

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az inzulin rezisztencia hatása a citosztatikumok okozta csontvelőtoxicitásra obez és inzulinrezisztens állatmodellekben

Géresi Krisztina

Témavezető: Dr. Benkő Ilona



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS.....	7
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	25
4.1. Kísérleti állatok:	25
4.2. Humán minták:	25
4.3. JY sejtvonal:	26
4.4. UD29:	26
4.5. Vegyszerek:	26
4.6. Biológiai minták:	27
4.6.1. Csontvelő szuszpenziók kinyerése	27
4.6.1.1. Csontvelő minták kinyerése egerekből:	27
4.6.1.2. Human csontvelő minták kinyerése:	27
4.6.1.3. Csontvelő minták kinyerése patkányokból:	27
4.7. Kolóniastimuláló faktorforrások:	28
4.7.1. WEHI-3B sejtvonal fenntartása.....	28
4.7.2. WEHI-3B kondicionált médium készítése.....	28
4.7.3. Fitohemagglutininnel stimulált humán leukocyta kondicionált médium (PHA-LCM) készítése:.....	28
4.8. A vércukorszintek és a plazma inzulinszintek meghatározása.....	28
4.9. Elhízott, inzulinrezisztens <i>db/db</i> egereken és kontroll párjaikon végzett vizsgálatok:	29
4.10. Wistar, Goto-Kakizaki és Zucker patkányokon végzett vizsgálatok:.....	30
4.11. UD29 anti-proliferatív hatásának és toxicitásának vizsgálata <i>in vivo</i> és <i>in vitro</i> kísérletekben: ..	32
4.12. Statisztikai kiértékelés	34
5. EREDMÉNYEK.....	35
5.1. <i>Db/db</i> egereken végzett vizsgálatok eredményei:	35

5.1.1. A testsúly, a vércukorszint és a plazma inzulin szintjeinek összehasonlítása elhízott, inzulinrezisztens <i>db/db</i> egerekben és kontroll párjaikban.....	35
5.1.2. A csontvelői cellularitás és a GM-CFU kolóniaszám összehasonlítása elhízott, inzulinrezisztens <i>db/db</i> egerekben és kontroll párjaikban normál tenyésztési feltételek között ...	36
5.1.3. A csontvelői cellularitás, a GM-CFU kolóniaszám és a teljes femorális GM-CFU tartalom <i>db/db</i> egerekben és kontroll párjaikban egyszeri, nagy dózisú carboplatin beadása után.....	37
5.1.4. A fehérvérsejtszám és az abszolút neutrophil szám változása a perifériás vérben egyszeri, nagy dózisú carboplatin beadása után <i>db/db</i> egerekben és kontroll párjaikban	39
5.1.5. <i>In vitro</i> a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége elhízott <i>db/db</i> egerekben és kontroll párjaikban	40
5.2. A három különböző patkánytörzsön végzett vizsgálatok eredményei:	42
5.2.1. A csontvelő funkciói a kontroll Wistar, az elhízott, inzulinrezisztens Zucker, nem elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányokban normál tenyésztési feltételek között, citosztatikumok jelenléte nélkül	42
5.2.2. <i>In vitro</i> a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége elhízott, inzulinrezisztens Zucker és a kontroll, Wistar patkányokban.....	43
5.2.3. Inzulínérzékenység meghatározás Wistar, Goto-Kakizaki és Zucker patkányokban.....	45
5.2.4. <i>In vitro</i> a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki és a kontroll, Wistar patkányokban.....	46
5.2.5. Roziglitazon előkezelés hatása a Goto-Kakizaki patkányok inzulínérzékenységére	48
5.2.6. <i>In vitro</i> a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége Goto-Kakizaki és roziglitazonnal előkezelt Goto-Kakizaki patkányokban	48
5.2.7. <i>In vitro</i> a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége kezeletlen Wistar és roziglitazonnal előkezelt Wistar patkányokban	50
5.3. UD29 mononukleotiddal végzett vizsgálatok eredményei:.....	52
5.3.1. Az UD29 mononukleotid hatása <i>in vitro</i> JY sejtvonal stem sejtjeinek kolóniaképző képességére.....	52
5.3.2. Az UD29 mononukleotid hatása <i>in vitro</i> egészséges humán GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességére	52
5.3.3. Az UD29 mononukleotid hatása <i>in vivo</i> SCID egerekben megtapadt JY leukémia sejtvonal kolóniaképző képességére	53
5.3.3.1. UD29 hatása a femorális csontvelő össz-sejttartalmára JY tumor sejtrel transzplantált és JY-sejtrel nem transzplantált SCID egerekben	53

5.3.3.2. UD29 hatása a leukémia stem sejtek előfordulási gyakoriságára, JY-sejttel transzplantált SCID egerekben, és a JY sejtet nem kapott csoportok normál GM-CFU kolóniaszámára	54
5.3.3.3. UD29 hatása a femorális csontvelő teljes leukémia stem sejt tartalmára és a csontvelő GM-CFU tartalmára a JY tumor sejtet nem transzplantált SCID egerekben	55
5.3.4. <i>In vitro</i> UD29 mononukleotid hatása a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) kolóniaképző képességére elhízott, inzulinrezisztens <i>db/db</i> egerekben és kontroll párjaikban.....	56
6. MEGBESZÉLÉS	58
7. ÖSSZEFOGLALÁS	67
8. IRODALOMJEGYZÉK	69
9. TÁRGYSZAVAK	81
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	82
11. FÜGGELÉK	83

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC-transzporterek: *ATP-binding cassette transporters*; ATP-kötő kazetta transzporterek

ADA: *adenosine deaminase*; adenzin-deamináz

AGE: *advanced glycation end product*; előrehaladott glikációs végtermék

ALL: akut limfoid leukémia

AML: akut mieloid leukémia

ANSZ: *absolute neutrophil count*; abszolút neutrofil számtól

BMI: *Body Mass Index*; testtömeg index

BSA: *body surface area*; testfelszín nagysága

CD4: *cluster of differentiation*

CLL: krónikus limfoid leukémia

CML: krónikus mieloid leukémia

DEKK: Debreceni Egyetem Klinikai Központ

FBS: *Foetal Bovine Serum*, újszülött marha vérsavó

FFA: *free fatty acid*; szabad zsírsav

FFM: *fat-free mass*; zsírszövet-mentes testtömeg

FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer

GM-CFU: *Granulocyte-Macrophage Colony Forming Unit*; granulocita-makrofág kolóniaképző egység

G-CSF: *granulocyte colony stimulating factor*; granulocita kolóniastimuláló faktor

gp120: glikoprotein120

HIV: Human immunodeficiency vírus

IBW: *ideal body weight*; idealizált testtömeg

IGF: *insulin like growth factor*; inzulin-szerű növekedési faktor

IGFBP: *insulin-like growth factor binding protein*; IGF-1-kötő fehérje

IL-6: interleukin-6

LIF: *leukocyte inhibitory factor*, leukocita gátló faktor

LPS: *lipopolysaccharides*, lipopoliszacharidok

MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*; monocita-kemotaktikus protein-1

MIP-1: *macrophag inflammatory protein-1*; makrofág-inflammatorikus protein-1

NIDDM: *non-insulin dependent diabetes mellitus*; nem-inzulinfüggő cukorbetegség

PBS: *phosphate buffered saline*, foszfát pufferelt só

PDI: protein-diszulfid-izomeráz

RAGE: *receptor for advanced glycation endproducts*; előrehaladott glikációs végtermék receptora

PNP: *purine nucleoside phosphorylase*; purin-nukleozid-foszforiláz

RIA: radio immuno assay

RIST: rapid insulin sensitivity test, gyors inzulinérzékenység vizsgálat

SCID: *severe combined immunodeficiency*, súlyos kombinált immundeficiencia

SHBG: *sexual hormon binding globulin*; nemi hormon-kötő globulin

TBW: *total body weight*; teljes testtömeg

TNF-alfa: Tumor Nekrózis Faktor-alfa

TTI: testtömeg index

UD29: 4-tio-uridin monofoszfát

VEGF: *vascular endothelial growth factor*; endotél-eredetű növekedési faktor

WBC: *white blood cells*, fehérvérsejtek

WHO: *World Health Organization*, Egészségügyi Világszervezet

5-FU: 5-fluorouracil

1. BEVEZETÉS

Az elhízás korunk egyik legjelentősebb népegészségügyi problémájának tekinthető. Jelenlegi adatok szerint körülbelül 1 milliárd ember túlsúlyos és legalább 310 millió súlyosan elhízott. Az Amerikai Egyesült Államokban 1980-ban 14,5%-os volt a klinikailag elhízottaknak tekinthető egyének száma, 1994-ben ez a szám már 22,5%-ra emelkedett (Taubes 1998). Az USA-n kívül is hasonló növekedésről számoltak be, például az Egyesült Királyságban ugyanezen idő alatt 6%-ról 15%-ra emelkedett az elhízás gyakorisága. Hasonló a helyzet a világ számos más országában is. Ma a fejlett ipari országokban az elhízottak aránya 15–25% között mozog (Haidar és Cosman 2011). Az elhízás alapvető befolyással bír az életminőségünkre és az élettartamunkra. Az obezitás nem önmagában káros, hanem a legfőbb veszélye abban rejlik, hogy hajlamosít több súlyos betegségre. Az elhízás szinte valamennyi szervrendszerben kóros folyamatokat indít be (Ogden és mtsai. 2007).

A rosszindulatú daganatos megbetegedések a szív- és érrendszeri kórképekkel együtt világszerte vezető halálteki tényezők (az Egészségügyi Világszervezet adatai alapján). Mindkét betegségcsoport kialakulása multikauzális, így a genetikai háttér mellett, számos környezeti tényező is szerepet játszik létrejöttükben. Az utóbbi években figyeltek fel arra, hogy összefüggés van a karcinogenezis és bizonyos kóros metabolikus folyamatok között. Gyarapodnak a bizonyítékok azzal kapcsolatban, hogy a 2-es típusú diabetes mellitus és a metabolikus szindróma, valamint számos malignus megbetegedés kialakulása között szoros ok-okozati kapcsolat van (Ceschi és mtsai. 2007). A daganatos megbetegedések halálozása magas, körülbelül a betegeket 50%-át veszítjük el 5 éven belül, így a malignus betegségek a modern társadalmak halálozási listáján, a kardiovaszkuláris betegségek mögött, a második helyet foglalják el. A magas halálozási ráta a szövődményeknek köszönhető, elsősorban a neutropéniás időszakban kialakuló infekciók tehetők felelőssé érte. Ez a daganatos betegségek vezető halálteki. A csontvelőtoxicitás, a kemo- és radioterápia legsúlyosabb, dózislimitáló mellékhatása (Puhalla és mtsai. 2012; Mac Manus és mtsai. 1997). A kemoterápiás kezelésben részt vevő betegek 60-70%-ában jelentkezik myelotoxicitás. A betegek 40%-ában az életet veszélyeztető neutropéniával találkozunk, a csontvelő vérképzésének károsodása miatt. A neutropénia miatt a kemoterápiás szerek dózisát és a kezelési ciklusok számát csökkenteni kell, ami a terápia hatékonyságának csökkenéséhez vezethet (Sinkó 2011).

Mindezek a myeloprotektív mechanizmusok vizsgálatának fontosságát, és myeloprotektív hatású anyagok klinikai gyakorlatban való alkalmazásának szükségességét mutatják.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatok során, új hatásmechanizmusú myeloprotektív anyagok kutatása közben, igazolta, hogy a roziglitazon, egy inzulin-érzékenyítő vegyület, képes mérsékelni az 5-fluorouracil nevű citosztatikum csontvelőkárosító hatását (Benkő és mtsai. 2003). A későbbiekben bebizonyosodott, hogy ebben az inzulinérzékenyítő mechanizmusoknak van szerepe (Djazayeri és mtsai. 2005; 2006). Az inzulin vérképzésben betöltött szerepét korábban nem vizsgálták, ugyanis az inzulin hemopoézisre gyakorolt hatását az élő szervezetben számos tényező elfedi, akár helyettesítheti is, azonban a csontvelőt ért károsodás során a szerepe felértékelődhet, és túlélési szignált jelenthet a csontvelőben lévő őssejtek számára. Ha a hemopoetikus őssejtek számára az inzulin hatásának amplifikálása segíti őket a toxikus hatások kivédésében, elképzelhető, hogy az inzulin rezisztenciával járó kórállapotok kedvezőtlenül befolyásolhatják a regenerációs kapacitásukat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkánk során arra kerestünk válaszokat, hogy az obesitas és az elhízáshoz leggyakrabban társult anyagcserezavar, az inzulin rezisztencia hogyan befolyásolja a csontvelői vérképzést fiziológias körülmények között és befolyásolja-e a carboplatin a citosztatikumok myelotoxicitását, *in vivo*.
2. A továbbiakban vizsgáltuk, hogy az ismert farmakokinetikai eltéréseken kívül, farmakodinamias különbségek lehetnek-e a klasszikus citosztatikumok toxicitásában, vannak-e a célsejtek működésében eltérések obesitasban vagy inzulin rezisztens állapotokban
3. Arra is kerestük a válaszokat munkánk során, hogy az ismert inzulinérzékenyítő vegyület, a roziglitazon, befolyásolja-e a vérképzést normál testsúlyú állatok, illetve elhízott és inzulinrezisztens vagy sovány, de inzulin rezisztens állatmodellekben. Az inzulin rezisztencia rendezésével javítható-e az esetleges csontvelő károsodás mértéke daganatellenes kemoterápia során?
4. új hatásmechanizmusú daganatellenes szerek kutatása, melyek myelotoxicitása a klasszikus citosztatikumokéhoz viszonyítva esetleg kisebb elhízott betegekben
5. az UD29 (4-tio-uridin-monofoszfát) hatásainak vizsgálata human akut limfocitás leukémia állatmodellben, SCID egerekben *in vivo*
6. az UD29 terápiás indexének meghatározása a csontvelő granulocita-makrofág progenitor sejteire gyakorolt toxicitást vizsgálva.
7. az UD29 toxikus hatásainak összehasonlítása obez *db/db* egerek és sovány kontroll párjaik csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtei esetében.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az elhízás a 21. század egyik legnagyobb egészségügyi kihívása és többé már nem tekinthetjük csupán esztétikai problémának. Napjainkra az elhízás járványszerű méreteket öltött, az elhízott emberek száma egyre emelkedik, mind a fejlett, mind a fejlődő országokban. Az obesitas gyakorisága 1980 óta megháromszorozódott, az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) adatai szerint Földünkön jelenleg 1,1 milliárd túlsúlyos ember él, és legalább 310 millióan súlyosan elhízottak. Továbbá a gyermekkori elhízás is egyre gyakoribb, a WHO becslései szerint 155 millió gyermek túlsúlyos és, ezeknek a gyermekeknek az egyharmada még nem töltötte be az 5. életévét (Hossain és mtsai. 2007). A WHO az obesitast - a fentiek alapján - az egész világra kiterjedő járványnak, és a legnagyobb egészségügyi problémának tartja. Az elhízás tehető felelőssé az össz-halálozás 10-30%-áért. Európában a felnőttek körében a túlsúly és az elhízás felelős a 2. típusú diabetes mellitus 80%-áért, az iszkémiás szívbetegség 35%-áért és a magas vérnyomás 55%-áért. A fentiek együttesen több mint egymillió halálesetet okoznak a világon évente.

Az elhízás kialakulásában több tényező is közreműködhet, azonban a genetikai tényezők helyett, minden kétséget kizáróan elsősorban étrendi és életmódbeli hatások együttes szerepéről beszélhetünk. Napjainkban világszerte elterjedt a gyorséttermek hálózata, ahol magas kalóriatartalmú, zsírban és szénhidrátban gazdag ételeket szolgálnak fel. Ez a kalóriadús étkezés, párosulva a mozgásszegény életmóddal, hozzáadva a gyakori dohányzási és túlzott alkoholfogyasztási szokásokat, nagymértékben felelős lehet az elhízás járványszerű elterjedéséért. Az emberek jelentős mennyiségű "luxuskalóriát" fogyasztanak, vagyis a szükséges anyagcsere-állapotuk fenntartásán túlmenően, felesleges kalóriamennyiséget vesznek magukhoz, amely azután zsír formájában rakódik le a szervezetükben.

Vajon mennyire káros az elhízás? Ennek a kérdésnek a megválaszolásához először is rendelkezünk kell olyan megbízható paraméterrel, amelyik pontosan jelzi a szükségesnél nagyobb testsúlyt. Önmagában a kilogrammban megadott tömeg ehhez nem elég. A gyakorlatban az elhízás mértékét a testtömeg index-el (TTI, angol rövidítéssel BMI) jellemezhetjük. A BMI meghatározása: a testtömeg és a méterben mért magasság négyzetének hányadosa (kg/m^2). Felnőttek (>18 év) esetében elhízásról beszélünk, ha a $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$, túlsúlyt (pre-obezitás) $25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$ közötti BMI esetében diagnosztizálhatunk (Garrouste-

Orgeas és mtsai. 2004). Fontos tudni, hogy a túlsúlyosok többsége az évek során elhízottá válik.

Vannak adatok arra nézve, hogy az alacsonyabb testsúly nem jelent feltétlenül előnyt. Az Amerikai Egyesült Államokban, az alabamai egyetemen több mint 20 000 egyénen végzett statisztikai megfigyelés szerint a nem sportoló, sovány (BMI: 25 vagy annál alacsonyabb) egyének között a halálozási arány kétszerese volt, a 27,8 vagy annál is nagyobb BMI-vel rendelkező, kispotolt, erős izomzatú egyének halálozási rátájánál (Wickelgren 1998). Önmagában a testsúly alacsonyabb volta tehát még nem jelent védeltséget a különféle betegségek okozta gyakoribb halálozás ellen, ugyanis a normál testsúlyú emberekben az abdominális zsírszövet felszaporodása ugyanúgy fokozza a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatát.

Az obesitas nem önmagában káros, hanem a legfőbb veszélye abban rejlik, hogy hajlamosít több súlyos betegségre. Az elhízás szinte valamennyi szervrendszerben kóros folyamatokat indít be. Az elhízáshoz társulva gyakran alakulnak ki súlyos szövődmények a légzőrendszerben, a kardiovaszkuláris rendszerben (magas vérnyomás, stroke, szívinfarktus, ateroszklerózis), létrejöhetnek metabolikus zavarok (hiperlipidémia, diabetes, inzulin rezisztencia), mozgásszervi panaszok és sok esetben megfigyelhető az immunrendszer diszfunkciója (Pi-Sunyer 2002). Továbbá kimutatták, hogy az elhízás és a metabolikus szindróma fontos szerepet játszik egyes tumorok kialakulásában és progressziójában (Davoodi és mtsai. 2013; Formiguera és Cantón 2004). Az ismert tumor indukáló tényezők, mint az elhízás, a tartósan magas vércukorszint, az inzulinrezisztens állapotok fennállásakor bizonyos kulcsfontosságú enzimek aktiválódnak, ezáltal serkentik az inzulin és inzulinszerű növekedési faktorok termelését, amelyek a malignus sejtek burjánzását okozzák (Goodwin és mtsai. 2002). Az inzulin és az inzulinszerű növekedési faktor-1 (insulin like growth factor-IGF) – hormonspecifikus receptorok útján – kapcsolódik a sejtek felszínéhez és indíthatnak be kontrollálatlan proliferációs folyamatokat (Draznin 2011; Pollak és mtsai. 2004).

Több kutatócsoport is szignifikáns összefüggéseket tapasztalt metabolikus szindróma és vastagbél daganatok között (Morita 2005; Anderson és mtsai. 2007). Továbbá hasnyálmirigy, nyelöcső és gyomor tumoroknál is igazolódott ez a korreláció az elhízás és a rosszindulatú megbetegedések között (Gumbs 2008; Abnet és mtsai. 2008). Nők körében világszerte vezető daganatos megbetegedés az emlő karcinóma. Ilyen betegek között a diabétesz előfordulási gyakorisága 25%-osnak mutatkozott, míg a cukorbetegség prevalenciája az ugyanilyen korú populációban kevesebb, mint 10% (Kruk 2014). Hasonlóan

gyakori nőkben a méhnyak, illetve a méhüreg rákos betegsége, amely csoportban a cukorbetegség előfordulási gyakorisága 20-60% (Vona-Davis és mtsai. 2007).

Az elhízás tumor-indukáló képességében szerepet játszik, hogy a metabolikus szindrómára jellemző hasi elhízásban megnövekszik a zsírszövet mennyisége (Schwartz és Yehuda-Shnaidman 2014). A korábbi feltevés szerint a zsírszövet nem volt más, mint egy térkitöltő szövet, amelynek legfontosabb feladata az energiaraktározás. Hosszú évekig tartotta magát az a nézet, hogy ha az energia felvétel meghaladja az energiafelhasználást, akkor a főleg passzívan tárolódik a zsírsejtekben. Az elhízás elmúlt évtizedekben tapasztalt terjedése, és főként az ezzel együtt járó betegségek azonban a kutatók érdeklődését a zsírszövetre irányították. Mára bebizonyosodott, hogy a zsírszövet nemcsak a résztvevője a metabolikus folyamatoknak, hanem az általa termelt hormonok, citokinek (gyűjtőnéven, adipokinek) révén az életműködések szabályozásában, összehangolásában is aktív szerepet játszik, azaz endokrin szervnek is tekinthető (Kershaw és Flier 2004). Az adipokinek a különböző szignálmechanizmusokban részt vevő molekulák szerteágazó csoportja, amely szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, inzulinérzékenységben, sejtproliferációban, atheroszklerózisban. Ezek a funkciók részint a metabolikus szindrómához és annak szövődményeihez, részint a daganatképződéshez kapcsolódnak, és mindkét kórkép kifejlődéséhez alapul szolgálhatnak (Cao 2014).

Az adipokinek növekvő családjának legismertebb képviselője a leptin, de ide sorolandó a tumor-nekrózis-faktor-alfa (TNF-alfa), adiponektin, interleukin-1, 6, 8, leukocita gátló faktor (leukocyte inhibitory factor- LIF) is, a kemokinek közül, pedig eddig a monocita-kemotaktikus protein-1 (MCP-1) és a makrofág-inflammatorikus protein-1 (MIP-1) termelődését írták le a zsírszövetben (Matarese és La Cava 2004). Emellett a zsírsejtek kiválasztanak még rezisztint, adipszint, acilálást stimuláló proteint, angiotenzin II-t, proszttaglandinokat (Gregoire 2001).

A leptin adipocita specifikus hormon, amely fontos szerepet játszik az étvágy és a testsúly szabályozásában (Suzuki és mtsai. 2012). Elhízottakban magas a leptin koncentráció, ami leptin-rezisztenciára utal. Az ilyen egyéneknél kimutatható hiperleptinémia fokozza a prosztata-, colon-, emlő-, endometriális tumorok képződését, valamint egyes leukémia sejtvonalak burjánzását. Így a leptinnak közvetlen hatása van a daganatsejtekre, és hidat képez az elhízás és daganatfejlődés között (Kershaw és Flier 2004).

Az adiponektin az egyetlen olyan citokin, amelynek szintje elhízottakban szignifikánsan csökken. Inzulinérzékenyítő, antidiabetikus, szabadzsírsav- (FFA-) csökkentő

és anti-inflammatórikus hatása van (Lee és Kwak 2014). Szintje fordítottan arányos az emlő-, az endometrium- és a gyomorrák kockázatával (Barb és mtsai. 2007).

A keringő ösztadiol koncentrációja postmenopauzális nőkben közvetlenül összefügg a BMI-vel (Key és mtsai. 2003). Számos emlő- és endometriális karcinóma növekedése ösztadiol-függő. 30 kg/m² feletti BMI esetén az ösztrogéntermelés jelentősen megemelkedik, és 2–5-szörösére nő az endometrium-, kétszeresére, pedig az emlőrák gyakorisága postmenopauzális nőkben (Kaaks és mtsai. 2002).

A fokozott hajlam a tumor képződésre, mind metabolikus szindrómában, mind 2-es típusú cukorbetegségben, kapcsolatban van a megnövekedett vércukorszinttel. Tanulmányok diabéteszes betegek fokozott kockázatát írták le különböző karcinóma típusokkal kapcsolatban (Ryu és mtsai. 2014; Xu és mtsai. 2014). A hiperglikémia tumorkeltő hatása bonyolult biokémiai hatásokon alapul, elsősorban a malignus sejtek biokémiai útvonalaik megváltoztatásával érik el a gyors proliferációt és terjedést. A metabolikus szindrómát megnövekedett vércukorszint jellemzi, amelynek felhasználására a daganatsejtek speciálisan alkalmazkodtak. Régóta ismert tény, hogy a tumorsejtek esetében fokozott glükózfelvétel figyelhető meg (Herling és mtsai. 2011). Az egyik lehetséges mechanizmus, amellyel a hiperglikémia fokozza a malignus megbetegedések progresszióját, az, hogy oxidatív stresszt hoz létre (Brown és Bicknell 2001). Turturro és munkatársai (2007) kimutatták, hogy MDA-MB-231 humán emlő tumoros sejtvonalon indukált hiperglikémia fokozza az oxidatív stressz-válaszadó gén expresszióját, és a reaktív szabadgyökök szintjét. Az oxidatív stressz DNS-károsodást okoz, amely a karcinogenezis kezdeti lépcsőfoka (Marseglia és mtsai. 2014).

Nem-enzimatis glikációnak nevezzük azt a több lépésben zajló, egy idő után irreverzibilissé váló folyamatot, mely redukáló monoszacharidok és aminocsoportot tartalmazó molekulák (fehérjék, DNS és lipidek) közt játszódik le. A glikáció során képződő szabad gyökök és glikációs intermedierek, valamint az előrehaladott glikációs végtermékek advanced glycation end products, AGE) fontos szerepet játszanak a krónikus veseelégtelenség és a cukorbetegség szövődményeinek kialakulásában (Negre-Salvayre és mtsai. 2009). A hiperglikémia fokozza a glikációját számos strukturális és funkcionális fehérjének (Khan és mtsai. 2009). Az AGE serkenti az oxidatív stressz kialakulását az AGE-receptorral (RAGE) való interakció útján, míg az oxidatív stressz elősegíti az AGE-képződést és fokozza a RAGE expresszióját. Lehetséges, hogy ez az AGE/RAGE rendszer közötti kölcsönhatás pozitív feedback mechanizmussal fokozza a karcinogenezis kockázatát diabéteszes betegekben (Abe és Yamagishi 2008).

