplaszálú töréseket a sejtmagban, a megnövekedett intenzitású H2AX γ immunreakció indikálta, amely mind az mEHT monoterápia mind pedig a kombinált mEHT+Dox kezelés esetén kimutatható volt.

A G₁-fázist mutató sejtek mennyisége szignifikánsan csökkent az mEHT, a Dox és az mEHT+Dox kezeléseket után is. Az S-fázisban detektált sejtpopulációk mérete csak a Dox kezelést követően csökkent, míg a G₂-ben lévők minden kezelés hatására megnövekedtek, ezek közül is leginkább a Dox csoportban. Az mEHT+Dox kezelés G₂ értékei a monoterápiák egyedi eredményei közé estek.

4.3. Lokális mEHT és szisztémás MTE kezelés *in vivo*

A kezeléseket követő 24-72 óra után a TDR szignifikánsan magasabb volt az mEHT-kezelt (mEHT_{jobb}) tumorokban, mint a kezeletlen oldalon (mEHT_{bal}), vagy a kontrollokbán. Ugyanekkor a kombinált terápia (mEHT+MTE) nemcsak a kezelt oldalon (mEHT+MTE_{jobb}), hanem a kezeletlen oldal (mEHT+MTE_{bal}) tumorjaiban is károsodást okozott. Az MTE adása önmagában elhanyagolható hatást fejtett ki.

A sejtmagi kromatin-kondenzáció és az apoptotikus testek nagy kiterjedésben való megjelenése 24 órával mEHT kezelést követően a programozott sejthalált indikálta. Ezt a fragmentált DNS-tartalmú TUNEL pozitív sejtmagok detektálása is alátámasztotta, melyek számában szignifikáns emelkedést figyeltünk meg az mEHT_{jobb}, valamint az mEHT+MTE_{jobb} és mEHT+MTE_{bal} tumorokban a kontrollokhöz és az mEHT_{bal}-hoz képest.

12-24 órával a kezelést követően az mEHT a Bax és citokróm c fehérjék mitokondriumokból a citoplazmába történő felszabadulását okozta a kezelt (mEHT_{jobb}) tumorokban mind a mono-, mind pedig a kombinált kezelést kapott állatokban is. A 48 és 72

órák időpontokban a kombinált kezelés után az mEHT-t nem kapott tumorokban (mEHT+MTE_{bal}) a citokróm c szintén delokalizálódik. A kaszpáz-független apoptózis egyik mediátora, az AIF semelyik terápia esetén sem mutatott releváns nukleáris transzlokációt, azonban 12 órával a kezeléseket követően a hasított/aktivált kaszpáz-3 pozitív sejtek számában lényeges emelkedést figyeltünk meg. A daganatok apoptotikus és sérült/ép határterületein a hasított kaszpáz-8, kaszpáz-3 és TUNEL pozitív sejtfrakció jelentős átfedést mutatott a 48-72 órák időpontokban. Ezek a megfigyelések az intrinszik és extrinszik kaszpáz-függő apoptotikus útvonalak aktivációját támogatják. Továbbá, a kezelés után azon tumorsejtek magjaiban, melyek az apoptózisnak csak enyhe morfológiai jeleit is mutatták, a Ki67 proliferációs marker expressziója teljesen leállt.

4.4. Az mEHT és MTE kezelések hatására megjelenő stressz- és sérülés-asszociált molekuláris mintázatok *in vivo*

12 órával a kezeléseket követően masszív kalretikulin relokalizáció volt megfigyelhető a citoplazmából a sejtmembránba, amely szignifikánsan erősebb volt az mEHT_{jobb} tumorokban, mint az mEHT_{bal}-ban, valamint az mEHT+MTE_{jobb} és mEHT+MTE_{bal}-ban is jelentősebb volt, mint az mEHT_{bal} vagy kontroll allograftokban. Ezt a Hsp70 expressziójának és sejtmembránba való akkumulációjának jelentős emelkedése követte az mEHT-kezelt csoportokban, amely 48 óránál tetőzött. Statisztikailag jelentős különbségeket detektáltunk az mEHT_{jobb} és mEHT_{bal} között; valamint mind az mEHT+MTE_{jobb} és mEHT+MTE_{bal} is szignifikánsan magasabb értéket mutatott az mEHT_{bal} vagy kontroll tumoroknál. A kezelés után 48 órával a HMGB1 fehérje sejtmagból citoplazmába való felszabadulása, valamint a károsodott területeken való teljes eltűnése szignifikánsan jelentősebb volt az mEHT_{jobb}, mEHT+MTE_{jobb}, mEHT+MTE_{bal} tumorokban, mint a kontrollok és az mEHT_{bal} eseteiben.

