

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az angiogenezis markerek és a miRNS-ek kapcsolatának tanulmányozása vesetumoros betegek mintáin, valamint az angiogenezis útvonalakkal kapcsolatos terápiás célpontok keresése a humán CAKI-2 és az A-498 vesedaganat sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálatok segítségével

Király József

Témavezető: Dr. Szabó Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. Bevezetés	12
II. Célkitűzések	16
III. Irodalmi áttekintés	18
III.1. Vesetumrok	18
III.2. A vesesejtes karcinóma fajtái	19
III.2.1. Világossejtes vesesejtes karcinóma (ccRCC)	19
III.2.2. Papilláris vesekarcinóma (pRCC)	21
III.2.3. Kromofób vesesejtes karcinóma (chRCC)	22
III.3. Jóindulatú vesekarcinóma fajták	23
III.3.1. Onkocitóma	23
III.3.2. Angiomiolipóma	24
III.4. A vesetumrok diagnosztizálása	24
III.5. A vesetumrok kezelése	25
III.5.1. Szervre lokalizált kezelés	25
III.5.2. A metasztatikus tumorok kezelése	26
III.6. Jelátviteli útvonalak szerepe a vesedaganatok kialakulásában	28
III.6.1. PI3K/AKT szignalizációs útvonal	28
III.6.2. A PTEN szerepe a PI3K/AKT szignalizációs útvonalban	30
III.6.3. A VHL/HIF szignalizációs útvonal	30
III.7. A sunitinib alkalmazása daganatos megbetegedésekben	31
III.8. A shikonin szerepe a daganatterápiában	32
III.9. Tumorok angiogenezise	33
III.10. A mikroRNS-ek általános jellemzői	35
III.10.1. A miRNS-ek biogenezise	35
III.10.2. miRNS-ek szerepe a daganatok kialakulásában	37
III.10.3. Néhány fontosabb miRNS	38
IV. Anyagok és módszerek	41
IV.1. A klinikai szövetminták gyűjtése	41
IV.2. Sejtkultúrák	41
IV.3. Vegyületek	41
IV.4. Sejtproliferációs aktivitás detektálása	42
IV.5. A sejtek kolóniaképző képességének a vizsgálata	42
IV.6. A kaspáz-3 és -7 aktivitásának vizsgálata	43

IV.7.	RNS izolálás és minőségének meghatározása	43
IV.8.	Az RNS izolálása a CAKI-2 és A-498 sejtekkel végzett in vitro vizsgálatainkhoz.....	43
IV.9.	Reverz-transzkripció PCR (RT-PCR).....	44
IV.10.	A mikroRNS (miRNS)-ek expressziójának mérése specifikus stem-loop primerek segítségével	44
IV.11.	A miRNS-ek azonosítása TaqMan assay alapú valós-idejű kvantitatív PCR-el, statisztikai analízis.....	45
IV.12.	Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)	46
IV.13.	In silico miRNS analízis target és útvonal meghatározáshoz	46
IV.14.	Az angiogenezis array kivitelezéséhez szükséges szöveti fehérje lizátumok elkészítése 46	
IV.15.	Fehérjék detektálása Western blot technikával.....	47
IV.16.	Statisztikai analízis	48
V.	Eredmények	50
V.1.	A betegek klinikopatológiai jellemzői	50
V.2.	Az angiogenezishez kapcsolódó miRNS-ek expressziója	51
V.3.	A vizsgált miRNS-ek és a patológiai grádusok közötti összefüggés	52
V.4.	A vizsgált miRNS-ek és nyirokcsomók közötti korreláció.....	54
V.5.	In silico miRNS target adatbázis elemzés.....	54
V.6.	Az angiogenezis array-el kapott eredmények értékelése	56
V.7.	Valós idejű qRT-PCR –rel kapott eredmények.....	58
V.8.	A shikonin dózis- és időfüggő módon gátolja a sejtek proliferációját	61
V.9.	A shikonin által indukált apoptózis a CAKI-2 és az A-498 humán vesedaganat sejtvonalakon	64
V.10.	A shikonin hatása az apoptózisra és a tumorszuppresszor gének kifejeződésére.....	66
V.11.	A MAPK/PI3K útvonalak szerepe a shikonin által indukált apoptózisban	68
V.12.	A shikonin hatása a multidrog-transzporter gének expressziójára	70
V.13.	A shikonin hatása az extracelluláris mátrix fehérjék expressziójára	72
V.14.	A shikonin hatása a miR-21 és a miR-155 expressziójára	73
VI.	Megbeszélés	75
VII.	Új megállapítások	89
VIII.	Összegzés	90
IX.	Summary	91
X.	Mellékletek.....	92
XI.	Tárgyszavak	101
XII.	A kutatást támogató pályázatok.....	102
XIII.	Köszönetnyilvánítás.....	103

XIV. Irodalom	104
Függelék	112

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3' UTR region	3' nem transzlálódó régió (3' untranslated region)
786-O	vese adenokarcinóma sejtvonala (renal adenocarcinoma cell line)
ABC	ATP-kötő kazettás fehérje (ATP-binding Cassette protein)
ABCB1	ATP-kötő kazettás fehérje B1 (ATP-binding Cassette protein Subfamily B Member 1)
ABCB5	ATP-kötő kazettás fehérje B5 (ATP-binding Cassette protein Subfamily B Member 5)
ABCC6	ATP-kötő kazettás fehérje C6 (ATP-binding Cassette Subfamily C Member 6)
Ago2	Argonauta fehérje (protein Argonaut 2)
AKT	Protein kináz B
cAMP	Ciklikus adenzin monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
AMPK	AMP aktivált fehérje kináz (AMP activated protein kinase)
ANG	Angiogenin
ASK1	Apoptózis szignál-szabályozó kináz 1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1)
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinkoninsav (Bicinchoninic Acid)
Bcl-2	B sejtes limfóma 2 (B cell lymphoma 2)
Bcl-xL	B sejtes limfóma extra nagy fehérje (B cell lymphoma extra large protein)
BCRP1	Emlőrák-rezisztens fehérje 1 (Breast cancer-resistance protein 1)
BHD	Brit-Hogg-Dubé szindróma

ccRCC	Világossejtes vesesejtes karcinóma (clear cell Renal Cell Carcinoma)
cDNS	komplementer DNS
chRCC	Kromofób vesesejtes karcinóma (chromophobe Renal Cell Carcinoma)
CI	konfidencia intervallum (confidence interval)
C _p	adott küszöbértékhez tartozó ciklusszám (crossing point cycle)
CRC	Kolorektális karcinóma (colorectal carcinoma)
CT	Computer tomográfia
C _T	Küszöb ciklus (treshold cycle)
CXCR4	4-es típusú C-X-C kemokin receptor (C-X-C motif chemokine receptor 4)
DGCR8	Mikroprocesszor komplex alegység (DiGeorge syndrome critical region 8)
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DMT1	Divalens fém-transzporter 1 (Divalent metal-transporter 1)
EC	Endotheliális sejtek (Endothelial cells)
EPC	Endotheliális progenitor sejtek (Endothelial progenitor cells)
ER	Endoplazmatikus retikulum
ERK	Extracelluláris szignál-reguláló kináz (extracellular signal-regulated kinases)
FBS	Szarvasmarha magzati szérum (fetal bovine serum)
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration)
FGF	Fibroblaszt növekedési faktor (Fibroblast Growth Factor)
FGF-1	Fibroblaszt növekedési faktor 1 (Fibroblast Growth Factor 1)

FH	Fumarát-hidratáz
FIH	HIF-1 faktor inhibitor (Factor Inhibitor HIF-1)
FLCN	Follikulin
FOXO3	Forkhead borsz O3
GAPDH	Glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase)
GTP	Guanidin-trifoszfát (Guanidin-triphosphate)
HeLa	Humán méh adenokarcinóma sejtvonal (human uterus adenocarcinoma cell line)
HIF	Hypoxia indukálta faktor
HIF-1 α	Hypoxia indukálta faktor-1 α alegység
HIF-2 α	Hypoxia indukálta faktor-2 α alegység
HIF- α	Hypoxia indukálta faktor- α alegység
HIF- β	Hypoxia indukálta faktor- β alegység
HGF	Hepatocita növekedési faktor (Hepatocyte Growth Factor)
HLRCC	Örökletes leiomyomatosis és vesesejtes vesekarcinóma (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma)
HPRC	Örökletes papilláris vesekarcinóma (Hereditary Papillary Renal Carcinoma)
HPRT	Hipoxantin-foszforibozil-transzferáz
HRE	Hypoxia válaszadó elem (Hypoxia Responsive Element)
HRP	Tormaperoxidáz (Horseradish-peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
K562	Krónikus mielogén leukémia sejtvonal (chronic myelogenous leukemia cell line)

KDM4B/HOXC4/PD-L1	Lizin-specifikus demetiláz 4B/Homeobox protein Hox-C4/Programozott sejthalál Ligand (Lysine-specific demethylase 4B/Homeobox protein Hox-C4/Programmed death-ligand)
KI-67	Kiel-67 antigén
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MCF7	Emlő adenokarcinóma sejtvonal
MDR	Multi Drog Rezisztencia
MET	Mezenchimális epitheliális átmenet (Mesenchymal-Epithelial Transition)
MHC I	Fő Hisztokompatibilis Komplex I (Major Histocompatibility Complex I)
MHC II	Fő Hisztokompatibilis Komplex II (Major Histocompatibility Complex II)
miRNS/miR	mikroRNS
MMP	Mátrix-metalloproteináz
MMP-2	Mátrix-metalloproteináz-2
MMP-9	Mátrix-metalloproteináz-9
mRCC	Metasztatikus vesesejtes karcinóma (metastatic Renal Cell Carcinoma)
mRNS	Hírvivő RNS (messenger RNS)
mTOR	Emlős rapamicin célpont (mammalian Target of Rapamycin)
mTORC1	mTOR komplex 1 (mammalian target of rapamycin complex 1)
mTORC2	mTOR komplex 2 (mammalian target of rapamycin complex 2)
NF- κ B	Nukleáris Faktor- κ B
NSCL	Nem-kissejtes tüdőrák (non-small cell lung cancer)
„p”	a statisztikai szignifikancia szintje

p21	Ciklin-dependens kináz inhibitor (p21)
p53	p53-as tumorszuppresszor gén
pAKT	Foszforilált AKT (phosphorilated AKT)
PARP	poli (ADP-ribóz) polimeráz
PBS	Foszfát pufferes sóoldat (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)
PDCD4	Programozott sejthalál 4 (Programmed Cell Death 4)
PDGF	Vérlemezke eredetű növekedési faktor (Platelet Derived Growth Factor)
PDGFR	Vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (Platelet Derived Growth Factor Receptor)
PDK1	Piruvát-dehidrogenáz kináz 1
PDK2	Piruvát-dehidrogenáz kináz 2
PDPK1	Foszfoinozítid-függő fehérje kináz-1 (Phosphoinositide-dependent protein kinase-1)
PD-L1	Programozott sejthalál ligand 1 (Programmed cell death ligand 1)
PGC1 α	Peroxiszóma-proliferátor-aktivált-receptor- γ koaktivátor-1 α
pERK	Foszforilált extracelluláris szignál-reguláló kináz (phosphorilated-extracellular signal-regulated kinases)
PHD	Prolil-hidroxiláz
PI	Foszfatidil-inozitol (Phosphatidyl-inositol)
PI3K	Foszfatidil-inozitol-3-kináz (Phosphatidyl-inositol-3-Kinase)
PIGF	Placentális eredetű növekedési faktor (Placental Growth Factor)
PIP	Foszfatidil-inozitol-foszfát (Phosphatidyl-inositol-phosphate)

PIP2	Foszfatidil-inozitol-bifoszfát (Phosphatidyl-inositol-biphosphate)
PIP3	Foszfatidil-inozitol-trifoszfát (Phosphatidyl-inositol-triphosphate)
pRCC	Papilláris Vesesejtes Karcinóma (papillary Renal Cell Carcinoma)
pre-miRNS	prekurzor-mikroRNS
pri-miRNS	primer-mikroRNS
PTEN	Foszfatáz és tenzin homológ (Phosphatase and tensin homologue)
PVDF	Polivinilidén-fluorid
qPCR	Kvantitatív Polimeráz Lánreakció (quantitative Polymerase Chain Reaction)
„Q”	a Spearman korreláció „agresszivitása”
qRT-PCR	Kvantitatív Valós Idejű Polimeráz Lánreakció (quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)
„r”	Korrelációs együttható
RAN	RAs- related nuclear protein
RAS	kis Guanozin trifoszfátáz (GTPáz)
RCC	Vesesejtes karcinóma (Renal Cell Carcinoma)
RGD	Arginin-glicin-aszparaginsav aminosavakból felépülő tripeptid motívum
RISC	RNS-indukálta csendesítő komplex (RNA-induced silencing complex)
ROS	Reaktív oxigén szintetáz (reactive oxygen synthetase)
RNS	Ribonukleinsav
RT-PCR	Reverz-transzkripcióval járó Polimeráz lánreakció (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction)

SD	Standard deviancia
SDF-1	Sztrómasejtekből származó 1-es faktor (Stromal cell-derived factor 1)
SDS	Nátrium-dodecyl-szulfát (Sodium-dodecyl-sulfate)
SDS-PAGE	Nátrium-dodecyl-szulfát - Poliakrilamid gélelektroforézis (Sodium-dodecyl-sulfate-Poliacrilamide Gel Electrophoresis)
SEM	Standard hibák átlaga (standard error mean)
SERPIN-A1	Szerpin peptidáz inhibitor-A1
SH2	Src homológ 2
TGF α	Transzformáló növekedési faktor α alegység (Transforming Growth Factor α subunit)
TGF β	Transzformáló növekedési faktor β alegység (Transforming Growth Factor β subunit)
TIMP	Metalloproteináz szöveti inhibitor (tissue inhibitor of metalloproteinase)
TIMP-1	Metalloproteináz szöveti inhibitor 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1)
TIMP-2	Metalloproteináz szöveti inhibitor 2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)
TKI	Tirozin-kináz inhibitor
TP53INP1	Tumor protein 53 indukált magi fehérje-1 (Tumor protein 53 induced nuclear protein 1)
UPL	Univerzális próba könyvtár (Universal Probe Library)
VEGF	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGFR	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

VEGFR-1	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1)
VEGFR-2	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2)
VEGFR-3	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3)
VHL	von Hippel-Lindau tumorszuppresszor
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

I. Bevezetés

A vesesejtes karcinóma (renal cell carcinoma: RCC) az összes rosszindulatú daganat mintegy 3%-át teszi ki, több mint 40%-os halálozási aránnyal rendelkezik. Az Egészségügyi Világszervezet adatai szerint, évente több mint 140 000 halálesetet eredményezhet [1]. Az epidemiológiai adatok szerint leginkább a szűrési és diagnosztikai technológiák fejlődésének köszönhetően az elmúlt öt évtizedben az RCC felismerése gyorsan növekedett [2, 3]. A világos sejtes RCC (clear cell renal cell carcinoma: ccRCC) az RCC leggyakoribb típusa, az összes eset körülbelül 75-88%-át teszi ki [4, 5]. A papilláris RCC (papillary RCC: pRCC) és a kromofób RCC (chromophobe RCC: chRCC) a vesekarcinóma további gyakori altípusai, előfordulási arányuk 6-15%, illetve 2-5% [6, 7]. A diagnózis felállításakor az RCC-ben szenvedő betegek körülbelül 20-30%-ában alakul ki metasztázis, továbbá a lokalizált RCC esetén végzett kuratív műtét után, a betegek újabb 30%-ában jelennek meg áttétek az utókövetési vizsgálatok során [2]. A jelenlegi rendszer, amelyet a vesedaganatban szenvedő betegek prognózisának előrejelzésére használnak, klinikopatológiai paramétereken alapul, azonban nem képes pontosan megjósolni a betegség természetes kimenetelét, különösen a lokalizált primer RCC esetében.

Az angiogenezis, azaz az új véredények képződése, kulcsfontosságú a különböző tumorok fejlődésében. A daganatok növekedéséhez és terjedéséhez szükséges oxigént és tápanyagokat az új véredények biztosítják. Emellett az angiogenezis elősegíti a daganatsejtek véráramba jutását, növelve a metasztázisok kialakulásának kockázatát. Az angiogenezis során megjelenő angiogén faktorok jelentős szerepet játszanak a tumoros folyamat előrehaladásában, a betegség klinikai kimenetelének meghatározásában, időben történő diagnosztizálásában és a terápiában egyaránt [1, 8, 9]. Éppen ezért fontos a teljes angiogenezis folyamat megismerése, megértése. A vesedaganatok kialakulásának és progressziójának biológiai alapjainak megértése lehetőséget ad új, célzott kezelési stratégiák kidolgozására, amelyek személyre szabott és hatékonyabb terápiákat eredményezhetnek. A megfelelően történő angiogenezis gátlása, megfékezheti a daganat növekedését és terjedését. A jelenleg alkalmazott terápiák is a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), annak kapcsolódó receptorai, továbbá a rapamycin emlős célpontja (mTOR) jelátviteli útvonalon alapulnak [1, 8, 9]. A tirozin-kináz inhibitorok (TKI), mint a sunitinib, a sorafenib, a temsirolimus, valamint az immun-adjuváns bevacizumab jelentősen javították a klinikai eredményeket a randomizált vizsgálatokban [10, 11]. A felsoroltakon kívül azonban még számos újonnan felfedezett molekula létezik, amelyek

hatékonyak a vesedaganat terápiájában és segíthetnek leküzdeni a multidrog rezisztenciát (MDR), ami kritikus a sikeres terápia szempontjából [12-14].

A vesedaganatokat érintő kockázati tényezők még nem teljesen feltártak, azok alaposabb ismerete segíthet a megelőzési stratégiák kialakításában, csökkentve ezzel a betegség előfordulását a populációban. Éppen ezért a terápiás szerek mellett a vesetumork kialakulásában részt vevő patomechanizmusok, az azokat szabályozó molekulák, faktorok ismerete is nagy jelentőséggel bír.

A mikroRNS-ek (miRNS) konzervált, kis méretű (18-22 nukleotid), nem kódoló RNS-ek, amelyek fontos szerepet játszanak különböző molekuláris útvonalakban a génexpresszió szabályozása révén [15, 16]. Stabil mikrovezikulumokban, apoptotikus testekben vagy membránmentes hordozókban előforduló, a humán testnedvekben (vérplazma, vizelet, nyál és sperma) megtalálható miRNS-ek diagnosztikai biomarker szerepet tölthetnek be, valamint jelezhetik a daganatos betegségek prognózisát is [17, 18]. Aveta és mtsai (2023) egy összefoglalóban bemutatták, hogy a humán veseszövetek miRNS expressziós mintázata nagy valószínűséggel társítható a rosszindulatú vesedaganatok diagnosztizálásához, ugyanakkor a humán vizeletben mért miRNS-ek hasznosak lehetnek a jóindulatú vesetumork, mint például az onkocitoma megkülönböztetésében [17]. A szakirodalom szerint néhány miRNS, mint például a miR-3648, miR-489, miR-638, miR-3656, miR-3687, miR-25-5p, miR-21-5p és a miR-663b jelentős potenciális diagnosztikai értékkel bír a ccRCC esetében. Az azonosított miRNS-ek közül sok az RCC tumorgenezisében részt vevő molekuláris jelátviteli útvonalak szabályozásával is összefüggésbe hozható [18].

A tumorgenezis tekintetében az is nagyon fontos, hogy a miRNS-ek képesek egyensúlyt teremteni a pro- és antiangiogén folyamatok között, és képesek módosítani az angiogenezis lépéseit [5]. Egyes miRNS-ek (miR-23a, miR-21 és a miR-17-92 klaszter) pro-angiogén tulajdonságokat mutatnak, míg mások (miR-29b, miR-29c, miR-192) gátolják az angiogenezist [15, 16, 19, 20]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a miR-210, amelyet hypoxia szabályozott miRNS-ként azonosítottak, magasabb expressziót mutat RCC-ben [21]. Más tanulmányok azt is igazolták, hogy a VEGF negatív szabályozójaként ismert, a miR-29b szintén erősebb expressziót mutat az RCC-ben. A miR-126 szintje összefüggésbe hozható a fő angiogén markerrel, a VEGF-A-val, ezáltal kapcsolatba hozható a tumorgenezissel számos daganat típus esetében [3, 21, 22].

Az eddig megjelent számos vizsgálat ellenére a vesedaganatokban feltárt miRNS-ek még nem eléggé ismertek ahhoz, hogy már önmagukban is hatékony eszközként szolgáljanak a vesekarcinoma diagnosztizálásában, prognózisában és terápiás kezelésében.

A vesedaganatok kialakulását érintő angiogenezis, tumorgenezis folyamatának megértésén túl kiemelkedő kutatások zajlanak a terápiás lehetőségek javításának terén. Napjainkban egyre fokozottabb figyelem irányul a természetes eredetű hatóanyagok különböző daganatok terápiáját érintő kutatásokra.

A shikonin (5,8-dihidroxi-2-((1S)-1-hidroxi-4-metilpent-3-en-1-il)naftalin-1,4-dion), egy természetes naftokinon vegyület, amelyet a kínai gyógynövény, a *Lithospermium erythrorhizon* gyökereiből izolálnak [12, 14]. Ez a növény világszerte megtalálható, azonban legnagyobb mennyiségben Ázsiában fordul elő [23]. A shikonint több ezer éve széles körben használják torokfájás, bőrkiütések, kanyaró, kelések és égési sérülések kezelésére [12, 24]. Az újabban megjelent tanulmányok azt mutatják, hogy a shikonin in vitro és in vivo is erős sejtproliferációt gátló hatást fejt ki számos humán daganatos sejtvonalra, miközben minimális toxicitást mutat a nem rosszindulatú humán sejtekkel szemben [12, 25-28].

Különböző sejtvonalakat vizsgálva, a shikonin apoptózist, nekrozist vagy nekroptózist indukál jelátviteli és molekuláris célpontok szabályozásával, valamint hasonló hatékonyságot mutat a gyógyszerérzékeny és a gyógyszer-rezisztens daganatos sejtvonalakkal szemben. A shikonin apoptózis indukál humán tüdő adenokarcinóma sejtekben, valamint sejtinvázió és sejt migráció csökkentését idézi élő humán emlődaganat sejtek esetén [12, 14, 25, 28]. A szakirodalom alapján a shikonin által kiváltott apoptózist az AKT (Apoptózis Sznál-Reguláló Kináz 1/p38 Mitogén-aktivált Protein Kináz (AKT/ASK1/p38-MAPK)) út vonal aktiválása és a ciklin-dependens kináz inhibitor (p21) csökkenése eredményezi számos daganat sejtben [25, 29-31].

Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a shikonin humán glioblasztóma sejtekre kifejtett hatása a miRNS expressziós profilok szabályozása által történik. Példaként említhető a miR-21 és a miR-155 [26]. A szakirodalomban alapján a miR-21 szerepet játszik a hepatocelluláris karcinóma, a tüdő-, a vastagbél- és a prosztaták kialakulásában és előrehaladásában [32]. Számos humán daganat típusban a miR-155 fokozott expressziót és onkogén szerepet mutat, valamint korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy a miR-155 fontos szerepet kap a világossejtes vesesejtes karcinóma progressziójában is [32].

A shikonin, mint potenciális terápiás vegyület a vesekarcinóma kezelésében, izgalmas és érdekes téma lett; azonban a daganatos vese sejtekre gyakorolt hatását és daganatellenes mechanizmusát érintő kutatások még nem teljeseek.

Ahogy már említésre került, a vesedaganatok tanulmányozása kiemelten fontos, mivel ez a betegség jelentős egészségügyi kihívást jelent világszerte. Mivel a vesedaganatok gyakran tünetmentesen alakulnak ki, és sok esetben csak előrehaladott állapotban kerülnek

felismerésre, az ezzel a kérdéssel kapcsolatos kutatások egyre nagyobb jelentőséggel bírnak. Az új diagnosztikai módszerek fejlesztése javíthatja a betegek túlélési esélyeit, valamint az új terápiás lehetőségek kidolgozása és a meglévő kezelési módok finomítása révén növelhető az érintettek hosszútávú túlélési aránya és életminősége.

A vesedaganatokkal kapcsolatosan végzett kutatások nemcsak a tudományos ismeretek bővítéséhez járulnak hozzá, hanem közvetlen és jelentős pozitív hatással lehetnek a betegek életére és az egész társadalom egészségére egyaránt.

Ezen tények és felvetések birtokában kezdtem el kutatásaimat a vesedaganatok patomechanizmusát, molekuláris hátterét és terápiáját illetően.

II. Célkitűzések

A vesekarcinóma végzetes kimenetele részben abban rejlik, hogy a betegség diagnosztizálására gyakran akkor kerül sor, amikor a daganat már előrehaladott állapotban van, vagy akár már a metasztázis is megtörtént. Napjainkban még nem teljesen állnak rendelkezésünkre olyan biomarkerek, amelyek segítségével a betegség nem-invazív módon lenne diagnosztizálható, és így a megfelelő kezelés idejében való elkezdését követően növelné a túlélés esélyét.

A miRNS-ek expressziós mintázata eltérhet a normál és daganatos veseszövetekben. Az ilyen eltérések azonosítása lehetőséget adhat új diagnosztikai biomarkerek kifejlesztésére, amelyek már a korai stádiumban képesek azonosítani a vesedaganatokat, javítva ezzel a betegek prognózisát. Bizonyos miRNS-ek szintjének változása összefüggésben lehet a vesedaganatok agresszivitásával és a beteg túlélési esélyeivel. Ezeknek a miRNS-eknek a vizsgálata segíthet a személyre szabott kezelési stratégiák kidolgozásában. A miRNS-ek szerepének vizsgálata lehetővé teszi, hogy jobban megértsük a vesedaganatok kialakulásának és progressiójának molekuláris mechanizmusait is. Ezen háttérinformációk birtokában a kutatásaink során a következő célokat fogalmaztuk meg:

- Célunk olyan specifikus mikroRNS-ek (hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-181a-5p) azonosítása és szerepének feltárása, amelyek befolyásolhatják a vesetumorok angiogenezisét.
- In silico target adatbázisok segítségével az általunk vizsgált miRNS-ek potenciális célpontjainak azonosítása is a munkánk részét képezte.
- Célunk volt az angiogenezis folyamatában szereplő célgének és fehérjék expressziójának vizsgálata az RCC-ben szenvedő betegekből származó tumoros és ép veseszövet mintákban.
- Statisztikai módszerek alkalmazásával korreláltuk a mikroRNS-ek expressziós mintázatát a rendelkezésünkre álló klinikopatológiai paraméterekkel, beleértve a patológiai státuszt és a szövettani típusokat is.
- Célunk volt a hsa-miR-15b-5p, a hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-181a-5p specifikus angiogenezishez kapcsolódó célmolekuláinak azonosítása és a miR-célmolekula kölcsönhatások tanulmányozása.

A vesedaganatok kemoterápiás kezelését illetően számos olyan készítmény áll rendelkezésünkre, melyek, ha az esetek többségében hatékonyak is bizonyulnak, alkalmazásuk során számos mellékhatás jelentkezhet. Az egyik ilyen készítmény a sunitinib,

melynek hosszútávú alkalmazása toxicitási problémát okozhat, emellett a szervezet képes rezisztenciát kialakítani ellene. Éppen ezért egyre nagyobb figyelem irányul a természetes eredetű hatóanyagok vizsgálatára, melyek ígéretesek lehetnek a daganatok kezelésében.

A shikonin, mint a vesekarcinóma egyik lehetséges jövőbeli terápiás lehetősége, a kutatások izgalmas és érdekes témájává vált; azonban a vesetumoros sejtekre gyakorolt hatását és daganatellenes mechanizmusát eddig még nem vizsgálták alaposan. Mindezen megfontolások alapján e növényi hatóanyaggal kapcsolatosan a következő célkitűzések fogalmazódtak meg:

- Jelen tanulmány egyik célja volt annak vizsgálata, hogy a shikonin önmagában képes-e *in vitro* gátolni a humán vesedaganat sejtek növekedését.
- További szándékunkban állt vizsgálni a shikonin hatását a humán CAKI-2 és A-498 vesedaganat sejtvonalakra; valamint a shikonin által kifejtett apoptikus hatás mögött álló PI3K/AKT és a MAPK/PI3K apoptikus útvonalak vizsgálata az útvonalban részt vevő célgének, célfehérjék vizsgálatán keresztül.
- A korábbi tanulmányok szerint egyes erős onkogén miRNS-ek, mint például a miR-21 és a miR-155 epigenetikai szabályozást gyakorolhatnak a tumorok kialakulásának folyamatára, ezért célunk volt a miR-21 és a miR-155 epigenetikai szerepének vizsgálata a shikonin hatására a humán CAKI-2 és az A-498 vesedaganat sejtvonalakon.

III. Irodalmi áttekintés

III.1. Vesetumorok

A vesetumorok, különösen a vesesejtes karcinóma az egyik leggyakrabban előforduló daganattípus az urológiai megbetegedések területén. Előfordulását tekintve az RCC az összes vesedaganatok körülbelül 85%-át teszi ki, előfordulási aránya jelentős földrajzi eltéréseket mutat, a legmagasabb arányokat Észak-Amerikában és Európában regisztrálták. Évente mintegy 400 000 új esetet diagnosztizálnak világszerte, ezen belül körülbelül 175 000 eset vezet halálhoz. Előfordulása férfiaknál gyakoribb, az életkor előrehaladtával növekszik, leggyakrabban az 50-70 éves korosztályban diagnosztizálják [1, 33].

Hisztológiai szempontból jó- és rosszindulatú daganatokat különböztetünk meg. Klinikai jelentősége általában csak a rosszindulatú daganatoknak van, melyek között az adenokarcinóma a leggyakoribb, azon belül is a világossejtes, a papilláris és a kromofób vesedaganat [34]. A patológiai jellemzők szerint a vesetumorok négy stádiumra oszthatók, a kategorizálás a TNM rendszeren alapul, ahol a „T” betű a tumor méretére és elhelyezkedésére utal, az „N” betű a nyirokrendszer érintettségét jelzi, míg az „M” betű a metasztázisok jelenlétéről és típusáról nyújt információt. A betűk után számokkal jelzik a beteg állapotának súlyosságát (1. Táblázat), [35].

1. Táblázat: A vesetumorok stádiumainak elnevezése [35]

Rövidítés	Meghatározás
T	Tumor stádium
Tx	primer tumor nem beazonosítható
T0	nincs feltételezett primer tumor
T1	≤ 7cm, szervre lokalizált
T1a	≤ 4 cm
T1b	≥ 4 cm, de ≤ 7 cm
T2	> 7 cm, de a vesére lokalizált
T2a	> 7cm, de <10 cm
T2b	<10 cm, de a vesére lokalizált.
T3	A tumor betör a nagyobb vesevénákba és /vagy a perinefrikus zsírszövetet involválja, de a Gerota fasciát nem töri át.
T3a	A tumor betör a nagyobb vesevénákba, és/vagy a peripelvikus zsírszövetbe, és/vagy betör a perinefrikus zsírszövetbe, de a Gerota fasciát nem haladja meg.

T3b	A tumor betör a vena cava inferiorba, de a rekeszt nem haladja meg.
T3c	A tumor betör a vena cava inferiorba és meghaladja a rekesz szintjét, vagy beszűri a vena cava inferior falát.
T4	A tumor áttöri a Gerota fascia szintjét és /vagy beszűri a mellékvesét.
N	Nyirokcsomó stádium
NX	Nincs észlelt nyirokcsomó áttét
N0	Patológiai feldolgozás során nem igazolódott nyirokcsomó áttét
N1	Regionális nyirokcsomó áttét igazolható
M	távoli áttét
M0	nem észlelhető távoli áttét
M1	távoli áttét észlelhető

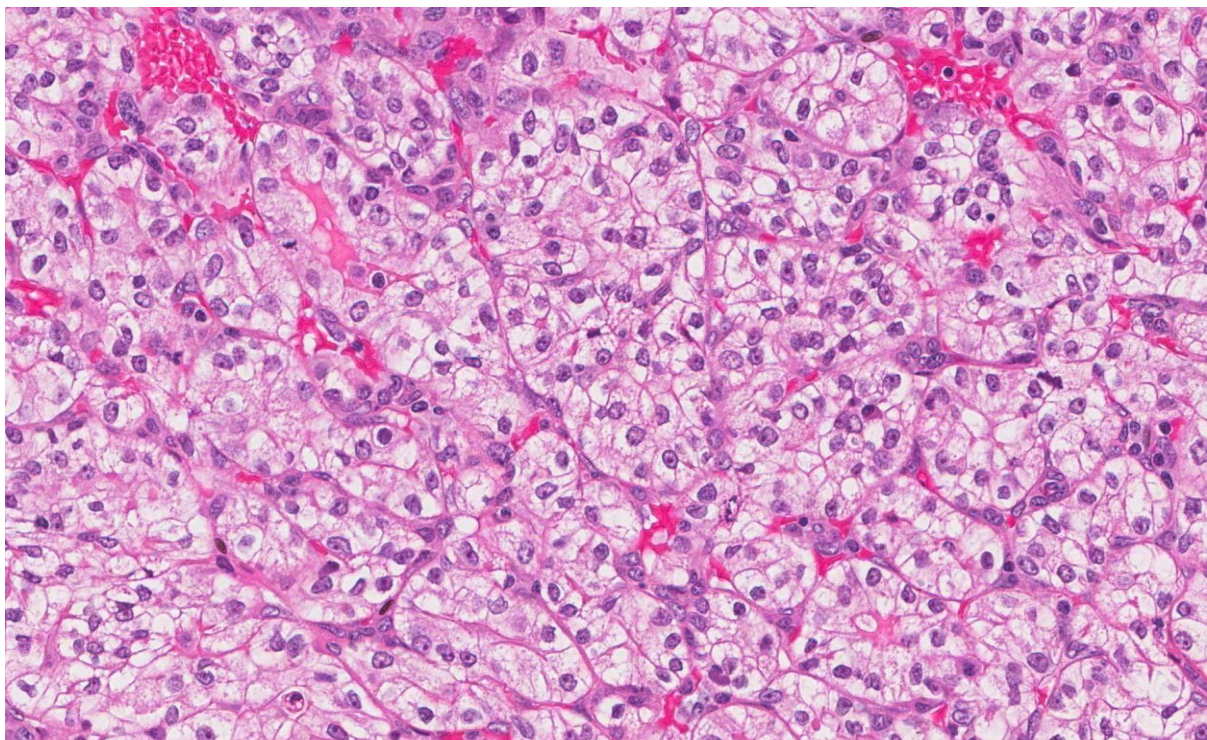
A daganat kórképe tünetszegény, az úgynevezett klasszikus triász (deréktáji fájdalom, véres vizelet és deréktáji tapintható terime) csak ritkán fedezhető fel a betegekben, amennyiben mégis, akkor az előrehaladott állapotra utal [36, 37]. A tumor a betegség bármely stádiumában képes biológiailag aktív, hormonszerű vagy citokinszerű anyagokat termelni, amelyek paraneoplasztikus szindróma kialakulásához vezethetnek. Az ebből adódó tünetek, mint például a hiperkalcémia, a Cushing-szindróma vagy a magas vérnyomás, azonban csak a betegek 20%-ánál fordulnak elő [37]. Az áttétképződés igen gyakori, és a betegek jelentős százalékánál már a diagnózis felállításakor kimutathatók metasztázisok. Az áttétek leggyakrabban a tüdőben, a csontokban és az agyban alakulnak ki [38].

III.2. A vesesejtes karcinóma fajtái

III.2.1. Világossejtes vesesejtes karcinóma (ccRCC)

A világossejtes vesesejtes karcinóma megközelítőleg a vesesejtes daganatok 70-80%-át teszi ki, feltehetően a proximális tubulus epithéliumból ered [39]. A tünetek észlelésekor a daganat általában már nagyméretű (3-15 cm), morfológiáját tekintve kerek, szoliter képlet, kis nyúlványokkal. Gyakran bocsát szatellita nodulusokat a környezetébe, betörve a vesevénákba [39]. Makroszkóposan vizsgálva a színe a sárgától a narancsszínen át változhat, gócosan fellazult vagy bevérzett területekkel és meszesedésekkel. Mikroszkóposan a tumorsejtek világos, optikailag üres vagy granuláris citoplazmával rendelkeznek, előfordulásuk sporadikus,

viszont familiáris formáját is megfigyelték (1. Ábra) [40]. A daganat legjellemzőbb genetikai eltérése a 3-as kromoszóma rövid karján található VHL (von Hippel-Lindau) tumorszuppresszor gén inaktivációja [39]. Az autoszomális domináns öröklődésű von Hippel-Lindau betegségben szenvedőknél a VHL gén hibás, ami számos szerv daganatos elváltozását okozhatja, és életük során folyamatosan ki vannak téve a ccRCC kockázatának [41]. A genetikai mutációk fontos metabolikus útvonalak módosulását eredményezik, amelyek tumorgenezishez vezetnek. A VHL gén mutációjának következtében nem alakul ki az a komplex, amely a hypoxia indukált faktor-1 α és -2 α (HIF-1 α , HIF-2 α) ubiquitin-mediált degradációját eredményezi. A HIF- α -függő útvonal az alacsony oxigén- és vasszintre adott sejtes válaszreakciót ellenőrzi, amely optimális oxigén- és vasszint esetén inaktiválódik. A VHL komplex hiányában stabilizálódnak a HIF- α fehérjék, amelyek számos növekedési faktor, ideértve a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF) és a transzformáló növekedési faktor- α (TGF- α) expresszióját fokozzák, továbbá szintén serkentik a glükóz metabolizmust szabályozó gének expresszióját. A növekedési faktorok receptorukhoz kötődve angiogenezist és proliferációt indukálnak, míg a megnövekedett glükóz metabolizmus elősegíti a daganatos sejtek alkalmazkodását a hypoxiás környezethez [40, 41]. A papilláris és kromofób sejtes vesekarcinómához képest a ccRCC érzékenyebb a gyógyszeres kezelésekre, viszont ennek ellenére prognózisa kedvezőtlenebb, az ötéves túlélési arány megközelítőleg 50% [40].



1. **Ábra:** A világossejtes vesekarcinóma szövettani képe (<https://www.mypathologyreport.ca/diagnosis-library/clear-cell-renal-cell-carcinoma/>)

III.2.2. Papilláris vesekarcinóma (pRCC)

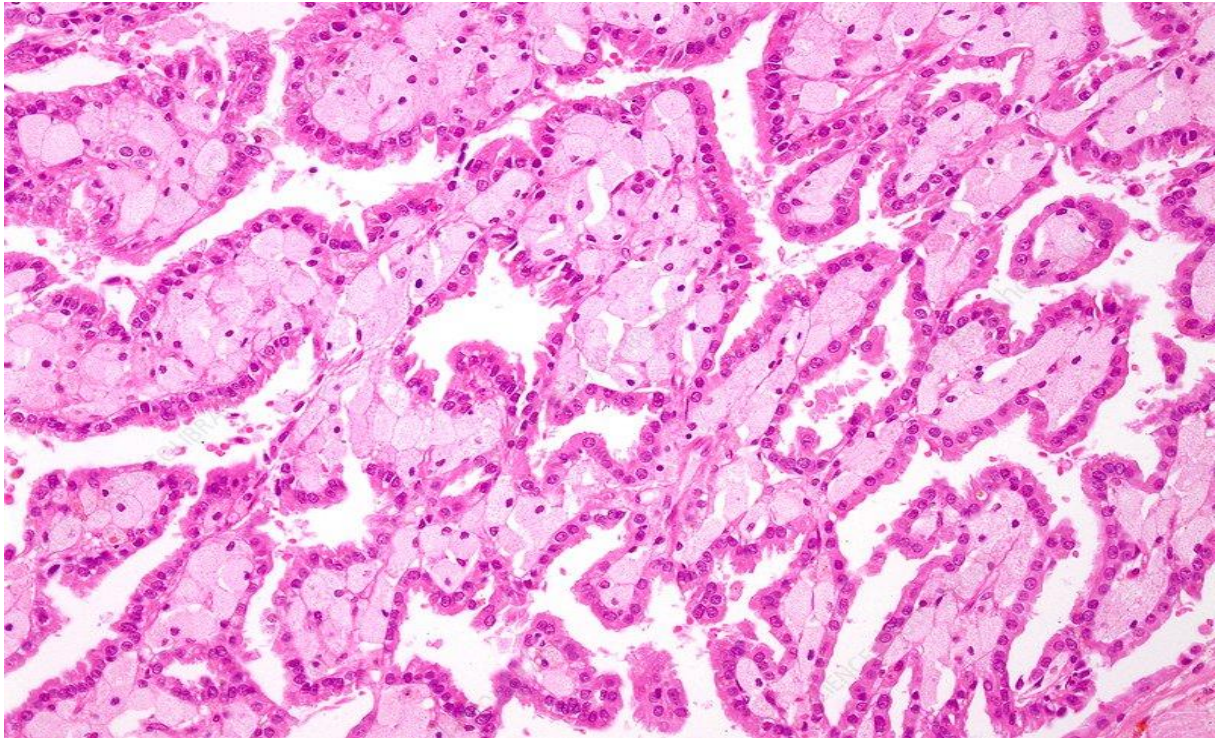
A vesesejtes daganatok második leggyakoribb altípusa a papilláris vesesejtes karcinóma (papillary Renal Cell Carcinoma: pRCC), kétoldali vagy multifokális előfordulású lehet, a vesesejtes daganatok 10-16%-áért felelős. Makroszkóposan vizsgálva a daganatban előforduló léziók barnásvörösek, jól körülhatárolt pszeudokapszula borítással. Mikroszkóppal megfigyelve papilláris vagy pszeudopapilláris struktúrák találhatók, továbbá meszesedések, nekrozisok és infiltrálódott makrofágok figyelhetők meg (2. Ábra). A papilláris vesekarcinóma szövettanilag tovább csoportosítható 1-es és 2-es típusra. Az 1-es típust halvány citoplazmájú tumorsejteket körülvevő vékony papillák jellemzik, kis sejtmaggal rendelkeznek, és hematoxin-eozin festéssel bazofilan festődnek. A 2-es típusnál vastagabb papillák figyelhetők meg, melyek tumorsejtjei nagyobb sejtmaggal rendelkeznek, valamint eozinofil vagy granuláris festődést mutatnak. Az 1-es típus jobb prognózisú, míg a 2-es típus esetében a daganat általában nagyobb átmérőjű és gyakrabban képez áttéteket [40].

Az 1-es altípus kialakulásáért az autoszomális domináns öröklődést mutató, örökletes papilláris vesekarcinóma szindróma (Hereditary Papillary Renal Cancer: HPRC) felelős, amely a 7-es kromoszóma q31 régióján elhelyezkedő mesenchymal-epithelial transition factor (MET) gént érinti [41]. A MET gén egy tirozin-kináz aktivitással rendelkező, több alegységből álló receptort kódol, amelynek a hepatocita növekedési faktor (HGF) a ligandja [42]. A HGF kötődése a MET receptorhoz elindítja a Foszfatidilinozitol-3-kináz/Protein kináz B/mTOR (PI3K/AKT/mTOR) jelátviteli pályát, ami szabályozza a sejtek növekedését, osztódását, a fehérjeszintézist, a riboszóma biogenezist, valamint a hírvivő RNS (mRNS) transzkripciót. A kromoszóma rendellenesség következtében a MET receptor ligand nélkül is képes aktiválódni, melynek következtében a sejtosztódási folyamatok ellenőrizetlenül zajlanak, ami a tumor kialakulását eredményezheti [38].

A 2-es típusú pRCC-t az örökletes leiomyomatosis és vesesejtes vesekarcinóma (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma: HLRCC) okozza, amely a bőr és a méh leiomyomájával társul. Ebben a betegségben az 1-es kromoszómán található fumarát-hidratáz gén (FH) érintett. Az érintett betegek körében beszámoltak nonszensz és frameshift mutációkról, valamint hibás splicingról [40]. A hibás géntermék miatt a fumarát nem tud tovább alakulni, így intracellulárisan felhalmozódik, gátolódik a Krebs-ciklus, valamint az oxidatív

foszforiláció sem megy végbe, számos metabolikus változást eredményezve. A csökkent AMP-aktivált protein kináz (AMPK) szint további következményeket von maga után, úgy, mint a p53 fehérje és a divalens fém-transzporter-1 (DMT1) expressziójának csökkenését [43]. A VHL gén mutációjához hasonlóan, ezek a folyamatok is a HIF- α fehérjék stabilizációjához vezetnek.

Mindkét altípus familiárisan és sporadikusan is előfordulhat, és az esetek egy részében az említett gének mutációi kimutathatók [44]. A kissejtes típus prognózisa kedvezőbb, az ötéves túlélési arány kb. 90%, míg a nagysejtes típus esetében mindössze 60% [40].