Elhízáshoz társulva a 2-es típusú diabétesz és az inzulin rezisztencia krónikus hiperinzulinémiát okoz. A hiperinzulinémia hatással van a tumorok kialakulására, egyrészt az inzulin mitogenetikus hatásain keresztül közvetlenül, másrészt indirekt módon az IGF-1 mennyiségének fokozásával. Az IGF-1 a májban termelődik növekedési hormon hatására, a növekedési hormon receptor aktivációja által. Inzulin jelenlétében a hepatikus növekedési hormon receptor aktiválódik és ez megnövekedett IGF-1 szintet eredményez (LeRoith és Roberts 2003, Renehan és mtsai. 2004).

Az inzulin csökkenti az IGF-1-kötő fehérje (insulin-like growth factor binding protein-IGFBP) májban történő termelődését, az IGFBP szabályozza az IGF-1 biológiai hozzáférhetőségének szintjét a perifériás szövetekben (Calle és Kaaks 2004). Így az emelkedett inzulin szint hatására megnő az IGF-1 biológiai hozzáférhetősége.

Tanulmányok igazolták, hogy a megnövekedett IGF-1 szint fokozza malignus tumorok kialakulását (Chen és mtsai. 2009; Rinaldi és mtsai. 2010). Az IGF-1 tumor képződésre gyakorolt proliferatív és antiapoptotikus hatásait bizonyítja, hogy az IGF-1 fokozott expressziója stimulálja, gátlása csökkenti karcinogénnel kezelt mutáns egerekben az emlőrák kifejlődését (Moschos és Mantzoros 2002). Az IGF-1 az angiogenezist is serkenti a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor – VEGF) termelésének fokozásával colon-, endometrium, emlő- és prosztata karcinómában (Hausmann és Richardson 2004).

Az IGF-1-jelátvitel nagymértékben szerepet játszik a karcinómák, különösen az epiteliális daganatok kialakulásában, a sejtek malignus átalakulásában és a sejtek túlélésében (Xie és Wang 2013). Ezek a szerepek a normális sejtek növekedésében kevésbé érvényesülnek. Az inzulin és a szabad IGF-1 szabályozza a szexuáliszteroidok biológiai hatékonyságát olyan daganatokban, amelyek ösztrogén- vagy androgén hormon dependensek (Calle és Kaaks 2004). IGF-1-receptor emlő- és colon tumorban túlexpresszált, fogékonyabbá válva az inzulin hatásaira, különösen hiperinzulinémia esetében. Az IGF-1-szintézis gátlása csökkenti karcinogénnel kezelt mutáns egerekben az emlő karcinóma kifejlődését (Ibrahim és Yee 2004). A májban termelődő nemi hormon-kötő globulin (sexual hormone binding globulin- SHBG) gátolja az ösztrogének és androgének receptorukhoz való kötődését, ezáltal a sejtek növekedésére gyakorolt hatásukat. A hiperinzulinémia és az IGF-1 gátolja az SHBG szintézist, ezáltal elősegíti a nemihormon-függő daganatok (prosztata, emlő, endometrium) fejlődését.

Tehát epidemiológiai tanulmányok bizonyítják, hogy az elhízás és a 2-es típusú diabétesz fokozzák a malignus megbetegedések kialakulását és a betegségekhez kapcsolódó mortalitást. Az obesitas, a 2-es típusú diabétesz és a tumoros megbetegedések között a kapocs az inzulin rezisztencia, a hiperinzulinémia és a magas IGF-1 szint, továbbá a szteroid és peptid hormonok, valamint az inflammatórikus markerek emelkedett szintje.

Kemoterápiát befolyásoló tényezők elhízott betegekben

Az elhízás tehát számos káros hatása mellett, bizonyítottan fokozza több malignus megbetegedés előfordulási kockázatát is (Pergola és Silvestris 2013). Ugyanakkor a fokozott tumor hajlam mellett az elhízott betegek esetében a kemoterápia pontos megtervezése nagy kihívások elé állítja az onkológus szakembereket. A helyzetet tovább súlyosbítja az a tény, amelyről számos tanulmány beszámol, miszerint, elhízott betegekben a rosszindulatú megbetegedéseknek rosszabb a prognóza, nagyobb esély van a tumorok kiújulására, és gyakoribb a halálozási ráta, mint a normál testsúlyú egyéneknél (Dignam és mtsai. 2006; Cleveland és mtsai. 2007; Calle és mtsai. 2003). Ennek hátterében több tényező is állhat. Az obese betegekben megváltoznak bizonyos farmakokinetikai paraméterek, amelyek eltérő gyógyszerhatást, és fokozott toxicitást eredményezhetnek. A megnövekedett zsírszövet például lényeges különbségeket okozhat egyes szerek farmakokinetikai tulajdonságaiban (Blouin és Warren 1999). A megnövekedett zsírszövet mennyisége miatt a vérátáramlás a zsírszövetben szignifikánsan csökken, emiatt megváltozik a szerek megoszlási térfogata. Elhízás esetén a zsírszövet beszűrődik a máj szövetállományába, ezzel megváltozhat a hepatikus vérátáramlás és ennek következtében a máj metabolizáló képessége. A megváltozott testösszetétel miatt a plazmakötő fehérjék koncentrációja is változhat, ami szintén befolyásolhatja a gyógyszerek hatását (Cheymol 2000). Számos olyan paramétert determináltak, amelyeket felhasználhatnak az individuális dózisok meghatározására. Ilyenek például, a teljes testtömeg (total body weight- TBW), idealizált testtömeg (ideal body weight- IBW), testfelszín nagysága (body surface area- BSA), zsírszövet-mentes testtömeg (fat-free mass- FFM), vagy előre meghatározható az ideális testtömeg (Hunter és mtsai. 2009). Ennek ellenére az általánosan elfogadott módszer az individuális dózisok meghatározására a testfelszín nagysága alapján történő kalkuláció (body surface area- BSA). Ugyanakkor a BSA módszer nem veszi figyelembe körültekintően a dózis, a testfelszín nagysága és egyéb testméretet leíró paraméterek közötti kapcsolatot a kalkuláció során. Így nincsenek speciális adagolási javaslatok elhízott betegek kemoterápiája során (Abdah-Bortnyak és mtsai. 2003).

Kevés olyan klinikai tanulmány van a szakirodalomban, amely pontosan leírja az obez páciensek farmakokinetikai paramétereit, a normál testsúlyú betegekhez képest (Griggs és mtsai. 2012). Ennek az oka valószínűleg az, hogy a gyógyszerfejlesztés és a klinikai vizsgálatok során a szakorvosok figyelmen kívül hagyják a betegek testsúlyát, így a különböző vizsgálatok ellentmondó adatokat közölnek kemoterápia hatásosságáról és a toxicitási tünetekről az elhízott betegekben (De Jonge és mtsai. 2002; Thompson és mtsai. 2014; Ekhardt és mtsai. 2009; Miyahara és mtsai. 2012). A jelenlegi irányelvek alapján egy obez beteg daganat-ellenes kemoterápiájának megtervezésekor a dózis meghatározásához a teljes testsúlyt veszik figyelembe, mivel elsődleges fontosságú a terápia hatásossága, a maximális hatás eléréséhez nem számolnak csökkentett dózissal (Griggs és mtsai. 2012).

Ugyanakkor az is elfogadott tény, hogy az elhízás esetén nem csak a megváltozott farmakokinetika paraméterek, hanem a megváltozott farmakodinámiás tényezők is befolyásolhatják a terápia kimenetelét (Griggs és mtsai. 2012). Az obesitással együtt járó metabolikus vagy endokrin változások a szervezetben megváltoztathatják a gyógyszerhatásokat a célsejteken, amely ezáltal, eredményezhet egy fokozottabb terápia során megjelenő toxicitást. Az egyik legjobban karakterizálható, és leggyakoribb metabolikus diszfunkció elhízott emberekben, az inzulin rezisztencia.

Az obesitáshoz hasonlóan, az inzulin rezisztencia is jelentősen befolyásolja a betegek túlélését malignus megbetegedések során (Satariano és Ragland 1994; Yancik és mtsai. 2001). Néhány megfigyelést találunk azzal kapcsolatban, hogy fokozottabb a csontvelőtoxicitás diabéteszes betegek tumorellenes kemoterápiája során. Srokowsky és munkatársai (2009) azt írták le, hogy nagyobb a kockázata a terápia során kialakuló mellékhatásoknak az elhízott betegekben, szemben a normál testsúlyú egyénnel. Az ebben az esetben előforduló leggyakoribb mellékhatások a neutropénia volt és a különböző infekciók, amelyek csontvelőtoxicitásra vezethetők vissza.

A tumorellenes terápiák során az egyik legfontosabb dózis-limitáló mellékhatás a csontvelőtoxicitás. A jelenlegi tudományos szakirodalomban ellentmondásos adatokat találunk azzal kapcsolatban, hogy elhízott betegek kemoterápiája során tapasztalható-e nagyobb mértékű myelotoxicitás. Takenaka és munkatársai (2013) megfigyelései alapján a neutropéniás lázas állapot gyakrabban fordul elő diabéteszes betegekben, akik docetaxel, ciszplatin, fluorouracil kezelést kaptak fej- és nyaki daganatos megbetegedésekben. Ugyanakkor más kutatócsoportok nem igazolták azt a tényt, hogy 2-es típusú cukorbeteg

betegeknél fokozódik a terápiához társuló csontvelőtoxicitás mértéke. Ilyen eredményre jutott Rosner és munkatársai (1996) és Barrett és mtsai. (2008), akik emlő-, és petefészek tumoros páciensek esetében mutatták ki, hogy az obese betegeknél alacsonyabb volt a terápiához-társuló mellékhatások mértéke. Inal és munkatársai (2012) kissejtes tüdőrákban szenvedő pácienseket vizsgálva, nem találták a diabéteszt prognosztikus tényezőnek a betegek túlélése szempontjából. Meyerhardt és munkatársai (2003) 3579 vastagbél daganatos átlagos testsúlyú és túlsúlyos, nő és férfi betegcsoportban vizsgálta a kemoterápiához társuló mellékhatások megjelenését és súlyosságát. Eredményeik alapján elmondható, hogy az obezitás kapcsán megnő a gasztrointesztinális toxicitás előfordulási gyakorisága, de nem nő meg a csontvelőkárosodás mértéke a tumorelles kemoterápia során. Gogas és munkatársai (1996) fokozottabb neurotoxicitást írtak le diabéteszes, petefészek tumorban szenvedő betegek cisplatin kezelése során, de ők sem mutattak ki fokozott csontvelőtoxicitást ezeknél a betegeknél.

Csontvelőtoxicitás, a kemoterápia során kialakuló egyik leggyakoribb mellékhatás

A komplex tumorelles terápia során a csontvelő károsodás az egyik leggyakoribb dózis-limitáló mellékhatás, amelynek szövődményei gyakran halálos kimenetelűek. A tumorelles szerek célpontjai a gyorsan proliferálódó tumor sejtek, de mivel ezek a szerek nem hatnak specifikusan csak a rákos sejtekre, ezért a csontvelőben lévő gyors-osztódású hemopoetikus őssejtek is érzékenyek lesznek a tumorelles szerek citotoxikus hatásaira.

A kifejlődő csontvelő elégtelenségnek az életet leginkább veszélyeztető eleme a neutropénia. A daganatos betegek halálozási listáját a neutropéniához kapcsolódó infekciós szövődmények vezetik. Egy fehérvérsejt rendellenességről van szó - ekkor a vérben rendkívül, akár mérhetetlenül alacsony szintre esik a neutrofil fehérvérsejtek száma (erre utal az elnevezés), így a szervezetnek a baktériumokkal, gombákkal szembeni elsődleges sejtveszély védelmi vonala meggyengül. A neutropénia következtében különböző infekciók alakulhatnak ki, amelyek a legyengült immunrendszerű betegek számára végzetes következményekkel járhatnak (Lyman és mtsai. 2005). Továbbá a neutropénia kialakulása kemoterápiás dózis csökkentésével és újabb kemoterápia ciklus elhalasztásával is járhat, amelyek miatt veszélybe kerül az onkológiai terápia hatékonysága, végső célja (Wolf és mtsai. 2004).

A neutropénia foka jelentősen változhat. Általában egy egészséges felnőtt vérében 1500-7000 neutrofil van mm^3 -enként ($1,5-7,0 \times 10^9/\text{L}$). 6 év alatti gyermekekben a neutrofil

szám alacsonyabb lehet. A neutropénia súlyossága az abszolút neutrofil számtól (ANSZ) függ, következőképpen jellemezhető:

- enyhe a neutropénia, amikor az ANSZ $1500/\text{mm}^3$ ($1,5 \times 10^9/\text{l}$) alá esik, de $1000/\text{mm}^3$ ($1,0 \times 10^9/\text{L}$) fölött marad
- mérsékelt a neutropénia, amikor az ANSZ $500\text{-}1000/\text{mm}^3$ ($0,5\text{-}1,0 \times 10^9/\text{L}$) között van.
- súlyos a neutropénia, amikor az ANSZ $500/\text{mm}^3$ ($0,5 \times 10^9/\text{L}$) alá esik.

A tünetek a neutropénia súlyosságától függenek. Minél alacsonyabb a neutrofilek száma annál nagyobb a fertőzés veszélye. A rizikó tovább nő, ha a neutropénia 3 napnál hosszabb ideig tart. A súlyos neutropénia komoly problémákhoz vezethet, ami folyamatos odafigyelést és néha azonnali ellátást igényel, mivel a betegnél bármikor jelentkezhet bakteriális, gombás vagy vegyes fertőzés.

A csontvelő károsodására jellemző, hogy lecsökken a csontvelőben az össz-sejtszám, a stem és progenitor sejtek előfordulási gyakorisága és a teljes femorális tartalom. A hemopoetikus progenitor sejtek között a granulocita-makrofág progenitor sejtek képezik a legfontosabb populációt. Elsősorban ezeknek a sejteknek a pusztulása vezet a neutropéniás állapot kialakulásához. A neutropénia miatt a citosztatikumok tervezett dózisát csökkenteni kell, mely a következő kemoterápiás ciklus eltolódását eredményezi. Mindez a myeloprotektív anyagok klinikai gyakorlatban való alkalmazásának szükségességét mutatja.

Az óriási igény ellenére a lehetőségeink nagyon szűkösek, pedig a myeloprotektív anyagok a daganatellenes kemo- és sugárterápiás kezelési protokollok eredményesebb kivitelezésével növelhetik a betegek túlélési esélyeit. A szövődmények csökkentésével a daganatos betegek életminőségét szintén javítják. Fokozódó mértékben igénylik az életminőségüket megőrző, javító lehetőségeket a betegek, az őket kezelő orvosokkal együtt, hiszen csak így biztosítható a hosszú terápia során a betegek megfelelő együttműködése. Számos, a vérképzést fiziológiásan serkentő citokin kipróbálása után a klinikai felhasználás ma a granulocita kolóniastimuláló faktorra (G-CSF) szűkült. Ennek használata során súlyos, életet veszélyeztető generalizált allergiás tünetek és kórképek viszonylag ritkábban jelentkeznek, mint más citokinek esetében. A másik ígéretes myeloprotektív hatású szer, az amifostine, ami egy aminoszulfonamid összetételű vegyület. Alkalmazásuk a betegek számára kényelmetlen, mert subkután injekció vagy infúzió formájában adhatják őket. Használatuk kellemetlen mellékhatásokkal társul- a G-CSF alkalmazásakor influenzaszerű tünetek, csontfájdalmak gyakoriak, míg az amifostin esetében igen jelentős mértékben, a betegek kb.

50%-ban észlelhető hányinger, hányás, amit a citosztatikumok hasonló hatásai miatt a betegek nehezen tolerálnak.

Új hatásmechanizmusú myeloprotektív anyagok kutatása során munkacsoportunk elsőként publikálta, hogy egy inzulinérzékenyítő vegyület, a roziglitazon képes mérsékelni az 5-fluorouracil citosztatikum okozta csontvelőkárosodást (Benkő és mtsai. 2003). További kísérletekben bizonyítást nyert, hogy ebben az inzulinérzékenyítő mechanizmusoknak szerepe van (Djazayeri és mtsai. 2005, 2006). Az ismert, hogy ha a csontvelői vérképzés fenntartásáért felelős őssejteket hosszabb időn keresztül életben akarjuk tartani a szervezeten kívüli sejtenyészetekben, inzulint kell adni a növekedési táptalához (Echarti és mtsai. 1989). Az inzulin vérképzésben játszott szerepét azonban még nem vizsgálták. Munkacsoportunk korábban in vivo állatkísérletekben bizonyította az inzulin védő hatását a citosztatikumok okozta csontvelő károsodással szemben. A citokinek bonyolult hálózata befolyásolja a fiziológiás és kóros vérképzés folyamatait (Lotem és Sachs 2002; Kiss és mtsai. 2004; Szegedi és mtsai. 2006). Az inzulin vérképzésben játszott szerepét az élő szervezetben számos egyéb faktor hatása elfedi, akár helyettesítheti is, azonban korábbi kísérleteink alapján a csontvelőt ért károsodások alkalmával hatása felértékelődik, és fontos szerepet kap, mint az őssejtek túlélését elősegítő növekedési faktor (Djazayeri és mtsai. 2005). Az inzulin ilyen célra történő felhasználása a gyakorlatban természetesen nem megoldható az anyagcsere hatásai miatt. Azonban az inzulinérzékenyítő mechanizmusok elősegítése a periférián lehet, hogy a gyakorlatban is hasznosítható védő hatást jelenthet a csontvelő sejtjeinek. Ha a csontvelői vérképző sejtek számára az inzulin hatásainak felerősítése segíti az őket érő toxikus hatások kivédésében, elképzelhető, hogy az inzulin rezisztenciával járó kórállapotok kedvezőtlenül befolyásolhatják regenerációs kapacitásukat.

Az inzulin rezisztencia vérképzésre gyakorolt hatásaival kapcsolatban kevés publikációt lehet találni. Egyrészt az erythropoezis fokozódását (Mardi és mtsai. 2005), másrészt a granulociták diszfunkcióját tárták fel metabolikus X szindrómás betegekben (Lo-Presti és mtsai. 2002). Egyre növekvő számban találunk adatokat a zsírsejtek által termelt hormonok vérképzést befolyásoló hatásairól. A leptin elősegíti (Bennett és mtsai. 1996), a rezisztin és az adiponektin gátolja a granulopoezist (Schinke és mtsai. 2004).

Elképzelhető, hogy az obesitással együtt járó számtalan patológiás folyamat hat a csontvelői vérképző sejtekre. Az előzetesen publikált eredmények szerint lehetségesnek látszik, hogy az elhízással együtt járó inzulin rezisztencia befolyásolhatja a myelotoxicitás célsejtjeinek működését.

A 4-tio-uridin-monofoszfát (UD29) tumorelles hatása és toxicitása összehasonlítva más citosztatikumokkal:

A tumorbiológiai kutatások fontos feladata megállapítani a tumorokat felépítő sejtpopulációk eredetét, heterogenitását, jellemezni a malignitással összefüggő sajátságait és változásait a tumor progressziója során. A tumorsejt populáció heterogén spontán mutációs rátának megfelelően hamar szubklónok jelennek meg, de a tumorsejtek proliferációs kapacitása szempontjából is alpopulációkra oszlanak. Korlátlanul szaporodó, a populációt újrateherelni és fenntartani képes stem sejtekből és különböző mértékben korlátozott számú, osztódásra képes sejtekből áll. A beteg gyógyulásához a tumor stem sejtek elpusztítása szükséges, melyek a tumorsejtek kisebb, mint 1%- át, az esetek túlnyomó többségében 1- 0,5 ezrelékét alkotják. A stem sejtek egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy képesek magukat állandóan megújítani, és ezzel fenntartani a tumor növekedését (Hatina és mtsai. 2007; Ravandi és Estrov 2006). A stem sejtek a tumor legagresszívebb sejtjei, melyek populációjuk expanziójával rövid idő alatt képesek újranöveszteni a tumort a kezeléseik szüneteiben (Guzman és Jordan 2004). A tumor stem sejtek kimutatása csak kolónia esszé módszerekkel lehetséges, amelyekben a speciális lágy- gél tenyésztő közegben a stem sejtek leánysejtjei együtt maradva kolóniákat képeznek. A kolóniaszám csökkenés egyértelműen a tumor stem sejtek pusztulását jelzi. Ezért kolónia esszé módszert alkalmazva vizsgáltuk a leukémia sejtek kolóniaképző képességét.

Nehéz megfelelő kemoterápiás szert találni az eliminálásukra, mert ezek a szerek a normál stem sejtekre is károsak (Jordan 2007). Mivel a tumor stem sejtek általában rezisztensebbek a kemoterápiával szemben, mint a tumort alkotó többi sejt, ugyanakkor rövid idő alatt képesek újra felépíteni az egész tumor szövetet, a jövőbeni kutatások célja megtervezni az őket szelektívebben elpusztító gyógyszereket. Ehhez meg kell ismernünk ezen sejtek sejtfelszíni molekuláit, jelátviteli útvonalait, a tumor stem sejtek mikrokozonyetét, differenciálódási folyamataikat és a gyógyszerekkel szemben mutatott rezisztenciájukat (Pan és mtsai. 2006; Jordan 2005). A stem sejtek molekuláris mechanizmusának megismerése lehetőséget adhat olyan terápiák kidolgozására, amelyek révén ezek a sejtek eliminálhatóak. A terápiára alkalmas targetek lehetnek a Wnt, Hedgehog és Notch jelátviteli útvonalai vagy az ABC transzporterek, amelyeknek jelentős szerepük van a kemoterápiás szerek elleni rezisztencia kialakulásában (Massard és mtsai. 2006).

A daganat kemoterápia a daganatos betegségek gyógyszeres kezelésével éri el a malignus kórképek progressziójának lassítást és esetenként a beteg teljes gyógyulását eredményezheti. Ezáltal a daganat- kemoterápia a tumorok sebészi eltávolítása és sugárterápia mellett a komplex onkoterápiás ellátás egyik oszlopa lett.

Az új hatóanyagok vizsgálata transzplantálható egér tumorokon történt a daganat- kemoterápia kezdeti szakaszában, majd az 1970-es évektől kezdődően lehetőség nyílt emberi tumor sejtvonalak fenntartására immunszuppresszált egerekben. Elterjedten alkalmaznak immundeficiens egérmodelleket in vivo vizsgálatokban, mert ezek egyedülálló lehetőséget nyújtanak az egerekbe transzplantált emberi daganatok tanulmányozására (Paine-Murrieta és mtsai. 1997). A súlyos kombinált immundeficiencia veleszületett immunhiányos állapot, ezt jellemzi a T- és B-limfociták képződésének és működésének zavara, ezáltal a celluláris és humorális immunválasz csökkenése vagy teljes hiánya. Ha az immunhiányos állapot autoszómáisan öröklődik, akkor az esetek egy részében egy rekombinázt enzim funkciójának kiesése miatt nem alakulnak ki a T- és B-sejtek antigénfelismerő receptorai. A betegség X-kromoszómájához kötött típusában a hemopoézis folyamatában szerepet játszó citokin receptorok γ_c láncát kódoló génben történik a mutáció. Mivel a γ_c számos receptor jelátvivő lánc, így képződésének zavara elsősorban a T-sejt előalakok fejlődését akadályozza, de befolyásolja B-limfociták és NK-sejtek érését és működését is. A betegség egyik leggyakoribb formája a 20-as kromoszómán kódolt adenzin-deamináz (ADA) enzim hiánya vagy erősen csökkent mennyisége, amely olyan RNS- és DNS-anyagcsere közti termékek felhalmozódásához vezet, amelyek a fejlődő T-sejtekre toxikusak. Kóros anyagcseretermékek felhalmozódását okozza a 14-es kromoszómán kódolt purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) enzim hibája esetén is. Ezek az egérmodellek képesek arra, hogy emberi tumoros sejteket fogadjanak be és, ezáltal in vivo vizsgálhatóvá váljanak különböző daganatos megbetegedések (Gergely és Erdei 2006.)

A súlyos kombinált immunhiányos betegség veleszületetten immundeficiens állapot. Ez az állapot alkalmatlanná teszi az immunrendszert arra, hogy a szervezetbe kerülő mikrobák ellen védekezzék. Ezért ezeket az állatokat steril körülmények között kell tartanunk és kezelésükkor is körültekintően be kell tartani a sterilitás szabályait. Mivel ezekben az állatokban az immunrendszer gyakorlatilag működésképtelen ezért alkalmasak arra, hogy emberi daganatokat transzplantáljunk beléjük a graft kilökődésének veszélye nélkül. Kísérleteinkben a humán leukémiás állatmodell kialakítása 2×10^7 JY humán B-sejtes limfoid

leukémia sejt transzplantálásával történt. Ez a tumorsejt dózis valamennyi transzplantált állatban létrehozta a leukémiás megbetegedést 100%-os mortalitással.

A leukémia esetében egy gyorsan metasztatizáló, rendszerbetegségről van szó, amely kombinált daganat gátló kezelést igényel. Magyarországon évente kb. 260-300 új gyermekkori rosszindulatú daganatos megbetegedés fordul elő, ezen betegségek kb. 25-30%-a leukémia. Hazánkban tehát évente 65 - 80 új leukémiás betegséggel számolhatunk. Krónikus mieloid leukémia (CML) csak igen ritkán fordul elő (2-4%), a betegségek döntő része heveny leukémia. Leggyakrabban akut limfoid leukémia (ALL) fordul elő, amely elsősorban B- sejt típusú. A betegség 80%-ban 15 év alatt, 20%-ban 15 év felett fordul elő. A nyirokcsomó daganatos betegségei a gyermekkori rosszindulatú daganatok 8-10%-át alkotják. Körülbelül fele-fele arányban fordul elő Hodgkin betegség, illetve non-Hodgkin-limfóma. A felnőttkori leukémiás megbetegedések közül a krónikus limfoid leukémia (CLL) a leggyakoribb. A betegek több mint fele 60 évesnél idősebb. Gyakrabban betegszenek meg férfiak, mint nők. A CML leggyakoribb középkorúakban (50 év körüliekben). Valamivel több férfi betegszik meg, mint nő. Akut mieloid leukémiában (AML) évente 250-300 felnőtt betegszik meg Magyarországon. A megbetegedettek száma és életkori átlaguk az adott ország gazdasági fejlettségétől függ. Idős korban szinte exponenciálisan emelkedő esetszám miatt a gazdagabb országokban, melyekben az átlagéletkor magasabb, több beteget regisztrálnak és a betegek átlagéletkora magasabb. Az ALL előfordulási gyakorisága egy gyermekkori csúcsot követő plató után idősök közt ismét megnő. Felnőtt korban a heveny leukémiák egynegyede ALL, évenként hozzávetőleg 100 új esettel. A két eltérő életkorban jelentkező ALL különbözik egymástól. Felnőttek körében gyakoribbak, gyermekeknél ritkábban fordulnak elő a rossz prognózist jelentő genetikai eltérések. A felnőttek ALL-je a gyermekkorban észlelténél ritkábban gyógyul meg. (Jeney és Kralovánszky 2005).