4.4. mEHT és MTE indukált immunválasz *in vivo*

A DAMP jelátviteli elemek megjelenése az S100 pozitív antigénprezentáló sejtek markáns tumor infiltrációjával párosult 48 órával a kezelést követően. Ez szignifikánsan magasabb volt az mEHT_{jobb}, mint az mEHT_{bal} vagy a kontroll tumorokban; továbbá az mEHT+MTE_{jobb}-ban a kontrollokhoz képest. Ugyancsak jelentősen magasabb volt a CD3 pozitív T-sejtek száma az mEHT_{jobb} és mEHT+MTE_{jobb} tumorok intakt területein 72 óránál az mEHT_{bal} és kontroll graftokhoz képest. Az antigénprezentáló- és T-sejt-invázió mértéke közel szignifikánsan megemelkedett tendenciát mutatott az mEHT+MTE_{bal} és kontroll tumorok között. Az ép és a sérült tumor-területek közt elhelyezkedő határ-régióban masszív T-sejt infiltrációs gyűrű volt

látható, azonban a FoxP3 pozitív regulátoros T-sejtek száma elhanyagolhatóan alacsony maradt az összes kísérleti csoportban.

5. Következtetések

Az mEHT kezelés szignifikáns tumor-károsodást okozott *in vitro* és *in vivo*. Ez együtt járt az anti-apoptotikus XIAP, BCL-2 és BCL-XL mRNS szintek korai csökkenésével, valamint a pro-apoptotikus BAX és PUMA megemelkedésével *in vitro*. Az aktivált kaszpáz-8 és -3 fehérjék expressziója megnőtt, miközben a polarizált membrán-festék DiOC6 intenzitása csökkent, mindez pedig az extrinszik és intrinszik apoptózis indukciójaként értelmezhető. A foszfo-p53^{Ser15} és p21^{waf1} fehérjék fokozott expressziója mellett az mEHT kezelés szignifikáns mennyiségű DNS-kettőtörést okozott, amit H2AX γ marker nukleáris halmozódása jelzett. Az előbbiekkal összefüggésben állt a sejtciklus leállása (szeneszcencia) és a tumor-sejt kolóniák számának csökkenése. Ugyancsak *in vitro*, az mEHT apoptózist indukált, míg a doxorubicin (Dox) kezelés nekrozist. Az mEHT azonban serkentette a Dox-felvételét a sejtekbe és így a kombinált alkalmazás közel szinergikus módon csökkentette a tumorsejtek életképességét. Az olyan sérülés-asszociált molekuláris mintázat (DAMP) fehérjék felszabadulása, mint a Hsp70, kalretikulin és HMGB1 hozzájárulhat az immunogén sejthalálhoz (ICD) *in vivo*. Ezzel összhangban állt, hogy az egyszeri mEHT kezelés progresszív tumor-károsodáshoz és a CD3+ T-sejtek (elhanyagolható mennyiségű FoxP3+ regulátoros T-sejt jelenlétében) és az S100+ antigénprezentáló dendritikus sejtek akkumulációjához vezetett. Vélhetően immun-mediált tumor-pusztulás volt megfigyelhető a lokális mEHT kezelést nem kapott ellenoldali tumorban is, amennyiben az mEHT-t a magas klorogénsav-tartalmú T-sejt promótáló MTE ágenssel kombinálva alkalmaztuk, ez pedig az mEHT kezelés szisztémás anti-tumor hatására utal.