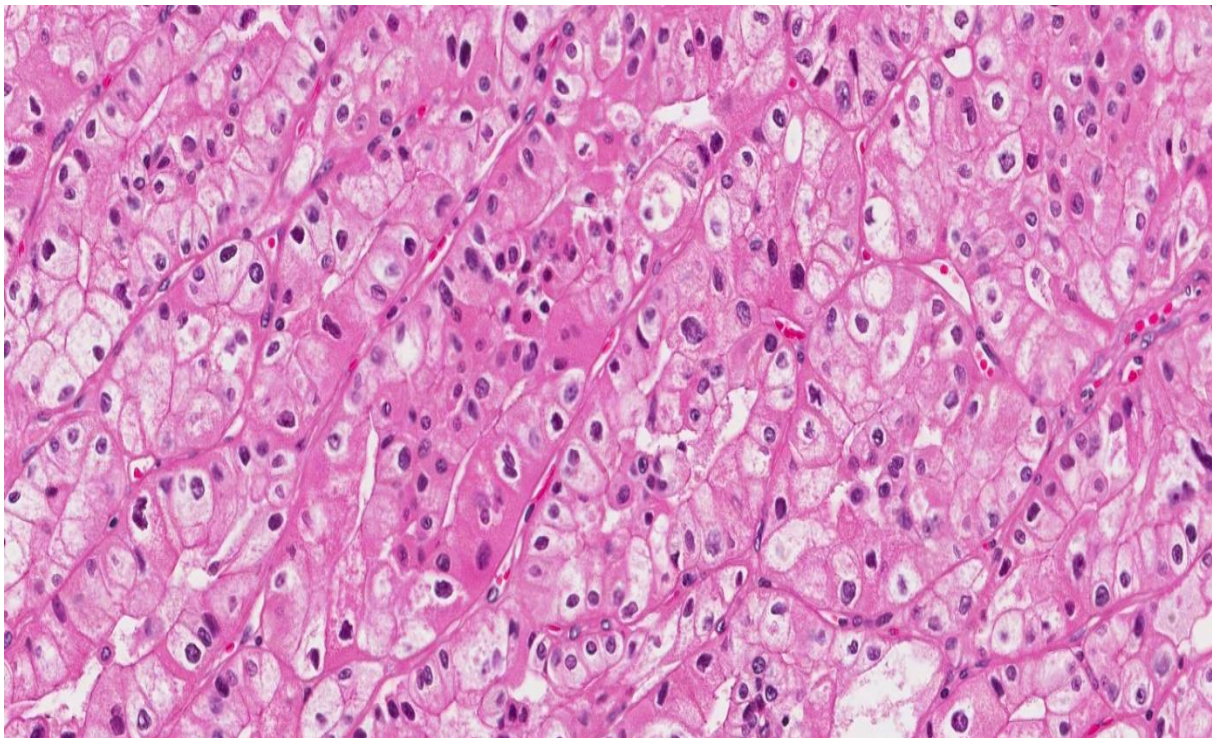
2. Ábra: A papilláris vesekarcinóma szövettani képe

(<https://www.sciencephoto.com/media/1184676/view/papillary-renal-cell-carcinoma-light-micrograph>)

III.2.3. Kromofób vesesejtes karcinóma (chRCC)

A kromofób vesesejtes karcinóma (chromophobe Renal Cell Carcinoma: chRCC) a vese rosszindulatú daganatainak 5%-át alkotja, mindkét nemben egyforma gyakorisággal fordul elő, főként 60 éves kor körül. Makroszkóposan különálló, nagyméretű, barnás színű daganatként jelennek meg, mikroszkópos vizsgálat során a sejtek jól elkülönülnek egymástól, a sejtmembránjuk tisztán kivehető, citoplazmájuk lehet tiszta vagy eozinofil. A sejtmagokat gyűrű veszi körül, és előfordulhatnak kettős sejtmagok is (3. Ábra). A chRCC ritkán képez áttétet, és igen jó prognózissal rendelkezik [40]. Jelentős deléciók az 1., 2., 6., 10., 13. és 17.

kromoszómán figyelhető meg. A 17. kromoszóma rövid karján található deléció következtében megfigyelhető Birt-Hogg-Dubé (BHD) szindróma a bőr jóindulatú elváltozásai és tüdőciszta mellett vesedaganatot is okozhat [41]. Az ebben a régióban központi szerepet játszó tumorszuppresszor follikulin (FLCN) gén, amely egy konzervált fehérjét, a follikulint kódolja. A follikulin hiánya több kóros metabolikus folyamatot idéz elő, növeli az mTORC1 komplex aktivitását, ezzel kedvezve a tumor növekedésének, és fokozza a peroxiszóma-proliferátor-aktivált-receptor- γ koaktivátor-1 α (PGC-1 α) aktivitását is [41]. A sejtekben a mitokondriumok számát növelve a PGC-1 α felelős a reaktív oxigéngyökök kialakulásáért. A sporadikus, nem BHD szindróma függő kromofób vesesejtes karcinóma esetében ritkán találtak eltéréseket az FLCN génben [40, 41, 45]. Prognózisa kedvező, az ötéves túlélési arány 90% [40].



3. Ábra: A kromofób vesekarcinóma szövettani képe

(<https://www.mypathologyreport.ca/diagnosis-library/chromophobe-renal-cell-carcinoma/>)

III.3. Jóindulatú vesekarcinóma fajták

III.3.1. Onkocitóma

Az onkocitóma egy jó indulatú elváltozás, a vesedaganatok 3-7%-át alkotja. A gyűjtőcsatornák interkaláris sejtjeiből alakul ki, jellemzője a sok mitokondrium, a világos és

finoman granulált eozinofil citoplazma, valamint a centrálisan elhelyezkedő csillag alakú heg [8]. Számos tulajdonsága megegyezik a kromofób típussal, ami arra utalhat, hogy a kromofób vesesejtes rák az onkocitoma malignus változata lehet [39].

III.3.2. Angiomiolipóma

Egy jóindulatú daganat típus, amely a mezenchimából származtatható, ultrahang és Komputertomográfia (CT) felvételek alapján könnyen diagnosztizálható és nyomon követhető. Előfordulhat sporadikusan vagy a sclerosis tuberosa részeként, ez utóbbi esetben többgócú és kétoldali elhelyezkedésű. Klinikai jelentőségét a spontán bevérvések adják, kezelése elsősorban sebészeti, lehetőleg szervmegtartó műtéttel történik. A sebészeti beavatkozást korábban 4 cm feletti méret esetén javasolták, jelenleg ezt a klinikai kép és a panaszok alapján határozzák meg. Sclerosis tuberosa esetén gyógyszeres kezelésként az mTOR gátló (everolimus) terápia alkalmazott [46].

III.4. A vesetumorok diagnosztizálása

A regisztrált vesedaganatos esetek az elmúlt 3 évtizedben folyamatosan emelkedtek, ami a modern képalkotó diagnosztikai eljárások megjelenésének, fejlődésének és elterjedésének köszönhető. A korai diagnózist számos tényező nehezíti, így általában már előrehaladott stádiumban kerül sor az észlelésre, amikor már a metasztázisok (főként tüdőben és csontokban) tüneteket okoznak [34]. Az egyik akadály, hogy a vesesejtes karcinóma sokféleképpen jelentkezhet, sokáig tünetmentes lehet, és a megjelenő tünetek nem specifikusak. Hiányoznak a korai felismeréshez és prognózishoz szükséges biomarkerek, a rutin hasi ultrahang vizsgálatok is csak az esetek 0,04%-ában mutatják ki daganat jelenlétét [39, 47, 48].

A vesekarcinóma jelenlétére az ún. „klasszikus triász” (fájdalmatlan véres vizelet, tompa deréktáji fájdalom, és tapintható hasi terime) utalhat [34]. Mivel azonban ez csak az esetek 10%-ában fordul elő, ekkor a betegség már gyakran előrehaladott. Az esetek több mint 40%-ában egyik sem jelentkezik tünetként, így elmondható, hogy a fizikális vizsgálatok, valamint a rutin laboratóriumi vizsgálatok igencsak kis szerepet kapnak a korai stádiumú vesedaganatok észlelésében [39]. A nem invazív diagnosztikai eljárások egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a vesekarcinóma időben történő diagnosztizálásában. Egyre több új biomarker és epigenetikai tényező azonosításán dolgoznak, amelyek ismerete előrelépést jelenthet mind a korai diagnózis, mind a kezelés szempontjából [48].

III.5. A vesetumorok kezelése

A diagnózis felállítása során, mint minden egyéb daganat esetében, egy szigorú kritériumrendszer alapján hozzák meg a terápiás döntést. Számos modell áll rendelkezésünkre, melyek segítségével meghatározható a daganat TNM besorolása, Fuhrman státusza, továbbá a vaszkularizációt és a posztoperatív túlélést is prediktálni lehet [49]. A lokalizált tumorok eltávolítása sebésziileg történik teljes vagy részleges nefrektómia alkalmazásával. A metasztatikus tumorok csak részlegesen távolíthatók el sebésziileg, a lokálisan kezelt tumorok a későbbiekben újra megjelenhetnek [50].

III.5.1. Szervre lokalizált kezelés

A vesetumorok első vonalbeli kezelése sebészeti úton történik. A T1 stádiumú vesekarcinóma kezelése során törekednek a szervmegtartó műtetre, vagyis a veserezekcióra, amely során a sebésznek minden esetben igyekezni kell, hogy a daganatos rész eltávolításakor minél kevésbé károsítsa az ép szöveti állományt. A sikeres beavatkozás eredményeként a betegek műtét utáni vesefunkciója jobb, mint a radikális veseeltávolításon átesett betegeké, miközben az onkológiai kimenetel megegyezik [51].

A részleges nefrektómiák esetében magasabb a vérvesztés és a szövődmények aránya, hosszú távon a T1 stádiumú betegek esetében a sikeres beavatkozás előnyös lehet [52].

A T2 stádiumú vesetumorok esetében a bevett módszer a radikális veseeltávolítás (nefrektómia), amennyiben lehetőség van rá, a szervmegtartó műtét alkalmazása. Ahogy a veserezekciók esetében, a nefrektómia során sem állapítható meg szignifikáns onkológiai különbség a különböző típusú eljárások között, mégis a gyakorlatban a laparoszko-pos és robot-asszisztált radikális nefrektómia a leggyakrabban alkalmazott eljárás [52].

A lokálisan előrehaladott (T3) esetekben a radikális nefrektómia az alapvető beavatkozás, azonban a daganat stádiumától függően szükség van kiegészítő beavatkozásokra is, mint például mellékvese eltávolítás, retroperitoneális nyirokcsomó disszekció, vena cava inferior rezekció és a tumor thrombus eltávolítása [53].

Abban az esetben, melyben a beteg műtetre alkalmatlan alternatív beavatkozások közül kell választani, melyek többsége még jelenleg is csak kísérleti stádiumban van. Kisméretű tumorok esetében a tumor abláció az egyik választható alternatív eljárás. A tumor abláció történhet mikrohullámú vagy radiofrekvenciás eljárással, továbbá a daganatos szövet

fagyasztással történő roncsolása (krioabláció) is szóba jöhet. Szövetteni biopsziát követően minhárom módszer elvégezhető laparoszkóppal asszisztált módon [54, 55].

A nem operálható T1a és T1b stádiumú daganatok esetében gyakran alkalmaznak szterotaxiás sugárkezelést, amely során nagy erősségű energiát összpontosítanak a daganatos területre [56]. Az ugyancsak műtetre nem alkalmas T3 és T4 stádiumú daganatok kezelése során gyakran alkalmaznak szelektív vagy részleges artéria renalis embolizációt, hogy csökkentsék a beteg fájdalmait [46].

III.5.2. A metasztatikus tumorok kezelése

Amennyiben a vesedaganatnál kialakult a metasztázis, multidiszciplináris, a beteg tüneti kezelésére irányuló kezeléseket alkalmaznak, azonban a teljes remisszióban ritkán lehet reménykedni. Oligometasztatikus daganatoknál citoreduktív nefrektómia elvégzése javasolt, míg a távoli áttétet képző daganatok esetében (tüdő, máj, csont) az érintett szerv eltávolítása javítja jelentősen a beteg hosszú távú túlélését [57], [58].

A metasztázist képző vesetumorok kezelésében a klasszikus kemoterápia alkalmazása nem javasolt, azonban napjainkban egyre több biztató eredmény van az úgynevezett célzott terápiák kifejlesztésében és alkalmazásában. A célzott terápiák közül kiemelendő az tirozin-kináz inhibitorok, az mTOR inhibitorok, valamint a monoklonális VEGF gátló antitest terápia alkalmazása [59].

III.5.2.1. Tirozin-kináz inhibitorok

A VHL gén hiánya és ennek egyik következménye a pro-angiogén hatással rendelkező vaszkuláris endotheliális növekedési faktor megnövekedett transzkripciója. A VEGF receptorok célzott terápiája a hagyományos citokin terápiával szemben hatékonyabbnak bizonyul. Ilyen célzott terápiában alkalmazott FDA (Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyező Hatóság: Food and Drug Administration) által jóváhagyott hatóanyagok a sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib, és a lenvatinib, melyek a tirozin-kináz aktivitással rendelkező VEGF receptorok 3 típusát képesek gátolni [50]. A sunitinib és a pazopanib az elsők között kerültek jóváhagyásra, mindkét készítmény alkalmazása során jelentős javulás volt dokumentálható, progressziómentes túléléssel; sunitinib esetében az interferont kapó csoporttal szemben, pazopanib esetében pedig a placebo csoporttal szemben. A hosszútávú után követést tekintve azonban egyik csoportnál sem volt megfigyelhető szignifikáns különbség [60].

Mindkét hatóanyagot elsővonalbeli terápiaként alkalmazzák jó- és közepes prognózisú világossejtes vesekarcinómánál. A tirozin-kináz inhibitorok hosszú távú alkalmazása során az esetek nagy részében rezisztencia alakul ki a daganatos sejtekben az adott készítménnyel szemben, alternatív jelátviteli útvonalak felerősítése révén, például fokozott multidrog rezisztens transzporter expresszió révén képesek csökkenteni a kemoterápiás szer intracelluláris koncentrációját [61].

A másodvonalbeli terápiában használt axitinib és a cabozantinib alkalmazását, melyek a VEGF receptorok mellett más tirozin-kináz receptorokat is képesek gátolni, csak később hagyta jóvá az FDA. Több klinikai vizsgálat is bizonyította, hogy ez a két kemoterápiás szer jobb hatást ér el, mint elődjeik, és bár az axitinib súlyosabb mellékhatásokkal bír, jelentős javulás figyelhető meg azon esetekkel szemben, ahol a rezisztencia kialakulása miatt nem történik válasz [50].

III.5.2.2. mTOR inhibitorok

Az mTOR a PI3K/AKT szignalizációs útvonal végső eleme, amely számos effektor molekulán keresztül képes szabályozni a sejtnövekedési és sejtproliferációs folyamatokat. Terápiásan a rapamycin származék temsirolimust és everolimust alkalmazzák mTOR gátlóként, melyek az mTOR-kináz doménjét gátolva leállítják a sejtciklust a G1 fázisban, csökkentve a daganatos sejtek osztódását [62]. Rossz prognózisú RCC-ben szenvedő betegeknél a temsirolimust elsővonalbeli terápiaként alkalmazzák, tirozin-kináz terápiát követően pedig másodvonalbeli kezelésként az everolimus jöhet szóba. Nem világossejtes vesekarcinóma terápiájában mindkét említett hatóanyagot alkalmazzák, mivel ezen daganatoknál jellemzően a PI3K/AKT/mTOR útvonal valamelyik pontját érheti károsodás [60, 62].

III.5.2.3. Immunellenőrzőpont-gátlók (Immun checkpoint inhibitorok)

A daganatos sejtek képesek alkalmazkodni az immunrendszer védelmi mechanizmusaihoz, képesek kitérni az immunrendszer úgynevezett effektor molekulái elől. Ezt úgy érik el, hogy csökkentik bizonyos molekulák, mint a tumor-asszociált antigének, vagy az MHC I és MHC II szintjét, valamint fokozzák az immunszuppresszálo citokinek és a transzformáló növekedési faktor β (TGF β) termelését [63]. A vesesejtes karcinóma esetében ilyen módosult immunfolyamatok működnek. A célzott terápiákkal ellentétben az „immun-checkpoint” inhibitorok egy, az egész szervezetet érintő, endogén immunválaszt stimulálnak,

és nem a daganatos sejteken fejtik ki hatásukat közvetlenül. Az „immun-checkpoint” inhibitorokat elsövonalbeli terápiaként alkalmazzák, mellékhatásaikat tekintve alacsony toxicitásúak, és nem alakul ki ellenük rezisztencia [64].

III.6. Jelátviteli útvonalak szerepe a vesedaganatok kialakulásában

A sejtben belüli szignalizációs útvonalak jelentös szerepet játszanak a tumoros folyamatok kialakulásában, befolyásolják a sejtek növekedését és proliferációját onkogének és tumorszuppresszorok regulációja révén. Az ezen szignalizációs útvonalakban részt vevő gének, melyeket különbözö genetikai és epigenetikai változások befolyásolhatnak, terápiás célponként szolgálhatnak [48, 65].

III.6.1. PI3K/AKT szignalizációs útvonal

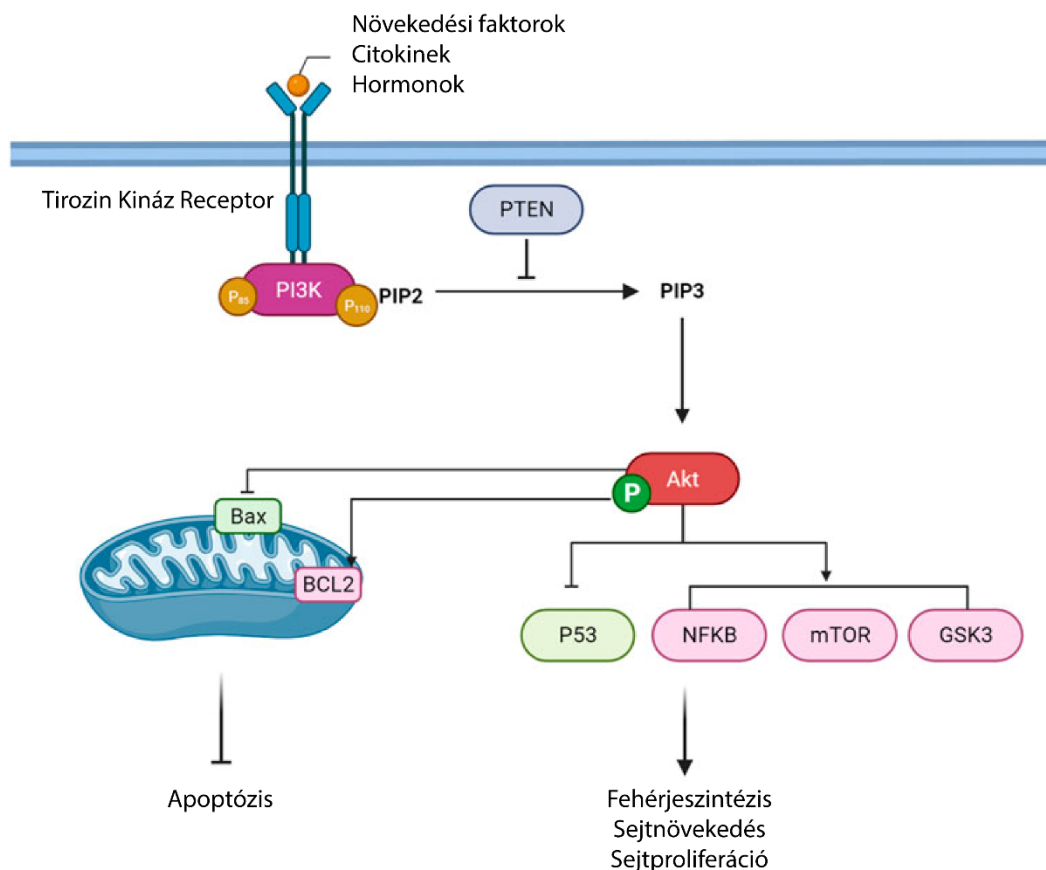
A foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) szignalizációs útvonal nélkülözhetetlen szerepet játszik a sejtostódás, a túlélés, a migráció, valamint az angiogenezis szabályozásában. Működése során foszforilálják az inozitol-foszfolipidek gyürűinek 3'- végén található hidroxil csoportokat, ezáltal foszfatidil-inozitol-trifoszfát (PIP3) szekunder hírvivö molekulát előállítva [66]. A protein-kináz B, másnéven AKT molekulák a PIP3 molekulákkal interaktálva aktiválódnak, ezáltal megváltoztatva számos olyan szubsztrát funkcióját, melyek a sejtek túlélését, proliferációját, metabolizmusát, valamint a sejtciklus előrehaladását szabályozzák. Számos tanulmányban leírták, hogy a PI3K/AKT szignalizációs útvonal elemeiben bekövetkezett módosulások szerepet játszanak a tumorok fejlődésében, továbbá hozzájárulhatnak a kemoterápiás és sugárterápiás kezelésekkal szembeni szerzett rezisztencia kialakulásához. Az útvonal negatív szabályozását a PTEN tumorszuppresszor molekula végzi (4.Ábra) [67, 68].

Az eltérö szerkezet, a felismert szubsztrát és az aktivációs mechanizmus alapján az emlös sejtekben lévö PI3K család további 3 osztályba csoportosítható, melyek közül az első osztályba tartozó PI3K-ok játszanak kiemelkedö szerepet a sejtproliferációs folyamatok szabályozásában. Az aktivációs mechanizmus alapján az első osztályba tartozó PI3K-kat két alosztályba lehet csoportosítani: az I.A. alosztály a receptor-tirozin-kináz által, az I.B. alosztály pedig G-fehérje kapcsolt receptor által aktiválódik [68].

Az első osztály PI3K-ok foszfatidil-inozitol (PI), foszfatidil-inozitol-foszfát (PIP), valamint a foszfatidol-inozitol-bifoszfát (PIP2) által aktiválódhatnak, in vivo a PIP2

foszforilációjából keletkezik a PIP3 szekunder jeltevábbitó molekula. Az aktivációt követően a receptor-tirozin-kináz foszfortirozinjai révén kapcsolódik a PI3K molekula szabályozó alegységében lévő SH2 (Src homológ 2) doménhez. Ennek következtében a PI3K katalitikus alegysége allosztérikusan aktiválódik, ami a sejtmembrán intracelluláris részén a PIP2-t PIP3-á foszforilálja [68].

Az AKT szerin-treonin protein kináz az egyik legfontosabb célpontja a PI3K-nak. Három izoformája ismert, Akt1, Akt2 és Akt3, mindegyik rendelkezik egy pleksztrin homológ doménnel, melyhez a PIP3 képes kapcsolódni. Az interakciót követően az AKT molekula az intracelluláris membránhoz kötődik, ugyancsak pleksztrin homológ doménon keresztül, továbbá egy konformációváltozás következtében két szabad foszforilációs helye válik elérhetővé. Ezt a két helyet a PDK1 és az mTORC2 foszforilálja, aminek következtében az AKT a sejtmagba transzlokálódik, ahol szubsztrátjai által gén szinten képes szabályozni a sejtosztódási folyamatokat [66].