Nem elég a tumoros sejtek eradikálása, a cél az is, hogy a beteg életben maradjon. Magának az alapbetegségnek és a kezelésnek is sok szövődménye van. Leggyakoribb célpont a csontvelő. A leukémiás klónok kiszorítják a normál hemopoézis sejtvonalait, ugyanakkor a csontvelőtoxicitás a legtöbb citosztatikus kezelés dózist limitáló mellékhatása. A kifejlődő csontvelő elégtelenségnek az életet leginkább veszélyeztető eleme a már korábban említett neutropénia. A daganatos betegek halálozási listáját a neutropéniához kapcsolódó infekciós szövődmények vezetik. A leukémiák kezelésének célja tehát olyan új anyagok alkalmazása, amelyek szelektívebb hatású daganat gátlók, vagy csökkentik a citosztatikumok myelotoxicitását és fokozzák a myelopoézist, javítanak a kialakuló neutropéniás állapotot.

Az általunk vizsgált vegyület az UD29 kémiaiilag módosított mononukleotid (4-tio uridin-monofoszfát), anti-HIV és anti-tumor aktivitása miatt szabadalmaztatott vegyület. A szabadalom tulajdonosa a Debreceni Egyetem, feltalálók: Aradi János, Fésüs László és Beck Zoltán.

Korábban ennek 35-tagú-homo-oligonukleotidját vizsgálták, mint HIV ellenes szert, ami hatásos lehet a vírus elleni terápiában (Szatmári és mtsai. 2000; Tőkés és Aradi 1996). Vizsgálták a vegyület kapcsolódását a sejtfelszíni molekulákhoz és meghatározták a HIV ellenes hatás mechanizmusát. Megállapították, hogy a vizsgálati anyag kb. tízszer jobban kötődik $CD4^+$ sejtekhez, mint $CD4^-$ sejtekhez, amit Cys-5-tel jelölt oligonukleotiddal mutatták ki (Horváth és mtsai. 2005). A HIV elsődleges célpontjai a $CD4^+$ sejtek, így elsősorban a T_H sejtek, a monociták és a dendritikus sejtek. A HIV vírusnak a sejtbe való bejutásához a $CD4$ molekula önmagában nem elegendő, szükség van a ko-receptor funkciót betöltő kemokin receptorokra is. HIV vírus gp120 glikoproteinjének az elsődleges célpontja a $CD4$ molekula. Kompetíciós és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálatokat végeztek, hogy meghatározzák az oligonukleotid kötődési helyét a $CD4$ receptoron. Ezek a vizsgálatok kimutatták, hogy a kérdéses anyag kötődik a $CD4$ receptorhoz, és nem vagy csak kisebb mértékben kötődik $CD48$ receptorhoz (Horváth és mtsai. 2005). A $CD4$ receptor 4 doménje közül a D2 domén diszulfid kötése redox aktív. Ezt a folyamatot a T-sejtek sejtfelszíni molekulája a tioredoxin szabályozza. A protein-diszulfid-izomeráz (PDI) szintén sejtfelszíni molekula és felelős lehet a sejtfelszíni redox állapot változásért. A gp120 $CD4^+$ sejtekhez kötődése a gp120 glikoproteinben lévő kilenc diszulfid kötés közül kettőnek a hasítását hozza létre, amely a PDI-nek tulajdonítható. A tioredoxin a $CD4$ -ben lévő diszulfidkötéseket hasítja. A vírus sejtbe történő bejutása a sejtfelszíni molekulák diszulfid kötésének hasítását kísérő konformáció változáson alapszik (Horváth és mtsai. 2005). Konfokális lézer mikroszkóp alkalmazásával megállapították, hogy nagy az átfedés a lipid raftok, a $CD4$ molekula és az oligonukleotid sejtfelszíni lokalizációjában, továbbá, hogy a vizsgált vegyületből képzett oligonukleotid és a tioredoxin szinte teljesen azonos helyen található meg a sejt felszíni membránjában. Ebben az esetben az oligonukleotid és a tioredoxin a lipid rafttal azonos helyen jelenik meg a sejt felszínén. Tehát valószínűsítik, hogy a vírus a bejutásához a lipid raftokban lokalizálódó $CD4$ receptorokat használja fel. Így minden bizonnyal az oligonukleotid nem jut be a sejtbe, így nem a reverz-transzkriptáz enzimet gátolja, hanem a HIV sejtbe jutásának gátlásán keresztül fejti ki a HIV ellenes hatását (Horváth és mtsai 2005).

A mi munkacsoportunk vizsgálta a mononukleotid hatásait leukémia sejtekre *in vitro* sejttenyészetekben, illetve *in vivo* kísérletekben is SCID egerekbe transzplantált tumorsejteken. Vizsgáltuk az esetleges toxikus hatásait egészséges csontvelő mintákon és elhízott, inzulinrezisztens állatokon csontvelőtenyészeiben is. Csontvelő károsító hatását összehasonlítottuk más hatásmechanizmusú, daganatellenes terápiákban gyakran alkalmazott citosztatikumokkal.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok:

Kísérleteinket az Európai Közösség laboratóriumi állatok tartására vonatkozó útmutatásainak betartásával végeztük. A kísérleti protokollokat a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága jóváhagyta (1/2009. DEMÁB).

4.1.1. *db/db egér és kontroll párja*

Kísérleteinkhez a Janvier S.A.S. forgalmazótól vásárolt 12 hetes hím kontroll ($24,9 \pm 2,5$ g) (C57BLKS/J-*mLep*^{db/+}) és leptin receptor-hiányos *db/db* (C57BLKS/J-*mLep*^{db/mLep}^{db}) ($45,2 \pm 2,7$ g) egereket használtunk fel. Ketrecenként 3-5 egeret tartottunk, melyek laboratóriumi tápot és csapvizet kaptak korlátozás nélkül.

4.1.2. *SCID egér UD29 vizsgálathoz*

A Debreceni Egyetem Klinikai Központ (DEKK) Bőrklinika állatházában steril körülmények között tartott SCID egerek ($23,6 \pm 2,4$ g) felhasználásával történt meg a leukémiás egérmodell kialakítása. Kísérleteinkhez 19-20 hetes nőstény SCID egereket alkalmaztunk (Charles River Kft; Budapest, Magyarország). Ketrecenként 3-5 egeret tartottunk, melyek laboratóriumi tápot és csapvizet kaptak korlátozás nélkül. A DEKK Gyermekklinika Hematológiai Osztályával, Dr. Kiss Csongorral és Dr. Szegedi Istvánnal kooperálva, a leukémiás egérmodell kialakítása JY humán B-sejtes limfoid leukémia sejtvonal SCID egerekbe transzplantálásával történt. Transzplantációjukra 2×10^7 JY humán tumor sejt dózist alkalmaztunk egyszeri intravénás oltás formájában, mely dózis valamennyi állatban kialakította a B-sejtes limfoid leukémiát 100 %-os halálozással. Az állatok boncolásakor nyert mintákban a csontvelő, a máj és a lép el volt árasztva tumor sejtekkel.

4.1.3. *Wistar, Goto-Kakizaki, Zucker patkányok*

Kísérleteink során a Charles River Kft-től (Budapest, Magyarország) vásárolt, 11-12 hetes hím Wistar (362 ± 19 g), Zucker (428 ± 24 g) és Goto-Kakizaki (305 ± 13 g) patkányokat használtunk fel. Ketrecenként 3 állatot tartottunk, melyek laboratóriumi tápot és csapvizet kaptak korlátozás nélkül.

4.2. Humán minták:

Munkacsoportunk a DEKK II. számú Belklinikájával kooperálva, a megfelelő etikai szabályok betartásával jutott vizsgálati anyaghoz. A humán csontvelősejteken történt *in vitro* toxicitási vizsgálatokhoz a DEKK II. sz. Belklinikáján, a Hematológiai osztályon fekvő 2

felnőtt beteg- akinél nem a granulopoézist érintő hematológiai betegség gyanúja miatt történt diagnosztikus csontvelő punkció- csontvelő mintájának egy része jelentette a forrást. A betegek beleegyező nyilatkozata esetén a megfelelő mennyiségben nyert diagnosztikus csontvelő mintából a Helsinki Deklarációt betartva kaptunk vizsgálatra csontvelői sejteket.

4.3. JY sejtvonala:

A JY sejtvonala a humán B-sejtes limfoid leukémiát reprezentálja. Ennek felhasználásával lehetőség adódott arra, hogy mind *in vivo* SCID egerekbe transzplantálva, mind körülmények között vizsgáljuk a mononukleotid hatását a leukémia stem sejtek kolóniaképző képességére. A DEKK Gyermekklinika Hematológiai Osztályával kooperálva jutottunk hozzá a JY sejtvonala-hoz.

4.4. UD29:

Az UD29 mononukleotidot Aradi János és Berényi Erika állították elő a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében és bocsátották rendelkezésünkre a vizsgálatok elvégzéséhez.

4.5. Vegyszerek:

Kísérleteink során az alábbi, frissen elkészített vegyszereket használtuk: carboplatin (Paraplatin, Bristol Myers-Squibb, Sermoneta, Olaszország), doxorubicin (Adriblastina, Pharmacia & Upjohn SPA, Milánó, Olaszország), 5-fluorouracil (Fluorouracil-TEVA, Pharmachemie, Haarlem, Hollandia). Frissen készítettük el a törzsoldatokat, az alábbiak szerint: 10 mg/ml-es carboplatin készítményből 100-szoros hígítást, 50 mg/ml-es 5-fluorouracil készítményből 5000-szeres hígítást készítettünk. A doxorubicin liofilizátumot desztillált vízben oldottuk fel, majd az így kapott 2 mg/ml-es oldatot 5000-szeresére hígítottuk meg. A törzsoldatokat McCoy's 5A táptalajjal hígítottuk a megfelelő koncentrációra. Az alábbi roziglitazon készítményt alkalmaztuk a kísérleteinkben: roziglitazon (Avandia, GlaxoSmithKline, Brentford, Egyesült Királyság). Roziglitazon törzsoldat: 3 mg/ttkg dózisú roziglitazonnal kezeltük a kísérleti állatokat. Ehhez a 4 mg hatóanyag tartalmú Avandia tablettát feltörtük és feloldottuk 13,2 ml vehikulumban. A vehikulum savasított Aqua destillata volt, pH 2-3.

4.6. Biológiai minták:

4.6.1. Csontvelő szuszpenziók kinyerése

4.6.1.1. Csontvelő minták kinyerése egerekből:

Az állatokat cervikális diszlokációval extermináltuk és a femurt aseptikus körülmények között eltávolítottuk. A csontvelősejteket steril fecskendő segítségével kimostuk. Vékony tűvel többször áthúzva egy sejtsuszpenziót készítettünk. Az egyedi sejteket McCoy's 5A (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) táptalajban szuszpendáltuk. Mindvégig lamináris fülkében dolgoztunk, ügyelve a steril munkavégzésre.

4.6.1.2. Human csontvelő minták kinyerése:

A betegek diagnosztikus célból nyert csontvelő mintáiból megfelelő mennyiség esetén a Helsinki Deklaráció szabályait betartva használtunk a csontvelő tenyészetekhez mononukleáris sejteket. A steril körülmények között nyert csontvelőből tartósítószer-mentes heparinnal (Richter Gedeon Gyógyszergyár, Budapest, Magyarország) McCoy's 5A (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) táptalajt 1:1 (v/v) arányban alkalmazva szuszpenziót készítettünk. Ezt a hígított mintát óvatosan Ficoll-ra (specifikus sűrűség= 1,077 g/ml; Immunotrin Ltd., Budapest, Hungary) rétegeztük és a csontvelőt 1000 g gyorsulást alkalmazva 15 perces gradiens centrifugálással (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Németország) szeparáltuk, elválasztva egymástól a vörösvértesteket és a granulocytákat. A 10% újszülött borjúsavót (Foetal Bovine Serum-FBS; GIBCO, NY, USA) tartalmazó McCoy's 5A táptalajjal a leukocytá rétegből óvatosan leszívott, a mononukleáris sejteket (MNC) tartalmazó frakciót centrifugálás közbeiktatásával kétszer mostuk.

4.6.1.3. Csontvelő minták kinyerése patkányokból:

Az állatokat magas intravénás dózissal (100 mg/ttkg) tiopental injekcióval extermináltuk. A csontvelősejteket steril fecskendő segítségével kimostuk. Vékony tűt többször áthúzva a combcsonton és átmossa a femurt, egy sejtsuszpenziót készítettünk. Az egyedi sejteket McCoy's 5A (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) táptalajban szuszpendáltuk. Ezt a sejtsuszpenziót óvatosan Ficoll-ra (specifikus sűrűség= 1,077 g/ml; Immunotrin Ltd., Budapest, Magyarország) rétegeztük és a csontvelőt 1000 g gyorsulást alkalmazva 15 perces gradiens centrifugálással (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Németország) szeparáltuk, elválasztva egymástól a vörösvértesteket és a granulocytákat. Az 10% FBS-t tartalmazó McCoy's 5A táptalajjal a leukocytá rétegből óvatosan leszívott, az

MNC-ket tartalmazó frakciót centrifugálás közbeiktatásával kétszer mostuk. Mindvégig lamináris fülkében dolgoztunk, ügyelve a steril munkavégzésre.

4.7. Kolóniastimuláló faktorforrások:

4.7.1. WEHI-3B sejtvonal fenntartása

Metcalf és munkatársai (1969) illetve Warner és munkatársai (1969) szerint történt a WEHI-3B sejtek tenyésztése és a kondicionált médium készítése.

Megfelelő számú, fagyaszóban (-20°C -on) tárolt és előzetesen sterilre szűrt 10 ml 20% borjúsavós szupplementált McCoy's 5A sejttenyésztő médiumot (továbbiakban táptalaj) tartalmazó sejttenyésztő flaskákat a teljes felolvadásig 37°C -os vízfürdőbe helyeztük. A felolvadás után legalább 3 órán keresztül 37°C -os 5% CO_2 koncentrációjú termosztátba tettük. Körülbelül 1×10^6 logaritmusos fázisban növekvő sejtet pipettával az előkészített táptalajt tartalmazó flaskába juttatunk. Ezután a flaskákat 37°C -os 5% CO_2 koncentrációjú termosztátba tettük és naponta inverz mikroszkóp alatt ellenőriztük a sejtek szaporodását. A sejtek további passzálását szükség szerint, de általában minden 3. nap végeztük.

4.7.2. WEHI-3B kondicionált médium készítése

A növekvő sejteket passzálást követően továbbra is termosztátban tartottuk majd összesen 5-7 nap tenyésztési idő után a sejtsuszpenziót 50 ml-es centrifugacsőben 15 percig 2500 fordulat/perc fordulatszámra centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítva, szűrés után, mint kondicionált médiumot a csontvelői progenitor sejtek tenyésztésénél használtuk.

4.7.3. Fitohemagglutininnal stimulált humán leukocita kondicionált médium (PHA-LCM) készítése:

Egészséges felnőtt önkéntestől a Helsinki Deklarációban foglaltakat betartva nyertünk perifériás vért a humán leukocita tenyésztések számára. Dresch és munkatársai (1979) szerint az előbbiekből alapján szeparált mononukleáris sejtsuszpenzióból $4 \times 10^6/\text{ml}$ -t alkalmazva a sejtekből 15% humán autológ szérumot tartalmazó McCoy's 5A táptalajban 17 mg/ml fitohemagglutininnal és 10 mg/ml levamisol jelenlétében szuszpenziós tenyészeteket készítettünk. 37°C -on CO_2 termosztátban inkubáltuk, majd az 5. napon centrifugálás után a kapott felülúszót steril körülmények között üvegekbe töltöttük és lefagyaszttva tároltuk.

4.8. A vércukorszintek és a plazma inzulinszintek meghatározása

Perifériás vérmintához a retroorbitális plexusból vettünk vérmintát, majd AccuCheck vércukorszintmérővel (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) meghatároztuk a

vérglükóz szinteket. A plazma inzulin szintjeinek meghatározásához a vérmintákat lecentrifugáltuk 4°C-on, 10000 g gyorsulást alkalmazva, 2 percig. A plazma mintákat összegyűjtöttük és lefagyasztottuk, -70°C-on tároltuk. Majd a plazma inzulin szintek mérése radioimmunoesszével (RIA) történt, kereskedelmi forgalomban elérhető kitek felhasználásával ((RK 400 M, Institute of Isotopes, Budapest, Magyarország).

4.9. Elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egereken és kontroll párjaikon végzett vizsgálatok:

Ezen kísérleteinkhez a 2-es típusú diabétesz genetikai egérmódeljét használtuk fel. A *db/db* egerekben a 4-es kromoszómán található mutáció meggátolja a leptin receptor expresszióját. A működőképes leptin receptor hiányában a táplálkozási idő megnyúlik a homozigóta egerekben (*db/db*), és a fokozott táplálékbevitel miatt a 2-es típusú diabéteszre jellemző elváltozások alakulnak ki már az állatok 8 hetes korára (Sharma és mtsai. 2003). Ezek az elváltozások tovább progrediálnak az állat 12-14 hetes koráig, amely életkorban a kísérleteinket elvégeztük.

- *Egyszeri, nagy dózisú carboplatin hatása a perifériás fehérvérsejt számra és az abszolút neutrofil számra, továbbá a csontvelői funkcióra az elhízott, inzulin rezisztens *db/db* egerekben és kontroll párjaikban*

10 darab elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egér, illetve 10 darab kontroll egyed kapott egyszeri, nagy dózisú (100 mg/ttkg) carboplatin injekciót intraperitoneálisan. Az oltást követően, 48 óra elteltével meghatároztuk a perifériás vérben a fehérvérsejt számot és az abszolút neutrofilek számát, majd megvizsgáltuk a femorális csontvelő funkcióját mindkét csoportban. Meghatároztuk a csontvelő össz-sejtszámát, a GM-CFU progenitor sejtek gyakoriságát és a csontvelő teljes GM-CFU tartalmát.

- *Carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil hatásai a *db/db* egerekből és kontroll párjukból származó csontvelő mintákon*

10-10 *db/db*, illetve kontroll egér exterminációját követően, a csontvelőt steril körülmények között eltávolítottuk és minden egyes állat csontvelő szuszpenziójából speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk. A tenyészetekben vizsgáltuk a *db/db* egerek és a kontroll egyedek GM-CFU progenitor sejtjeinek citosztatikum érzékenységét. A csontvelő mintákhoz növekvő koncentrációban, 0,1-10 mg/L koncentrációtartományban adtuk hozzá a carboplatint, 0,001-1 mg/L koncentrációban a doxorubicint és szintén 0,001-1 mg/L koncentrációban az 5-fluorouracilt.

4.10. Wistar, Goto-Kakizaki és Zucker patkányokon végzett vizsgálatok:

- *Wistar, Goto-Kakizaki és Zucker patkányok vérképzésének jellemzése normál körülmények között*

Kísérletünkben 10 darab Wistar, 10 darab elhízott, inzulinrezisztens Zucker és 10 darab nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányt dolgoztunk fel. Exterminációt követően steril körülmények között eltávolítottuk a femurt és a kimosott csontvelőből sejtsuszpenziót készítettünk. Meghatároztuk a csontvelő össz-sejtszámát, a fagocita sejtek utánpótlását biztosító granulocita-makrofág progenitorok előfordulási gyakoriságát és a csontvelő teljes GM-CFU tartalmát. A progenitor sejt lágy-gél tenyészeteket fiziológias körülmények között tenyésztettük.

- *Carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil hatásai a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességre Wistar, Zucker és Goto-Kakizaki patkányok csontvelőtenyészeiben*

A csontvelő steril körülmények között történő eltávolítása után minden egyes állat csontvelő szuszpenziójából speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk. A tenyészetekben vizsgáltuk a 10 darab Zucker és a 10 darab kontroll egyed GM-CFU progenitor sejteinek citosztatikum érzékenységét. A csontvelő mintákhoz növekvő koncentrációban, 0,1-10 mg/L koncentrációtartományban adtuk hozzá a carboplatint, 0,001-1 mg/L koncentrációban a doxorubicint és szintén 0,001-1 mg/L koncentrációban az 5-fluorouracilt.

Annak tisztázására, hogy a Zucker patkányok inzulin rezisztenciája hozzájárul-e a csontvelői progenitor sejtek fokozott citosztatikum érzékenységéhez további vizsgálatokat végeztünk nem elhízott, de a Zucker patkányokhoz hasonlóan, inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányokkal. 10 darab Goto-Kakizaki és 10 darab kontroll egyedből származó csontvelő mintákon vizsgáltuk GM-CFU progenitor sejteik citosztatikum érzékenységét. Carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil toxikus hatásait vizsgáltuk a korábbiakban leírt koncentrációtartományban, speciális lágy-gél tenyészetekben.

- *Inzulin érzékenység meghatározás Wistar, Zucker és Goto-Kakizaki patkányokban gyors inzulin érzékenységi teszt alkalmazásával*

Mind a három patkány csoportban meghatároztuk az inzulin érzékenységet gyors inzulin érzékenységi teszt felhasználásával (rapid insulin sensitivity test- RIST), csoportonként 8-8 állaton. Ezeket a vizsgálatokat Dr. Peitl Barna egyetemi docens végezte (Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet). A RIST teszt során

meghatározható az, az infúzióban adott glükóz mennyiség, amely az euglikémiás állapot fenntartásához szükséges egy intravénásan bólusban adott meghatározott mennyiségű inzulin ellensúlyozására. A bólusban beadott inzulin adása után a vércukorszint lecsökken. A normál állatokban, mivel megfelelő az inzulinérzékenység nagyobb mértékű lesz a vércukorszint-csökkenés. Az inzulinrezisztens állatokban, kisebb lesz a vércukorszint csökkenés, mert az inzulin nem tudja kifejteni a hatását olyan mértékben. Így a normál állatokban a kontroll vércukor érték eléréséhez több glükóz mennyiségre van szükség, míg az inzulinrezisztens állatokban kevesebb glükóz kell a kontroll vércukor eléréséhez és megtartásához.

- *Roziglitazon előkezelés hatása nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok inzulinérzékenységére*

Kísérletünkben 8 darab Goto-Kakizaki patkány, illetve 8 darab Wistar patkány kapott roziglitazon előkezelést. Az állatokat 3 mg/ttkg dózisú roziglitazonnal kezeltük per os, 14 egymás követő napon keresztül. Az előkezelés végén az állatokat 50 mg/ttkg tiopentál injekcióval elaltattunk, majd elvégeztük rajtuk a RIST vizsgálatot, az inzulin érzékenység meghatározására.

- *Roziglitazon előkezelés hatása nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok GM-CFU sejtjeinek citosztatikum érzékenységére*

A roziglitazon előkezelést követően az állatokat extermináltuk és a csontvelő sejtjeikből speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk, amelyek ugyanolyan koncentrációtartományban tartalmazták a carboplatint, doxorubicint, 5-FU-t, mint a korábbi kísérletekben.

Kísérleteink során 10 darab nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkány, illetve 10 darab kontroll, Wistar patkány kapott egy inzulinérzékenyítő szert, roziglitazont, 3 mg/testsúly kilogramm dózisban, per os, 14 egymást követő napon keresztül. Az előkezelés végén az állatokat nagy dózisú (100 mg/ttkg) tiopentál injekcióval extermináltuk, majd meghatároztuk a csontvelői GM-CFU sejtek citosztatikum érzékenységét, carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil jelenlétében lágy-gél kolóniatenyészetekben. A csontvelő mintákhoz növekvő koncentrációban, 0,1-10 mg/L koncentrációtartományban adtuk hozzá a carboplatint, 0,001-1 mg/L koncentrációban a doxorubicint és szintén 0,001-1 mg/L koncentrációban az 5-fluorouracilt.

- *Carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil hatásai Wistar patkányokból származó csontvelőtenyészetekben roziglitazon előkezelést követően*

Vizsgáltuk, hogy a roziglitazon hogyan befolyásolja a GM-CFU sejtek citosztatikum érzékenységét normál metabolizmusú, kontroll patkányokban. 10-10 darab állatot kezeltünk elő, majd a roziglitazon előkezelés után az állatokat extermináltuk, csontvelő sejtuszpenziót készítettünk steril körülmények között, majd ezekből lágy-gél tenyészeteket csináltunk. A lágy-gél tenyészetekhez adtuk hozzá a citosztatikumokat növekvő koncentrációban. Carboplatint 1-10 mg/L koncentrációtartományban tettünk a tenyészetekbe, doxorubicint 0,001-1 mg/L koncentrációban és szintén 0,001-1 mg/L koncentrációban az 5-fluorouracilt.

4.11. UD29 anti-proliferatív hatásának és toxicitásának vizsgálata *in vivo* és *in vitro* kísérletekben:

- *Leukémiás egérmodell*

A JY humán B-sejtes limfoid leukémia sejtvonalat SCID egerekbe transzplantálva *in vivo* körülmények között vizsgáltuk a 20 napos 250 mg/ttkg-os UD29 kezelés hatásait az alábbi paraméterekre a JY sejttel transzplantált és a nem-transzplantált csoportokban egyaránt.

A femur teljes csontvelő tartalmát kimosva meghatároztuk annak teljes sejttartalmát, majd speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk és a tenyésztési idő letelte után meghatároztuk a tumor stem sejtek előfordulási gyakoriságát és teljes tumor stem sejt tartalmat, melyet összehasonlítottunk a kontroll, kezelést nem kapott állatok hasonló adataival.

A SCID egerekből 4 csoportot képeztünk. Az első és második csoport 10-10 darab állata vehikulumot (a vehikulum Phosphate Buffered Saline- PBS volt) kapott intravénásan a leukémiás JY sejtek helyett. A második csoport intraperitoneálisan 20 napon keresztül naponta egyszer 250 mg/ttkg UD29 anyagot, míg az első csoport állatai e helyett 0,3 ml vivőanyagot, azaz PBS puffer oldatot kaptak.