Következtetésként vontuk le, hogy önmagában az mEHT kezelés mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* DNS-kettőtöréseket és irreverzibilis sejt-stresszt okozott, ami kaszpáz-függő apoptózishoz és sérülés-asszociált DAMP fehérjék felszabadulásához vezetett a C26-os colorectalis carcinoma modellekben. Az *in vitro* eredmények alapján a p21^{waf1}-mediált növekedés-gátlást és apoptózist vélhetően a sejtmagban megemelkedett mennyiségű p53 indukálta. A megnőtt foszfo-p53^{Ser15} hozzájárulhatott az mdm2 által gátolt p53 készlet aktiválódásához is. Az mEHT potenciózta a doxorubicin felvételét a tumor-sejtekbe és annak citotoxikus hatását. *In vivo*, az egy alkalommal adott mEHT progrediáló apoptózist okozott a tumorokban, amivel párhuzamosan megnövekedett a daganatok immunsejt infiltrációja. Az antigénprezentáló dendritikus és T-sejtek felhalmozódása valószínűleg az immunogén sejthalál útvonalán keresztül hozzájárul mind a lokális, mind pedig a távoli allograftokban az

időben folytonos másodlagos tumor-károsodáshoz. Az mEHT tumor-ellenes hatásmechanizmusának tisztázása segítheti a humán onkoterápiák racionálisabb megtervezését.

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Vancsik T, Kovago C, Kiss E, Papp E, Forika G, Benyo Z, Meggyeshazi N, Krenacs T. Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts. *Journal of Cancer*. 2018;9(1):41-53. IF: 3.182

Vancsik T, Forika G, Balogh A, Kiss E, Krenacs T. Modulated electro-hyperthermia (mEHT) induced p53 driven apoptosis and cell cycle arrest additively support doxorubicin chemotherapy of colorectal cancer in vitro. *Cancer Medicine*. 2019;00:1–12. IF: 3.357

Egyéb publikációk

Rajnai H, Teleki I, Kiszner G, Meggyeshazi N, Balla P, Vancsik T, Muzes Gy, Csomor J, Matolcsy A, Krenacs T. Connexin 43 communication channels in follicular dendritic cell development and in follicular lymphomas. *Journal of immunology research*. 2015;2015:528098. IF: 2.812

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Dr. Krenács Tibornak, hogy lehetőséget nyújtott a laboratóriumában dolgoznom és a mindenkori támogatásért a munkámban.

Köszönöm Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy az intézetében dolgozhattam és Dr. Kovalszky Ilona professzor asszonynak, hogy a Patológiai Tudományok Doktori Iskolában tanulhattam.

Nagyon hálás vagyok Parsch Editnek† és Mátrainé Balogh Évának a labormunkában nyújtott kiváló technikai támogatásért és Sztodola Andrásnak az állatkísérletekben való segítségért. Továbbá, köszönöm Csorba Gézáné Maricának† és Dankó Titanillának a sejtenyészőben való munkám támogatását.

Köszönöm minden korábbi és jelenlegi munkatársamnak: Kiss Évának, Fórika Gertrúdnak, Meggyesházi Nórának, Balla Péternek, Füleki Lillának a sok segítséget és a barátságos légkört, továbbá Dr. Kővágó Csabának, aki segített és útbaigazított az állatkísérletek első lépéseinél és Papp Edinának az adatelemzésekben nyújtott munkájáért.

Köszönettel tartozom Dr. Barna Gábornak és Szabó Orsinak a türelmükért, tanításaikért és hogy dolgozhattam az áramlások citometriai laboratóriumában.

Köszönettel tartozom Dr. Benyó Zoltán professzor úrnak a motiváló hozzáállásáért és hogy lehetőséget biztosított az együttműködésre a Klinikai Kísérleti Kutató Intézettel, továbbá Balogh Andreának az *in vitro* tanulmányokhoz nyújtott iránymutatásért és értékes tanácsokért.

Szeretném megköszönni az I.sz. Patológiai Intézet minden tagjának, akik bármiben hozzájárultak az itt végzett munkámhoz.

Hálás vagyok Dr. Szász András professzor úrnak, hogy a témámat illető professzionális tanácsokkal látott el.

Végezetül, őszintén köszönöm szeretett családomnak és barátaimnak, akik stabil háttérrel és motivációt adtak a munkához.