4. Ábra: A PI3K/AKT szignalizációs útvonalak [69]

III.6.2. A PTEN szerepe a PI3K/AKT szignalizációs útvonalban

A foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) szerkezetét tekintve, ahogy az elnevezése is mutatja egy foszfatáz molekula, melynek szubsztrátjai lipidek és fehérjék egyaránt lehetnek. Lipid szubsztrátja a PIP3 szekunder hírvivő molekula, melyet hidrolizálva PIP2 keletkezik, ezáltal a PTEN-nek kulcsfontosságú szerepe van a foszfatidil-inozitol homeosztázisban [68]. A PI3K/AKT útvonal negatív szabályozásával a PTEN gátolja a sejtek növekedését, miközben az apoptotikus útvonalak irányába tolja a sejtciklust, vagyis tumorszuppresszor szerepe is van. A PTEN a tumorszuppresszor p53 után a második leggyakrabban mutálódó vagy hiányzó gén. A mutáció, illetve deléción kívül a PTEN sejten belüli szintje transzkripcionális gátlások és aktiválások által is változhat, melyekért a poszttranszlációs módosítások, illetve a mikroRNS-ek felelnek [67].

III.6.3. A VHL/HIF szignalizációs útvonal

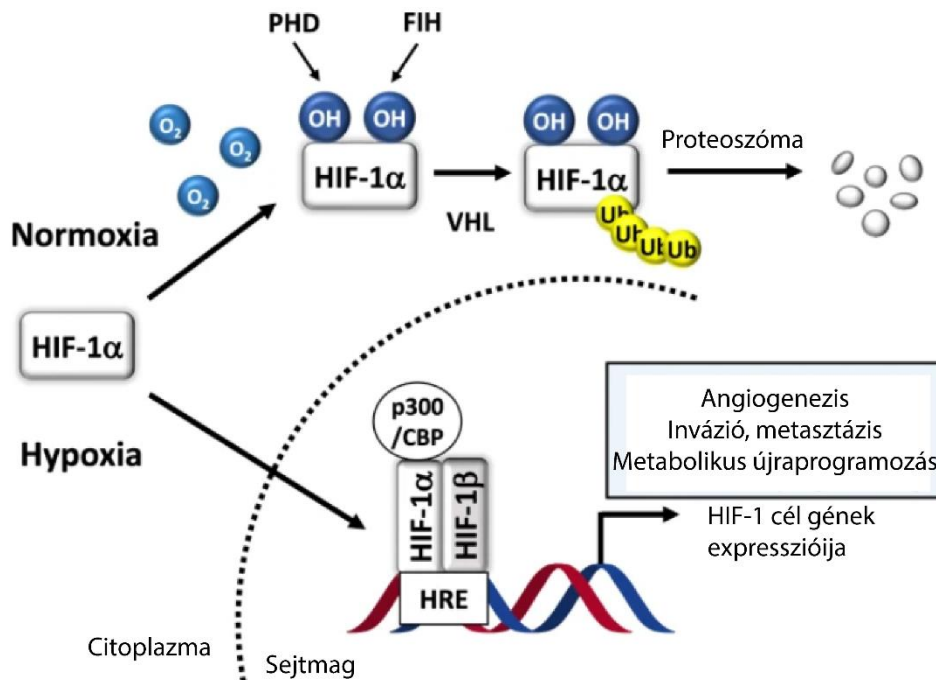
A hypoxia indukált faktorok (HIF) a sejtek oxigénhiányos környezethez történő alkalmazkodását teszik lehetővé. Hatásukat transzkripciós faktorként fejtik ki, késleltetik a csökkent oxigénszint okozta károsodások kialakulását, és ezzel egyidejűleg elősegítik a sértetlen sejtek regenerálódását, valamint a nekrotikus területek eltávolítását. A tumoros területek vaszkularizálásával, a tumoros sejtek életben maradásának szabályozásával a HIF-ek hozzájárulnak a daganatok malignitásának növeléséhez [70].

A HIF-ek a foszforilált von Hippel-Lindau tumorszuppresszor fehérje által szabályozottak (pVHL), amely megfelelő oxigénellátottság mellett a HIF- α alegység proteozomális lebontásában vesz részt. A VHL gén mutációja vagy delécióna következtében folyamatosan aktiválódnak a hypoxia-útvonalak, az ennek következtében felhalmozódott HIF-ek növelik a tumor malignitását [70].

A HIF transzkripciós faktorok hypoxia rezponzív elemekhez kötődve (HRE) szabályozzák a génexpressziót. A HIF-ek HRE-hez történő kötődésének eredményeként egy olyan széleskörű transzkripciós válasz jön létre, amely az apoptózist, a proliferációt, a sejtek növekedését és metabolizmusát, valamint az angiogenezist egyaránt szabályozza [71].

A heterodimer HIF fehérje egy oxigén-szenzitív α alegységből, amely kizárólag hypoxiás körülmények között van jelen, valamint egy hypoxiás és normoxiás körülmények között egyaránt jelen lévő β alegységből épül fel (HIF- β). A HIF α alegységből hármat különböztethetünk meg (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), melyek egyaránt a VHL fehérje célpontjai

lehetnek [71]. Normoxiás körülmények között a HIF-1 α oxigén hatására degradálódik, a prolihidroxiláz (PHD) és a HIF-1 Faktor Inhibitor (Factor Inhibitor HIF-1: FIH) hidroxilálja a HIF-1 α -t, amit a pVHL poliubiquitinál, ezáltal elősegítve a proteozomális degradációt. A VHL gén mutációja vagy deléciója révén a HIF- α stabilizálódik, és a sejtmagba transzlokálódva a HIF- β alegységgel heterodimert alkotva a p300/CBP transzkripciók ko-faktorok segítségével a hypoxia válaszelemeket tartalmazó régiók promótereire kötődve szabályozza azok expresszióját (5. Ábra) [72].



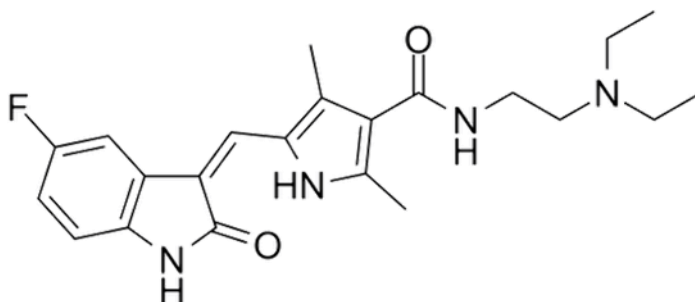
5. Ábra: A VHL/HIF szignalizációs út vonal [73]

III.7. A sunitinib alkalmazása daganatos megbetegedésekben

A sunitinib egy tirozin-kináz inhibitor, mely hatásmechanizmusát tekintve igen szerteágazó, egyidejűleg képes gátolni a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGFR α , PDGFR β), a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptorainak (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), továbbá a proto-onkogén KIT receptorok tirozin-kináz aktivitását, vagyis egyszerre bír anti-tumor és anti-angiogenezis hatással (6. Ábra) [74].

Mivel a sunitinib hatással van a tumor angiogenezisre, képes közvetlenül gátolni a tumor növekedését, emellett elősegíti a tumorsejtek apoptotikus folyamatait, felerősíti a daganatellenes immunválaszt, így növelve a teljes túlélés esélyét. Elsősorban olyan a gasztrointesztinális tumorok terápiája során alkalmazzák, melyek nem távolíthatók el műtéti úton,

valamint amikor a tumor már metasztázisokat képzett. Emellett a sunitinibet a pankréász neuroendokrin jellegű daganatai esetén, valamint a metasztatikus vesesejtes karcinóma (mRCC) kezelésében is alkalmazzák [75]. Mivel tirozin-kináz receptorokat a tumoros szöveteken kívül az ép szövetek is expresszálnak, hosszú távú alkalmazása toxicitási problémákhoz vezethet, emiatt a terápia intermittálóan alkalmazható [59].



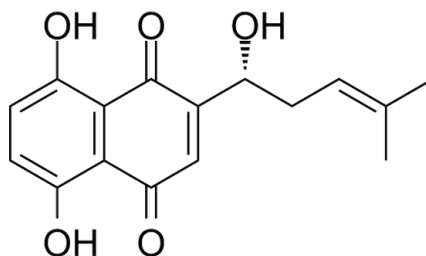
6. **Ábra:** A sunitinib szerkezeti képlete (www.medchemexpress.com)

III.8. A shikonin szerepe a daganatterápiában

Habár a sunitinib az egyik leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás készítmény, mely az esetek többségében sikeresen növeli a betegek hosszú távú túlélését, a nem tumoros sejtekre való magas toxicitása, illetve a tumorsejtek által sunitinibbel szemben kialakított rezisztencia miatt nem minden esetben alkalmazható [12]. Ebből kifolyólag az újabb terápiás lehetőségek kutatása kiemelkedő fontossággal bír.

A shikonin (5,8-dihidroxi-2-((1S)-1-hidroxi-4-metilpent-3-en-1-il)naftalin-1,4-dion), egy természetes naftokinon vegyület, melyet a kínai gyógynövény, a *Lithospermum erythrorhizon* gyökeréből izolálták (7. Ábra), [12, 14]. Ahogy az már a bevezetésben is említésre került, a shikonint és származékait évezredek óta használják torokfájás, bőrkiütés, kanyaró, furunkulusok és égési sérülések kezelésére. Izolálása napjainkban kromatográfias elválasztással, ultrahangos módszerrel és ultrahangosan asszisztált ionos folyadék-szilárd-folyadék extrakcióval történhet [12, 23, 24]. Számos, humán daganat sejtvonalon végzett kutatás bizonyítja a shikonin in vitro és in vivo daganatellenes hatásait, miközben minimális toxicitást mutat az ép humán sejtekkel szemben [12, 25-28]. A shikonin különböző daganatellenes hatását igazolták korábbi tanulmányok, beleértve a proliferáció gátlását, az apoptózis indukálását humán tüdő adenokarcinóma sejteken, valamint az invázió és migráció csökkentését humán emlődaganatos sejteken. A shikoninról bebizonyosodott, hogy apoptózist,

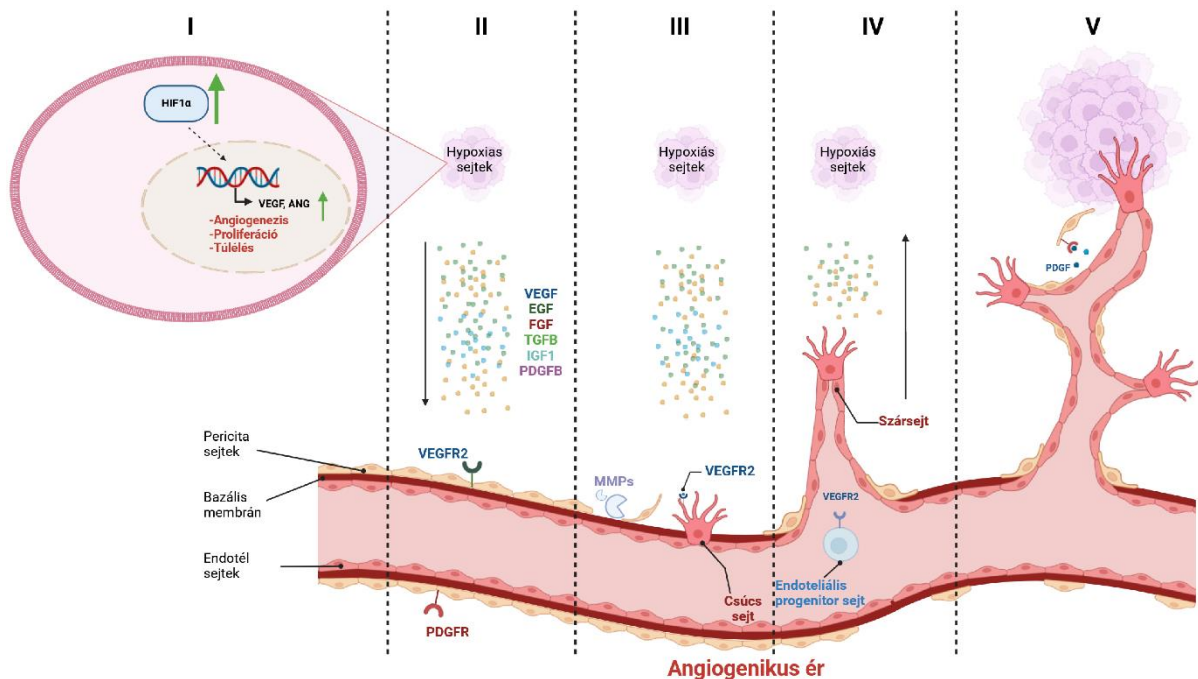
nekrózist vagy nekroptózist indukál különböző sejtvonalakon, jelátviteli útvonalak és molekuláris célpontok szabályozása révén [12, 14, 25]. Emellett az is ismert, hogy a shikonin különböző molekuláris célpontokon keresztül hat a karcinogenezissel összefüggő folyamatokra, és erős sejtproliferációt gátló hatással bír még gyógyszer-rezisztens daganatos sejtvonalakon is [25, 28]. További tanulmányok kimutatták, hogy a shikonin apoptotikus hatásán túl autofágiás folyamatokat is aktivál különböző daganatos sejtekben [12, 28-31, 76]. A shikonin által kiváltott apoptózis elsősorban az AKT/ASK1/p38-MAPK jelátviteli útvonal és a sejtciklus-függő kináz-gátló (p21) szabályozásán keresztül jön létre. Azt is kimutatták, hogy humán prosztatarák sejtvonal esetében a shikonin az apoptózist az ER stressz útvonal és a mitokondriális apoptotikus útvonal aktiválásával segíti elő [25, 29-31].



7. **Ábra:** A shikonin szerkezeti képlete (www.medchemexpress.com)

III.9. Tumorok angiogenezise

Az angiogenezis egy olyan folyamat, amely során a már meglévő vérerek újakat képeznek. Ez a fiziológiai folyamat elengedhetetlen az embrionális egyedfejlődés során. Felnőttkorban nyugalmi állapotban marad, azonban bizonyos körülmények között, mint például a sebgyógyulás, az ovulációs ciklus vagy a terhesség újra aktiválódik. Az angiogenezis azonban olyan kóros jelenségekkel is összefüggésbe hozható, mint például a daganatok kialakulása, ugyanis egy daganat nem lenne képes 1 mm²-nél nagyobb méretűre nőni egy olyan érrendszer kialakulása nélkül, amely számára biztosítja az oxigén és tápanyagellátást. Az angiogenezis folyamata az endotheliális sejtek (EC) fejlődését, migrációját és proliferációját foglalja magába, amelyet számos pro- és anti-angiogén faktor szabályoz (8. **Ábra**) [77, 78].



8. Ábra: Az angiogenesis folyamata [5]. Az angiogenesis folyamata során az angiogen inkek hatására a már meglévó erekből új erek fejlődnek. Tumorokban a csökkent oxigénkoncentráció a HIF felhalmozódását idézi elő, ami a VEGF és más angiogen faktorok fokozott expressziójához vezet. (I). A pro-angiogen faktorok fokozott expressziója, beleértve a VEGF-A-t is, stimulálja a VEGFR-2 receptorokat az erek endothél sejtjein (II). Ez a periciták bazális membránról történő leválásához vezet, melynek eredményeként az erek elongáció (III) irányítását végző csúcssejtek termelődnek. A szárcsejtek szaporodnak és megnyúlnak a hypoxiás sejtek irányába (IV), és az új véredényt a PDGFR-t expresszáló (V) periciták stabilizálják [5].

Az angiogenesis egyik legfontosabb tényezője a VEGF-A. Ez a molekula egy hét tagból álló családba tartozik, amely magába foglalja a Placentális Növekedési Faktor (PIGF)-1 és -2, a VEGF-B, a VEGF-C, a VEGF-D és a VEGF-E faktorokat. Míg a VEGF-A az angiogenesis kulcs-szabályozója, a VEGF-C és -D elsősorban a limfangiogenesiszt szabályozzák [78]. A VEGF-A hatása az endotheliális sejtekre intracelluláris jelátvitel révén valósul meg, miután kötődik receptoraihoz (VEGFR-1 és VEGFR-2). A VEGFR-2 az angiogenesis fő jeltovábbító molekulája, míg a VEGFR-1 negatív szerepet játszik az angiogenesis szabályozásában azáltal, hogy fenntartja a VEGFR-2 aktivációjának megfelelő szintjét. A VEGF-A, a VEGFR-2-n keresztül történő jelátvitel által serkenti az endothél sejtek proliferációját, migrációját, növeli az érrendszeri permeabilitást és az endotheliális progenitor sejtek (EPC) mozgósítását. A VEGFR-1 kötődésén keresztül a VEGF-A elősegíti a monociták migrációját, lehetővé teszi az endotheliális progenitor sejtek toborzását és növeli az NK sejtek adhéziós tulajdonságait. A

VEGFR-3, a VEGF-C receptora szükséges a vérerek kialakulásához a korai embriogenezis során, de később a limfangiogenezis kulcsszabályozójává válik [78].

A hypoxia hatására csökken a HIF- α transzkripciós faktorok lebomlása, ami proangiogén faktorok, köztük a VEGF-A expresszióját indukálja, elősegítve ezzel a tumorok érképződését [71].

III.10. A mikroRNS-ek általános jellemzői

A mikroRNS-ek konzervált, néhány nukleotidból álló (~18-22), nem kódoló endogén RNS molekulák, melyek fontos szerepet játszanak különböző molekuláris útvonalak poszttranszkripciós szabályozásában. Az érett mRNS-ek 3'UTR régiójához kötődve a miRNS-ek vagy megakadályozzák a transzláció végbemenetelét, vagy degradálják az érintett mRNS-t, és ezzel akadályozzák a transzlációt [47, 48].

Az egyes miRNS-ek akár 100 különböző mRNS szabályozásában vehetnek részt, mely szabályozás a sejtfunciók széles spektrumát érinti [48]. Szerepet játszanak számos fiziológiai és patológiai folyamatban, szabályozzák a metabolizációt, a sejtek növekedését, differenciálódását, proliferációját, az apoptózist, továbbá részt vesznek a szöveti invázió, a metasztázis és az angiogenezis folyamataiban [47]. A miRNS-eknek kiemelkedő szerepe van a tumorok kialakulásában, ugyanis amennyiben egy onkogén expresszióját gátló miRNS expressziós szintje lecsökken, vagy egy tumorsuppresszor gén expresszióját gátló miRNS aktivitása emelkedik, daganatos elváltozás alakul ki. A daganatok kialakulásában, illetve progressziójában szerepet játszó miRNS-eket onkomiR-eknek nevezzük [79].

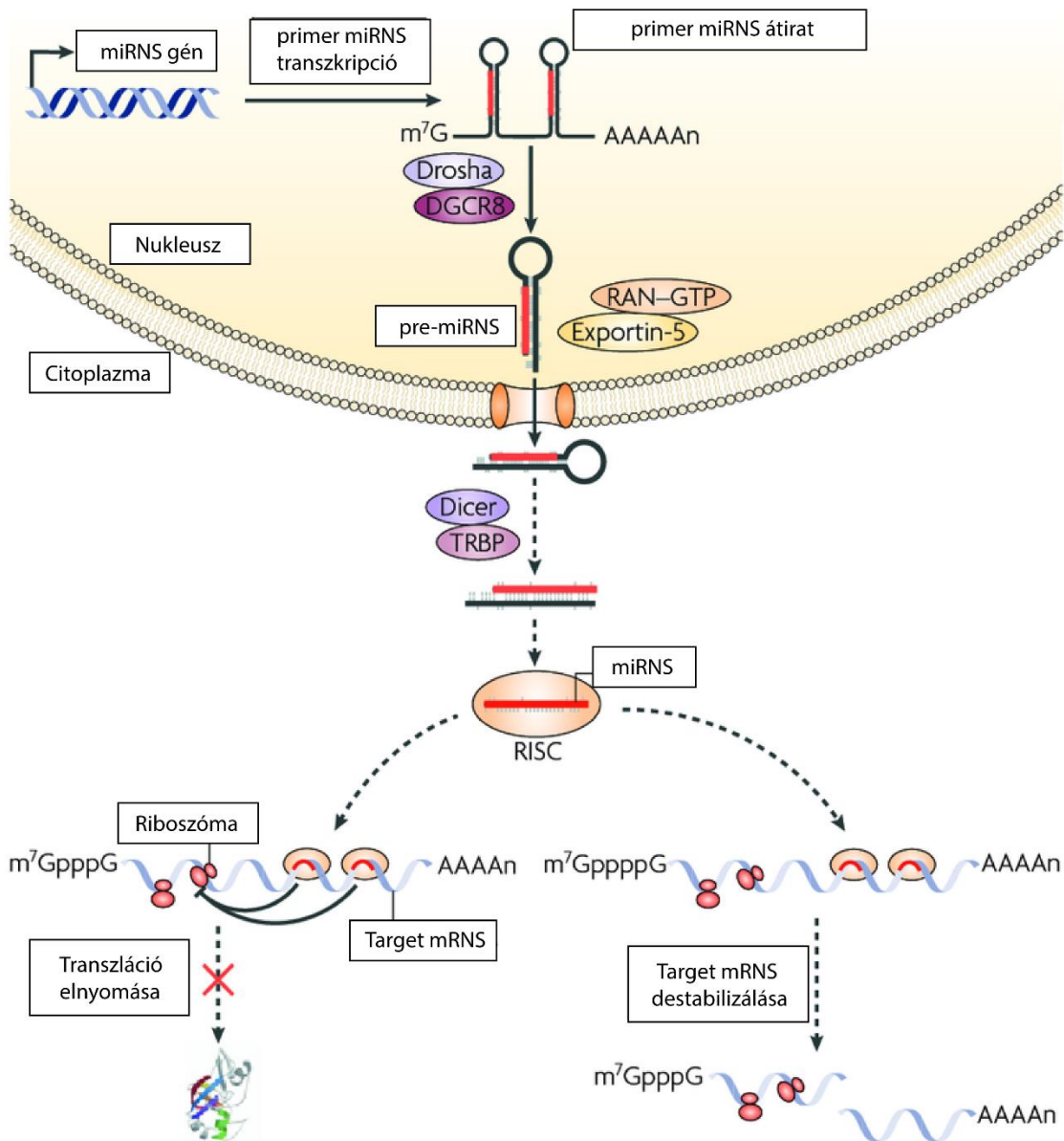
A miRNS-ek mint biomarkerek is jelentős előrelépést jelenthetnek az olyan daganatok korai diagnosztizálásában, többek között a vesetumorer esetében is, melyek tünetei csak későbbben jelentkezhetnek, ezzel hozzájárulva a betegség korai felismeréséhez, a kezelések időbeni elkezdéséhez, valamint a túlélés növeléséhez [48].