A 3. és 4. csoport 10-10 darab SCID egereit transzplantáltuk JY tumor sejtekkel az előbb leírtak szerint. Ezekben az immundeficiens egerekben kifejlődött a humán B-sejtes leukémia. A kontrollként alkalmazott 3. csoportban az állatokat a vizsgálati anyag helyett PBS-sel kezeltük. A 4. csoport egerei naponta voltak kezelve intraperitoneálisan 250 mg/ttkg UD29 anyaggal. Az összes kezelt állat ugyanannyi térfogatú anyagot kapott a kezeléseik során. 10 kezelés után történt meg az állatok boncolása illetve a további vizsgálatok.

Az első két csoportba tartozó egereken vizsgáltuk a vegyület hatását a normál hemopoetikus sejtek kolóniaképző képességére. Mivel ezeknek az állatoknak nem történt meg

a megbetegítése tumor sejtekkel, így lehetőség nyílt a mononukleotid hatását in vivo vizsgálni egészséges csontvelőre.

1. táblázat: SCID egerek kezelésének menete kontroll és kezelt csoportokban

	intravénás kezelés	intraperitoneális kezelés
1. csoport (n=10)	vehikulum	PBS
2. csoport (n=10)	vehikulum	250mg/ttkg UD29
3. csoport (n=10)	2×10^7 JY	PBS
4. csoport (n=10)	2×10^7 JY	250mg/ttkg UD29

A kezelés végén az állatokat extermináltuk és a combcsontot steril körülmények között eltávolítottuk. A femur teljes csontvelő tartalmát kimosva meghatároztuk annak teljes sejttartalmát. A korábban leírtak szerint lágy-gél tenyészeteket készítettünk a csontvelői sejtszuspenzióból. Majd a tenyésztési idő letelte után meghatároztuk a tumor stem sejtek előfordulási gyakoriságát és teljes tumor stem sejt tartalmát, melyet összehasonlítottunk a kontroll, kezelést nem kapott állatok hasonló adataival. Meghatároztuk az UD29 előkezelést követően, a mononukleotid hatását a csontvelői össz-sejtszámmra, a GM-CFU kolóniaszámmra és a teljes GM-CFU tartalomra SCID egerek csontvelő tenyészetiben a JY sejttel transzplantált és nem transzplantált csoportokban.

- *UD29 mononukleotid antiproliferatív hatásának vizsgálata human B-sejtes leukémia, JY sejt vonalon*

A JY sejtenyészetből 1×10^4 /ml sejtszám felhasználásával készítettünk lágy-gél tenyészeteket. Mivel leukémia sejt vonalról van szó exogén kolóniasztimuláló faktort nem adtunk a tenyészetekhez. A tenyészeteket 14 napig inkubáltuk 5%-os CO₂ atmoszférában telített vízgőz mellett. A tenyésztés során a vizsgálati anyag emelkedő koncentrációsorát alkalmaztuk. A vizsgálati anyag adott koncentrációját tartalmazó tenyészetekből 3-3 párhuzamos tenyészetet indítottunk. A tenyésztési idő letelte után a vizsgálati anyagot nem

tartalmazó kontroll tenyészetek kolóniaszámát 100%-nak véve, ehhez viszonyítjuk a vizsgálati anyag jelenlétében nőtt kolóniák számát.

- *UD29 hatásai a normál granulocita-makrofág sejtpopuláció kolóniaképző képességére egészséges, human csontvelő tenyészetekben*

Az egészséges emberektől nyert human csontvelőmintákat a korábban leírtak szerint szeparáltuk és a mononukleáris sejtfракcióból, amely tartalmazza a GM-CFU progenitor sejteket is lágy-gél sejtenyészeteket készítettünk. Ezek a tenyészetek tartalmazták a vizsgálati anyagot 3-300 μM koncentrációban. A vizsgálati anyag adott koncentrációját tartalmazó tenyészetekből 3-3 párhuzamos tenyészetet indítottunk. A tenyésztési idő letelte után a vizsgálati anyagot nem tartalmazó kontroll tenyészetek kolóniaszámát 100%-nak véve, ehhez viszonyítjuk a vizsgálati anyag jelenlétében nőtt kolóniák számát.

- *UD29 hatása a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképzésére elhízott, inzulinrezisztens db/db egerek csontvelőtenyészeiben*

10-10 db/db, illetve kontroll egér exterminációját követően, a csontvelőt steril körülmények között eltávolítottuk és minden egyes állat csontvelő szuszpenziójából speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk. A tenyészetekben vizsgáltuk a db/db egerek és a kontroll egyedek GM-CFU progenitor sejtjeinek kolóniaképző képességét UD29 mononukleotid jelenlétében koncentrációba. A csontvelő mintákhoz növekvő koncentrációban, 3-300 μM koncentrációtartományban adtuk hozzá a vizsgált anyagot.

4.12. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai analízist GraphPad Prism szoftverrel végeztük (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Egyes kísérleteinkben az egyedi egerekből kapott adatokat használtuk a statisztikai analízishez. A statisztikai analízist páratlan t-próba alapján végeztük. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $P < 0,05$.

A továbbiakban az egyedi patkányokból kapott adatokat használtuk a statisztikai analízishez. ANOVA analízis után, ha a csoportok adatai szignifikáns inhomogenitást mutattak, a statisztikai analízist a Bonferroni-féle módosított t-teszt alapján folytattuk, mely több csoportot egyszerre analizál egymáshoz képest. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $P < 0,05$.

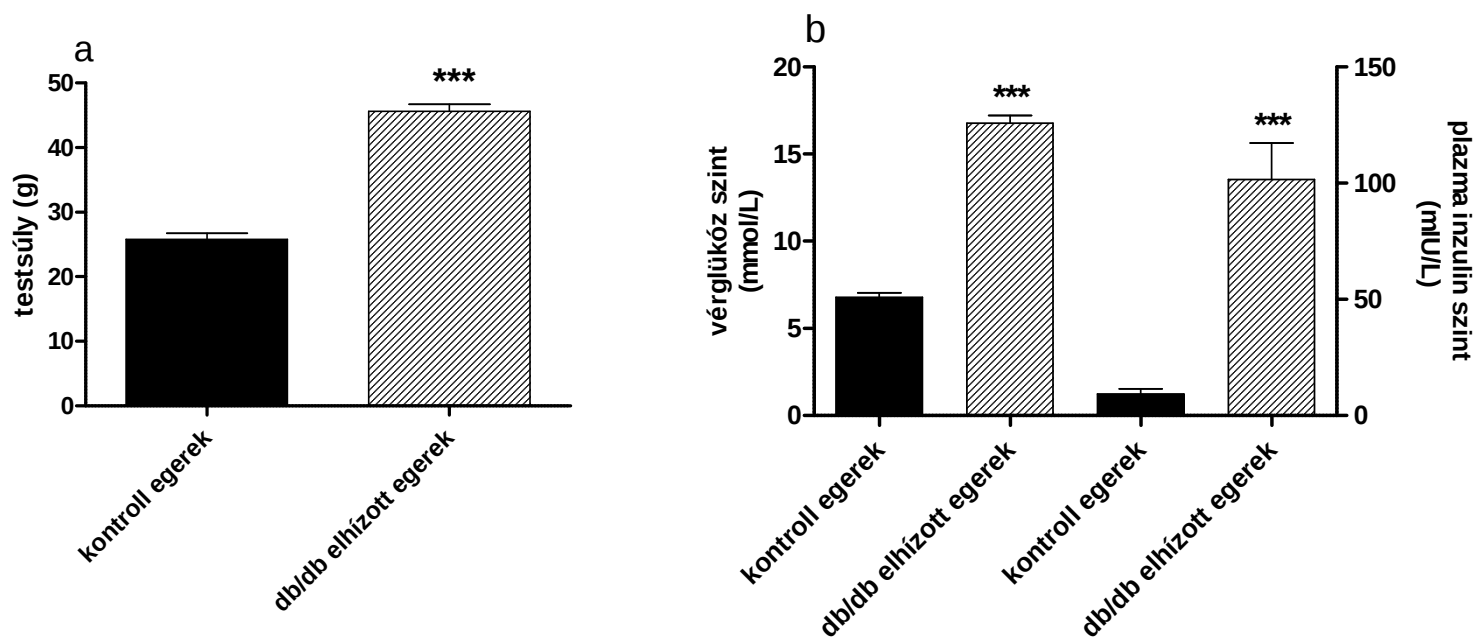
A koncentráció-hatás adatokra GraphPad Prism szoftverrel 4-paraméteres logisztikus-variable slope görbéket illesztettünk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Db/db egereken végzett vizsgálatok eredményei:

5.1.1. A testsúly, a vércukorszint és a plazma inzulin szintjeinek összehasonlítása elhízott, inzulinrezisztens db/db egerekben és kontroll párjaikban

A leptin rezisztens *db/db* egerek a 2-es típusú cukorbetegség releváns tüneteit mutatták. Szignifikánsan nagyobb testsúlyúak voltak, továbbá hiperglikémia és inzulin rezisztencia jellemezte őket a kontroll egyedekhez képest (1a. és b. ábra). A kontroll egerek leptin receptort expresszálnak, aminek következtében normál testsúly és egészséges glükóz metabolizmus jellemzi őket. Ezek az egerek használhatóak voltak a kísérleteinkben normál, nem-diabetikus kontrollként.

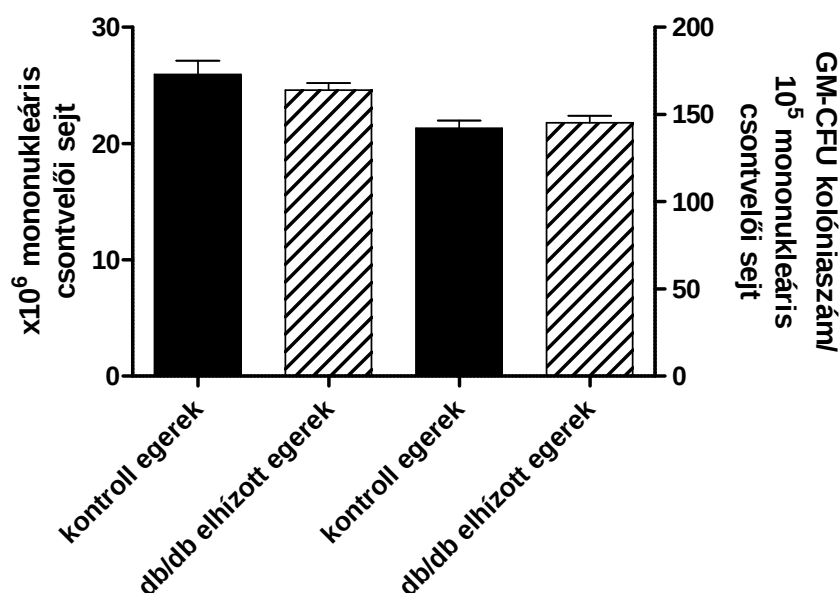


1. ábra: A testsúly (a) és a vér glükóz szintjeinek, valamint a plazma inzulin szintjeinek (b) összehasonlítása 12 hetes elhízott, diabetikus *db/db* egerek és a kontroll párjaik között (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve. ***P<0.001

5.1.2. A csontvelői cellularitás és a GM-CFU kolóniaszám összehasonlítása elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerekben és kontroll párjaikban normál tenyésztési feltételek között

A csontvelő funkciója meghatározható a femorális csontvelő össz-sejttartalmával és a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaszámával. Mindkét paraméter érzékeny a csontvelőt érő károsodásokkal szemben, csökkenésük informatívan mutatja a myelotoxicitás mértékét. A csontvelő össz-sejtszáma, azaz a cellularitás megadható a csontvelő sejtszámának és a sejtszuspenzió térfogatának szorzataként. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy nincs különbség a csontvelő cellularitásában az obez, inzulinrezisztens *db/db* egerek és kontroll párjaik között (2. ábra).

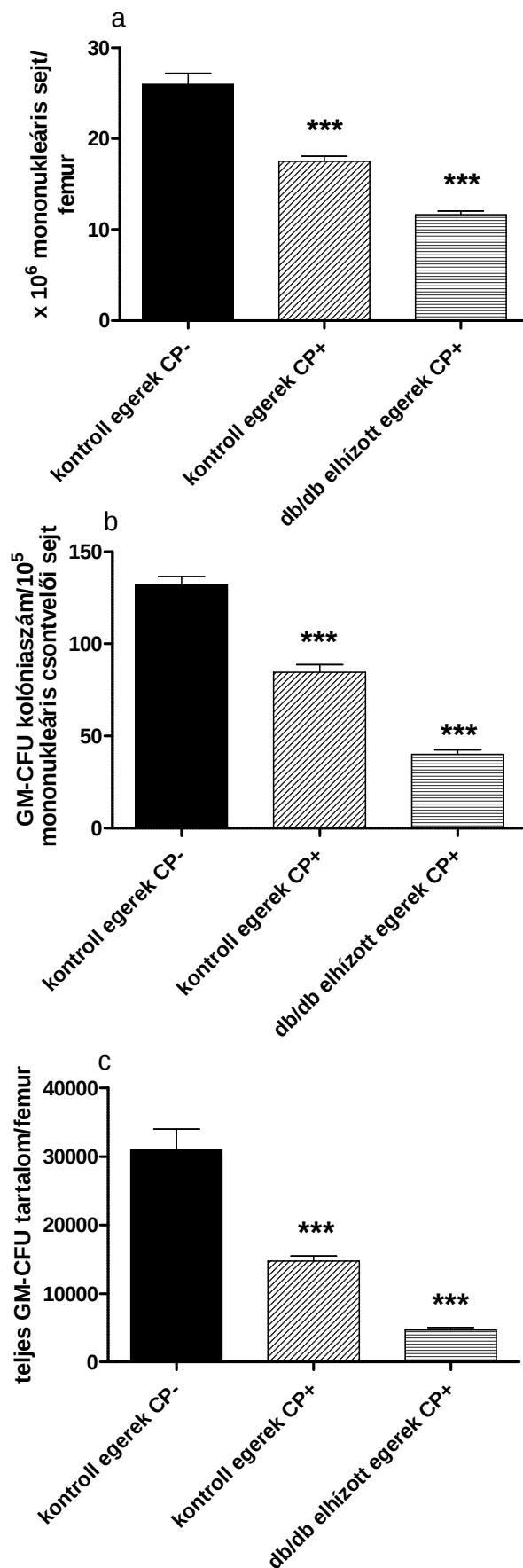
A csontvelőben a granulocita-makrofág progenitorok gyakoriságát a speciális lágy-gél tenyészetekben tudtuk vizsgálni. A tenyésztő táptalaj a növekedési faktorokkal együtt elősegíti a sejtszuspenzióból a GM-CFU sejtek proliferálódását és a speciális fél-folyékony tenyésztő közeg, pedig összetartja a progenitor sejteket a leánysejtjeikkel együtt. A tenyésztési idő elteltével inverz mikroszkóp alatt megszámoltuk a GM-CFU progenitor sejtek kolóniáinak számát. Ez az adat arra utal, hogy a beoltott 10^5 -en csontvelő sejtől mennyi volt granulocita-makrofág progenitor sejt. Eredményeink alapján a két egér törzsben nincs különbség a GM-CFU progenitorok számában normál tenyésztési feltételek között (2. ábra). Látszólag a vérképzés ép, nem sérült az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerekben.



2. ábra: A csontvelő össz-sejtszáma és granulocita-makrofág kolóniaszáma (GM-CFU) a kontroll és az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek csoportjában normál tenyésztési feltételek között (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve.

5.1.3. A csontvelői cellularitás, a GM-CFU kolóniaszám és a teljes femorális GM-CFU tartalom *db/db* egerekben és kontroll párjaikban egyszeri, nagy dózisú carboplatin beadása után

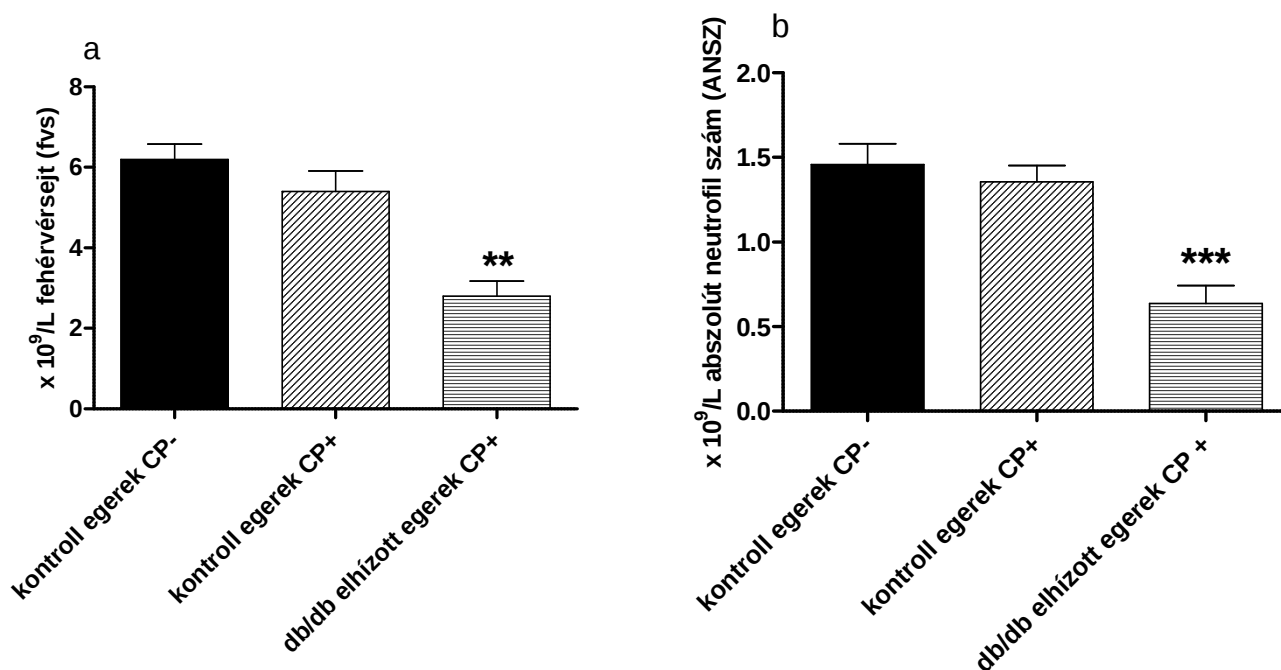
Egyszeri, nagy dózisú (100 mg/ttkg) carboplatin beadásával idéztünk elő súlyos csontvelőkárosodást a *db/db* egerekben és a kontroll csoportban. Vizsgáltuk, hogy az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek fogékonyabbak-e a carboplatin csontvelőkárosító hatására a kontroll párjaikhoz képest. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a 100 mg/ttkg carboplatin dózis mindkét csoportban károsította a csontvelői funkciókat, azonban az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerekben nagyobb volt a csontvelő károsodásának mértéke. Mind a cellularitás (3/a. ábra), mind a GM-CFU kolóniaszám (3/b. ábra) és a teljes femorális GM-CFU tartalom (3/c. ábra) is szignifikánsan alacsonyabb a *db/db* egerek csoportjában összehasonlítva a kontroll csoporttal, ennek következtében a *db/db* egerekben a csontvelőnek alacsonyabb a regenerációs képessége, hogy helyreállítsa a funkcióit a carboplatin okozta károsodást követően. Mindez arra utal, hogy a carboplatin súlyosabb károsodást idézett elő a *db/db* egerek csontvelői tenyészeiben, mint a kontroll csoport mintáiban, az elhízott, inzulinrezisztens állatok fogékonyabbnak bizonyultak az *in vivo* beadott citosztatikum csontvelőkárosító hatásaira.



3. ábra: A csontvelő össz-sejtszáma (a), granulocita-makrofág kolóniaszáma (GM-CFU) (b) és a teljes GM-tartalma (c) a kontroll és az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek csoportjában carboplatin beadása nélkül, továbbá egyszeri, nagy dózisú carboplatin beadása után (n=10 valamennyi csoportban) Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve. ***P<0.001)

5.1.4. A fehérvérsejtszám és az abszolút neutrophil szám változása a perifériás vérben egyszeri, nagy dózisú carboplatin beadása után *db/db* egerekben és kontroll párjaikban

A 100 mg/ttkg dózisban beadott carboplatin injekció után 48 órával meghatározva a perifériás vérben a fehérvérsejtszámot, azt tapasztaltuk, hogy a fehérvérsejtszám szignifikánsan lecsökkent a *db/db* egerek csoportjában a kontroll állatokhoz képest, ez a csökkenés elsősorban a perifériás vérben keringő neutrofil granulociták pusztulását jelentette (4/a. ábra). Az abszolút neutrofil szám a carboplatin kezelést követően kétszer olyan magas volt a kontroll egerekben, mint az elhízott, diabetikus *db/db* egerekben ($1,35 \pm 0,09 \times 10^9/L$), miközben a carboplatin kezelést nem kapott kontroll csoporthoz képest nem volt kimutatható szignifikáns különbség a kontroll csoportban a carboplatin beadása után 48 órával (4/b. ábra).



4. ábra: A fehérvérsejtszám (a) és az abszolút neutrofil szám (b) változása a vehikulum-kezelt kontroll csoportban, illetve a 100 mg/kg carboplatinval kezelt kontroll, és *db/db* egér csoportokban a kezelést követően 48 órával. (n=10 valamennyi csoportban) Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve. **P<0.01 és ***P<0.001)

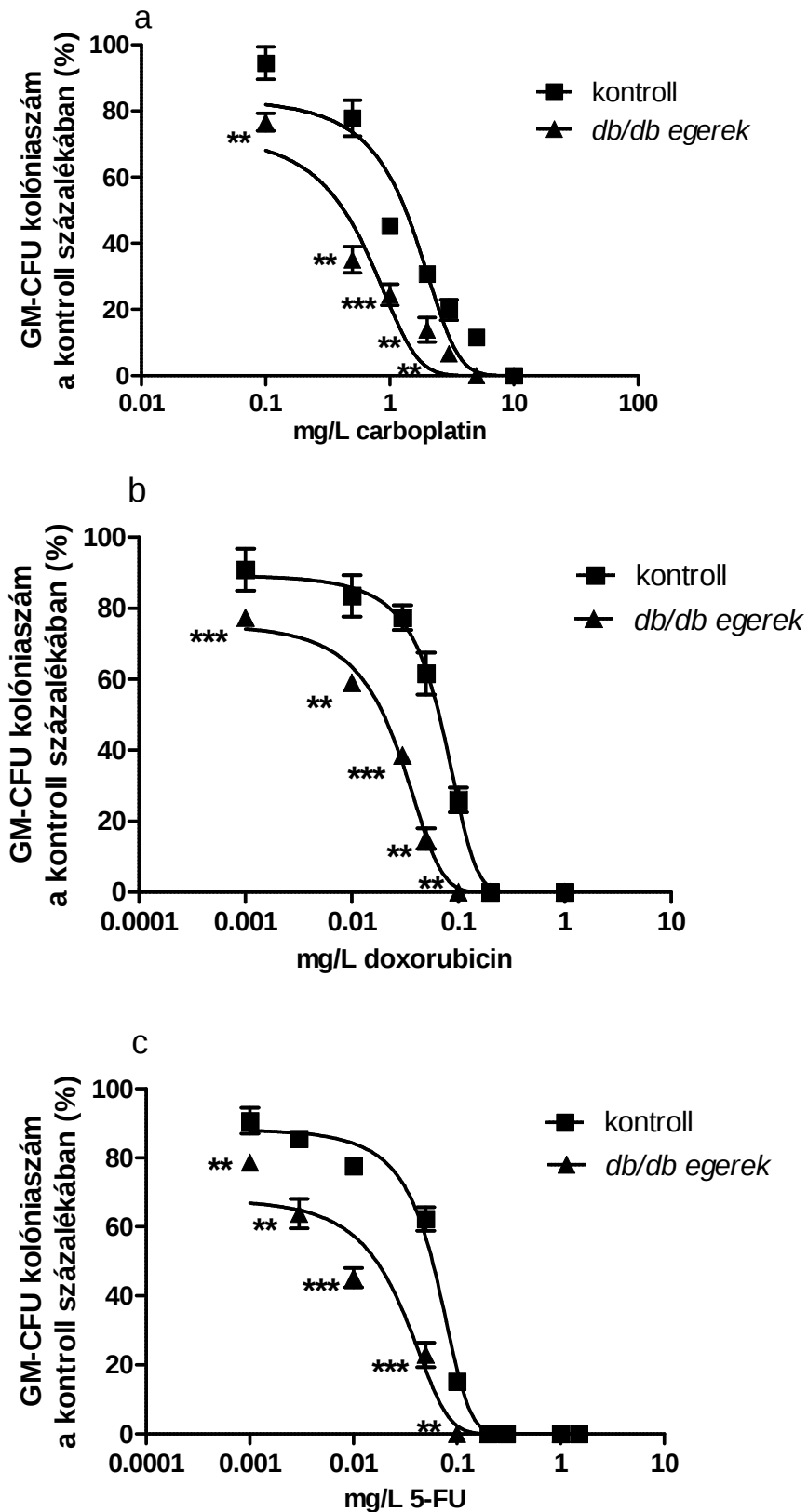
5.1.5. *In vitro* a csontvelői granulocita-makofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége elhízott *db/db* egerekben és kontroll párjaikban

A két egér törzsből származó csontvelő sejtekből speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk, ezekhez a tenyészetekhez adtuk hozzá a különböző hatásmechanizmusú citosztatikumokat, név szerint carboplatint, doxorubicint és 5-fluorouracilt növekvő koncentrációban. Ezáltal a citosztatikumok közvetlen hatásait tudtuk vizsgálni a csontvelő GM-CFU progenitor sejt populációjára.

A carboplatin csökkentette a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességét mind az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek, mind a kontroll párjaik esetében. Azonban összehasonlítva a kontroll csoporttal a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb a *db/db* egerek esetében (5/a. ábra). Ezeknek az egereknek a GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a carboplatin toxikus hatásaira.

A doxorubicin szintén csökkentette a kolóniaképző képességét mind a kontroll, mind az elhízott, inzulinrezisztens egyedek GM-CFU progenitorainak. Azonban ebben az esetben is a *db/db* egerek esetében szignifikánsan nagyobb volt a kolóniaszám csökkenés a kontroll egyedekhez képest (5/b. ábra). Az obesez, inzulinrezisztens egerek csontvelői GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a doxorubicin károsító hatásaira.

A másik két citosztatikumhoz hasonlóan, 5-fluorouracil hatására is csökkent a GM-CFU kolóniaszám a kontroll és a *db/db* egerek csontvelő tenyészeiben. Azonban a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb volt az elhízott, inzulinrezisztens egerek esetében, összehasonlítva a kontroll csoporttal őket (5/c. ábra). A *db/db* egerek GM-CFU progenitorai érzékenyebbek voltak az 5-FU myelotoxikus hatásaira.



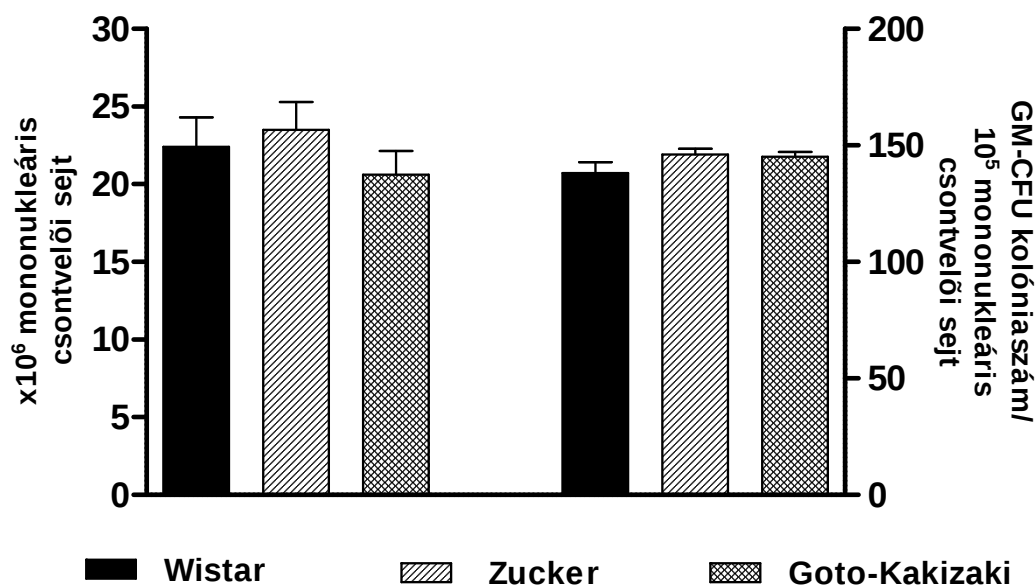
5. ábra: GM-CFU kolóniaszám a kontroll százalékában ábrázolva az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek csoportjában és a kontroll párjaikban, a tenyészetek növekvő koncentrációban tartalmaztak carboplatint (a), doxorubicint (b) és 5-fluorouracilt (c) (n=10 valamennyi csoportban) Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve.**P<0.01 és ***P<0.001).

5.2. A három különböző patkánytörzsön végzett vizsgálatok eredményei:

5.2.1. A csontvelő funkciói a kontroll Wistar, az elhízott, inzulinrezisztens Zucker, nem elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányokban normál tenyésztési feltételek között, citosztatikumok jelenléte nélkül

A csontvelő károsodás mértékét a femorális csontvelő teljes cellularitásának és a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaszámának változása mutatja. Az állatok exterminációját követően, a csontvelő kimosása után elkészítettük a csontvelő szuszpenziókat. A femorális össz-sejtszámot, a sejtuszuszpenzióban megszámlolt sejtszám és a szuszpenzió térfogatának szorzataként adjuk meg. Ez a paraméter a Wistar, a Goto-Kakizaki és a Zucker patkányok esetében sem mutatott különbséget (6. ábra).

A GM-CFU progenitorok kolóniaszámának változását speciális lágy-gél tenyészetekben vizsgáltuk. A tenyészetekben a sejteknek fiziológiás feltételeket biztosítottunk. A kontroll Wistar, az elhízott, inzulinrezisztens Zucker és a nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok mintáiban nem mutattunk ki különbséget a GM-CFU progenitorok kolóniaszámát tekintve normál tenyésztési feltételek között (6. ábra). Látszólag a hemopoézis ép az obez, inzulinrezisztens Zucker és a nem-elhízott, inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányokban fiziológiás körülmények között.



6. ábra: A csontvelő össz-sejtszáma és granulocita-makrofág kolóniaszáma (GM-CFU) a kontroll Wistar, az elhízott, inzulinrezisztens Zucker és a nem-elhízott, inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok csoportjában normál tenyésztési feltételek között (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve.

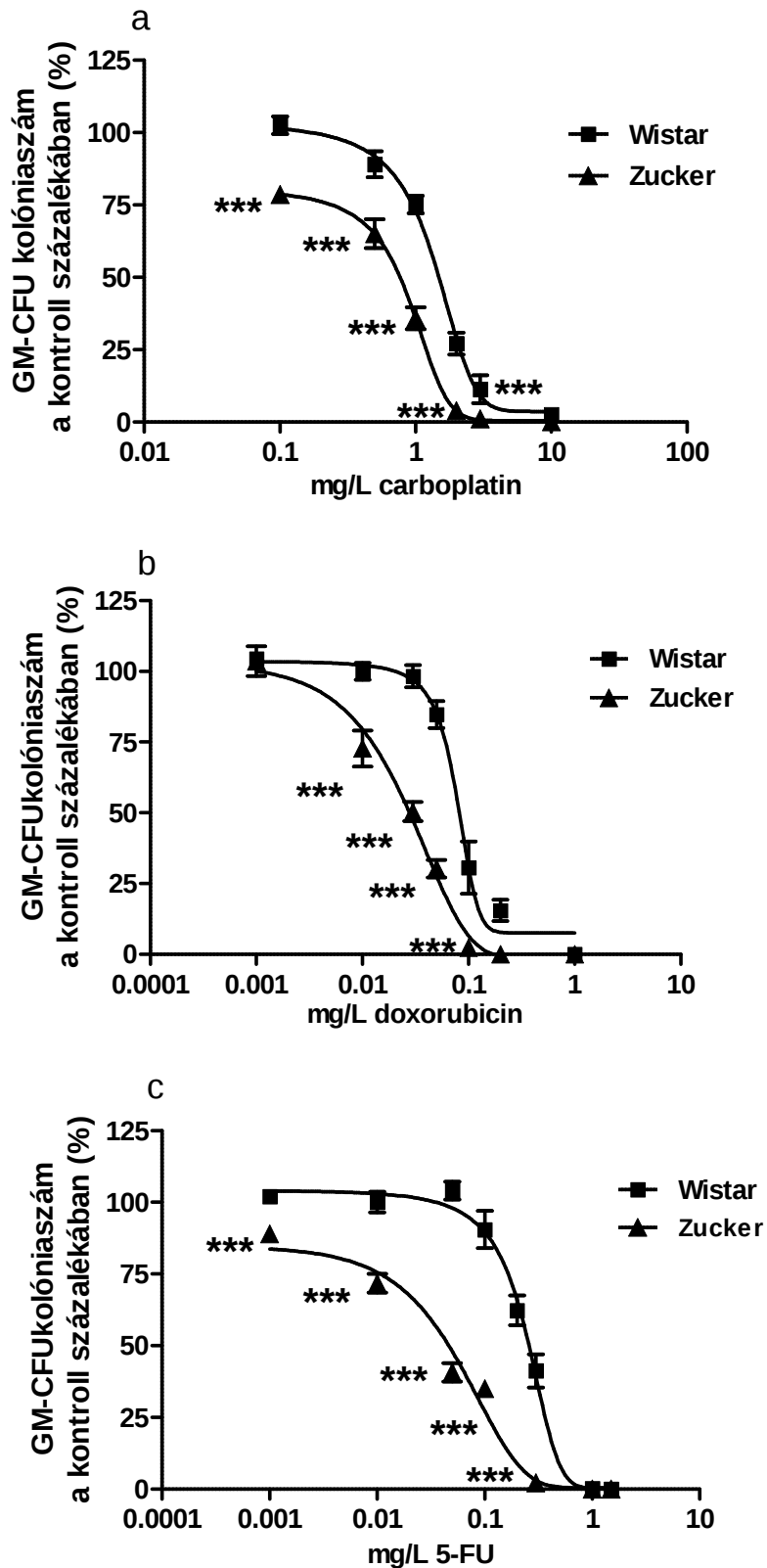
5.2.2. *In vitro* a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége elhízott, inzulinrezisztens Zucker és a kontroll, Wistar patkányokban

A két különböző patkány törzsből származó csontvelő sejtekből speciális lágy-gél tenyészeteket készítettünk, ezekhez a tenyészetekhez adtuk hozzá a különböző hatásmechanizmusú citosztatikumokat, név szerint carboplatint, doxorubicint és 5-fluorouracilt növekvő koncentrációban. Ezáltal a citosztatikumok közvetlen hatásait tudtuk vizsgálni a csontvelő GM-CFU progenitor sejt populációjára.

A carboplatin dózisfüggően csökkentette a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességét mind az elhízott, inzulinrezisztens Zucker patkányokban, mind a kontroll párjaikban. Azonban összehasonlítva a kontroll csoporttal a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb a Zucker patkányok esetében (7/a. ábra). Ezeknek a patkányoknak a GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a carboplatin myelotoxikus hatásaira.

A doxorubicin szintén csökkentette a kolóniaképző képességét dózisfüggően, mind a Wistar, mind az elhízott, inzulinrezisztens egyedek GM-CFU progenitor sejtjeinek. Azonban ebben az esetben is a Zucker patkányok esetében szignifikánsan nagyobb volt a kolóniaszám csökkenés a kontroll csoport egyedeihez képest (7/b. ábra). Az obez, inzulinrezisztens Zucker patkányok csontvelői GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a doxorubicin károsító hatásaira.

A másik két citosztatikumhoz hasonlóan, 5-fluorouracil hatására is dózisfüggően csökkent a GM-CFU kolóniaszám a kontroll és a Zucker patkányok csontvelő tenyészeiben. Azonban a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb volt az elhízott, inzulinrezisztens patkányok esetében, összehasonlítva a kontroll csoporttal (7/c. ábra). A Zucker patkányok GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak az 5-FU myelotoxikus hatásaira.

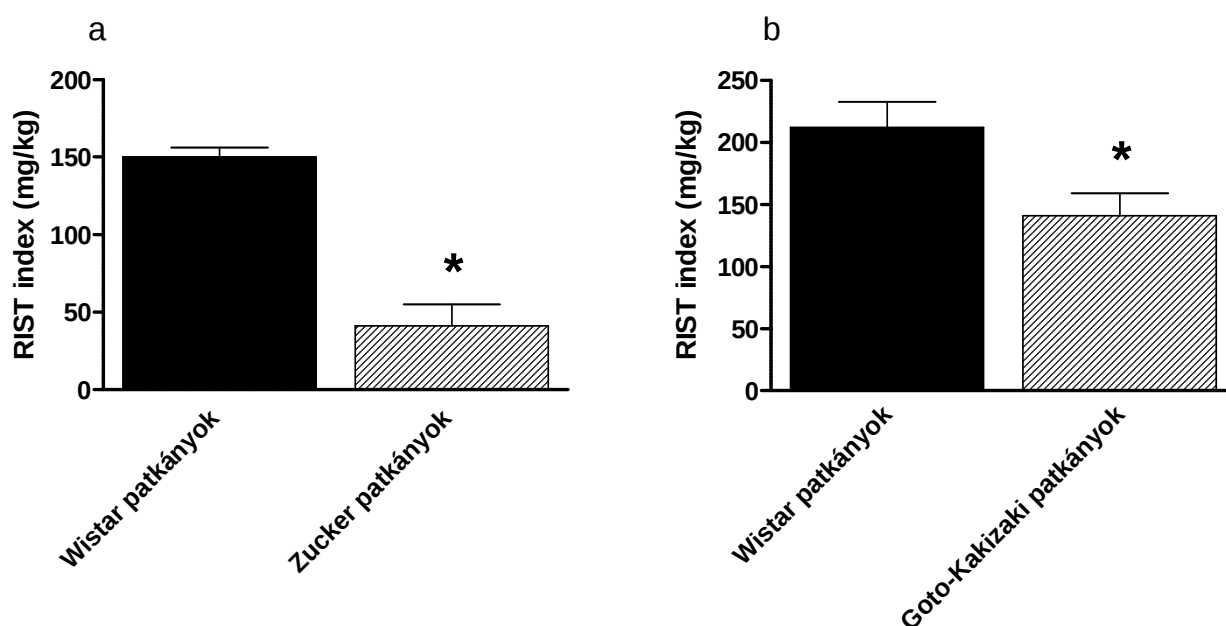


7. ábra: GM-CFU kolóniaszám a kontroll százalékában ábrázolva az elhízott, inzulinrezisztens Zucker patkányok és a kontroll, Wistar patkányok csoportjában, a tenyészetek növekvő koncentrációban tartalmaztak carboplatint (a), doxorubicint (b) és 5-fluorouracilt (c) (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve.***P<0.001

5.2.3. Insulinérzékenység meghatározás Wistar, Goto-Kakizaki és Zucker patkányokban

Összehasonlítottuk az elhízott, inzulinrezisztens Zucker patkányok és a nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok RIST index értékét a kontroll, Wistar patkányokéval. A gyors insulinérzékenység vizsgálat során az állatok bólusban kaptak inzulint, majd glükózt. A teszt során egy kontroll vércukor értéket kell beállítani és a procedúra során mérjük, hogy mennyi glükóz szükséges a kontroll vércukor érték fenntartásához.

Normál esetben (megfelelő insulinérzékenység) több glükóz kell a vércukor érték megtartásához, így magasabb oszlopot kapunk, inzulinrezisztens állatoknál, pedig alacsonyabb oszlopot fogunk kapni, mert kisebb lesz a beadott glükóz mennyisége. Ennek megfelelően az alábbi ábrák mutatják, hogy a Wistar patkányhoz képest a Zucker patkányoknál alacsonyabb oszlopot kapunk, ami csökkent insulinérzékenységre utal, szignifikánsan alacsonyabb az insulinérzékenységük a kontroll állatokhoz képest (8/a. ábra). A Goto-Kakizaki patkányok esetében szintén szignifikánsan alacsonyabb a RIST értékeket kaptunk, ami az esetükben is csökkent insulinérzékenységre utal (8/b. ábra).



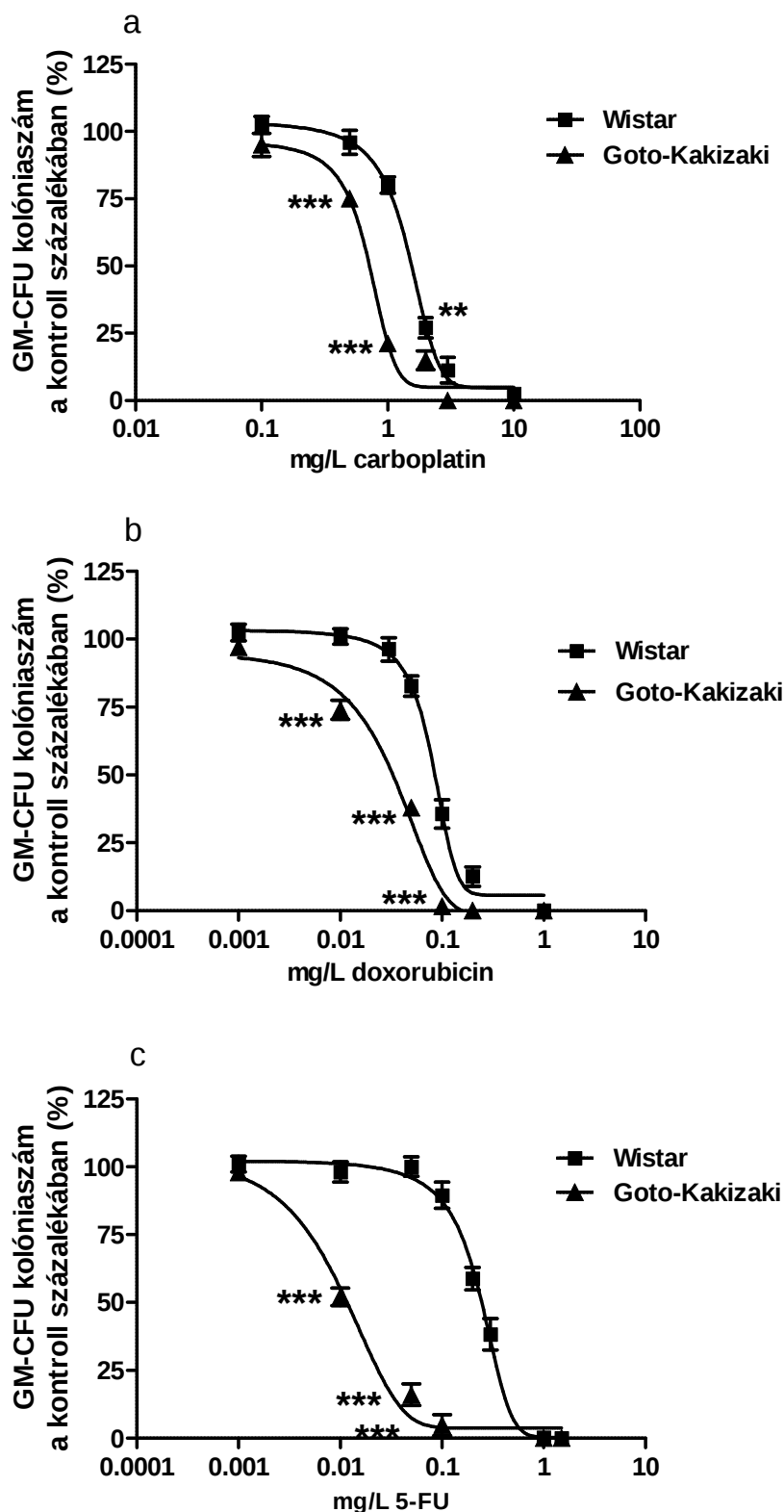
8. ábra: Gyors insulinérzékenységi tesztel (RIST) meghatározott insulinérzékenység a Zucker és a Goto-Kakizaki patkányokban összehasonlítva a kontroll, Wistar patkányokkal (n=8 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve.*P<0.05

5.2.4. *In vitro* a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki és a kontroll, Wistar patkányokban

A carboplatin dóziszfüggően csökkentette a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességét a nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányokban, és a kontroll, Wistar patkányokban is. Azonban a kontroll csoporthoz képest a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb a Goto-Kakizaki patkányok esetében (9/a. ábra). Ezeknek a patkányoknak a GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a carboplatin myelotoxikus hatásaira.

A doxorubicin szintén dóziszfüggően csökkentette a kolóniaképző képességét, mind a Wistar, mind a normál testsúlyú, de inzulinrezisztens egyedek GM-CFU progenitor sejtjeinek. Azonban ebben az esetben is a Goto-Kakizaki patkányok csontvelő tenyészeiben szignifikánsan nagyobb volt a kolóniaszám csökkenés a kontroll csoport eredményeihez képest (9/b. ábra). A nem-obez, inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok csontvelői GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a doxorubicin károsító hatásaira.

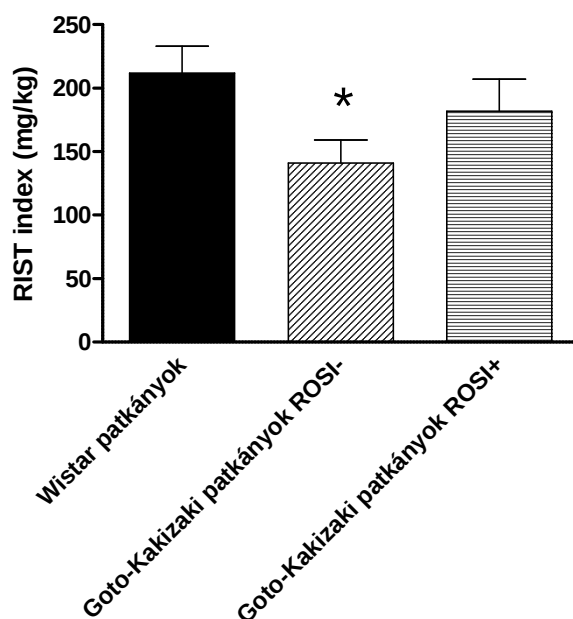
A másik két citosztatikumhoz hasonlóan, 5-fluorouracil hatására is dóziszfüggően csökkent a GM-CFU kolóniaszám a kontroll és a Goto-Kakizaki patkányok csontvelő tenyészeiben. Azonban a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb volt a nem-elhízott, de inzulinrezisztens patkányok esetében, összehasonlítva a kontroll csoporttal (9/c. ábra). A Goto-Kakizaki patkányok GM-CFU progenitor sejtjei, hasonlóan a Zucker patkányokhoz, érzékenyebbek voltak az 5-FU myelotoxikus hatásaira.



9. ábra: GM-CFU kolóniaszám a kontroll százalékában ábrázolva a normál testsúlyú, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok és a kontroll, Wistar patkányok csoportjában, a tenyészetek növekvő koncentrációban tartalmaztak carboplatint (a), doxorubicint (b) és 5-fluorouracilt (c) (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában vannak feltüntetve. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

5.2.5. Roziglitazon előkezelés hatása a Goto-Kakizaki patkányok inzulinérzékenységére

A Goto-Kakizaki patkányokat előkezeltük 14 napig, per os 3 mg/ttkg inzulinérzékenyítő szerrel, a roziglitazonnal. Az előkezelést követően meghatároztuk az inzulinérzékenységet gyors inzulinérzékenységi teszttel az előkezelt, a kezeletlen Goto-Kakizaki és a Wistar patkányokban. Eredményeink azt mutatják, hogy a roziglitazonnal történt előkezelést követően megnőtt az inzulinérzékenység az előkezelt csoportokban, az előkezelt állatok inzulinérzékenysége majdnem eléri a kontroll csoportét. Míg a kezelést nem kapott Goto-Kakizaki patkányokban szignifikánsan alacsonyabb az inzulinérzékenység a Wistar és a roziglitazon előkezelt csoportokhoz képest.

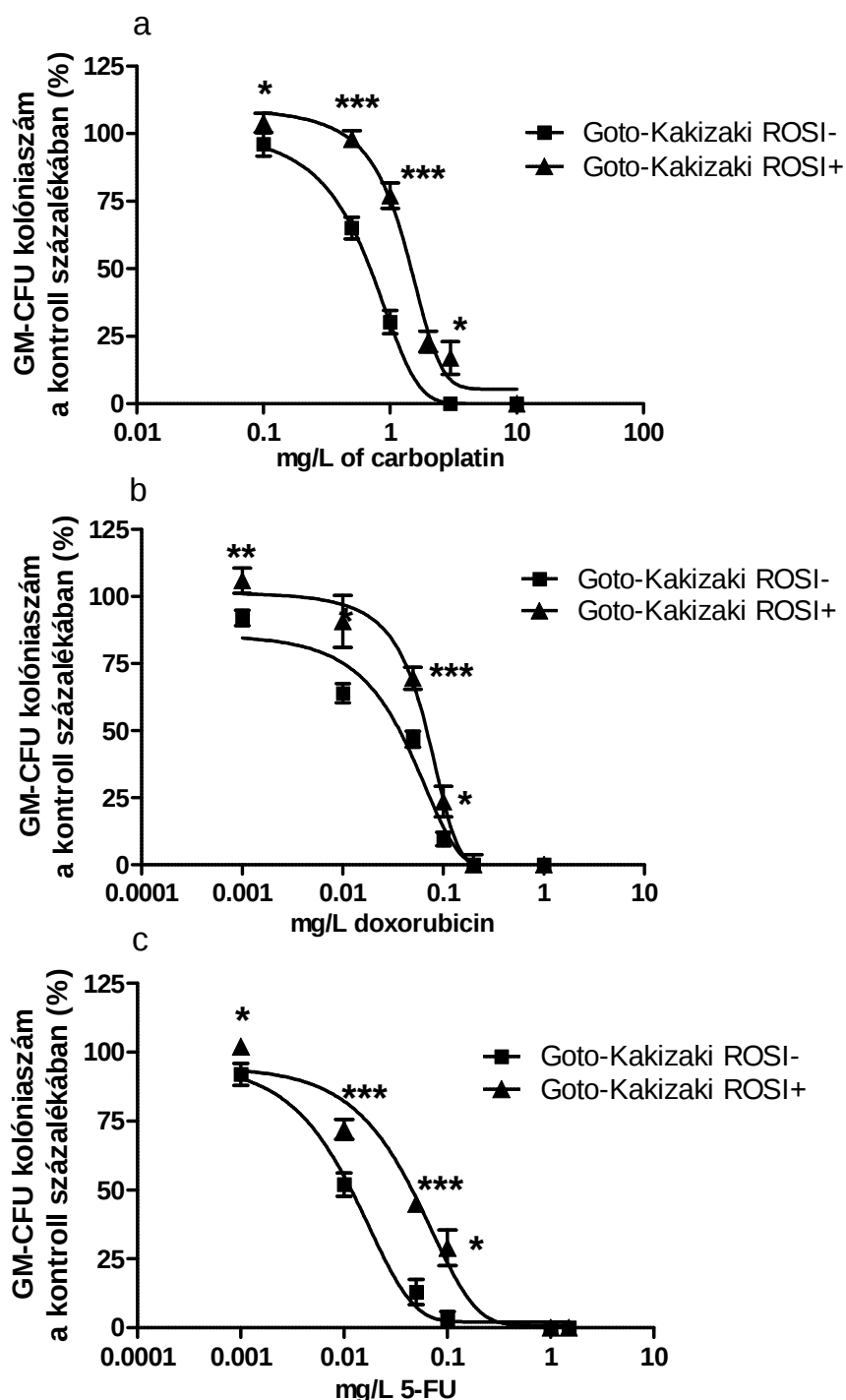


10. ábra: Gyors inzulinérzékenységi teszttel (RIST) meghatározott inzulinérzékenység a Wistar és a roziglitazonnal nem kezelt, illetve a roziglitazon előkezelést kapott Goto-Kakizaki patkányokban (n=8 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve *P<0.05

5.2.6. *In vitro* a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége Goto-Kakizaki és roziglitazonnal előkezelt Goto-Kakizaki patkányokban

Az előkezelt csoportokban csökkent a GM-CFU progenitor sejtek érzékenysége a carboplatin (11/a. ábra), a doxorubicin (11/b. ábra) és az 5-fluorouracillal (11/c. ábra) szemben. Roziglitazon előkezelés után a GM-CFU progenitor sejtek megnövekedett életképességét mutattuk az előkezelt csoportokban összehasonlítva a kezeletlen Goto-Kakizaki patkányokkal. A roziglitazon előkezelést követően nőtt az állatok

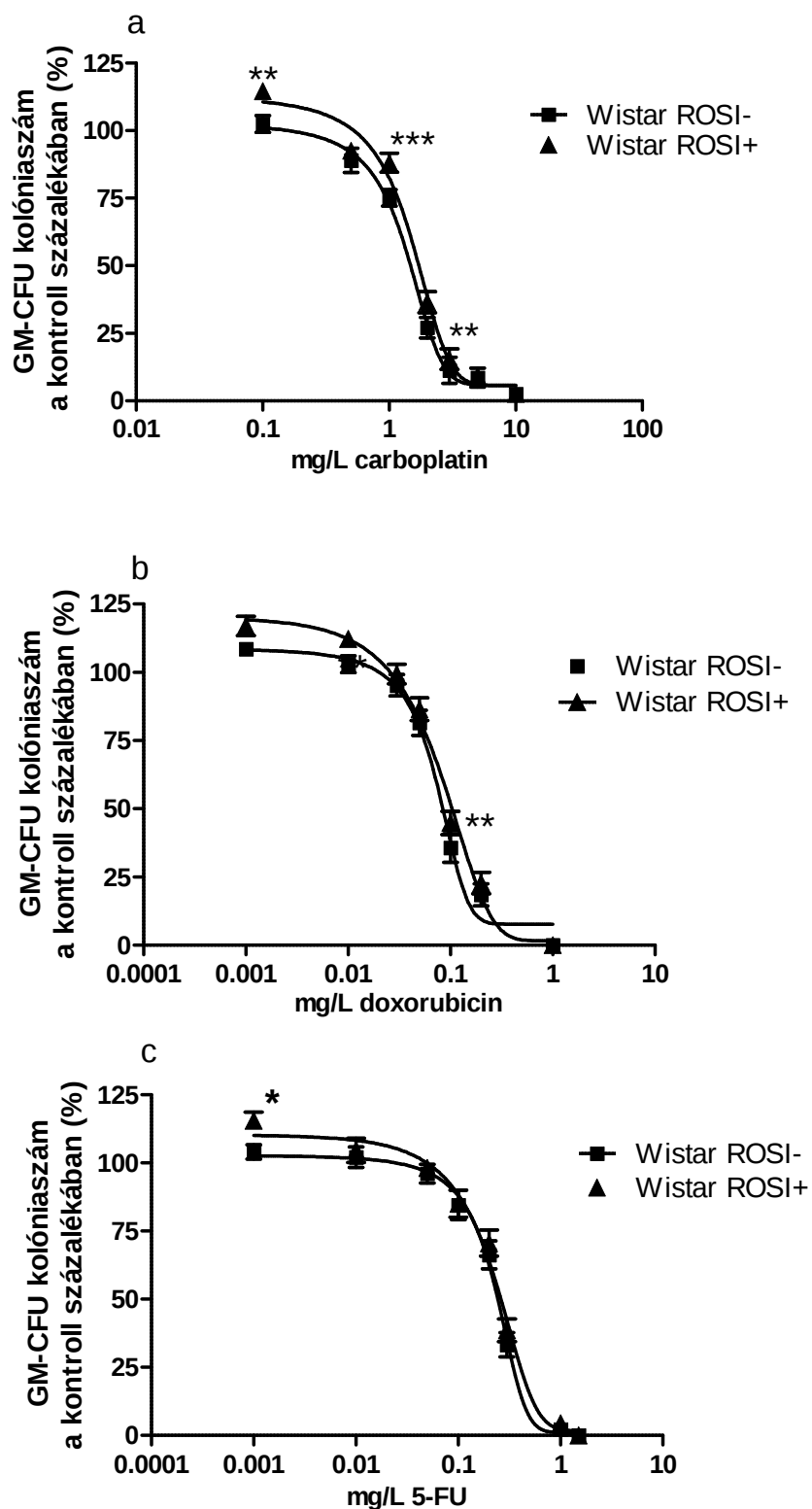
inzulinérzékenysége, amivel párhuzamosan csökkent a femorális GM-CFU progenitor sejtek érzékenysége a citosztatikumok csontvelő károsító hatásaival szemben. Az alkalmazott citosztatikumok dózis-hatás görbéi eltolódtak a normál tartomány felé.