III.10.1. A miRNS-ek biogenezise

A miRNS-ek endogén és exogén eredetűre oszthatók. A celluláris miRNS-ek többsége endogén eredetű, átírásuk a sejtmagban történik az RNS polimeráz II által, amely egy több mint 500 nukleotid hosszúságú, hajtű alakú primer miRNS-t (pri-miRNS) hoz létre. Ez a splicing-on átesett pri-miRNS rendelkezik poli-adenin „farokkal” és metil-guanin sapkával, ami védelmet biztosít az RNázokkal szemben. Még a sejtmagban, a pri-miRNS-t a Drosha RNáz II enzim

annak kofaktorával, a DGCR8-cal hasítja, melynek következtében 65-75 nukleotid hosszúságú prekursor miRNS (pre-miRNS) jön létre, ami az Exportin-5/Ran-GTP komplexen keresztül a citoplazmába transzlokálódik [48, 80]. A citoplazmában a Dicer nevezetű enzim lehasítja a hajtűkanyarról a hurkot, egy rövidebb, 19-23 nukleotid hosszúságú, dupla szálú miRNS-t létrehozva. Egy helikáz enzim a dupla szálú miRNS-t szétcsavarja, majd az így már egyszálú miRNS-ek és az Argonauta 2 fehérje (Ago2) létrehozzák az úgynevezett RISC komplexet (RNA-induced silencing complex – RNS indukálta csendesítő komplex), mely a cél mRNS 3'UTR régiójához kapcsolódik teljes, vagy részleges komplementaritással (9. Ábra). Teljes komplementaritás esetén a cél gén mRNS degradációja, részleges komplementaritás esetén pedig a fehérjeszintézis gátlása következik be (9. Ábra), [47, 48, 80].

A sejtekben előforduló miRNS-ek extracelluláris forrásból is származhatnak. A sejtek különböző miRNS-eket tartalmazó vezikulákat bocsáthatnak a test folyadék tereibe, mint pl. a vér, nyál, vizelet vagy az anyatej. Ezek az endogén miRNS-ek képesek a vérben keringve távoli sejtekhez is elérni, ami egy miRNS mediált sejtek közötti kommunikációt eredményez [80].



9. Ábra: A mikroRNS-ek biogenezise [81]

III.10.2. miRNS-ek szerepe a daganatok kialakulásában

Mint már korábban is említésre került, a miRNS-ek onkogénként vagy tumorszuppresszorként viselkedve befolyásolják a sejtek növekedését, differenciálódását, a sejtproliferációt, az apoptózist, valamint részt vesznek az angiogenezis, a sejtinvázió és a metasztázis folyamataiban [48, 80]. Számos tanulmány számol be arról, hogy az egészséges és a tumoros szövetek, de akár a különböző típusú vesedaganatok eltérő miRNS profilt mutatnak

[72, 80]. Az eltérő miRNS expresszió okozója, illetve következménye is lehet a karcinogenezisnek [47]. Számos miRNS mutatott emelkedett expressziót vesedaganatos mintákban, olyanok, mint a miR-210, a miR-155, valamint a miR-21, melyek emelkedett expressziós szintjét a sejten belüli hypoxiás mikrokörnyezet idézheti el. Ezen miRNS-eknek több olyan célpontja van, melyek a PI3K/Akt vagy a VHL/HIF szignalizációs útvonalban helyezkednek el [79].

A miRNS-ek rendellenes expressziója összefüggésbe hozható a betegek teljes túlélésével, a daganatok stádiumával, a metasztázis kialakulásával, valamint a daganat kiújulásával [82]. Annak köszönhetően, hogy a miRNS-ek nem-invazív módon akár vérérből vagy vizeletből is kimutathatók igen ígéretes biomarkernek is bizonyulhatnak.

III.10.3. Néhány fontosabb miRNS

miR-21

Az onkogén jellegű miR-21 emelkedett expressziót mutat daganatos szövetekben, az RCC altípusai közül inkább a ccRCC, valamint a pRCC expresszálja magasabb szinten [83]. A miR-21 képes tovább redukálni a hypoxia által eleve csökkent pro-apoptotikus szignalizációt, szerepet játszik az invázió és a metasztázis kialakulásában a PDCD4 (programozott sejthalál 4) szintjének csökkentésével. A PDCD4 hiányának következtében megszűnik az mTORC1, valamint az mTORC2-függő Akt foszforiláció gátlása, ami a sejtek migrációját és invázióját eredményezi [82].

A miR-21 gátlása révén a G0/G1 fázisban rekedt sejtek száma csökken in vitro a megemelkedett p21 (ciklin-dependens kináz inhibitor p21) és MAPK szintjének következtében. Egyes irodalmak szerint a PTEN és a tumorszuppresszor p53 gén is a miR-21 célpontja lehet [83]. Az RCC-ben szenvedő betegek miR-21 szintje negatív korrelációt mutat a túléléssel, a legtöbb esetben a kiemelkedően magas miR-21 szint előrehaladott stádiumra utal [82].

miR-155

A miR-155 az egyik legjobban tanulmányozott miRNS, létfontosságú szabályozó szerepet tölt be számos fiziológiai folyamatban, ideértve a hematopoetikus vonal differenciálódását, az immunválaszt és bizonyos gyulladási folyamatokat. A megemelkedett miR-155 szint összekapcsolható a hypoxiás mikrokörnyezettel. Számos gén szabályozásában

részt vesz, melyek közül kiemelendő az apoptotikus hatást kiváltó TP53INP1 (tumor protein 53 induced nuclear protein 1: TP53INP1). Habár a tumor mérete és a miR-155 expressziós szintje között összefüggést figyeltek meg, ezen korreláció a túléléssel nem köthető össze [47].

hsa-miR-15b

A hsa-miR-15b mikroRNS fontos szerepet játszik a daganatok kialakulásában és progressziójában. Számos tanulmány kimutatta, hogy a hsa-miR-15b részt vesz olyan különböző sejtfunkciók szabályozásában, amelyek kritikusak a daganat kialakulásában, mint például a sejtosztódás, apoptózis, angiogenezis és a sejt migrációja [84]. Bizonyos daganatokban onkogénként működik, elősegítve a tumor növekedését és progresszióját, míg más daganatokban tumorszuppresszorként viselkedik, gátolva a daganatos sejtek proliferációját. Befolyásolja az apoptózist szabályozó gének expresszióját, például csökkentheti az antiapoptotikus Bcl2 (B-sejtes limfóma 2) fehérje szintjét, elősegítve ezzel a daganatos sejtek pusztulását. Számos sejtproliferációt szabályozó génre van hatással, overexpressziója fokozhatja a sejtosztódást, míg gátlása csökkentheti azt, ami befolyásolja a tumor növekedését [85].

hsa-miR-99b

A hsa-miR-99b-t számos tanulmány tumorszuppresszorként azonosította, mivel alacsony expressziója összefüggésbe hozható a daganatok növekedésével és progressziójával. Különböző daganatos sejtípusokban kimutatták, hogy a hsa-miR-99b expressziójának csökkenése elősegíti a sejtek proliferációját, migrációját és invázióját [86]. Hatással van különböző célgének szabályozására, amelyek szerepet játszanak a daganatos sejtek növekedésében és túlélésében. Az mTOR, mely szabályozza a sejtnövekedést és -osztódást, a hsa-miR-99b expressziójának csökkenése az mTOR aktivitásának növekedéséhez vezethet, ami elősegíti a tumor növekedését. A hsa-miR-99b-nek szerepe van a kemoterápiára való érzékenységben is, overexpressziója növelheti a daganatos sejtek érzékenységét a kemoterápiás gyógyszerekkel szemben, míg a csökkent expressziója rezisztenciát eredményezhet [87].

hsa-miR-181a

A hsa-miR-181a funkciója daganatfüggő lehet, bizonyos daganatokban tumorszuppresszorként működik, míg másokban onkogénként viselkedik, elősegítve a tumor növekedését és progresszióját. Szerepet játszik a sejt differenciálódásban és más sejtfunkciókban is, amelyek befolyásolják a daganatok viselkedését. A hsa-miR-181a expressziója összefüggésbe hozható a hematopoetikus sejtek differenciálódásával és funkciójával. A hsa-miR-181a befolyásolja az angiogenezist, az új vérerek képződését, amely kritikus a tumorok vérellátásában és növekedésében, szabályozhatja a VEGF és más angiogén faktorok expresszióját [88].

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. A klinikai szövetminták gyűjtése

Az angiogenezissel és a miRNS-ekkel kapcsolatos vizsgálatunk a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján, a 2021 és 2023 közötti időszakban a vesetumorral diagnosztizált és műtétre érkező betegekből származó szövetmintákat (20-20 tumoros/ép) foglalja magába. A vizsgálatainkhoz használt minták vétele a műtétet végző urológus sebész által makroszkóposan tumorosnak ítélt területből történt, az ép mintapárok pedig a még tumorosnak vélt területtől legalább 3 cm távolságra lettek kimetszve a laparoszkóppal vagy nyílt műtéttel végzett rezekció során. A vizsgált betegcsoportban metasztázis nem volt azonosítható, a minták mindegyike primer tumorként lett azonosítva.

IV.2. Sejtkultúrák

Az *in vitro* kísérleteinket az A-498 és CAKI-2 humán vesedaganat sejtvonalakkal végeztük, melyek az American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) gyűjteményből származtak. A sejteket Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) tápközegben tenyésztettük, amelyet 10% FBS (fetal bovine serum) és antibiotikumokkal (100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin) egészítettük ki. Mindkét sejtvonalat 37 °C-on, párasított atmoszférában, 5% CO₂ mellett működő termosztátban tartottuk.

IV.3. Vegyületek

Az A-498 és CAKI-2 humán vesedaganat sejtvonalakkal végzett *in vitro* kísérleteinkhez a tirozin-kináz inhibitor hatással bíró sunitinibet és a növényi eredetű shikonint használtuk, amely a szakirodalom szerint ugyancsak a tirozin-kináz útvonal gátlása révén fejti ki hatását. A shikonint (tisztaság > 98%) a Santa Cruz Biotechnology-től (Dallas, TX, USA) szereztük be, melyet DMSO-ban oldottunk, és porciók formájában -20 °C-on tároltunk, majd a további *in vitro* vizsgálatainkhoz ezt használtuk. A shikonint és a sunitinibet a sejtproliferációs vizsgálat esetében a 2,5 - 40 µM közötti koncentrációban alkalmaztuk. A DMSO-t minden kísérletben vivóanyagként használtuk. A további, CAKI-2 és A-498 humán vesedaganat sejtvonalakkal kapcsolatos kísérletekben alkalmazott shikonin koncentrációt a sejtproliferációs görbék szerint optimalizáltuk (lásd az Eredmények részben, 17. Ábra).

IV.4. Sejtproliferációs aktivitás detektálása

A sejtproliferációs vizsgálathoz a Cell Titer Blue Assay-t (Promega, Madison, WI, USA) használtuk. A vizsgálathoz az A-498 és CAKI-2 sejteket (10^4 /sejt) 96-lyukú plate-ekre helyeztük, minden sejtet a teljes IMDM növekedési médiumban növesztettünk 24 órával a kísérletek előtt. Másnap a médiumot eltávolítottuk, és helyette a vegyületeket (sunitinib vagy shikonin) növekvő koncentrációban tartalmazó médiumot használtunk a dózis-hatás analízishez. A kezelések után a sejteket tovább inkubáltuk a vegyületekkel 72 órán keresztül 37°C -on, 5% CO_2 -t tartalmazó sejtinkubátorban. A sejtek életképességét 24 óránként mértük, a sejtekhez Cell-Titer Blue reagenst (Promega) adva, a plate-eket 2 órán át inkubáltuk 37°C -on sejtenyészítő inkubátorban. A fluoreszcencia intenzitást BioTek Plate Reader rendszer (BioTek, Winooski, VT, USA) segítségével mértük. Minden adat (sejtproliferációs aktivitás), amit az Y-tengelyen mutatunk be, az 560/590 nm-en mért fluoreszcens intenzitás eredménye.

IV.5. A sejtek kolóniaképző képességének a vizsgálata

A kolóniaképződési sejtproliferációs vizsgálat arra alkalmas, hogy megvizsgáljuk egy adott terápiás szer csökkentheti-e a daganatsejtek kolóniaképződési képességét. A vizsgálatot az A-498 és CAKI-2 sejteken végeztük el sunitinib és shikonin kezelés jelenlétében. A sejtszuspenziók előkészítése után a sejteket 6-lyukú plate-re mértük szét ($3-5 \times 10^3$ sejt/well), amit egy éjszakán át tartó inkubálás követett. Másnap a sejteket a shikonin (1-20 μM) vagy a sunitinib (2,5-40 μM) különböző koncentrációit tartalmazó oldataival kezeltük, mely koncentrációkat a sejtproliferációs eredmények alapján választottuk ki. A kontroll csoport sejtjeit 0,01% DMSO-t tartalmazó médiumban növesztettük. Ezt követően a sejteket 14 napig hagytuk növekedni, a kezeléshez alkalmazott szert tartalmazó IMDM médiumot minden harmadik napon frissre cseréltük. A 14 napos inkubációt követően a médium eltávolításával állítottuk le a kísérletet, a sejteket óvatosan mostuk foszfát-pufferes sóoldattal (Phosphate Buffer Saline: PBS), majd ezt egy metanol: ecetsav (3:1 arányú) oldattal történő fixálás követte. Az így fixált sejteket 0,1% -os kristályibolya oldattal festettük (Crystal Violet, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Minden 6 lyukú, kristályibolyával megfestett plate-ről fotót készítettünk, majd a megfestett kolóniákat vizuálisan megszámloltuk. A kolóniák spektrofotometriásan történő kvantifikálásához a sejteket 2%-os nátrium-dodecyl-szulfát (Sodium-Dodecyl-Sulfate: SDS)

oldatban reszuszpendáltuk, a reszuszpendált oldat abszorbanciáját a Biotek plate - reader rendszerrel (BioTek, Winooski, VT, USA) detektáltuk 96 lyukú plate-n.

IV.6. A kaszpáz-3 és -7 aktivitásának vizsgálata

A kaszpáz-3 és a kaszpáz-7 aktivitást a Caspase-Glo 3/7 teszttel (Promega, Madison, WI, USA) mértük, a gyártó által előírt utasításoknak megfelelően. A vizsgálathoz a CAKI-2 és az A-498 sejtek 10^4 /ml mennyiségnek megfelelő sejtszuspenzióit 96-lyukú plate-ekre mértük, majd a kezeléshez a shikonint növekvő koncentrációkban (2,5–10 μ M) alkalmaztuk. A kezelést 48 óra elteltével állítottuk le, majd friss médiumot mértünk a 96 lyukú plate minden egyes well-jébe. Ezután a sejteket 25 μ L Caspase-Glo® reagenssel (a reagenst a kit tartalmazza) lizáltuk, majd a plate-eket szobahőmérsékleten 30 percig rázattuk. A lizátumból 100 μ L-t áthelyeztünk egy 96-lyukú (fehér színű műanyag) plate-re, a lumineszcenciát BioTek plate-reader (BioTek, Winooski, VT, USA) segítségével 490 nm-en mértük.

IV.7. RNS izolálás és minőségének meghatározása

Az angiogenezis és miRNS vizsgálatainkkal kapcsolatos mérésekhez, valamint az in vitro vizsgálatainkhoz is teljes RNS-t izoláltunk. A vesetumoros szövettel végzett vizsgálatainkhoz az RNS izolálásához a Qiagen RNeasy Mini izoláló kitet (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) használtuk a gyártó protokollja szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát a NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg. Amennyiben az OD_{260/280} arány 1,8 feletti jó RNS tisztaságot jelzett, az RNS-t további génexpressziós vizsgálatokhoz használtuk. Az RNS integritásának vizsgálatát az Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével végeztük. Ebben az esetben a 260/230 nm-es optikai denzitásnál 2,0 vagy nagyobb értékű RNS mintákat megfelelőnek találtuk a cDNS elkészítéséhez alkalmazott RT-PCR reakcióhoz és további qRT-PCR-el történő génexpressziós elemzésekhez. A molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig az izolált RNS mintákat -80 °C-on tároltuk.

IV.8. Az RNS izolálása a CAKI-2 és A-498 sejtekkel végzett in vitro vizsgálatainkhoz

A humán vesedaganat sejtvonalakkal a shikonin kezelést követően több génexpressziós változás mérését is elvégeztük (NF- κ B, p53, CXCR4, MMP-2, MMP-9, E-kadherin, BCRP1,

ABCC6, ABCB1 és ABCB5). Ezen gének mRNS-szintű kifejeződésének elemzéséhez az A-498 és a CAKI-2 sejteket növekvő dózisu shikoninnal (2,5–10 µM) kezeltük 24, 48 és 72 óras inkubációs időtartamokon keresztül, majd a NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) felhasználásával totál RNS-t izoláltunk. Az RNS koncentrációjának és tisztaságának meghatározása, valamint tárolása az „Anyagok és módszerek” IV.7. alapján történt.

IV.9. Reverz-transzkripció PCR (RT-PCR)

Az egyes mintákból 250 ng RNS felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk a Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, London, UK) segítségével, a gyártó útmutatásai szerint. Az RT-PCR reakciót 20 µl térfogatban végeztük el véletlenszerű hexamerek használatával (1. Melléklet). A futtatás minden alkalommal 35 ciklusból állt (95 °C-on 15 másodpercig, 60 °C-on 30 másodpercig, 72 °C-on 10 másodpercig, és 72 °C-on két percig zajlottak a PCR lépései). A kontamináció tesztelésére a reakció RT-NTC-t is tartalmazott.

IV.10. A mikroRNS (miRNS)-ek expressziójának mérése specifikus stem-loop primerek segítségével

A miRNS-elemzések elvégzéséhez az A-498 és a CAKI-2 sejteket növekvő dózisu shikoninnal (2,5–10 µM) kezeltük 24, 48 és 72 óras inkubációs periódusok alatt, majd teljes RNS-t izoláltunk (Macherey-Nagel, Düren, Németország). Az intracelluláris miRNS-ek, a miR-21 és miR-155 expresszióját miRNS-specifikus Universal Probe Library (UPL) próba alapú stem-loop RT-qPCR módszerrel mértük [89, 90]. A primereket és a qPCR vizsgálatokat a Czimmerer és mtsai (2013) által kifejlesztett szoftver segítségével terveztük. A tanulmányban használt oligonukleotidok a 2. Mellékletben szerepelnek [90, 91]. A kvantifikációs módszer két lépésből állt:

- A miRNS-ek cDNS-re történő átírását miRNS-specifikus stem-loop-RT primereket (500 nM, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) alkalmazva reverz transzkripcióval végeztük el az erre alkalmas TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével a gyártó leírása alapján.

- A miRNS-ek kvantifikációját RT-qPCR-rel végeztük, melyhez miRNS-specifikus tervezett forward primert (100 nM, Integrated DNA Technologies), univerzális reverz primert (100 nM, Integrated DNA Technologies) és UPL próbákat (#21, #155: 10 nM, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) használtunk. A polimerizációt a Taq polimeráz (5 U/ μ L) és dNTP-k (2,5 mM), (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) tették lehetővé.

A kvantitatív real-time PCR reakciókat minden alkalommal három ismétléssel hajtottuk végre a QuantStudio 12 K Flex qPCR műszer (Applied Biosystems Waltham, Massachusetts, USA) segítségével. A reakció 10 μ L végtérfogatban játszódott le a következő protokoll alapján: 95 °C-on 1 perc előinkubálás, majd a PCR reakció 40 cikluson keresztül 95 °C-on 15 másodpercig és 60 °C-on 30 másodpercig tartott. A C_T értékek normalizálásához a RNU43 referencia RNS-t használtuk [89, 90].

IV.11. A miRNS-ek azonosítása TaqMan assay alapú valós-idejű kvantitatív PCR-el, statisztikai analízis

A szövetmintákban mért miRNS vizsgálatainkat TaqMan® assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) qRT-PCR segítségével végeztük. A vizsgált mikroRNS-ekhez tartozó komplementer DNS-t (cDNS) totál RNS-ből (5 ng) szintetizáltuk TaqMan® mikroRNS reverz transzkripció reagens (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) és specifikus reverz transzkripció primerek (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével, a valós idejű PCR-t pedig TaqMan® próbákkal hajtottuk végre a CFX-96 valós idejű PCR-készülékben (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) a következő paraméterek mellett: denaturáció 95°C-on 10 percig, majd a DNS polimerizáció 95°C-on 30 másodpercig tartott 40 ismétlődő ciklussal, az annealing lépések 60°C-on 1 percig zajlottak le. Minden assay-t 96 lyukú plate-en triplikátumokban vitezeltünk ki. Az alkalmazott hsa-miR-ekhez tartozó C_T értékeket az SDS szoftver (v3.1.) alapján kapott automatikus küszöbértékek (threshold baseline alapján) beállításával határoztuk meg. A miRNS-ek normalizálásához a veseszövetekben (ép és tumoros mintákban egyaránt) stabilan expresszálandó RNU6-ot használtuk, az adatokat az R statisztikai szoftver segítségével (v.2.14.0, Applied Biosystem, Foster City, Kalifornia, USA) dolgoztuk fel. A triplikátumból nyert C_T értékeket átlagoltuk és az RNU6 geometriai átlagához normalizáltuk, amelyet endogén kontrollként választottunk a geNorm27 és NormFinder (Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus N, Denmark) alapján.

A normalizált expressziós értékeket $\log_2(2^{-\Delta CT})$ formában számoltuk ki. A 36-nál nagyobb C_T értékeket a detektálási határ alattinak tekintettük.

IV.12. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

Az egyes angiogenezis markerek mRNS szinten történő génexpressziós vizsgálatához valós idejű qRT-PCR-t alkalmaztunk, melyhez az iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) elegyet használtuk. A reakciót egy CFX-96 Real-Time műszerrel (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) hajtottuk végre, 20 μ l végső térfogatot alkalmazva: 10 perc előmelegítéssel 95 °C-on, majd a PCR láncreakciók 45 ismétlődő ciklusban 95 °C-on 15 másodpercig és 60-65 °C-on 1 percig zajlottak. Az angiogenezis markerek azonosításához használt oligók szekvenciái a 3. Mellékletben található (ebben az esetben is minden reakciót három ismétléssel végeztünk el). Ezt követően a relatív mRNS expressziós értékeket a C_T értékek alapján határoztuk meg. A három C_T értékek átlaga a GAPDH C_p értékére lett normalizálva, amelyet endogén kontrollként választottunk. A normalizált mRNS expressziós értékeket a $\log_2(2^{-\Delta CT})$ formában számítottuk ki.

Az angiogenezis markerek vizsgálatához használt primerek szekvenciáit a 3. Melléklet foglalja össze. Az in vitro sejtes vizsgálatainkhoz alkalmazott primerek szekvenciái pedig a 4. Mellékletben található.