11. ábra: GM-CFU kolóniaszám a kontroll százalékában ábrázolva a rozigitazonnal előkezelt Goto-Kakizaki és a kezeletlen Goto-Kakizaki patkányok csoportjában, a tenyészetek növekvő koncentrációban tartalmaztak carboplatint (a), doxorubicint (b) és 5-fluorouracilt (c) (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

5.2.7. *In vitro* a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) citosztatikum érzékenysége kezeletlen Wistar és roziglitazonnal előkezelt Wistar patkányokban

A roziglitazon előkezelést követően kissé emelkedett a GM-CFU kolóniaszám a speciális lágy-gél tenyészetekben, amelyek a korábbiakban leírt koncentrációban tartalmazták a carboplatint, a doxorubicint és az 5-FU-t. Tehát, kimutatható volt egy enyhe emelkedés a progenitor sejtek kolóniaképző képességében a citosztatikumokkal szemben, de ezek a legtöbb koncentrációpontban nem voltak szignifikánsak (12/a, b, c. ábra). Ezek az eredmények megegyeznek munkacsoportunk korábbi megfigyeléseivel, amikor nem tudtunk kimutatni a roziglitazonnak és az inzulinnek szignifikáns hatásait egészséges csontvelőre 5 napos előkezelést követően (Benkő és mtsai. 2003; Djazayeri és mtsai. 2005).

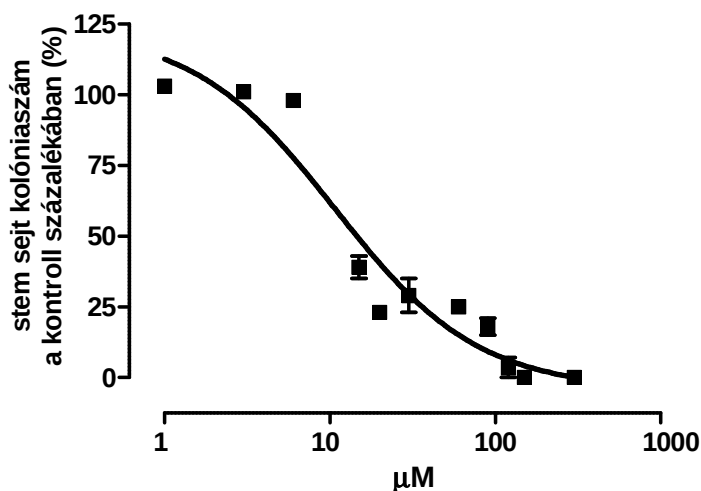


12. ábra: GM-CFU kolóniaszám a kontroll százalékában ábrázolva a roziglitazonnal előkezelt Wistar és a kezeletlen Wistar patkányok csoportjában, a tenyészetek növekvő koncentrációban tartalmaztak carboplatint (a), doxorubicint (b) és 5-fluorouracilt (c) (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve *P<0.05, **P<0.01)

5.3. UD29 mononukleotiddal végzett vizsgálatok eredményei:

5.3.1. Az UD29 mononukleotid hatása *in vitro* JY sejt vonal stem sejtjeinek kolóniaképző képességére

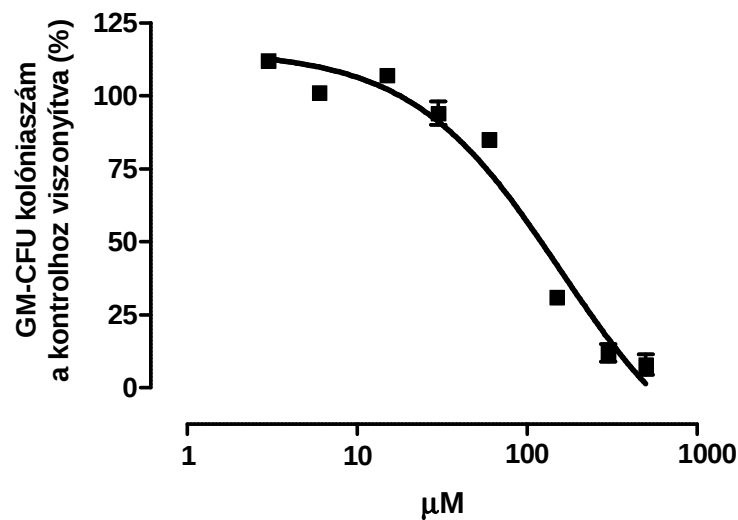
In vitro sejtenyészetekben vizsgáltuk a mononukleotid hatásait a humán B-sejtes limfoid leukémiát reprezentáló JY sejtek kolóniaképző képességére. Az UD29 mononukleotid dózisfüggően csökkentette a JY leukémia stem sejtek kolóniaképző képességét. Meghatároztuk a kolóniaképződés 50%-os gátló koncentráció értékét, amely 10,77 μM -nál volt (13. ábra).



13. ábra: A JY (B-sejtes limfoid leukémia) sejtek kolóniaképző képessége UD29 jelenlétében. *In vitro* a tenyészetek 1-300 μM koncentráció tartományban tartalmazták a vizsgálati anyagot. Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

5.3.2. Az UD29 mononukleotid hatása *in vitro* egészséges humán GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességére

A mononukleáris csontvelő sejteket tartalmazó tenyészetekhez a vizsgálati anyag emelkedő koncentrációit adtuk. A két hetes tenyésztési idő letelte után meghatároztuk a kinőtt kolóniák számát a koncentrációk függvényében. A tenyészeteket 3-300 μM koncentráció tartományban kezeltük a vizsgált vegyülettel. A vizsgálati anyag még 60 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban sem gátolta jelentős mértékben a granulocita-makrofág progenitor sejtek kolóniaképződését (kolóniaszám > 85%). Meghatároztuk a kolóniaképződés 50%-os gátló koncentráció értékét, amely 156 μM -nál volt (14. ábra).

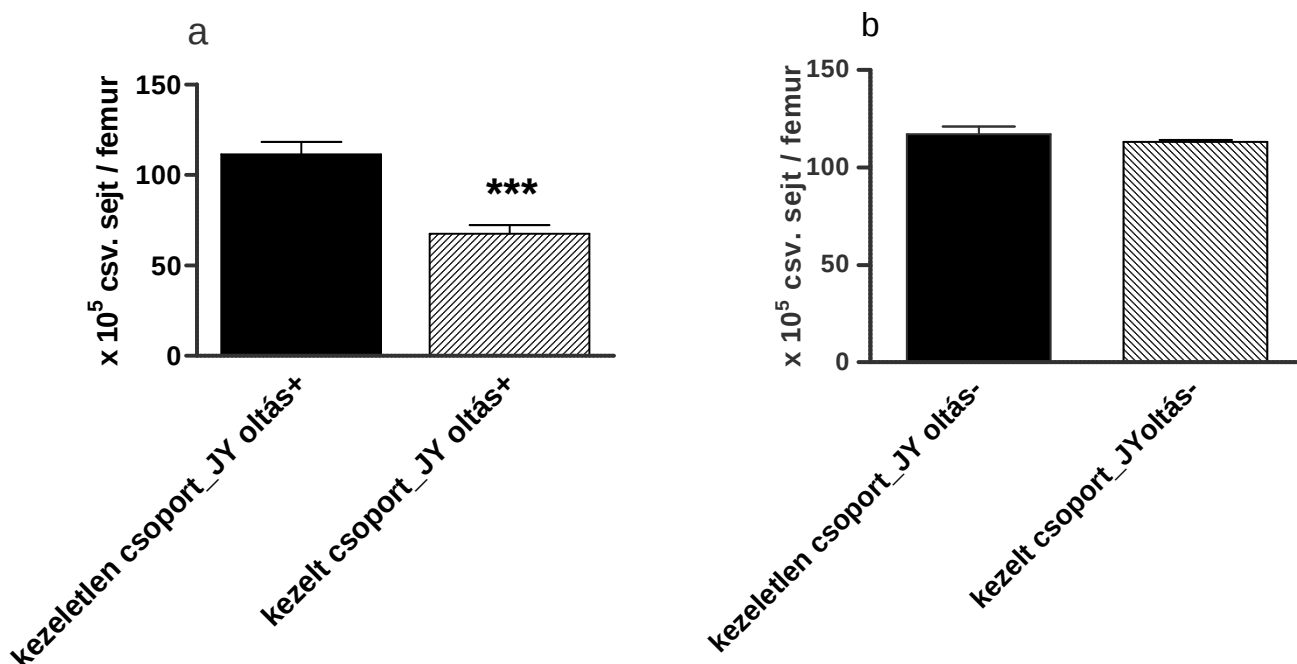


14. ábra: Az egészséges, human csontvelői GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képessége UD29 jelenlétében. *In vitro* a tenyészetek 1-300 μM koncentráció tartományban tartalmazták a vizsgálati anyagot. Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve.

5.3.3. Az UD29 mononukleotid hatása *in vivo* SCID egerekben megtapadt JY leukémia sejtvonal kolóniaképző képességére

5.3.3.1. UD29 hatása a femorális csontvelő össz-sejttartalmára JY tumor sejttel transzplantált és JY-sejttel nem transzplantált SCID egerekben

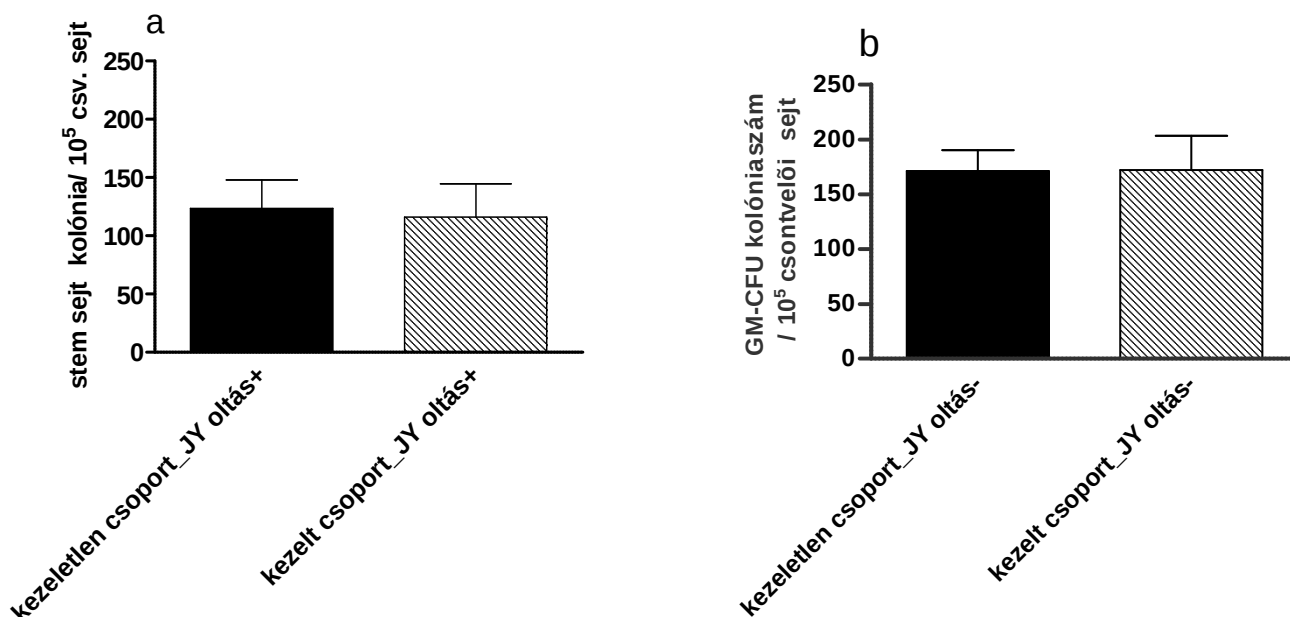
In vivo SCID egerekben a JY sejttel transzplantált csoportokban az UD29 szignifikánsan csökkentette a tumor sejtekkel elárasztott csontvelő össz-sejttartalmát, azaz csökkent a cellularitás a kezeletlen csoporthoz viszonyítva (15/a. ábra). Ezzel szemben a JY sejttanszplantációt nem kapott csoportban nem csökkent a csontvelő össz-sejtszáma az UD29 kezelést kapott csoportokban, összehasonlítva a kezeletlen csoporttal (15/b. ábra).



15. ábra: JY tumor sejttel transzplantált SCID egerek csontvelőjének össz-tumor stem sejt tartalma a kezelt és kontroll csoportokban (a). JY tumor sejttel nem transzplantált SCID egerek femorális össz-sejttartalma kezeletlen és UD29 mononukleotiddal kezelt csoportokban (b) (n=10 valamennyi csoportban) Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve. ***P<0.001

5.3.3.2. UD29 hatása a leukémia stem sejtek előfordulási gyakoriságára, JY-sejttel transzplantált SCID egerekben, és a JY sejtet nem kapott csoportok normál GM-CFU kolóniaszámára

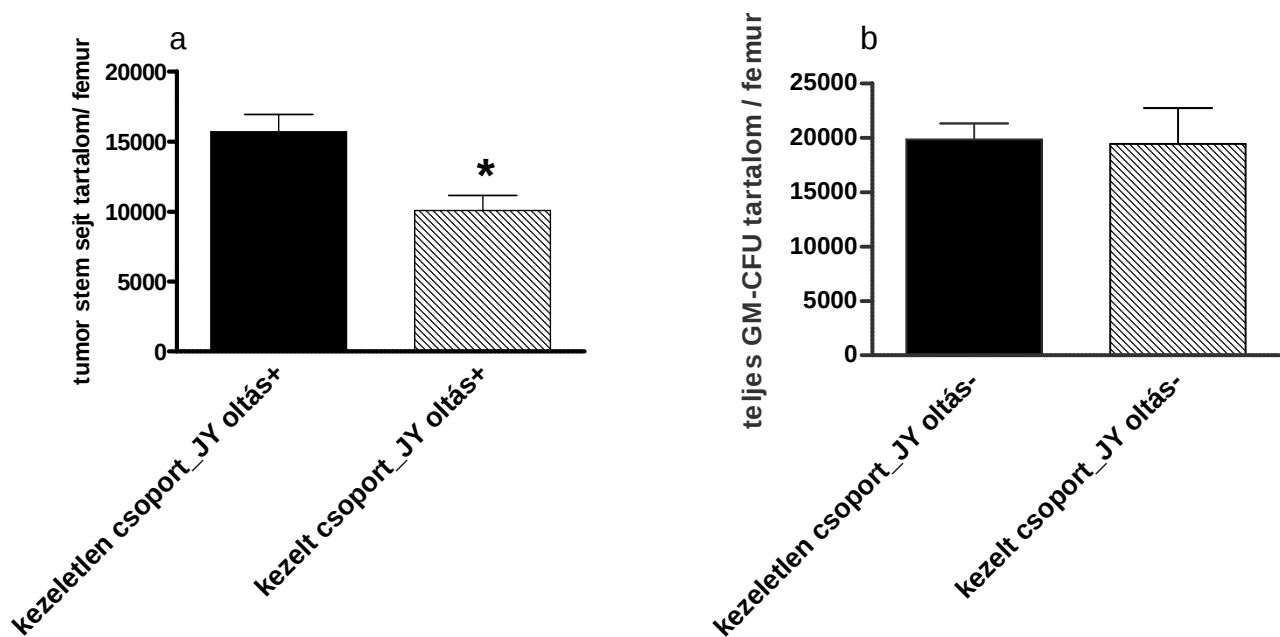
Az UD29 előkezelést követően a csontvelőben a leukémia stem sejt kolóniaszám nem csökkent a kontroll csoporthoz képest, ami arra utal, hogy az UD29 nem kizárólag a tumor sejtpopuláció stem sejtjeit, hanem a tumor többi sejttypusát is pusztítja (16/a. ábra). A JY tumor sejttel nem transzplantált csoportokban az UD29 előkezelést követően nem csökkent szignifikánsan a GM-CFU kolóniaszám, a kezeletlen csoporthoz viszonyítva (16/b. ábra).



16. ábra: JY tumor sejttel transzplantált SCID egerek csontvelőjében a stem sejt kolóniaszám a kezelt és kezeletlen csoportokban (a). JY tumor sejttel nem transzplantált SCID egerekben a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaszáma az UD29 mononukleotiddal kezelt és kezeletlen csoportokban (b) (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag $\pm$ SEM formában vannak feltüntetve.

5.3.3.3. UD29 hatása a femorális csontvelő teljes leukémia stem sejt tartalmára és a csontvelő GM-CFU tartalmára a JY tumor sejttel nem transzplantált SCID egerekben

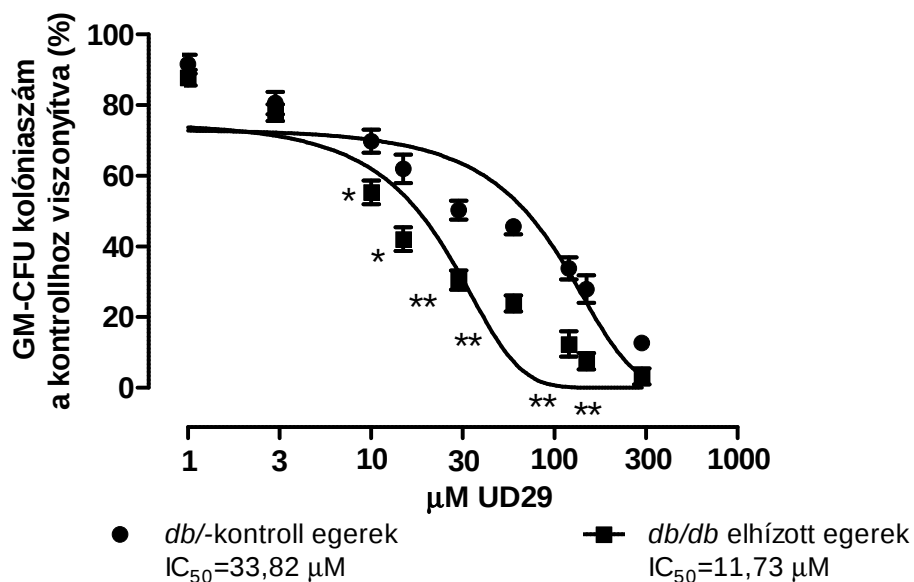
Összehasonlítva a kontroll csoporttal, a vizsgálati anyaggal kezelt csoportban szignifikánsan csökkent az össz-tumor stem sejt tartalom és következésképpen a leukémiás sejtpopuláció (17/a. ábra). Ezzel szemben a JY sejttel nem transzplantált csoportokban a teljes femorális GM-CFU tartalom nem csökkent szignifikánsan a kezelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva (17/b. ábra).



17. ábra: JY tumorsejttel transzplantált SCID egerek csontvelőjében a teljes stem sejt tartalom a kezelt és kezeletlen csoportokban (a) JY tumor sejttel nem transzplantált SCID egerekben a teljes GM-CFU tartalom az UD29 mononukleotiddal kezelt és kezeletlen csoportokban (b) (n=10 valamennyi csoportban). Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve. *P<0.05

5.3.4. *In vitro* UD29 mononukleotid hatása a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) kolóniaképző képességére elhízott, inzulinrezisztens db/db egerekben és kontroll párjaikban

Az UD29 mononukleotid *in vitro* lágy-gél tenyészetekben dóziszfüggően csökkentette a GM-CFU kolóniaszámot, mind a db/db egerek, mind a kontroll párjaik tenyészeiben. A kolóniaszám csökkenés szignifikánsan nagyobb volt az elhízott, inzulinrezisztens egerek esetén, mint a kontroll csoportban. Viszont összehasonlítva a korábban vizsgált carboplatin, doxorubicinnel és 5-fluorouracillal, látható, hogy az UD29 esetében a kolóniaképzés 50%-os gátló koncentráció értéke lényegesen magasabb volt a kontroll és a db/db egerek tenyészeiben egyaránt (2. táblázat). A vizsgált anyag tehát kevésbé károsítja a GM-CFU progenitor sejteket, mint a carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil.



18. ábra: Elhízott, inzulin rezisztens *db/db* egerek és kontroll párjaik csontvelőtenyésztéseiben a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képessége UD29 jelenlétében. *In vitro* a tenyészetek 1-300 μM koncentráció tartományban tartalmazzák a vizsgálati anyagot. Az adatok átlag±SEM formában vannak feltüntetve. *P<0.05, **P<0.01

2. táblázat: A GM-CFU kolóniaképződés 50%-os gátló koncentráció értékei, carboplatin, doxorubicin, 5-fluorouracil vagy 4-tio-uridin-monofoszfát jelenlétében a kontroll és az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek csoportjában.

	IC50 (μM) kontroll egerek csoportja	IC50 (μM) <i>db/db</i> egerek csoportja
carboplatin	2,22	0,46
doxorubicin	0,0082	0,0018
5-fluorouracil	0,03	0,015
4-tio-uridin-monofoszfát	33,82	11,73

6. MEGBESZÉLÉS

Napjainkban az elhízás „járványszerűen” terjed, a helytelen táplálkozás, a mozgásszegény életmód és a krónikus stressz következtében. Az elhízáson és a hozzá gyakran társuló inzulin rezisztencián alapuló kórállapotok úgy, mint a 2-es típusú diabétesz és a metabolikus szindróma, súlyos egészségügyi problémát jelentenek világszerte.

Mivel az elhízás több rosszindulatú megbetegedésre hajlamosít, így a túlsúllyal rendelkezők aránya a daganatos betegek között egyre nő. A prognózis sok esetben rosszabb a magas testtömeg index-szel rendelkező betegek körében (McTiernan és mtsai. 2003). Az obez betegek kemoterápiájának megtervezése számos nehézségbe ütközik. Az individuális dózis meghatározásához a testfelszín és a BMI egyaránt fontos. A testfelszín bár általában jó összefüggést mutat a clearance-szel, azonban, elsősorban elhízott betegekben már nem elegendő a gyógyszerek terápiás plazmakoncentrációjának beállításához (Canal és mtsai. 1998). Többen arra a következtetésre jutottak, hogy sokszor aluldozírozzák a túlsúlyos embereket, ami a terápia elégtelensége révén vezet magasabb mortalitáshoz (Griggs és mtsai. 2005).

Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy az obezitással együtt járó számtalan patológiás folyamat hat a csontvelői vérképző sejtekre is. Munkám során azt a feltételezést próbáltam tisztázni, hogy az obesitással társuló inzulin rezisztencia hogyan befolyásolhatja a femorális vérképző progenitor sejtek működését, különösen citosztatikumok hatására kialakuló myelotoxikus állapotokban. Tudományos munkámban ezért célul tűztem ki, hogy különböző elhízott, inzulinrezisztens, vagy sovány, de inzulin rezisztencia tüneteit mutató állatmodellekben vizsgáljam meg a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtpopuláció működését fiziológiás körülmények között, és citosztatikumok okozta myelotoxikus feltételek mellett. További célom volt, egy új fejlesztésű, korábbi vizsgálatok alapján anti-HIV és anti-proliferatív hatást mutató vegyület, a 4-tio-uridin-monofoszfát vizsgálata, mely egy ígéretes terápiás ágens lehet a tumorelles kemoterápiában.

6.1. A kísérleteimben felhasznált állatmodellek karakterizálása

Az ún. *db/db* egerekben a 4-es kromoszómán található mutáció meggátolja a leptin receptor expresszióját. A működőképes leptin receptor hiányában a kontrollálatlan étvágy, illetve a megnyúlt táplálkozási idő következtében a homozigóta egyedekben a 2-es típusú diabéteszre jellemző elváltozások már 8 hetes életkorban kifejlődnek (Sharma és mtsai. 2003), és az elváltozások progrediálnak az állatok 12 hetes koráig, amely életkorban a kísérleteinket végeztük. A munkám során felhasznált *db/db* homozigóta állatok a kontroll,

heterozigóta egyedekhez képest, szignifikánsan nagyobb testsúlyúak voltak (1/a. ábra). Továbbá a vércukor szintjük és a plazma inzulin szintjük is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll egyedekhez képest (1/b. ábra). A *db/db* egerek tehát a 2-es típusú cukorbetegség releváns tüneteit mutatták, míg a kontroll csoportot normál testsúly és egészséges glükóz metabolizmus jellemezte.

A Zucker obese patkányok az 5-ös kromoszómán levő leptin receptor gén autoszomális recesszív mutációja miatt az inzulin rezisztenciával társuló obesitas megfelelő modelljei. Ezek az állatok 4-5 hetes korukra elhízhatnak és a humán obesitassal társuló 2-es típusú diabetes mellitus minden tünetét, például inzulin rezisztencia, hiperfágia, hiperlipidémia, hiperkoleszterolémia, izom atrófia, hiperinzulinémia produkálják (Martin-Cordero és mtsai. 2009). A Goto-Kakizaki patkányok a non-obese inzulinrezisztens, nem-inzulinfüggő diabetes mellitus modelljei, az inzulin szekréció és a glükóz tolerancia génjeiben lévő mutáció miatt (Gauguier és mtsai. 1996). Gyors inzulin érzékenység vizsgálattal megállapítottuk, hogy a kísérleteinkhez választott két patkány törzs, a Zucker és a Goto-Kakizaki patkányok valóban inzulinrezisztensek. Összehasonlítottuk az elhízott, inzulinrezisztens Zucker patkányok és a nem-elhízott, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok RIST index értékét a kontroll, Wistar patkányokéval. A Wistar patkányhoz képes a Zucker patkányoknál szignifikánsan alacsonyabb inzulin érzékenységet tapasztaltunk (8/a. ábra). A Goto-Kakizaki patkányok esetében szintén szignifikánsan alacsonyabb a RIST értékeket kaptunk, ami az esetükben is inzulin rezisztenciára utal (8/b. ábra).

6.2. *A csontvelő funkcióinak jellemzése az össz-sejtszámmal (cellularitás) és a granulocita-makrofág progenitor sejtek kolóniaszámmal normál tenyésztési feltételek mellett a különböző elhízott, inzulinrezisztens állatmodellekben és kontrolljaikban*

A csontvelő funkciójának károsodásra jellemző, hogy lecsökken a csontvelőben az össz-sejtszám, a stem és progenitor sejtek előfordulási gyakorisága és a teljes femorális stem és progenitor sejt tartalom. A vérképző progenitor sejtek között a granulocita-makrofág sejtek képezik a legfontosabb populációt. Elsősorban ezeknek a sejteknek a pusztulása vezet a súlyos myelotoxikus állapot kialakulásához. Így munkánk során elsődleges volt annak tisztázása, hogy fiziológiás körülmények között vajon van-e különbség a csontvelő működésében és a célsejtek funkcióiban az elhízott, inzulinrezisztens állatokban és kontroll párjaikban.

Sem a *db/db* egerekkel végzett vizsgálatainkban, sem a Zucker obez és Goto-Kakizaki patkányokkal végzett kísérleteinkben nem tudtunk kimutatni eltérést a csontvelő működésében a kontroll csoporthoz képest, normál tenyésztési feltételek mellett. Sem a csontvelő össz-sejtszáma, sem a GM-CFU progenitor sejt kolóniák száma nem különbözött szignifikánsan a kontroll mintákhoz képest (2; 6. ábra). Látszólag a csontvelő ép, működése zavartalan az elhízott és/vagy inzulinrezisztens állatokban.

6.3. Egyszeri, nagy dózisú carboplatin injekció hatása a csontvelő funkciójára (cellularitására, a GM-CFU kolóniaszáma, a teljes femorális GM-CFU tartalomra), továbbá a perifériás vérben keringő fehérvérsejt számra és az abszolút neutrofil számra

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a 100 mg/testsúlykilogramm dózisban beadott carboplatin mindkét csoportban károsította a csontvelő funkciókat a carboplatinnal nem kezelt kontrollhoz képest, azonban az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerekben nagyobb volt a csontvelő károsodásának mértéke. Mind a cellularitás (3/a. ábra), mind a GM-CFU kolóniaszám (3/b. ábra) és a teljes femorális GM-CFU tartalom (3/c. ábra) is szignifikánsan alacsonyabb a *db/db* egerek csoportjában összehasonlítva a kontroll csoporttal, aminek következtében a *db/db* egerekben a csontvelőnek alacsonyabb a regenerációs képessége, hogy helyreállítsa a funkcióit a carboplatin által előidézett myelotoxicitást követően. Mindez arra utal, hogy a carboplatin súlyosabb károsodást idézett elő a *db/db* egerek csontvelői tenyészteteiben, mint a kontroll csoport mintáiban, ezek az elhízott, inzulinrezisztens állatok fogékonyabbnak bizonyultak az *in vivo* beadott citosztatikum csontvelőkárosító hatásaira.

Hasonlóan a csontvelőben leírtakhoz, a carboplatin injekció után 48 órával a perifériás vérben a fehérvérsejtszám szignifikánsan lecsökkent a *db/db* egerek csoportjában, a kontroll állatokhoz képest, ez a csökkenés elsősorban a perifériás vérben keringő neutrofil granulociták pusztulását jelentette (4/a. ábra). Az abszolút neutrofil szám a carboplatin kezelést követően kétszer olyan magas volt a kontroll egerekben, mint az elhízott, diabetikus *db/db* egerekben ($1,35 \pm 0,09 \times 10^9/L$), miközben a carboplatin kezelést nem kapott kontroll csoporthoz képest nem volt kimutatható szignifikáns különbség a kontroll csoportban a carboplatin beadása után 48 órával (4/b. ábra). Ez arra utal, hogy *db/db* egerekben a carboplatin dózist követően 48 órával, már a korai neutropénia tünetei megjelentek.

Több munkacsoport is eltéréseket írt le a csontvelő működésében diabétesz fennállásakor. Gilbert (2013) leírta, hogy a csontvelői eredetű angiogenetikus progenitor sejteknek csökken a

számuk és a funkciójuk, ami károsodott endoteliális regenerációhoz vezet diabéteszben. Wan és munkatársai (2013) kimutatták, hogy nem-diabetikus állatokból kinyert csontvelői mesenchimális őssejtek diabétesz állatokba történő transzplantációjakor a károsodott a sebgyógyulás folyamata javul, ami szintén a progenitor sejtek működésének zavarára utal diabétesz esetén. Hasonló eredményeket ír le Shin és Peterson (2012), csökkent in vitro proliferációs kapacitást és csökkent in vivo graft beültetési eredményességet tapasztaltak *db/db* egerekből nyert csontvelői mesenchimális őssejtek transzplantálásakor.

A jelen kísérleteinkben megfigyelhető fokozottabb myelotoxicitás a *db/db* egerek csoportjában is alátámasztja azt a feltételezést, hogy az obesitasban és a hozzá társuló inzulin rezisztenciában megnyilvánuló nagyobb csontvelőkárosodás okozója, a célsejtek funkciózavara, nem pedig a progenitor sejtek számának csökkenése.

6.4. *Carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil hatása a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek kolóniaképző képességére a különböző elhízott, inzulinrezisztens állatmodellekben és kontrolljaikban*

Annak érdekében, hogy közvetlenül tudjuk mérni a citosztatikumok csontvelői GM-CFU progenitor sejtekre gyakorolt hatásait, illetve a progenitor sejtfunkciókat citosztatikumok jelenlétében, kidolgoztunk egy *in vitro* kísérleti elrendezést. A kísérleti állatok csontvelői sejtjeit speciális lágy-gél közegben tenyésztettük. A megfelelő tenyésztő médiummal és a kolóniastimuláló faktorok keverékével ideális feltételeket biztosítottunk a csontvelő granulocita-makrofág sejtpopulációjának a proliferációhoz. A tenyészetekhez adtuk hozzá a vizsgált citosztatikumokat, növekvő koncentrációsorban. A carboplatint, doxorubicint, 5-FU-t nem tartalmazó kontroll csoportokhoz viszonyítottuk a GM-CFU kolóniaképződés mértékét. Ezzel a módszerrel tudtuk mérni a citosztatikumok közvetlen hatásait GM-CFU progenitor sejtekre, kizárva más, nem-specifikus hatásokat.

A carboplatin, a doxorubicin és az 5-fluorouracil is csökkentette a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességét mind az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek, mind a kontroll párjaik esetében. Azonban összehasonlítva a kontroll csoporttal a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb a *db/db* egerek esetében (5/a, b, c. ábra). Tehát az obez, inzulinrezisztens egerek csontvelői GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a citosztatikumok károsító hatásaira.

Az elhízott, inzulinrezisztens Zucker patkányok csontvelőtenyésztéseiben is megvizsgáltuk a carboplatin, doxorubicin és 5-FU GM-CFU kolóniaképzésre gyakorolt hatásait. Hasonlóan a

db/db egereken látott eredményekhez, a carboplatin, a doxorubicin és az 5-fluorouracil is dózisfüggően csökkentette a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességét mind az elhízott, inzulinrezisztens Zucker patkányokban, mind a kontroll párjaikban. Azonban összehasonlítva a kontroll csoporttal a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb a Zucker patkányok esetében (7/a, b, c. ábra). Tehát az elhízott, inzulinrezisztens Zucker patkányok GM-CFU progenitor sejtjei is érzékenyebbek voltak a citosztatikumok toxikus hatásaira, a kontroll állatokhoz képest.

Azért, hogy az obesitast, mint myelotoxicitást befolyásoló tényezőt kizárhassuk, olyan állatmodellt választottunk, amely normál testsúlyú, viszont inzulinrezisztens, ilyenek a Goto-Kakizaki patkányok. Szintén vizsgáltuk a Goto-Kakizaki patkányok GM-CFU progenitorainak érzékenységét carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil toxikus hatásaira a korábbiakban leírt koncentrációtartományban, speciális lágy-gél tenyészetekben.

Az előbbi eredményekhez hasonlóan a carboplatin, a doxorubicin és az 5-FU is dózisfüggően csökkentette a GM-CFU progenitor sejtek kolóniaképző képességét a sovány, de inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányokban, és a kontroll, Wistar patkányokban is. Azonban a kontroll csoporthoz képest a GM-CFU kolóniaszám csökkenés szignifikánsan magasabb a Goto-Kakizaki patkányok esetében (9/a, b, c ábra). Ezeknek a patkányoknak a GM-CFU progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a citosztatikumok myelotoxikus hatásaira. A különbség, hasonlóan az obese állatokban kapottakhoz, igen kifejezett volt mindhárom vizsgált citosztatikum esetében.

6.5. *A roziglitazon előkezelés hatása a Goto-Kakizaki patkányok inzulin érzékenységére és a GM-CFU progenitor sejt kolóniaképzésére carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil jelenlétében. Roziglitazon előkezelés hatása Wistar patkányok GM-CFU kolóniaképzésére a vizsgált citosztatikumok jelenlétében*

Korábbi kísérletek során, új hatásmechanizmusú myeloprotektív anyagok kutatása során munkacsoportunk elsőként publikálta, hogy egy inzulinérzékenyítő vegyület, a roziglitazon képes mérsékelni az 5-fluorouracil okozta myelotoxicitást (Benkő és mtsai. 2003). Ez a megállapítás irányította a figyelmünket abba az irányba, hogy megvizsgáljuk vajon inzulinrezisztens állatokban, egy inzulinérzékenyítő vegyület hatására csökken-e a citosztatikumok által létrehozott toxicitás mértéke.

Rozigitazon előkezelést követően meghatároztuk az inzulinérzékenységet gyors inzulinérzékenységi teszttel az előkezelt, a kezeletlen Goto-Kakizaki és a kontroll, Wistar

patkányokban. Eredményeink azt mutatják, hogy a roziglitazonnal történt előkezelést követően megnőtt az inzulinérzékenység az előkezelt csoportokban, az előkezelt állatok inzulinérzékenysége majdnem eléri a kontroll csoportét. Míg a kezelést nem kapott Goto-Kakizaki patkányokban szignifikánsan alacsonyabb az inzulinérzékenység, a Wistar és a roziglitazon előkezelt Goto-Kakizaki csoportokhoz képest.

Megvizsgáltuk a GM-CFU progenitor sejtek érzékenységét, a korábban alkalmazott citosztatikumokkal szemben *in vitro* lágy-gél tenyészetekben a roziglitazonnal előkezelt, illetve a kezeletlen Goto-Kakizaki patkányok esetében is. Az előkezelt csoportokban csökkent a GM-CFU progenitor sejtek érzékenysége a carboplatinnal (11/a. ábra), a doxorubicinnel (11/b. ábra) és az 5-fluoruracillal (11/c. ábra) szemben. Roziglitazon előkezelés után a GM-CFU progenitor sejtek megnövekedett életképességét mutattuk az előkezelt csoportokban a kezeletlen Goto-Kakizaki patkányokhoz képest. A roziglitazon előkezelést követően csökkent az állatok inzulin rezisztenciája, amivel párhuzamosan csökkent a femorális GM-CFU progenitor sejtek érzékenysége a citosztatikumok csontvelő károsító hatásaival szemben.

További kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a roziglitazon előkezelést követően kissé emelkedett a GM-CFU kolóniaszám az előkezelt Wistar patkányok speciális lágy-gél tenyészeinkben, amelyek a korábbiakban leírt koncentrációban tartalmazták a carboplatint, a doxorubicint és az 5-FU-t. Tehát, kimutatható volt egy enyhe emelkedés a progenitor sejtek kolóniaképző képességében a citosztatikumokkal szemben, de ezek a legtöbb koncentrációpontban nem voltak szignifikánsak (12/a, b, c. ábra). Ezek az eredmények megegyeznek munkacsoportunk korábbi megfigyeléseivel, amikor nem tudtunk kimutatni a roziglitazonnak és az inzulinnak szignifikáns hatásait egészséges csontvelőre 5 napos előkezelést követően (Benkő és mtsai. 2003; Djazayeri és mtsai. 2005).

Eredményeink jelentősége, hogy rámutat arra, hogy bár kvantitatív eltérések nincsenek, a progenitorok termelődése hasonló mértékű, de funkcionális zavar kimutatható. Elhízásban a granulocita-makrofág progenitorok diszfunkciójának gyanúját veti fel a makrofágok normálistól eltérő fagocita aktivitása (Dong és mtsai. 1998). A Zucker obez patkányokban a keringő makrofágok interleukin-1 béta és gamma interferon termelése deregulált állapotban van, ami az LPS antigénnel szembeni csökkent immunválaszt eredményez az elhízott állatokban (Martin-Cordero és mtsai. 2009). Jól ismert, hogy a túlsúllyal rendelkezők bizonyos fertőzésekkel szemben fogékonyabbak (Lamas és mtsai. 2002; Falagas és Kompoti 2006), ami szintén lehet a GM-CFU progenitorok diszfunkciójának következménye.

Kísérleteinkben a citosztatikumokkal szembeni érzékenység és a toxicitás növekedése nem valamilyen specifikus, a hatásmechanizmusnak megfelelő útvonal molekuláin keresztül érvényesül. A három különböző hatásmechanizmusú citosztatikum esetében hasonló mértékű volt a toxicitás fokozódása az elhízott, inzulinrezisztens állatokban. Nem volt erre hatással az, hogy a carboplatin a DNS-sel komplexet képezve, az alkiláló mechanizmushoz hasonló mértékű károsodást okoz a sejtekben, vagy a doxorubicin hatásai között az interkalálódás a DNS bázispárjai közé, a szabadgyök képzés és a topoizomeráz enzim gátlás egyaránt szerepet játszik, vagy az 5-FU antimetabolitként az RNS és DNS szintézist is gátolja. A toxicitás az inzulin rezisztencia mértékével volt arányos és jelentősen mérséklődött a roziglitazon előkezelés után, mellyel normalizáltuk az állatok inzulinérzékenységét. A funkcionális eltérés, legalábbis részben, az inzulin rezisztencia miatti anyagcserezavarra vezethető vissza. Ez a toxikus hatásokkal szemben érzékenyebbé teszi a granulocita-makrofág progenitor sejteket, ami a citosztatikumok alkalmazásakor fokozott pusztulásukhoz, és következményesen súlyosabb neutropéniához vezethet. Ezt érdemes figyelembe venni inzulinrezisztens kórállapotokban a kemoterápia megtervezésénél. Az inzulin rezisztencia kezelése, mérséklése csökkentheti a myelotoxicitás kialakulásának veszélyét.

6.6. *4-tio-uridin-monofoszfát hatásainak vizsgálata leukémia stem sejtekre in vitro tenyészetekben és in vivo leukémiás SCID egérmodellben*

A vizsgálati anyaggal történt kezelést követően *in vitro* JY sejtvonalon csökkent a leukémia stem sejt kolóniaszám (13. ábra). *In vivo* leukémiás SCID egerekben, a kezelést követően szintén csökkent a leukémia stem sejt tartalom (17/a. ábra). Valószínűleg a stem sejtek a malignus transzformációk célpontjai, korlátlanul képesek megújulni, és ezzel fenntartani a tumor folyamatos növekedését (Soltysova és mtsai. 2005.)

Mind *in vivo* SCID egerekben, mind *in vitro* JY sejttenyészetekben láthattuk, hogy a leukémia stem sejtek, amelyek esszenciális tulajdonsága a kolóniaképzés, száma szignifikánsan csökkent UD29 hatására.

SCID egerekben végzett kísérleteink alkalmasak voltak arra, hogy megállapítsuk a vizsgálati anyag hatását *in vivo* végzett kezeléseik során. JY tumor sejtekkel történt az egerek megbetegítése, amelyekben a fennálló immundeficiens állapot miatt kifejlődött a humán B-sejtes limfoid leukémia. A femorális csontvelő össz-sejtszáma, mely áramlási cytometriás vizsgálatok alapján 90 % feletti arányban JY tumor sejteket tartalmazott volt, a kezelt állatokban szignifikánsan csökkent. Speciális kolónia esszé tenyésztéseinkben a tenyésztési idő letelte után a stem sejtekből képződött kolóniaszámot összehasonlítottuk a kontroll, és a

kezelt csoportokban. Eredményeink azt mutatták, hogy a kezelt csoportban csökkent a leukémia stem sejtek száma. Az *in vitro* kísérletekben kapott dózis-hatás görbe szerint ez a stem sejtekre gyakorolt direkt hatás következménye, ami dóziszfüggő volt.

6.7. 4-tio-uridin-monofoszfát toxicitásának vizsgálata egészséges humán csontvelőtenyészetekben és JY sejttel nem oltott SCID egerekben

Mikor vizsgálataink azt mutatták, hogy a 4-tio-uridin-monofoszfát mind *in vitro* mind *in vivo* végzett kísérletekben hatásosan gátolta a stem sejtek kolóniaképződését, olyan kísérleteket végeztünk, amelyekben az UD29 esetleges csontvelő toxicitását tudtuk felmérni. A toxicitási vizsgálatokat *in vitro* egészséges humán csontvelő mintákon, illetve *in vivo* JY tumor sejttel nem transzplantált SCID egereken végeztük el. A vizsgált UD29 sem *in vitro*, sem *in vivo* körülmények között nem gátolta jelentős mértékben a normál granulocita-makrofág kolóniaképződést (14, 15/b, 16/b, 17/b. ábra).

A gyógyszermolekulák terápiás felhasználhatósága összefüggésben áll a kémiai szerkezettel és a hatásmechanizmussal. Azok az anyagok, amelyek bejutnak a sejtekbe nagyobb toxicitással rendelkeznek. Az UD29 mononukleotid nem jut be a sejtekbe, mert makroerg foszfát csoporttal rendelkezik az 5-ös pozícióban, és ennek a nagy töltéssel rendelkező molekulának a membránon való átjutása gátolt. Valószínűleg ez összefüggésben áll azzal, hogy a vegyület kevésbé toxikus.

A jelen vizsgálatainkban szereplő monomer uveális melanoma sejteken bizonyult antiproliferatív hatásúnak, mely a szolid tumorok közé sorolható. Antiproliferatív hatásáért részben az apoptózis fokozása a felelős. Jellemző apoptótikus sejteltváltozások, DNS fragmentáció és a kaszpáz-9 aktiválódása volt kimutatható a vizsgálati anyaggal történt kezelést követően az OCM-1 sejtvonalon. (Kemény-Beke és mtsai. 2006).

6.8. *In vitro* UD29 hatása a csontvelői granulocita-makrofág progenitor sejtek kolóniaképző képességére elhízott, inzulinrezisztens db/db egerekben és kontroll párjaikban

A 4.3.1. fejezetben beszámoltam azokról az eredményeinkről, miszerint az elhízott, inzulinrezisztens db/db egerek granulocita-makrofág progenitor sejtjei érzékenyebbek voltak a citosztatikumok toxikus hatásaira, összehasonlítva a kontroll párjaikban kapott eredményekkel. A speciális lágy-gél tenyészetekben, amelyek növekvő koncentrációban tartalmazták a különböző citosztatikumokat, szignifikánsan alacsonyabb volt a GM-CFU kolóniaszám a db/db egerek esetében, mint a normál testsúlyú és metabolizmusú kontroll párjaikban. A természetes immunválasz kialakításában fontos szerepet játszó, és a

citosztatikumok csontvelőkárosító hatására leginkább fogékony sejtpopuláció tehát nagyobb mértékben pusztult el a citosztatikumok jelenlétében az elhízott, inzulinrezisztens állatokban, mint a kontroll párjaikban (5/a, b, c. ábra).

Az előzőekben bemutattam egy új fejlesztésű molekulával, az UD29 mononukleotiddal kapcsolatos eredményeinket. Az új vegyület rendelkezik tumor ellenes hatással, hiszen *in vitro* dózisfüggően gátolta a JY leukémia stem sejtek kolóniaképző képességét, valamint *in vivo* vizsgálatokban csökkentette a tumor sejtekkel elárasztott csontvelő össz-sejtszámát és a teljes femorális tumor sejt tartalmát is. Ugyanakkor a toxicitása a csontvelő GM-CFU progenitor sejteire bízató, mind az *in vitro*, egészséges humán csontvelő mintákon, mind az *in vivo* SCID egereken végzett kísérletek alapján (14, 15/b, 16/b, 17/b. ábra).

Mindezek alapján vizsgáltuk, hogy az UD29 vajon mennyire toxikus a *db/db* egerek GM-CFU tenyészeiben és összehasonlítottuk a kolóniaképződés 50%-os gátló koncentráció értékét a korábban vizsgált citosztatikumok jelenlétében meghatározott IC_{50} értékekkel a *db/db* egerek esetében és a kontroll csoportban.

Az UD29 mononukleotid *in vitro* tenyészetekben dózisfüggően csökkentette a GM-CFU kolóniaszámot, mind a *db/db* egerek, mind a kontroll csoport tenyészeiben. A kolóniaszám csökkenés szignifikánsan nagyobb volt az elhízott, inzulinrezisztens egerek esetén. Viszont összehasonlítva a korábban vizsgált carboplatin, doxorubicinnel és 5-fluorouracillal, belátható, hogy az UD29 esetében a kolóniaképzés 50%-os gátló koncentráció értéke lényegesen magasabb volt a kontroll és a *db/db* egerek tenyészeiben egyaránt (2. táblázat) a másik három citosztatikum IC_{50} értékeihez képest. Az UD29 tehát kevésbé károsítja a GM-CFU progenitor sejteket, mint a carboplatin, doxorubicin és 5-fluorouracil.

Összefoglalva az eredményeinket megállapíthatjuk, hogy az UD29 hatásosan gátolja a leukémia stem sejtek kolóniaképző képességét. Ez *in vivo* SCID egerekben, illetve *in vitro* JY sejtenyészetekben végzett kísérletekben is bebizonyosodott. Emellett a vegyület terápiás indexe ígéretes a terápiás felhasználás szempontjából.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elhízás megnöveli több malignus megbetegedés kockázatát, ugyanakkor a normál testsúlyú betegekhez viszonyítva, az elhízott betegek kemoterápiája során súlyosabb csontvelőtoxicitás is előfordulhat. Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy csak az eltérő farmakokinetikai paraméterek állnak ennek hátterében vagy az inzulinrezisztencia eredményez-e különbségeket a vérképzésben, elhízás esetén. In vivo egyszeri, nagy dóziséjú carboplatinnal történt kezelést követően nagyobb volt a csontvelő károsodás mértéke az elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerekben. A vizsgált paraméterek- a csontvelői összsejtszám, a granulocita-makrofág progenitor sejtek (GM-CFU) kolóniaszáma, a teljes femorális GM-CFU tartalom- mind szignifikánsan alacsonyabbak voltak a *db/db* egerekben. In vitro tenyészetekben, különböző citosztatikumok hatásait vizsgáltuk funkcionális kolónia esszékkal. Eredményeink azt mutatják, hogy az elhízott, inzulinrezisztens egerek progenitor sejtjei érzékenyebbek a citosztatikumok toxikus hatására, in vivo és in vitro kísérletek eredményei alapján.