IV.13. In silico miRNS analízis target és útvonal meghatározáshoz

A tanulmányhoz kiválasztott hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p és hsa-miR-181a-5p esetében in silico vizsgálatot végeztünk, amely során az miRNS-specifikus célpontokat három adatbázis segítségével hasonlítottuk össze: miRDB, TargetScan és Tarbase. Ennek a folyamatnak a fő célja az angiogenezis jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó célfehérjék keresése volt. Az adatbázis-szűrés eredményei alapján azonosítottuk az miRNS-célfehérje kölcsönhatásokat, melyeket a célmolekulákhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalalba soroltunk.

IV.14. Az angiogenezis array kivitelezéséhez szükséges szöveti fehérje lizátumok elkészítése

A vizsgálatainkhoz használt 20 veseszövetminta párok közül 8-8 daganatos és egészséges mintából fehérjét izoláltunk lízis pufferek (Lysis buffer 6 és Lysis buffer 17)

segítségével extraháltuk, melyek a Proteome profiler Human Angiogenesis Array Kit (ARY007, Bio-Techne, McKinley, MN, USA) készletben található. A mintákat 4°C-on 30 percig inkubáltuk és rázattuk, majd 14 000 rpm fordulatszámmal 5 percig centrifugáltuk. A minták teljes fehérjetartalmát a Bradford-módszerrel határoztuk meg. Az izolálás és kvantifikálás során a fehérje degradáció elkerülése érdekében a mintákat jégen tartottuk, majd -80 °C-on tároltuk a további vizsgálatokig. Az array alkalmazásakor a Human Angiogenesis Array készletében található membránokhoz 300 µg fehérje extraktumot használtunk. A fehérjéket a Detection Antibody Cocktail oldattal (a kitben mellékelve) kevertük össze, majd szobahőmérsékleten egy órán át inkubáltuk. A minta/antitest keveréket az array membránokra helyeztük, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Másnap az összes membránt háromszor mostuk 1x mosó pufferrel (Wash Buffer, a kitben mellékelve), majd Streptavidin-HRP-vel szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk egy keverővel ellátott asztali rázókészüléken (Biosan Rocker-Shaker MR-1, Biosan, Riga, Lettország). Az inkubálás után az array-eket egymást követően háromszor mostuk mosó pufferrel, és a fehérje pontokat az array-hez mellékelt kemilumineszcens reagens segítségével azonosítottuk. A jel detektálásához a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készüléket használtuk. Az egyes duplikáltan megjelenő array foltok intenzitási értékének meghatározását az Image Lab szoftver (5.2.1. verzió, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tette lehetővé az átlagolt intenzitás értékek alapján az átlagolt háttérjelet is figyelembe véve. Az egyes fehérje expresszióban változást mutató értéket a daganatos szövetminták és az ép minták összehasonlításával kaptuk meg. Az összes antitest azonosítása és koordinátái az array- készletben mellékelt útmutatóban találhatóak.

IV.15. Fehérjék detektálása Western blot technikával

A shikoninnal végzett kezelések során célunk volt az egyes, általunk tanulmányozott jelátviteli útvonalak célpont fehérjéinek azonosítása, amelyet Western blot analízis segítségével végeztünk el. Az A-498 és a CAKI-2 vesedaganat sejt vonalakat 5 µM shikoninnal kezeltük 24, 48 és 72 órán keresztül. A kezelés után a sejteket PBS-sel mostuk és fehérje lízis pufferben (M-PER, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) lizáltuk, amely proteáz- és foszfatáz-inhibitorokat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazott. A sejt lizátum fehérje mennyiségét Bicinkoninsav (Bicinchoninic acid: BCA) reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. A mintákat 4× Laemmli pufferrel hígítottuk és 95 °C-on 8 percig forraltuk. Minden alkalommal azonos mennyiségű fehérjéket (40 µg) vittünk fel 10%- vagy 14%-os nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid géltre, és elektroforézissel (SDS-PAGE)

futtattuk. A fehérje lizátumokat molekulatömegüknek megfelelően választottuk szét a Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard marker (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) alapján. A gélekről a fehérjéket egy polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra (Millipore, Burlington, MA, USA) transzferáltuk, majd a blottokat az 5. Mellékletben felsorolt specifikus antitestek megfelelő hígításaival jelöltük. Az elsődleges antitestekkel való inkubációt torma-peroxidáz (HRP)-jelölt anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG másodlagos antitestekkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) történő inkubálás követte. A jelet kemilumineszcens technikával detektáltuk. A vizsgált minták többségénél a sávinzenzításokat β -aktin vagy hipoxantin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) háztartási fehérjékre normalizáltuk. A pERK esetén a teljes ERK (Cell Signalling, Danvers, MA, USA) jöhetett szóba, mint normalizáláshoz használható háztartási fehérje.

IV.16. Statisztikai analízis

Minden, sejtekkel kapcsolatos in vitro kísérletet legalább háromszor végeztünk el. Az átlagértékek kiszámítása és generálása, a hozzájuk tartozó szórás, valamint a normalizálás Microsoft Excel (Office Professional Plus 2016, Microsoft, Redmond, WA, USA) segítségével történt. A statisztikai szignifikanciát kéttényezős varianciaanalízissel (two-way ANOVA) számítottuk ki a GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) szoftvert alkalmazva.

A TaqMan miRNA assay (Life Technology, Carlsbad, CA, USA) segítségével kvantifikáltuk a hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-181a-5p expressziós szintjeit. A statisztikai elemzéshez kéttényezős varianciaanalízist (two-way ANOVA) használtunk, melyet a Sidak többszörös összehasonlító teszttel végeztünk el a GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) szoftvert használva.

A vesetumoros szövetekben vizsgált egyes miRNS expressziók és a betegek patológiai fokozata közötti kapcsolatot háromféleképpen vizsgáltuk, azaz kiugró értékek (outlier-ek) azonosításával és anélkül (az utóbbi esetben a ROUT módszerrel, két különböző „outlier” szinttel, $Q = 1\%$ és $Q = 5\%$ történt). Minden adatcsoport esetében a változók (miRNS-expresszió és patológiai grádus) közötti korrelációs együtthatót (r) a Spearman (nem paraméteres) módszerével számítottuk ki. A korreláció pontosságát a korrelációs együttható 95%-os konfidencia intervallumával jellemeztük. Amennyiben a korreláció statisztikailag szignifikánsnak bizonyult, lineáris regressziót alkalmaztunk, és annak pontosságát a legjobban illeszkedő egyenes körüli 95%-os konfidenciasávokkal vizualizáltuk. A 0,05 alatti p értéket

statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. A szignifikancia értékek az alábbiak szerint lettek csoportosítva:

- $p > 0,05$: a különbség nem szignifikáns
- $p < 0,05 - 0,002$: egy csillaggal ellátott szignifikancia (*)
- $p < 0,0021 - 0,00019$: két csillaggal ellátott szignifikancia (**)
- $p < 0,0002 - 0,00011$: három csillaggal ellátott szignifikancia (***)
- $p < 0,0001$: négy csillaggal ellátott szignifikancia (****)

V. Eredmények

V.1. A betegek klinikopatológiai jellemzői

Minden, a tanulmányunkban használt szövetminta (N=20) hisztopatológiai vizsgálatnak lett alávetve annak érdekében, hogy a vesetumorok szövettani klasszifikációja, a patológiai grádusonként történő elkülönítése, valamint a minták TNM szerinti besorolása megtörténjen. A patológus által készített leírások, jelentések alapján a tanulmányban használt minták szövettani szempontból az alábbiak szerint voltak osztályozhatók: 16 esetben (78%) ccRCC, 2 esetben (10%) pRCC, és 2 esetben (10%) pedig a chRCC szövettani típusok lettek azonosítva. A hisztológiai típuson belül minden szövetminta a Fuhrman-fokozatok szerint lett elemezve: a minták 62,5%-át (13 minta) 2-es patológiai grádussal (alacsony fokozatú) osztályozták, 20%-át (4 minta) 1-es grádussal (alacsony fokozatú), valamint a minták 15%-a (3 minta) 3-as grádust (magas fokozatú) mutatott. A vizsgált veseszövetminták közül 8 minta (40%) férfi betegektől, 12 minta (60%) pedig női betegektől származott (2. Táblázat).

A daganatok a Nemzetközi Rákellenes Unió (Union for International Cancer Control: UICC) által készített TNM stádiumbeosztási rendszerével lettek osztályozva, a szövettani típusok a WHO kritériumai szerint lettek meghatározva [92]. A tumorsejtek helyi invázióját T stádium alapján értékeltük, a nyirokcsomó állapotot pozitívként vagy negatívként rögzítettük. A rövid vizsgálati időszak miatt a betegek után-követésére nem volt lehetőség. A minták sebészeti eltávolítását vagy kimetszését követően, szállításig azonnal folyékony nitrogénbe kerültek, majd $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk őket a további molekuláris biológiai feldolgozásig. A betegek klinikopatológiai adatai a 2. Táblázatban láthatók.

2. Táblázat: A tanulmányban szereplő RCC betegek klinikopatológiai adatai

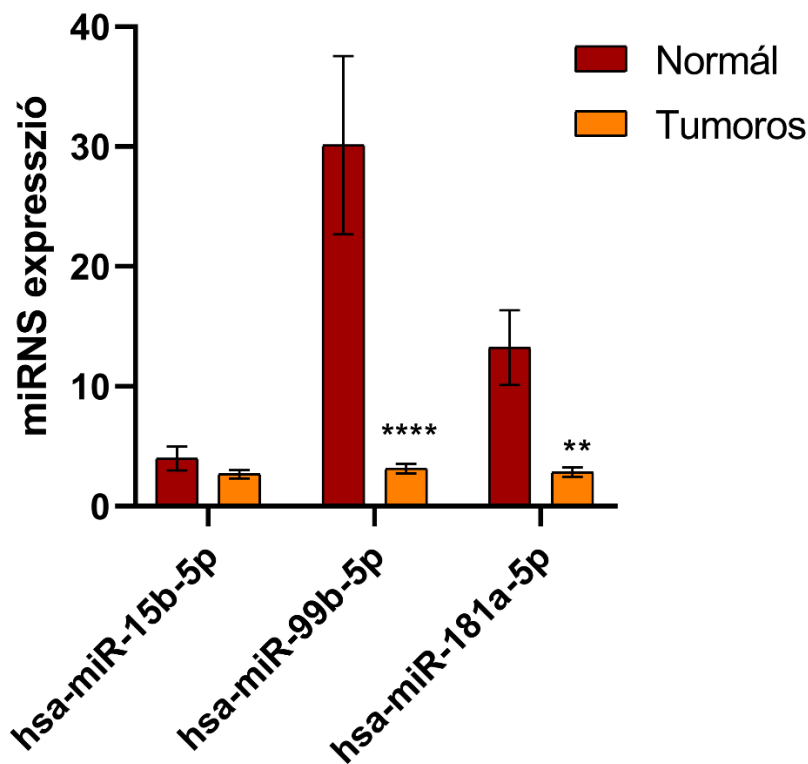
Mintaszám	Nem	Kor	Szövettan	Grádus	TNM	Műtét típusa
1.	nő	65	ccRCC	1	pT1b	Laparoszkópos Radikális Nefrektómia
*2.	férfi	56	ccRCC	1	pT1b	Nyitott Radikális Nefrektómia
*3.	férfi	73	ccRCC	2	pT1a	Laparoszkópos Veserezekció
4.	nő	59	ccRCC	2	pT1a	Laparoszkópos Veserezekció
5.	nő	76	ccRCC	2	pT1a	Laparoszkópos Radikális Nefrektómia
6.	férfi	66	pRCC	2	pT1a pNx	Laparoszkópos Veserezekció
7.	nő	62	ccRCC	2	pT1a	Laparoszkópos Radikális Nefrektómia

*8.	férfi	53	pRCC	2	pT1a pNx	Laparoszkópos Veserezekció
*9.	nő	74	ccRCC	2	pT1a	Nyitott Radikális Nefrektómia
10.	férfi	46	chRCC	2	pT1b	Laparoszkópos Nefrektómia
*11.	nő	64	ccRCC	1	pT3a	Laparoszkópos Radikális Nefrektómia
*12.	férfi	78	ccRCC	3	pT1b	Laparoszkópos Nefrektómia
13.	nő	65	ccRCC	2	pT1a	Laparoszkópos Veserezekció
14.	nő	65	ccRCC	1	pT1b	Nyitott Radikális Nefrektómia
*15.	nő	48	ccRCC	3	pT3a pN1	Laparoszkópos Radikális Nefrektómia
16.	nő	68	ccRCC	2	pT1a	Laparoszkópos Veserezekció
17.	nő	71	ccRCC	3	pT1b	Laparoszkópos Nefrektómia
*18.	férfi	51	ccRCC	2	pT1a	Nyitott Radikális Nefrektómia
19.	férfi	53	ccRCC	2	pT1b	Laparoszkópos Radikális Nefrektómia
20.	férfi	64	chRCC	2	pT1b	Nyitott Veserezekció

ccRCC: clear cell Renal Cell Carcinoma – világossejtes vesesejtes karcinóma; **pRCC:** papillary Renal Cell Carcinoma – papilláris vesesejtes karcinóma; **chRCC:** chromophobe Renal Cell Carcinoma – kromofób vesesejtes karcinóma; **T1a:** a tumor a szervben belül helyezkedik el, mérete < 4 cm; **pT1b:** a tumor a szervben belül helyezkedik el, mérete: 4-7 cm; **pT3a:** a tumor eléri a vesegyűjtő ér ágait, áthatol a vesemedencébe, a perirenális és/vagy veseszínusz területére, de nem haladja meg Gerota-fasciát; **ccRCC:** világossejtes vesesejtes karcinóma; **pRCC:** papilláris típusú vesesejtes karcinóma; **N0/M0:** negatív nyirokcsomó státusz és nincsenek áttétek; **Nx/Mx:** ismeretlen nyirokcsomó státusz; **pN1:** mikrometasztázisok vagy áttétek az 1-3 axilláris nyirokcsomóban; *: az angiogenezis array-hez használt minták.

V.2. Az angiogenezishez kapcsolódó miRNS-ek expressziója

Annak feltárására, hogy a miRNS-ek hogyan változnak a vesetumor progressziója során, a hsa-miR-15b-3p, a hsa-miR-99b-5p és a miR-181a-5p expresszióját a tumoros és ép veseszövet mintákban a TaqMan RT-qPCR segítségével analizáltuk. Ahogyan a 10. Ábrán is látható, a vizsgált három miRNS mindegyike jelentősen alacsonyabb expressziót mutatott a daganatos mintákban a szomszédos ép szövetekhez képest ($p \leq 0,05$). A legjelentősebb különbség az ép és a tumoros minták esetében a hsa-miR-99b-5p ($p < 0,0001$) és a hsa-miR-180a-5p ($p = 0,0090$) expressziójában volt megfigyelhető (10. Ábra).

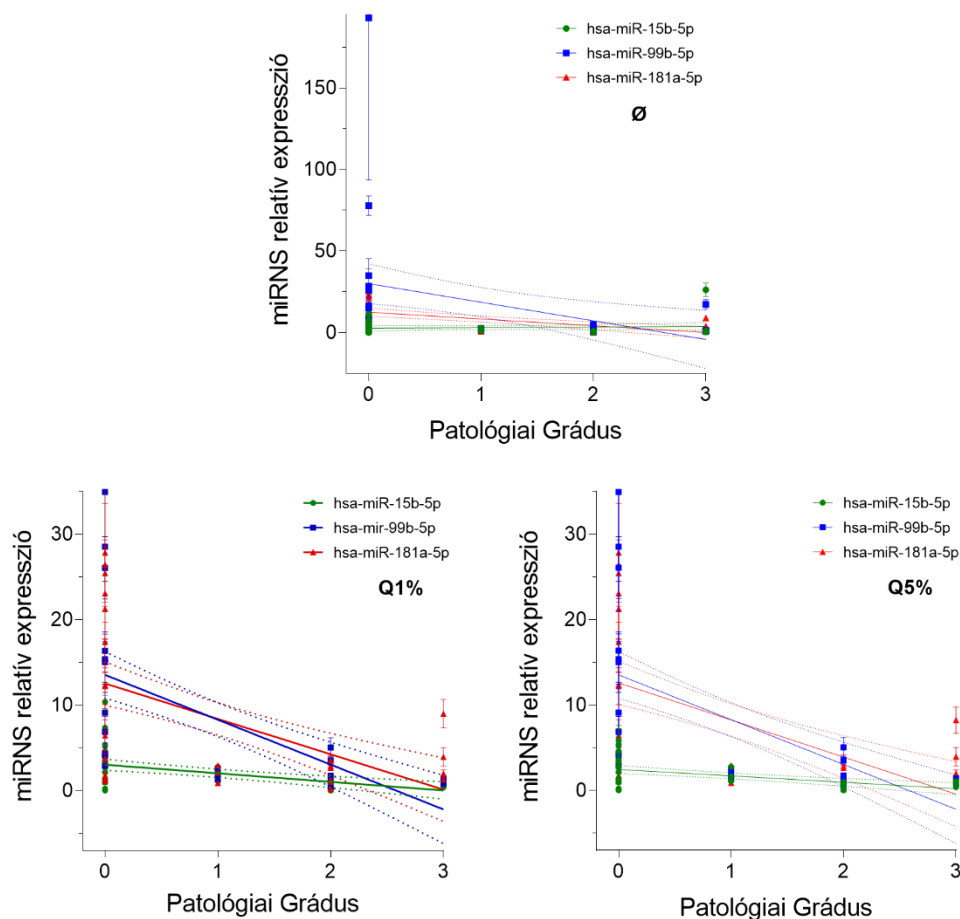


10. Ábra: A miRNS-ek expressziójának elemzése a daganatos és párosított egészséges (normál) vesetumoros szövetmintákban TaqMan assay segítségével (N=20 minta átlaga). Endogén kontroll miRNS-ként az RNU6-ot használtuk a cél- miRNS-ek normalizálásához. A statisztikai elemzéshez kéttényezős varianciaanalízist (two-way ANOVA) és a Sidak többszörös összehasonlító tesztet alkalmaztuk (** $p = 0,0090$, **** $p < 0,0001$).

V.3. A vizsgált miRNS-ek és a patológiai grádusok közötti összefüggés

A vizsgált miRNS-ek expresszióját a tumoros és az ép mintapárokban a betegek patológiai státusza szerint elemeztük. Mindhárom vizsgált miRNS esetében az általunk vizsgált mintacsoportban statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk a miRNS-ek relatív expressziója és a patológiai grádusok között. A korreláció és a statisztikai szignifikancia akkor mutatkozott a legszignifikánsabbnak és legpontosabbnak, amikor az „outlier” azonosításához a „Q” -t 1%-os (közepes „agresszivitás”) érékkel választottuk (3. Táblázat). A lineáris regresszióval nyert eredmények megegyeztek a korrelációs elemzés eredményeivel (11. Ábra). A Spearman korreláció szerint a vizsgált miRNS-ekhez tartozó, a statisztikai szignifikanciát jelölő p értékek a következők voltak: a hsa-miR-15a-5p esetében $p=0,033$, a hsa-miR-99b-5p esetében $p < 0,0001$, a hsa-miR-181a-5p esetében pedig $p = 0,0133$ (11. Ábra).

A vizsgált miRNS-ek expressziója mindhárom patológiai grádusban szignifikánsan alacsonyabb volt az ép kontroll párjához képest, a legjelentősebb különbséget ($p \leq 0,05$) a 2-es és 3-as patológiai grádusokkal azonosított minták esetében figyeltük meg. Megközelítőleg legalább háromszoros csökkenés volt megfigyelhető a vizsgált miRNS-ek expressziójában a daganatos mintákban a szomszédos ép szövetekhez képest a 3-as patológiai grádussal azonosított minták esetében. Az 1-es és 2-es patológiai grádussal azonosított mintáknál a hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-15b-5p expressziója harmadára csökkent a tumoros mintákban az ép mintákhoz képest. A patológiai grádusokat tekintve, a hsa-miR-99b-5p ($p < 0,0001$) és a hsa-miR-181a-5p ($p = 0,0090$) szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott a tumoros mintákban, mint az ép mintapárokban (11. Ábra, 3. Táblázat).



11. Ábra: A vizsgált mikro-RNS-ek (hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-181a-5p) relatív expressziója a szövetek patológiai grádusához viszonyítva, nem azonosított „outlierek” (\emptyset), 1%-kal azonosított „outlierek” (Q1%), 5%-kal azonosított outlierek (Q5%) esetében. Az ábrán a három technikai ismétlés átlaga (\pm SEM) látható (az azonosított „outliereket” is figyelembe véve).

3. Táblázat: A Spearman korrelációs analízis eredménye

	has-miR-15b-5p	has-miR-99b-5p	has-miR-181a-5p
outlier		Ø	
r	-0.397	-0.677	-0.479
95% CI	-0.686 to 0.001	-0.847 to -0.382	-0.736 to -0.1
p	0.0449	0.0001	0.0133
outlier		Q1%	
r	-0.565	-0.794	-0.479
95% CI	-0.789 to -0.206	-0.911 to -0.558	-0.736 to -0.1
p	0.0033	<0.0001	0.0133
outlier		Q5%	
r	-0.544	-0.794	-0.479
95% CI	-0.782 to -0.168	-0.911 to -0.558	-0.736 to -0.1
p	0.006	<0.0001	0.0133

A Spearman korrelációs analízis eredményei a három vizsgált miRNS (miR-15b, miR-99b, miR-181a) relatív expressziója és a minták patológiai grádusa (0-tól 3-ig) közötti összefüggés; r: a korrelációs együttható; CI: a konfidencia intervallum; Q: az „outlier” szintje a kiugró értékek azonosítására (hamis kiugró értékek azonosításának megengedett maximális esélye); p: a statisztikai szignifikancia szintje.

V.4. A vizsgált miRNS-ek és nyirokcsomók közötti korreláció

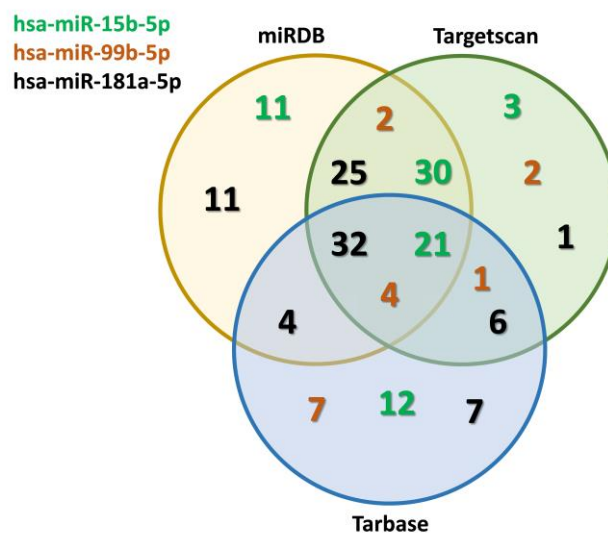
A betegek többsége negatív nyirokcsomó-státusszal rendelkezett, a diagnosztika során áttét nem volt észlelhető. A későbbiekben csupán egy betegnél írtak le regionális nyirokcsomó áttétet (2. Táblázat), ebből kifolyólag nem figyeltünk meg korrelációt a hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p és hsa-miR-181a-5p kifejeződése és a nyirokcsomó státusz között.

V.5. In silico miRNS target adatbázis elemzés

Három különböző miRNS adatbázis in silico elemzését végeztük el az angiogenezis-specifikus célpontok keresése érdekében, beleértve a miRDB (<https://mirdb.org/> - 2023. november 2.), a Tarbase (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/tarbasev9/interactions> - 2023. november 7.), valamint a TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/ - 2023. november. 9.) adatbázisokat.

Ezeknek az adatbázisoknak a segítségével a hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p és hsa-miR-181a-5p potenciális célpontjait azonosítottuk. A mindhárom adatbázisban megtalálható célpontokat a 4. Táblázat szemlélteti. A Venn-diagram (12. Ábra) a három fent említett adatbázisban talált miRNS-ek leggyakoribb angiogenezis útvonalhoz kapcsolódó célpontjait mutatja. A találatok számszerű ábrázolásával az adatbázisok közötti átfedések számos olyan

célpontot fednek le, amelyek szerepet játszhatnak az angiogenezis folyamatában. Ilyen célmolekulának bizonyult a fibroblaszt növekedési faktor-1 (FGF-1), a Vaszkuláris-endotheliális növekedési faktor-A (VEGF-A), a Serpin peptidáz inhibitor-A1 (SERPIN-A1), a különböző Mátrix metalloproteinázok (MMP-ok), a Hypoxia-indukálható faktor 1-alfa (HIF-1 α), valamint a metalloproteinázok szöveti inhibitorai (TIMP-ek). A beazonosított célmolekulák teljes listája a 6. Mellékletben található. A két vagy mindhárom adatbázisban közös célpontok a 12. Ábrán található számok jelölik. Az adatbázis-elemzések szerint a hsa-miR-181a-5p esetében 32 közös célmolekulát találtunk, beleértve a VEGF-et, a TIMP-eket és az MMP-eket. Hasonlóan, a hsa-miR-15b-5p esetében a keresésünk 21 validált célmolekulát azonosított, közöttük relevánsnak találtuk a VEGF-et, FGF-1-et és FGFR-1-et. Emellett a hsa-miR-99b-5p esetében a VEGF és a TIMP-ek közösen validált célpontként kerültek azonosításra (12. Ábra). Ezek az adatbázis elemzések arra utalnak, hogy mindhárom vizsgált miRNS epigenetikai tényezőként részt vehet a veserák angiogenezisének patológiai folyamatában [17].



12. Ábra. TaqMan RT-qPCR validált miRNS-ek és az angiogenezis lehetséges célpontjai. Három különböző adatbázisban végzett elemzés során az egyes miRNS-ek potenciális célpontjai kerültek azonosításra. A Venn-diagramban láthatók a vizsgált miRNS-eknek az egyes adatbázisokban talált targetjei, valamint a három adatbázisban közös targetek számszerű ábrázolása. A mindhárom adatbázisban megtalálható targetek a 4. Táblázatban találhatóak.

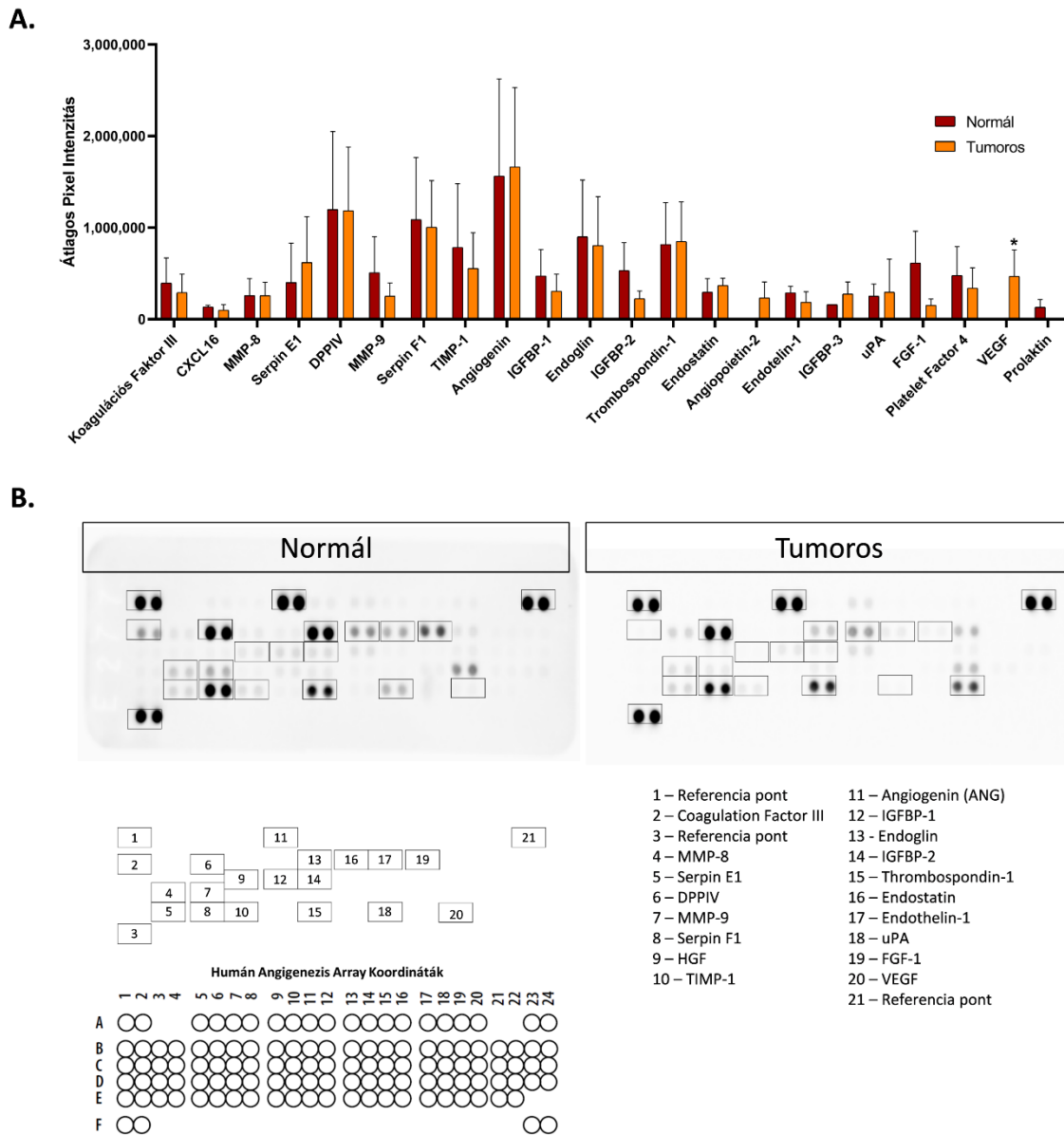
4. Táblázat: Az adatbázis elemzés során mindhárom adatbázisban az egyes miRNS-ek azonosított specifikus célpontjai

Adatbázis miRNS	miRDB, TargetScan, Tarbase közös targetek
hsa-miR-15b-5p	FGF2, RECK, SPRED1, AKT3, PTPN3, HIPK2, VEGFA, MYBL1, PLXNA4, SOCS6, AMOTL1, AMOT, FGF9, RORA, E2F7, LATS2, UNC5B, GLCE, RNF213, FGFR1, ACVR2A,
hsa-miR-99b-5p	MBNL1, AGO2, VEGFA, TIMP2
hsa-miR-181a-5p	S1PR1, PROX1, ACVR2B, ATP2B1, UBP1, AKT3, IL1A, KLF6, HSP90B1, ETS1, B4GALT1, MYBL1, KDM5A, RORA, RECK, E2F7, PIK3R3, MAP3K2, MBNL1, ITGB8, SERPINE1, SRPK2, TIMP3, HIPK1, MMP14, PTEN, FLT1, PDPK1, SIRT1, SPAG9, EGR3, PIK3C2A,

V.6. Az angiogenesis array-el kapott eredmények értékelése

Az angiogenesis folyamatában számos olyan molekuláris markert azonosítottak, amelyek szerepet játszanak a vesetumorok kialakulásában. Munkánk célja volt, hogy feltárjuk a fő angiogenesis faktorok és az ezekhez kapcsolódó miRNS-ek közötti kapcsolatot. Az angiogenesis folyamatát érintő legfontosabb markerek szűrésére „proteome profil” analízist alkalmaztunk. A szűrést párhuzamosan néhány ép és tumoros szövetmintapáron (8-8 minta) végeztük el az összehasonlítás érdekében a Human Angiogenesis Array (ARY007, Bio-Techne, McKinley, MN, USA) segítségével, mely fehérje profil elrendezése a korai angiogenesis jelátviteli események tanulmányozására ad lehetőséget.

A kemilumineszcens detektálást követően az egyes pontok intenzitása mutatta az array-en elhelyezett specifikus, immobilizált antitestekhez kötődött fehérjék mennyiségét. Az általunk vizsgált 8-8 egészséges és daganatos vese szövetmintához kapott „fehérje pontok” intenzitását a Chemidoc Image Analyser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével elemeztük ki és kvantifikáltuk. Az oszlopdiagrammon az összes vizsgált 8-8 párosított tumoros és ép vese szövetminták kombinált eredményei láthatók (17./A Ábra). Egy ép/ tumoros mintapárhoz tartozó reprezentatív elemzést a 17./B Ábra mutatja be. Az összes, általunk vizsgált 8-8 ép/tumoros mintához tartozó membránokon detektált eredményt pedig a 7. Melléklet foglalja össze.



13. Ábra. Fehérje expresszió analízis ép (normál) és tumoros humán veseszöveteken a Humán Angiogenesis Array Kit segítségével. Az array „fehérje pontjait” a gyártó által mellékelte felhasználási útmutatót követve vizualizáltuk. Az adatok a 8 normál és 8 tumoros minta átlagos intenzitását mutatják (A), valamint a fehérjék helyzetét egy reprezentatív membránon a tumoros és a szomszédos ép (normál) szövetminták esetében (B).

Az angiogenesis array-ek alapján kapott eredmények szerint az egyes angiogén fehérjék, mint például az ANG expressziója emelkedést mutatott a tumoros mintákban, míg az MMP-9 expressziója enyhe csökkenést jelzett. A tumoros szövetekben a TIMP-1 expressziója szintén enyhe csökkenést mutatott az egészséges mintákhoz képest. A fehérje array-k elemzése alapján az egyik legjellemzőbb angiogén marker, a VEGF nagyon alacsony expressziós szintet

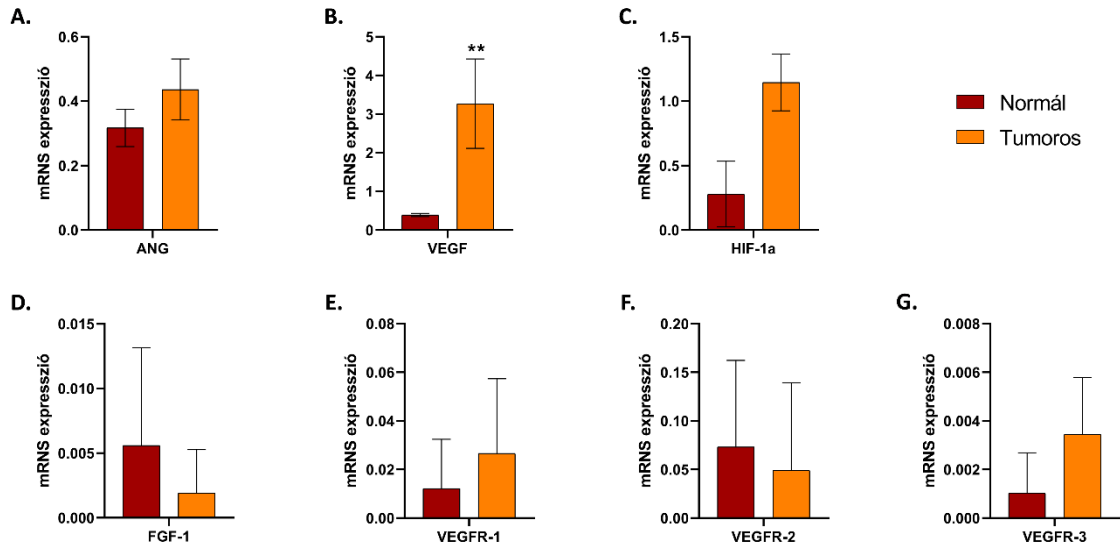
mutatott (szinte nem is volt észlelhető az expressziója) az egészséges szövetekben, ugyanakkor a tumoros mintákban a VEGF jelentős expresszióját figyeltünk meg ($p = 0,0402$).

V.7. Valós idejű qRT-PCR –rel kapott eredmények

Annak megbizonyosodására, hogy a Humán Angiogenezis array-el megfigyelt változások upstream vagy downstream szabályozásból erednek-e, valamint, hogy mintánként megerősítsük a specifikus génexpressziót mRNA szinten, szekvencia-specifikus primer alapú qRT-PCR analízist végeztünk. Mind a 20 párosított egészséges és tumoros veseszövetminták génexpressziós elemzését elvégeztük a következő génekre: VEGF-A, FGF-1, ANG, MMP-9, TIMP-1. Vizsgáltuk a HIF-1 α , MMP-2, TIMP-2 expresszióját is valós idejű qRT-PCR segítségével. Az fizioiógias és patológiás angiogenezis folyamatok állapotjelzői a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor-1 (VEGFR-1) és a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor-2 (VEGFR-2), mint alap angiogenezis markerek, szintén mérésre kerültek.

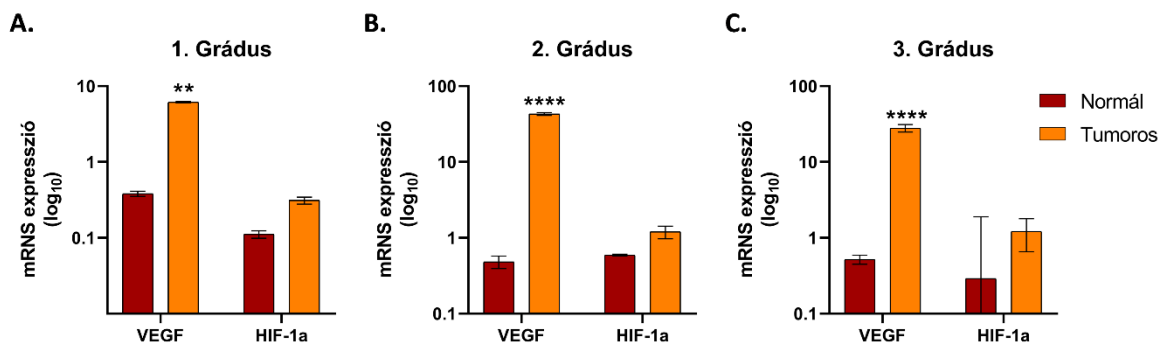
Az ANG, a VEGF és a HIF-1 α expressziója szignifikánsan emelkedett ($p \leq 0,05$) a tumoros mintákban, és szignifikánsan csökkent ($p \leq 0,05$) az ép szöveti mintapárokban (14-15. Ábra). A qRT-PCR és az angiogenezis array eredményeiben tapasztalt kis eltérés az angiogenezis markerek szűrése során valószínűleg a szűréshez használt alacsony mintaszámból adódhat.

Az FGF-1 és a VEGFR receptorok expressziója szintén vizsgálatra került, mivel mindkét receptor részt vesz az RCC angiogenezisében. A valós idejű PCR elemzések megerősítették a Humán Angiogenezis Array eredményeit, az FGF-1 downregulációja volt megfigyelhető a tumoros szövetekben, valamint a VEGFR-1, -2 és -3 receptorok kifejeződése úgy a tumoros, mint a szomszédos ép szövetekben is a vizsgált RCC esetekben (14. Ábra).



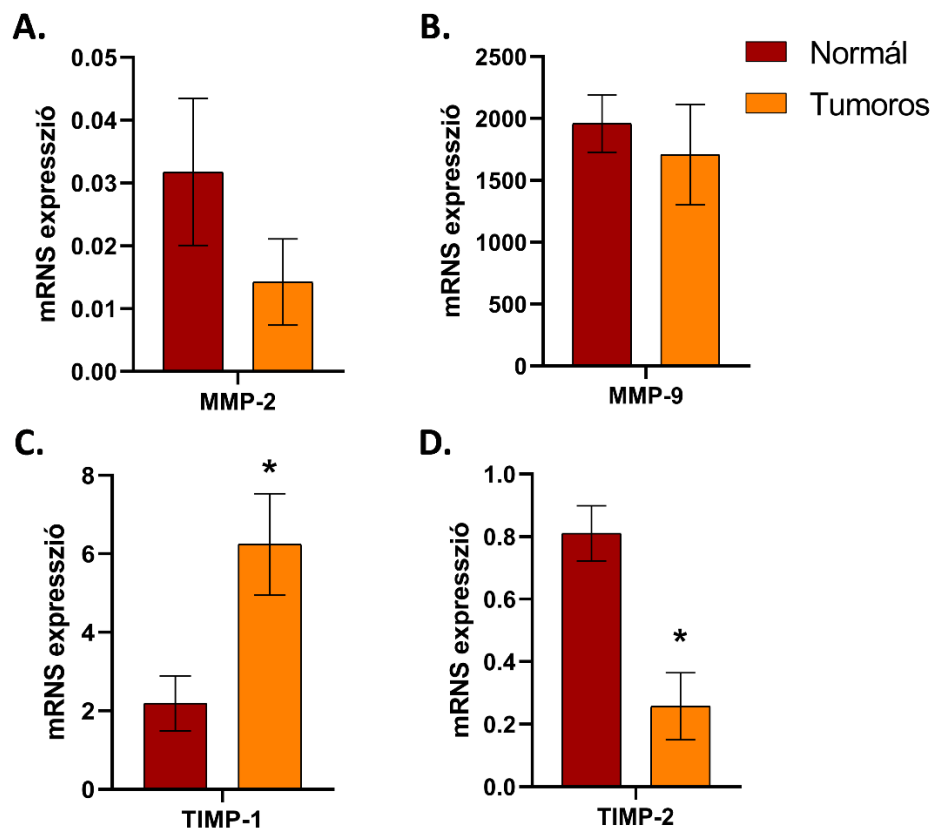
14. Ábra. Az angiogenezis folyamatában szereplő gének expressziójának vizsgálata az ép (normál) és tumoros veseszövetekben: ANG (A), VEGF (B), HIF-1 α (C) és FGF-1/VEGFR-1-2-3 (D-G) expressziójának elemzés a vizsgált mintákban ($p = 0,0011$ **).

Továbbá, az eredményeket a minták patológiai grádusának fényében vizsgálva, az RCC minták magasabb HIF-1 α expressziót mutattak, mint az alacsonyabb patológiai grádussal jellemzett ép minták. Intenzív VEGF expressziót figyeltünk meg az alacsony grádusú (1-es és 2-es grádus) RCC minták esetében, valamint a magasabb fokozatú (3-as grádus) RCC mintákban is (1-es grádus: $p = 0,0014$, a 2-es grádus és a 3-as grádus: $p < 0,0001$) (15. Ábra).



15. Ábra. A VEGF és a HIF-1 α expressziója a vizsgált tumoros és a szomszédos ép szövetekben patológiai grádus szerint ábrázolva. A statisztikai elemzéshez kéttényezős varianciaanalízist (two-way ANOVA) és a Sidak-féle többszörös összehasonlítást végző tesztet alkalmaztuk (1-es grádus: $p = 0,0014$, a 2-es grádus és a 3-as grádus: $p < 0,0001$).

Az MMP-k és TIMP-ek expresszióját illetően a kvantitatív RT-PCR eredmények többnyire összhangban voltak a Human Angiogenesis Array eredményeivel. A génexpresszió elemzések szerint az MMP-9 expressziójában enyhe csökkenés mutatkozott, valamint növekedés volt megfigyelhető az kapcsolódó TIMP-1 esetében a tumoros mintákban a szomszédos ép szövetekhez képest, ami összefügghet ezen fehérjék expressziójának az emelkedésével (16. Ábra). Továbbá, ebben a tanulmányban vizsgáltuk az MMP-2 és TIMP-2 expresszióját, miszerint mindkét gén alacsonyabb expressziót mutatott a tumoros szövetekben, mint a szomszédos ép veseszövet mintákban (16. Ábra). Az MMP-2 (20./A Ábra) és az MMP-9 (20./B Ábra) nem mutatott szignifikáns különbségeket ($p > 0,9999$), azonban a TIMP-1 (* $p = 0,0328$) és a TIMP-2 (* $p = 0,0371$) expressziójában szignifikáns eltérés mutatkozott (20./ C-D Ábra).



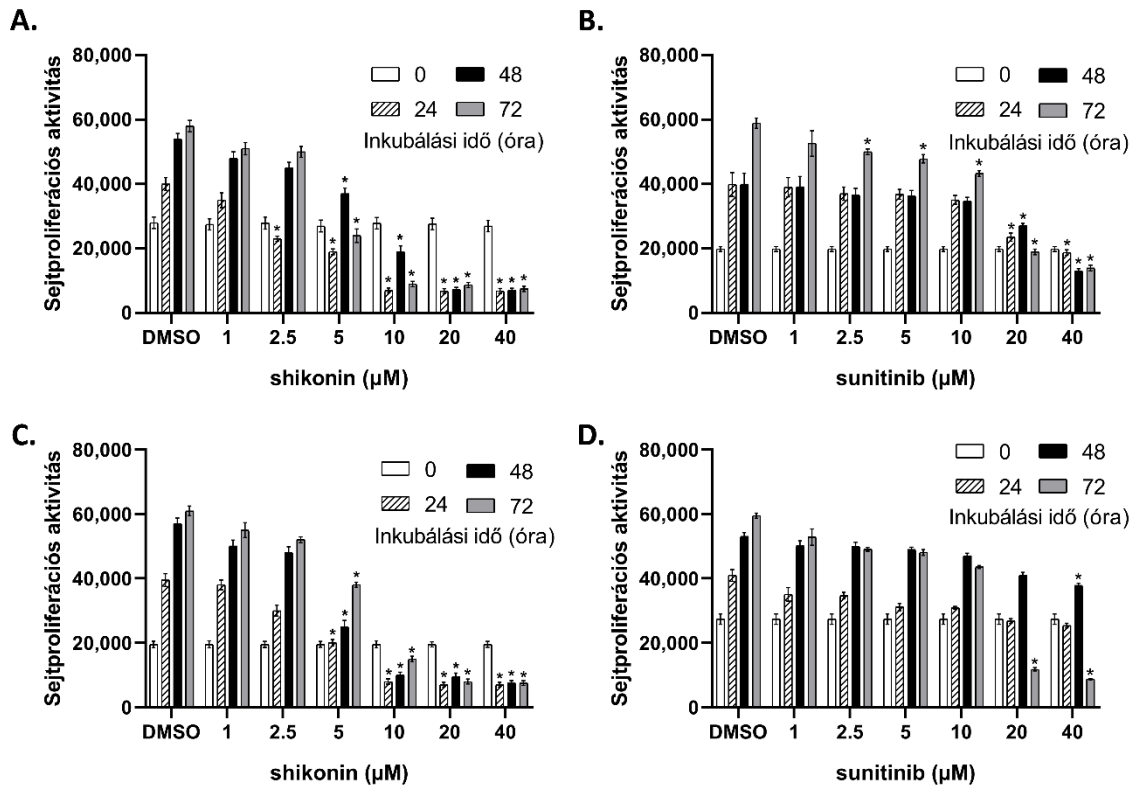
16. Ábra. Az MMP és TIMP expresszió elemzése humán ép és tumoros veseszövetekben.