Eredményeink megerősítésére további vizsgálatokat végeztünk elhízott, inzulinrezisztens Zucker, illetve nem-elhízott, inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányok bevonásával. Normál tenyésztési körülmények között nem mutattunk ki különbséget, de citosztatikumokkal szemben, a GM-CFU sejtpopuláció érzékenyebb volt a toxikus hatásokra a Zucker patkányokban. Ennek hátterében metabolikus rendellenességek állhatnak, mivel hasonló mértékű toxicitást tapasztaltunk nem-obez, inzulinrezisztens Goto-Kakizaki patkányokban is. Roziglitazon in vivo adása után, az inzulin érzékenység fokozásával csökkent a csontvelőtoxicitás mértéke. Mivel az előző kísérletek azt bizonyítják, hogy a klasszikus citosztatikumok három jelentős képviselője fokozottan toxikus az obez állatok GM-CFU sejtjeire, célunk volt találni olyan daganatellenes szert, amely esetében kevésbé lenne toxicitás fokozódás kimutatható.

A vizsgált UD29, kémiaiailag módosított mononukleotid (4-tio-uridin-monofoszfát) anti-HIV és anti-tumor aktivitása miatt szabadalmaztatott vegyület. Az UD29 a betegek életkilátásai szempontjából meghatározó leukémiás tumor stem sejtek kolóniaképző képességét dóziszfüggően gátolta. Emellett a vegyület terápiás indexe megfelelő lehet. Továbbá elhízott, inzulinrezisztens *db/db* egerek tenyészteiben összehasonlítva az UD29 toxicitását a korábban vizsgált carboplatin, doxorubicinnel és 5-fluorouracillal szemben, megállapítottuk, hogy a vizsgált vegyület kevésbé toxikus a GM-CFU progenitor sejtekre, mint a klasszikus citosztatikumok ezen három képviselője. Ennek jelentősége lehetne az inzulinrezisztens betegek terápiája szempontjából.

SUMMARY

Obesity leads to many health problems, such as metabolic, cardiovascular and pulmonary disorders. Moreover, evidence shows that obesity is related to increased risk of several types of tumors. It is not clear what influence obesity has on anticancer therapy. According to several studies, the correlation between obesity and myelotoxicity of cancer chemotherapy is controversial.

Hemopoiesis – as measured by cellularity, frequency of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) and total CFU-GM content of the femoral bone marrow – was not different in obese, insulin resistant *db/db* mice compared to their non-obese counterparts. Nevertheless, after *in vivo* administration of a high dose of carboplatin, cellularity of bone marrow, frequency and total femoral content of CFU-GM progenitors were significantly decreased and the induced neutropenia was more serious in *db/db* mice than in the control animals. The increased myelotoxicity, at least in part, seemed to be a direct effect on myeloid progenitors since an increased *in vitro* sensitivity of CFU-GM progenitors of *db/db* mice was found by culturing them in the presence of three established cytotoxic drugs with different mechanism of actions (carboplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil).

In further investigations we studied the hemopoiesis in obese, insulin resistant Zucker and non-obese, but insulin resistant Goto-Kakizaki rats. At first sight hemopoiesis was intact in obese, insulin resistant animals. Nevertheless increased sensitivity of their CFU-GM progenitor cells to cytotoxic drugs was found by culturing them *in vitro* in the presence of carboplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil. All drugs were more toxic on CFU-GM progenitor cells of Zucker rats. This might be based on metabolic disorders, at least in part, because we could demonstrate a similar increase in toxicity of the studied anticancer drugs to the CFU-GM progenitors originated from Goto-Kakizaki rats in the same dose ranges. After *in vivo* administration of rosiglitazone, an insulin sensitizer, the anticancer drug sensitivity of CFU-GM progenitors of Goto-Kakizaki rats was decreased concurrently with improvement of insulin resistance. Our aim was to find an anti-cancer therapeutic agent, which has less toxicity on CFU-GM progenitors. 4-thio-uridine-monophosphate showed selective effect on leukemic stem cells both *in vitro* and *in vivo*. However UD29 had no effect on normal CFU-GM progenitor cells. In addition the fifty percent inhibitory concentration of 4-thiouridylate on CFU-GM cells from *db/db* mice was 25 times higher than carboplatin and 6500 times higher than doxorubicin, while in the control mice the same differences were 15 and 4100 times, respectively. This may be an advantage in therapy of malignant diseases for diabetic and obese patients, if UD29 proved to be a proper drug for clinical use in the future.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Taubes G. 1998. As obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science* 280:1367-1368.
2. Haidar YM, Cosman BC. 2011. Obesity epidemiology. *Clin Colon Rectal Surg*. 24:205-210.
3. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. 2007. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*. 132:2087-102. Review.
4. World Health Organization. The top 10 causes of death. WHO, 2012. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en.
5. Ceschi M, Gutzwiller F, Moch H, Eichholzer M, Probst-Hensch NM. 2007. Epidemiology and pathophysiology of obesity as cause of cancer. *Swiss Med Wkly*. 137:50-56. Review.
6. Puhalla S, Bhattacharya S, Davidson NE. Hematopoietic growth factors: personalization of risks and benefits. 2012. *Mol Oncol*. 6:237-41. Review.
7. Mac Manus M, Lamborn K, Khan W, Varghese A, Graef L, Knox S. 1997. Radiotherapy-associated neutropenia and thrombocytopenia: analysis of risk factors and development of a predictive model. *Blood*. 89:2303-10. Review.
8. Sinkó J. Treatment and prevention of infections in cancer patients with neutropenia. 2011. *Magy Onkol*. 55:155-63. Review.
9. Benkő I, Djazayeri K, Abrahám C, Zsuga J, Szilvássy Z, 2003. Rosiglitazone-induced protection against myelotoxicity produced by 5-fluorouracil. *Eur J Pharmacol*. 477:179-182.
10. Djazayeri K, Szilvássy Z, Peitl B, Németh J, Nagy L, Kiss A, Szabó B, Benkő I. 2005. Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment. *Eur J Pharmacol*. 522:122-129.
11. Djazayeri K, Szilvássy Z, Benkő K, Rózsa B, Szabó B, Szentmiklósi A.J, Benkő I. 2006. Effect of rosiglitazone, an insulin sensitizer, on myelotoxicity caused by repeated doses of 5-fluorouracil. *Pharmacol Res*. 53:156-161.

12. Garrouste-Orgeas M, Troché G, Azoulay E, Caubel A, de Lassence A, Cheval C, Montesino L, Thuong M, Vincent F, Cohen Y, Timsit JF. 2004. Body mass index. An additional prognostic factor in ICU patients. *Intensive Care Med.* 30:437-43.
13. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. 2007. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *N Engl J Med.* 356:213–215 Erratum in: *N Engl J Med.* 356:973.
14. Wickelgren I. 1998. Obesity, how big a problem? *Science.* 280:1364-1367.
15. Pi-Sunyer FX. 2002. The medical risks of obesity. *Obes Surg.* 12 Suppl 1:6S-11S.
16. Davoodi SH, Malek-Shahabi T, Malekshahi-Moghadam A, Shahbazi R, Esmaeili S. 2013. Obesity as an important risk factor for certain types of cancer. *Iran J Cancer Prev.* 6:186-194.
17. Formiguera X., Cantón A. 2004. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 18:1125-1146.
18. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Madarnas Y, Hartwick W, Hoffman B, Hood N. 2002. Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. *J. Clin. Oncol.* 20:42–51.
19. Draznin B. 2011. Mechanism of the mitogenic influence of hyperinsulinemia. *Diabetol Metab Syndr.* 3:10. doi: 10.1186/1758-5996-3-10.
20. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 4:505-518.
21. Morita T, Tabata S, Mineshita M, Mizoue T, Moore MA, Kono S. 2005. The metabolic syndrome is associated with increased risk of colorectal adenoma development: the Self-Defense Forces health study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 6:485-489.
22. Anderson JC, Messina CR, Dakhllalah F, Abraham B, Alpern Z, Marti, C, Hubbard PM, Grimson R, Shaw RD. 2007. Body mass index: a marker for significant colorectal neoplasia in a screening population. *J Clin Gastroenterol.* 41:285-290.
23. Gumbs AA. 2008. Obesity, pancreatitis, and pancreatic cancer. *Obes Surg.* 18:1183-1187. Review.

24. Abnet CC, Freedman N., Hollenbeck AR, Fraumeni JF Jr, Leitzmann M, Schatzkin A, 2008. A prospective study of BMI and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 44:465-471.
25. Kruk J. Overweight, obesity, oxidative stress and the risk of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 15:9579-86.
26. Vona-Davis L, Howard-McNatt M, Rose DP. 2007. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev*. 8:395-408.
27. Schwartz B, Yehuda-Shnaidman E. 2014. Putative role of adipose tissue in growth and metabolism of colon cancer cells. *Front Oncol*. 4:164.
28. Kershaw EE, Flier, JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 89:2548–2556.
29. Cao H. 2014. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol*. 220:T47-59.
30. Matarese G, La Cava A. 2004. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol*. 25:193–200.
31. Gregoire FM. 2001. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)*. 226:997–1002.
32. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. 2012. Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res*. 2012:824305.
33. Lee S, Kwak HB. 2014. Effects of interventions on adiponectin and adiponectin receptors. *J Exerc Rehabil*. 10:60-68.
34. Barb D, Williams CJ, Neuwirth AK, Mantzoros CS. 2007. Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *Am J Clin Nutr*. 86:s858-866
35. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK. 2003. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst*. 95:1218–1226.
36. Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. 2002. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 11:1531–1543.

37. Ryu TY, Park J, Scherer PE. 2014. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab J.* 38:330-336.
38. Xu CX, Zhu HH, Zhu YM. 2014. Diabetes and cancer: Associations, mechanisms, and implications for medical practice. *World J Diabetes.* 5:372-80.
39. Herling A, König M, Bulik S & Holzhutter HG. 2011. Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *FEBS Journal.* 278:2436–2459.
40. Brown NS, Bicknell R. 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Research.* 3:323–327.
41. Turturro F, Friday E, Welbourne T. 2007. Hyperglycemia regulates thioredoxin-ROS activity through induction of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in metastatic breast cancer-derived cells MDA-MB-231. *BMC Cancer.* 7:96.
42. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. 2014. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 16:378-400. Review.
43. Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M. 2009. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal.* 11:3071-3109.
44. Khan N, Bakshi KS, Jaggi AS, Singh N. 2009. Ameliorative potential of spironolactone in diabetes induced hyperalgesia in mice. *Yakugaku Zasshi.* 129:593-599.
45. Abe R, Yamagishi S. 2008. AGE-RAGE system and carcinogenesis. *Curr. Pharm. Des.* 14:940–945.
46. LeRoith D, Roberts CT Jr. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters.* 195:127–137.
47. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM & Egger M. 2004. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet.* 363:1346–1353.
48. Calle EE, Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* 4:579–591.

49. Chen W, Wang S, Tian T, Bai J, Hu Z, Xu Y, Dong J, Chen F, Wang X & Shen H. 2009. Phenotypes and genotypes of insulin-like growth factor 1, IGF-binding protein-3 and cancer risk: evidence from 96 studies. *European Journal of Human Genetics*. 17:1668–1675.
50. Moschos SJ, Mantzoros CS. 2002. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology*. 63:317–332.
51. Rinaldi S, Cleveland R, Norat T, Biessy C, Rohrmann S, Linseisen J, Boeing H, Pischon T, Panico S, Agnoli C et al. 2010. Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a metaanalysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*. 126:1702–1715.
52. Hausman GJ, Richardson RL. 2004. Adipose tissue angiogenesis. *J. Anim. Sci.* 82:925–934.
53. Xie L, Wang W. 2013. Weight control and cancer preventive mechanisms: role of insulin growth factor-1-mediated signaling pathways. *Exp Biol Med (Maywood)*. 238:127-32.
54. Ibrahim YH, Yee D. 2004. Insulin-like growth factor-I and cancer risk. *Growth Horm IGF Res*. 14:261–269.
55. De Pergola G, Silvestris F. 2013. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes*. 2013:291546. doi: 10.1155/2013/291546.
56. Dignam JJ, Polite BN, Yothers G, Raich P, Colangelo L, O'Connell MJ, Wolmark N. 2006. Body mass index and outcomes in patients who receive adjuvant chemotherapy for colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 98:1647-1654.
57. Cleveland RJ, Eng SM, Abrahamson PE, Britton JA, Teitelbaum SL, Neugut AI, Gammon MD. 2007. Weight gain prior to diagnosis and survival from breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16:1803-1811.
58. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 348:1625-1638.
59. Blouin RA, Warren GW. 1999. Pharmacokinetic considerations in obesity. *J Pharm Sci*. 88:1-7 Review.

60. Cheymol G. 2000. Effects of obesity on pharmacokinetics implications for drug therapy. *Clin Pharmacokinet.* 39:215-231.
61. Hunter RJ, Navo MA, Thaker PH, Bodurka DC, Wolf JK, Smith JA. 2009. Dosing chemotherapy in obese patients: actual versus assigned body surface area (BSA). *Cancer Treat Rev.* 35:69-78.
62. Abdah-Bortnyak R, Tsalic M, Haim N. 2003. Actual body weight for determining doses of chemotherapy in obese cancer patients: evaluation of treatment tolerability. *Med Oncol.* 20: 363-368.
63. Griggs JJ, Mangu PB, Anderson H, Balaban EP, Dignam JJ, Hryniuk WM, Morrison VA, Pini TM, Runowicz CD, Rosner GL, Shayne M, Sparreboom A, Sucheston LE, Lyman GH. 2012. Appropriate chemotherapy dosing for obese adult patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 30:1553-1561.
64. De Jonge ME, Mathot RA, Van Dam SM, Beijnen JH, Rodenhuis S. 2002. Extremely high exposures in an obese patient receiving high-dose cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 50:251-255.
65. Thompson P, Wheeler HE, Delaney SM, Lorier R, Broeckel U, Devidas M, Reaman GH, Scorsone K, Sung L, Dolan ME, Berg SL. 2014. Pharmacokinetics and pharmacogenomics of daunorubicin in children: a report from the Children's Oncology Group *Cancer Chemother Pharmacol.* 74:831-838.
66. Ekhardt C, Rodenhuis S, Schellens JH, Beijnen JH, Huitema AD. 2009. Carboplatin dosing in overweight and obese patients with normal renal function, does weight matter? *Cancer Chemother Pharmacol.* 64:115-122.
67. Miyahara T, Mochinaga S, Kimura S, Aragane N, Yakabe T, Morita S, Okudaira K, Fujito H. 2013. Effects of tumor type, degree of obesity, and chemotherapy regimen on chemotherapy dose intensity in obese cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 71:175-182.
68. Satariano WA, Ragland DR. 1994. The effect of comorbidity on 3-year survival of women with primary breast cancer. *Ann Intern Med.* 120:104-110.

69. Yancik R, Ganz PA, Varricchio CG, Conley B. 2001. Perspectives on comorbidity and cancer in older patients: approaches to expand the knowledge base. *J Clin Oncol.* 19:1147-1151.
70. Srokowski TP, Fang S, Hortobagyi GN, Giordano SH. 2009. Impact of diabetes mellitus on complications and outcomes of adjuvant chemotherapy in older patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 27:2170-2176.
71. Takenaka Y, Cho H, Yamamoto M, Nakahara S, Yamamoto Y, Inohara H. 2013. Incidence and predictors of febrile neutropenia during chemotherapy in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer.* 21:2861-2868.
72. Rosner GL, Hargis JB, Hollis DR, Budman DR, Weiss RB, Henderson IC, Schilsky RL. 1996. Relationship between toxicity and obesity in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer: results from cancer and leukemia group B study 8541. *J Clin Oncol.* 14:3000-3008.
73. Barrett SV, Paul J, Hay A, Vasey PA, Kaye SB, Glasspool RM. 2008. Does body mass index affect progression-free or overall survival in patient with ovarian cancer? Results from SCOTROC I trial. *Ann Oncol.* 19:898-902.
74. Inal A, Kaplan MA, Kucukoner M, Urakci Z, Karakus A, Nas N, Guven M, Isikdogan A. 2012. Is diabetes mellitus a prognostic factor for survival in patients with small cell lung cancer? *Asian Pac J Cancer Prev.* 13:1491-1494.
75. Meyerhardt JA, Catalano PJ, Haller DG, Mayer RJ, Benson AB 3rd, Macdonald JS, Fuchs CS. 2003. Influence of body mass index on outcomes and treatment-related toxicity in patients with colon carcinoma. *Cancer.* 98:484-495.
76. Gogas H, Shapiro F, Aghajanian C, Fennelly D, Almadrones L, Hoskins WJ, Spriggs DR. 1996. The impact of diabetes mellitus on the toxicity of therapy for advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 61:22-26.
77. Lyman GH, Lyman CH, Agboola O. 2005. Risk models for predicting chemotherapy-induced neutropenia. *Oncologist.* 10:427-37.
78. Wolf T, Densmore JJ. 2004. Pegfilgrastim use during chemotherapy: current and future applications. *Curr Hematol Rep.* 3:419-423. Review.
79. Echarti C, Maurer HR. 1989. Defined, serum-free culture conditions for the GM-micro-clonogenic assay using agar-capillaries. *Blut.* 59:171-176.

80. Lotem J, Sachs L. 2002. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. *Oncogene*. 21:3284-3294. Review.
81. Kiss C, Benko I, Kovács P. 2004. Leukemic cells and the cytokine patchwork. *Pediatr Blood Cancer*. 42:113-121. Review.
82. Szegedi I, Kiss C, Karászi E, Vámosi G, Szöllősi J, Kovács P, Benkő I. 2006. Differential regulation of umbilical cord blood and leukemic B cells by interferon-alpha (IFN-alpha): observations in cultured cells. *Pathol Oncol Res*. 12:159-163.
83. Mardi T, Toker S, Melamed S, Shirom A, Zeltser D, Shapira I, Berliner S, Rogowski O. 2005. Increased erythropoiesis and subclinical inflammation as part of the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 69:249-255.
84. Lo Presti R, Sinagra D, Montana M, Scarpitta AM, Catania A, Caimi G. 2002. Haemorheological profile in metabolic Syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc*. 26:241-247.
85. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. 1996. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol*. 6:1170-1180.
86. Schinke T, Haberland M, Jamshidi A, Nollau P, Rueger JM, Amling M. 2004. Cloning and functional characterization of resistin-like molecule gamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 314:356-362.
87. Hatina J, Schulz WA, Fisher J, Wahl J, Debatin KM, Beltinger C. 2007 Tumour stem cells- a new concept in tumour biology. *Dtsch Med Wochenschr*. 132:1629-1632.
88. Ravandi F, Estrov Z. 2006. Eradication of Leukemia Stem Cells as a New Goal of Therapy in Leukemia. *Clin Cancer Res*. 12:340-344.
89. Guzman ML, Jordan CT. 2004. Consideration for Targeting Malignant Stem Cells in Leukemia. *Cancer Control*. 11:97-104.
90. Jordan CT. 2007. The leukemic stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 20:13-8. Review.
91. Pan CX, Zhu W, Cheng L. 2006. Implication of cancer stem cells in the treatment of cancer. *Future Oncol*. 2:723-731.
92. Jordan CT 2005. The potential of targeting malignant stem cells as a treatment for leukemia. *Future Oncol*. 1:205-207.

93. Massard C, Deutsch E, Soria JC. 2006. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Annals of Oncology*. 17:1620-1624.
94. Paine-Murrieta GD, Taylor CW, Curtis RA, Lopez MHA. 1996. Human tumor models in the severe combined immune deficient (scid) mouse. *Cancer Chemother Pharmacol*. 40:209-214.
95. Gergely J, Erdei A. 2006. *Immunbiológia, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest*
96. Jeney A, Kralovánszky J. 2005. *Onkofarmakológia, Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest*
97. Szatmári I, Tőkés S, Dunn CB, Bardos TJ, Aradi J. 2000. Modified telomeric repeat amplification protocol: a quantitative radioactive assay for telomerase without using electrophoresis. *Anal Biochem*. 282:80-88.
98. Tőkés S, Aradi J. 1996. (s4dU)₃₅: a novel highly potent oligonucleotide inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *FEBS Lett*. 396: 43-46.
99. Horváth A, Tőkés S, Hartman T, Watson K, Turpin JA., Buckheit RW, Sebestyén Zs, Szöllősi J, Benkő I, Bardos TJ, Dunn JA., Fésüs L, D. Tóth F, Aradi J. 2005. Potent inhibition of HIV-1 entry by (s4dU)₃₅ *Virology*. 334:214-223.
100. Metcalf D, Moore MA, Warner NL. 1969. Colony formation in vitro by myelomonocytic leukemic cells. *J Natl Cancer Inst*. 43:983-1001.
101. Warner NL, Moore MA, Metcalf D. 1969. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J Natl Cancer Inst*. 43:963-982.
102. Sharma K, McCue P, Dunn SR. 2003. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 284:F1138-1144.
103. Dresch C, Faille A, Poirier O, Balitrand N, Najean Y. 1979. Hydroxyurea suicide study of the kinetic heterogeneity of colony forming cells in human bone marrow. *Exp Hematol*. 7:337-344.
104. McTiernan A, Rajan KB, Tworoger SS, Irwin M, Bernstein L, Baumgartner R, Gilliland F, Stanczyk FZ, Yasui Y, Ballard-Barbash R. 2003. Adiposity and sex hormones in postmenopausal breast cancer survivors. *J Clin Oncol*. 21:1961-1966.

105. Canal P, Chatelut E, Guichard S. 1998. Practical treatment guide for dose individualisation in cancer chemotherapy. *Drugs*. 6:1019-1038. Review.
106. Griggs JJ, Sorbero ME, Lyman GH. 2005. Undertreatment of obese women receiving breast cancer chemotherapy. *Arch Intern Med*. 165:1267-1273.
107. Martin-Cordero L, Garcia JJ, Giraldo E, De la Fuente M, Manso R, Ortega E. 2009. Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1beta and IFNgamma affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. *Eur J Appl Physiol*. 107:535-543.
108. Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B, James MR, Penicaud L, Lathrop M, Ktorza A. 1996. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat Genet*. 12:38-43.
109. Gilbert RE. 2013. Augmenting endothelial repair in diabetes: role of bone marrow-derived cells. *Can J Diabetes*. 37:315-318.
110. Wan J, Xia L, Liang W, Liu Y, Cai Q. 2013. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. *J Diabetes Res*. 2013:647107. doi: 10.1155/2013/647107.
111. Shin L, Peterson DA 2012. Impaired therapeutic capacity of autologous stem cells in a model of type 2 diabetes. *Stem Cells Transl Med*. 1:125-135.
112. Dong W, Selgrade MK, Gilmour IM, Lange RW, Park P, Luster MI, Kari FW. 1998. Altered alveolar macrophage function in calorie-restricted rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19:462-469.
113. Lamas O, Marti A, Martínez JA. 2002. Obesity and immunocompetence. *Eur J Clin Nutr*. 56 Suppl 3:S42-45. Review.
114. Falagas ME, Kompoti M. 2006. Obesity and infection. *Lancet Infect Dis*. 6:438-446.
115. Soltysova A, Altanero V, Altaner C. 2005. Cancer stem cells. *Neoplasma*. 52:435-440.
116. Kemény-Beke Á, Berényi E, Facskó A, Damjanovich J, Horváth A, Bodnár A, Berta A, Aradi J. 2006. Antiproliferative effect of 4-thiouridylate on OCM-1 uveal melanoma cells. *Eur Ophtalmol*. 16:680-685.



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENK/5/2015. PL
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Géresi Krisztina
Neptun kód: HSX71I
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10047765

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Géresi, K.**, Megyeri, A., Szabó, B., Szabó, Z., Aradi, J., Németh, J., Benkő, I.: Myelotoxicity of carboplatin is increased in vivo in db/db mice, the animal model of obesity-associated diabetes mellitus.
Cancer Chemother. Pharmacol. "Accepted by Publisher" (2015)
IF:2.571 (2013)
2. **Géresi, K.**, Benkő, K., Szabó, B., Megyeri, A., Peitl, B., Szilvássy, Z., Benkő, I.: Toxicity of cytotoxic agents to granulocyte-macrophage progenitors is increased in obese Zucker and non-obese but insulin resistant Goto-Kakizaki rats.
Eur. J. Pharmacol. 696 (1-3), 172-178, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.09.018>
IF:2.592
3. Berényi, E., Benkő, I., Vámosi, G., **Géresi, K.**, Tárkányi, I., Szegedi, I., Lukács, L., Juhász, I., Kiss, C., Fésüs, L., Aradi, J.: In vitro and in vivo activity of 4-thio-uridyate against JY cells, a model for human acute lymphoid leukemia.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 410 (3), 682-687, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.056>
IF:2.484





DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



További Közlemények

4. Miszti-Blasius, K., Felszeghy, S., Kiss, C., Benkő, I., **Géresi, K.**, Megyeri, A., Hevessy, Z., Kappelmayer, J.: P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency augments G-CSF induced myeloid cell mobilization.

Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 387 (2), 109-118, 2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-013-0913-9>

IF:2.36 (2013)

5. Benkő, I., Rajta, I., Csik, A., Tóth, J., Benkő, K., **Géresi, K.**, Ungvári, É., Szabó, B., Sarkadi, G., Paripás, B., Takács, I., Tókési, K.: Major and trace elements in mouse bone measured by surface and bulk sensitive methods.

Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. 279, 223-226, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2011.10.059>

IF:1.266

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,273

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
7,647

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.01.13.



9. TÁRGYSZAVAK

elhízás

inzulin rezisztencia

csontvelőtoxicitás

neutropénia

granulocita-makrofág progenitor sejt (GM-CFU)

carboplatin

doxorubicin

5-fluorouracil

db/db egér

Zucker patkány

Goto-Kakizaki patkány

roziglitazon

KEYWORDS

obesity

insulin resistance

myelotoxicity

neutropenia

granulocyte-macrophage progenitor cells (CFU-GM)

carboplatin

doxorubicin

5-fluorouracil

db/db mice

Zucker rats

Goto-Kakizaki rats

rosiglitazone

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kiemelt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Benkő Ilonának, aki széleskörű elméleti és gyakorlati ismereteivel, valamint céltudatos iránymutatásával lehetővé tette számomra, hogy sikeresen kivitelezsem a tudományos munkámat és megírhasam doktori disszertációm.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Szilvássy Zoltán Professzor Úrnak, a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra az intézetben végzett munkát.

Külön köszönettel tartozom Dr. Megyeri Attilának, aki szakmai tanácsaival, logikus érveléseivel folyamatosan támogatott a munkám során.

Köszönöm Dr. Aradi Jánosnak, Dr. Peitl Barnának és Dr. Németh Józsefnek, hogy munkájukkal hozzájárultak a kísérleteink elvégzéséhez.

Külön köszönettel tartozom Ungvári Évának, aki sok gyakorlati segítséget nyújtott munkám során, valamint a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet valamennyi dolgozójának.

11. FÜGGELÉK