Ezen tanulmány célja volt az angiogenesis célpontok tanulmányozása, illetve ezen célpontok változásának, jelátviteli útvonalakhoz történő kapcsolatainak feltárása a terápiás alkalmazásként szóba jöhető vegyületek, mint akár a hagyományos terápiás szerként használt sunitinib, vagy az egyéb alternatív megoldásként említhető shikonin esetén.

A következőkben részletesen ismertetem a humán vesetumoros sejteken a sunitinibbel és shikonin-nal végzett in vitro vizsgálatok eredményeit.

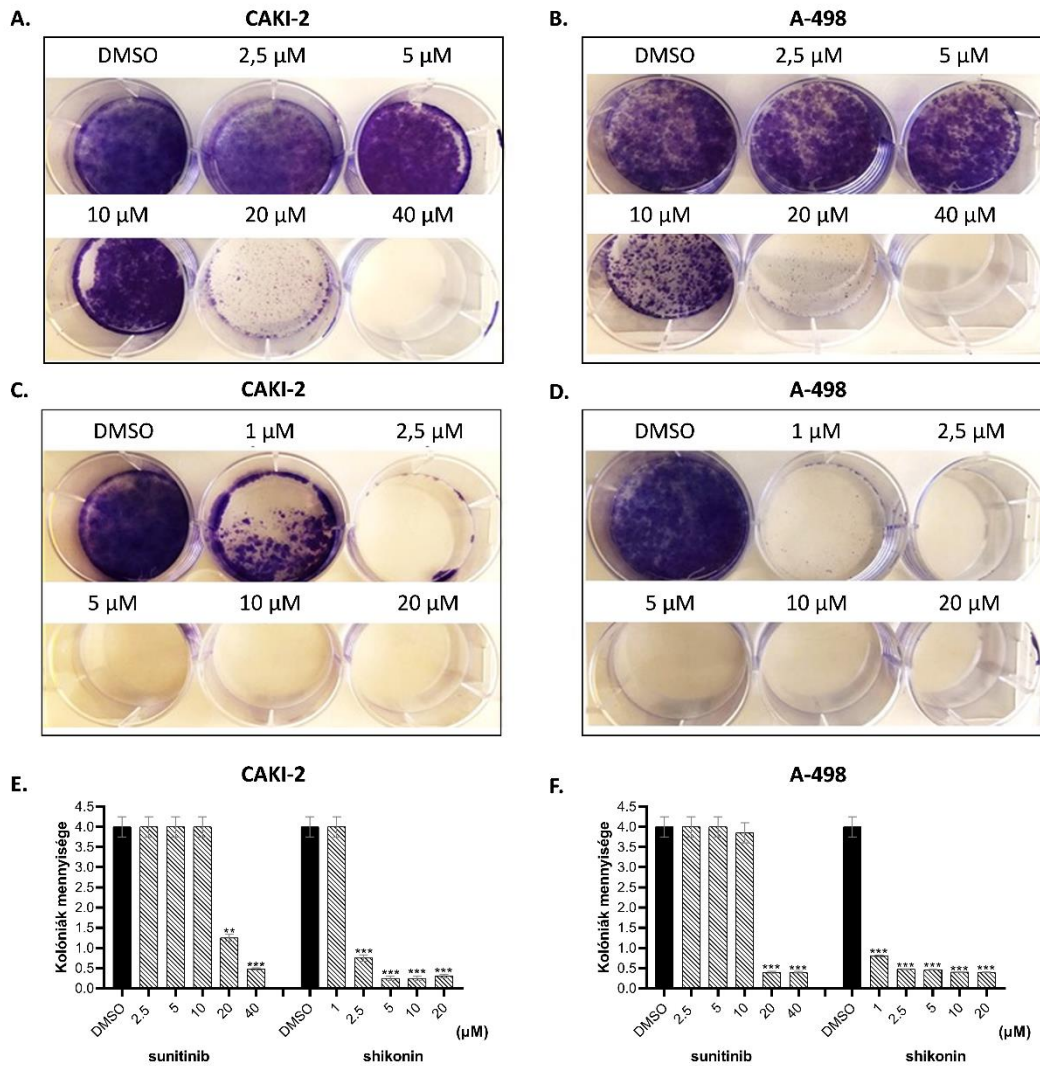
V.8. A shikonin dózis- és időfüggő módon gátolja a sejtek proliferációját

A tanulmányban két különböző, világossejtes vesedaganat sejtvonalat, az A-498 és a CAKI-2 sejteket használtuk a shikonin sejtproliferáció gátló hatásának vizsgálatához. A shikonin hatásos dózisének meghatározása az „Anyagok és módszerek” IV.4. fejezete alapján történt. A 17. Ábrán látható, hogy a shikonin antiproliferatív hatást mutatott az A-498 és CAKI-2 sejtekre, és dózisfüggő módon jelentősen gátolta a sejt szaporodást (21./A, C Ábra). A shikonin hatékonyságának összehasonlítása érdekében a sejteket a hagyományos terápiás szerrel, a sunitinibbel kezeltük (21./B, D Ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a shikonin mindössze 24 óra elteltével, már 2,5 μM koncentrációnál jelentősen gátolta az A-498 és a CAKI-2 sejtek szaporodását is. Azonban a sunitinib által indukált jelentős sejt szaporodás-gátlás az A-498 sejtekben csak 20 μM koncentrációnál volt megfigyelhető (21./B Ábra), valamint a CAKI-2 sejt szaporodás gátlását már csak a 40 μM -nál és csak a vegyület alkalmazását követő 48 órával később (21./D Ábra) észleltük. A shikonin gátló hatása az idő előrehaladtával fokozatosan növekedett, ami a shikonin vesesejtes karcinómára gyakorolt időfüggő hatását jelzi. Az inverz mikroszkóppal (Nikon Eclipse TS 100, Melville, NY, USA) végzett morfológiai megfigyelés szintén a shikonin rendkívül kifejezett hatását mutatta mindkét sejt vonalon.



17. **Ábra.** A shikoninnal vagy sunitinibbel kezelt A-498 (A, B) és CAKI-2 (C, D) humán vesedaganat sejtvonalak sejtproliferaációs aktivitása.

Ezt követően a sejtek kolóniaképző, túlélésüket mutató vizsgálatokat végeztünk abból a célból, hogy megvizsgáljuk a shikonin gátló hatását a kiválasztott vesedaganat sejtek klónképző képességére. A proliferációs aktivitás vizsgálati eredményei alapján a sejteket két hétig növekvő dózisú shikoninnal (1–20 μM) és sunitinibbel (1–40 μM) kezeltük, hogy teszteljük és összehasonlítsuk a shikonin és a sunitinib hatását a CAKI-2 és az A-498 sejtek kolóniaképző képességére. Amint az a 18. Ábrán látható, a shikonin hatékonyan gátolta a kolóniaképződését mindkét sejtvonalnak, úgy a CAKI-2, mint az A-498 sejteken (22./C, D Ábra). A shikonin kolóniaképződést gátló képessége hatékonyabbnak bizonyult az A-498 sejtek esetében, mint a CAKI-2-ben. Az A-498 sejtek esetében a kolóniák száma körülbelül harmadára csökkent, amikor 1 μM shikonint használtunk a kontroll csoporthoz képest, és körülbelül nyolcszorosára csökkent a 2,5 μM shikonin koncentrációnál. A CAKI-2 sejtekben a hatás csak 2,5 μM -nál volt kifejezett (~hatszoros). A sejt szaporodási vizsgálat eredményeivel összhangban a shikonin sokkal alacsonyabb koncentrációnál (1 μM) gátolta a daganatos sejtek kolóniaképződését, mint a sunitinib, ami csak 20 μM -nál fejtette ki hasonló hatását a kolóniaképződésre (18. Ábra).

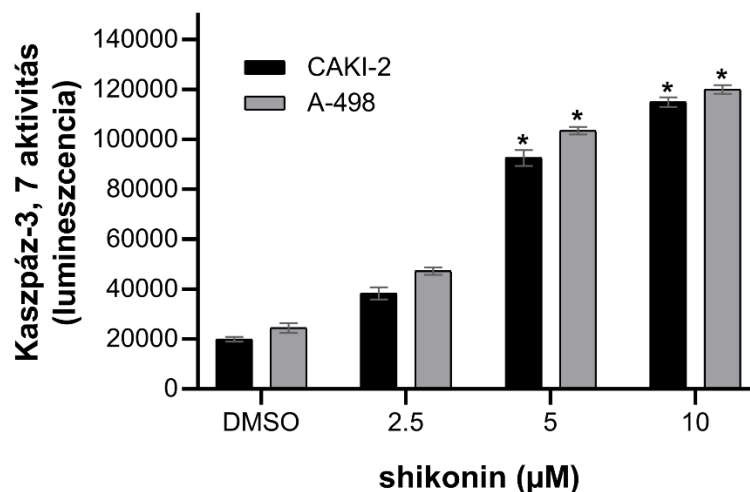


18. Ábra. A CAKI-2 és A-498 humán vesedaganat sejtek kolónia képződésének gátlása shikonin kezelés hatására. A 6-lyukú plate-re mért sejteket (A, B) sunitinibbel és (C, D) shikoninnal kezeltük egyidejűleg. A 2% SDS oldatban reszuszpendált kolóniákat az abszorbancia értékek 570 nm-en történő meghatározásával kvantifikáltuk (E, F). A sunitinibbel és shikoninnal kezelt sejtek által képzett kolóniák kvantifikálása a két különböző sejtvonal esetében az alábbi szignifikánsnak jelölhető értékeket kaptuk: ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a shikonin dózis- és időfüggő módon gátló hatást fejthet ki a humán CAKI-2 és A-498 vesedaganat sejtvonalak életképességére (18. Ábra) Mindezen túl a shikonin nagyobb mértékű gátlást mutatott az A-498 sejtek szaporodására, mint a CAKI-2 sejtekére.

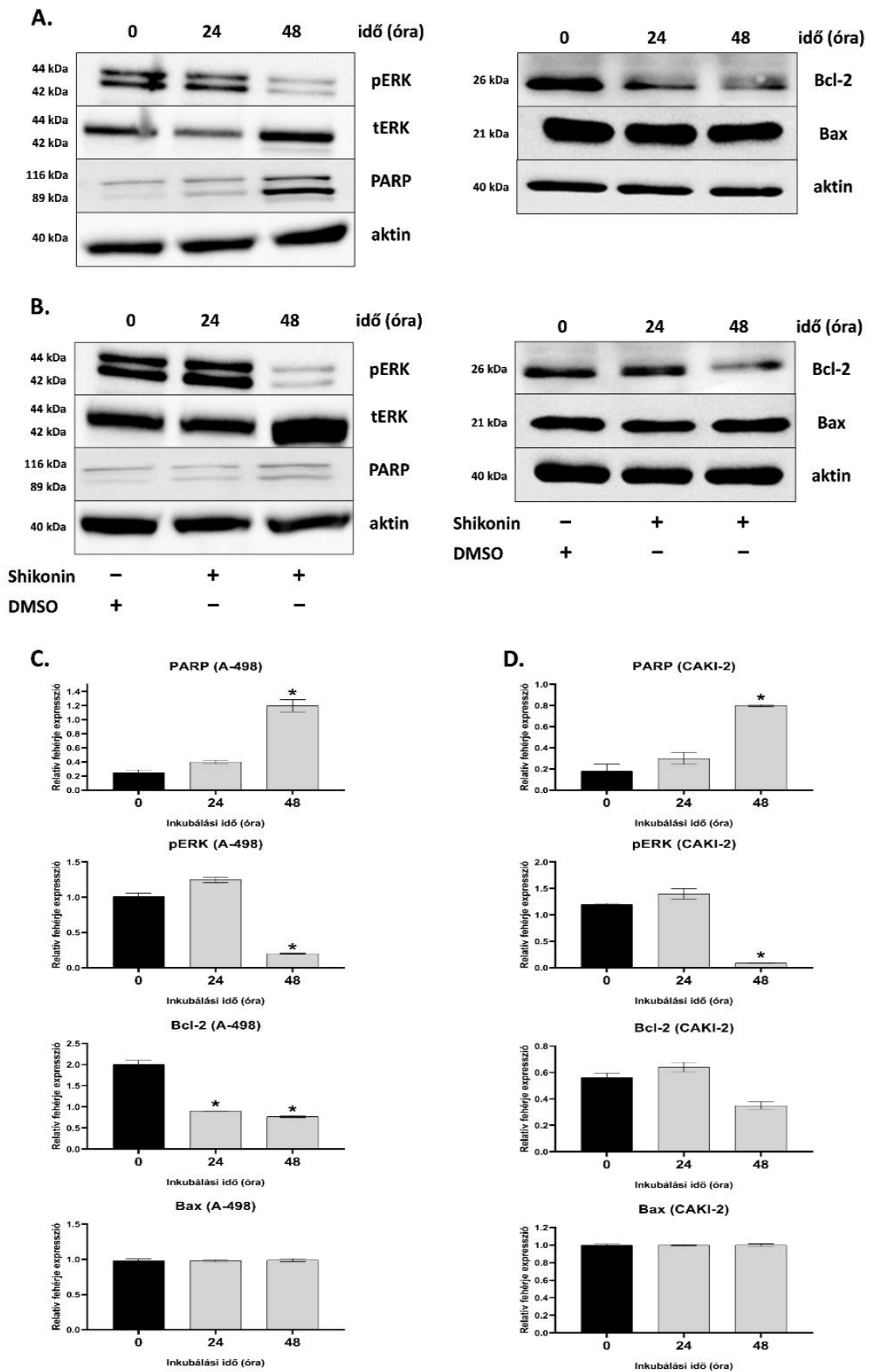
V.9. A shikonin által indukált apoptózis a CAKI-2 és az A-498 humán vesedaganat sejtvonalakon

A shikonin és származékai által indukált apoptózist számos más sejtvonalon is kimutatták. A kaszpázokat az apoptózis kritikus modulátorainak tekintik [93]. Mivel a kaszpáz-3 és -7 proteázok aktiválása kulcsfontosságú az apoptotikus sejthalálban; ezért a kaszpáz-3 és -7 aktivitását a shikoninnal kezelt CAKI-2 és A-498 sejteken is vizsgáltuk. A shikoninnal történő kezeléseket követően azt figyeltük meg, hogy 48 óra elteltével ezekben a sejtvonalakban a kaszpáz-3 és -7 aktivitásában körülbelül hatszoros növekedést mutatott a kontroll sejtekhez képest. Tehát a kaszpáz-3 és kaszpáz-7 aktivitás szignifikánsan növekedett a shikonin kezelés hatására, a maximális aktivitás 10 μM koncentrációnál tetőzött (19. Ábra).



19. Ábra. A shikonin a CAKI-2 és A-498 humán vesedaganat sejtvonalak apoptózisára kifejtett hatása (* $p < 0,05$)

A kaszpáz-függő apoptózis általában befolyásolja más fehérjék hasítását is (példaként említhető a poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP)), ezért a PARP expresszióját is elemeztük a shikonin kezelés hatására [29]. Ahogyan azt a 20. Ábra mutatja, a PARP szintjét Western blot segítségével mértük, ami szerint a PARP jelentősen fokozott expressziót mutatott 24 órával a kezelés után, amely tovább növekedett 48 óra elteltével a shikoninnal történő kezelést követően. Az A-498 sejtekben a PARP expresszió körülbelül hatszorosára nőtt, míg a CAKI-2 sejtekben mintegy négyszeresére a kezeletlen kontroll csoporthoz képest (20./C, D Ábra).



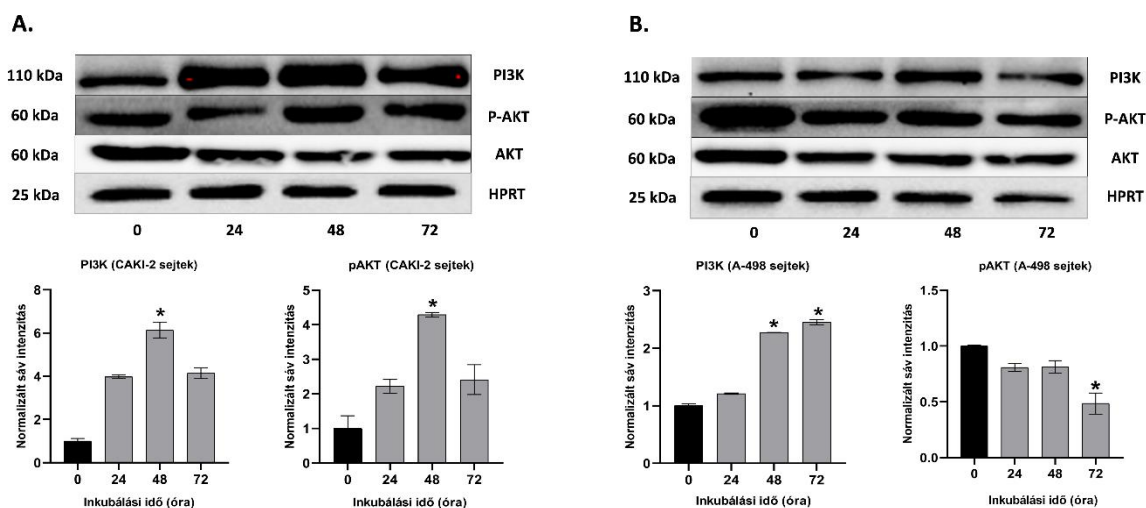
20. Ábra. Apoptotikus fehérjék expressziójának vizsgálata a CAKI-2 és az A-498 sejtekben a shikonin kezelést követően (5 μ M) Western blot technikával. (A) Shikonin hatása különböző fehérjék expressziójára az A-498 sejtekben. (B) A shikonin kezelés által érintett fehérjék expressziós szintje a CAKI-2 sejtekben. (C, D) Az oszlopdiagramok mutatják a fehérjék kvantifikált eredményeit a β -aktin vagy tERK-hez viszonyítva (C: az A-498 sejtek a bal oldali oszlopban, D: a CAKI-2 sejtek a jobb oldali oszlopban) (* $p < 0,05$).

Az Wesern blot technikával kapott eredmények kimutatták, hogy a fokozott kaszpáz-3 és kaszpáz-7 szintek csökkent anti-apoptotikus fehérjeként funkcionáló B-sejtes limfóma 2 (Bcl-2) szintekkel jártak együtt; azonban a proapoptotikus fehérje, a Bcl-2-asszociált X-fehérje (Bax) kifejeződésére vonatkozóan a shikoninnak nem volt észlelhető hatása a kezeletlen kontroll sejtekkel összehasonlítva (20./A, E Ábra).

V.10. A shikonin hatása az apoptózisra és a tumorszuppresszor gének kifejeződésére

A Foszfatidil-inozitol 3-kináz/AKT (PI3K/AKT) útvonal alapvető szerepet játszik a fehérjeszintézisben és a sejt szaporodásban, emellett szabályozó szerepet tölt be az apoptózisban is. Ez az útvonal olyan faktorok által aktiválódik, amelyek a PI3K-t indukálják, ezzel aktiválva az mTOR útvonalakat, ezért fontosnak tartottuk tanulmányozni az útvonal célpontjainak változásait a shikonin kezelést követően [94].

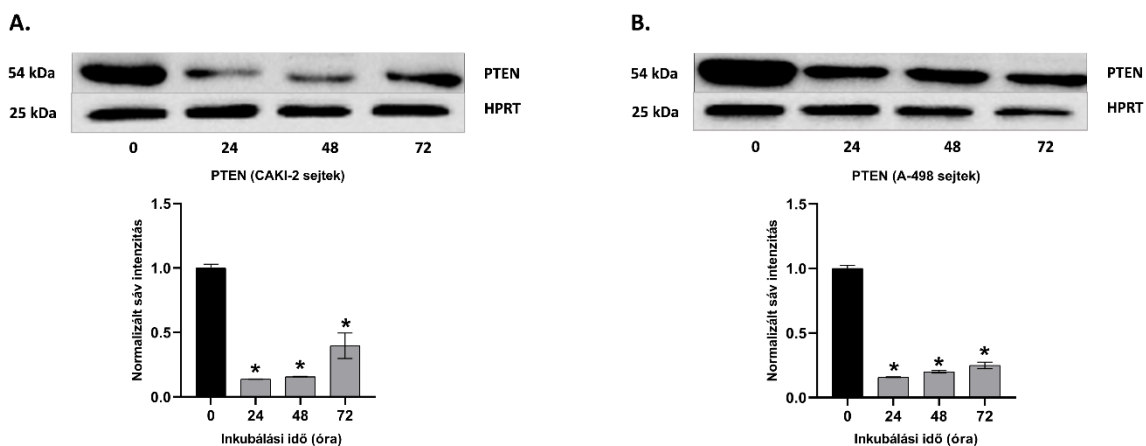
A humán CAKI-2 és A-498 sejt vonalakban vizsgáltuk a PI3K és a foszforilált-AKT (p-AKT) fehérjék expresszióját shikonin kezelés hatására („Anyagok és módszerek” IV.15). A Western blot elemzések alapján a CAKI-2 sejtekben a PI3K és a p-AKT expressziós szintjének növekedése volt megfigyelhető, amely a kezelés után 48 órával érte el a legmagasabb szintet (21./A Ábra). Az A-498 sejtekben a PI3K expresszió folyamatos növekedést mutatott a kísérlet során, de a p-AKT fehérje szintjében egyértelmű csökkenés volt megfigyelhető (21./B Ábra).



21. Ábra. Az apoptotikus és tumorszuppresszor fehérjék expresszióját mutató Western blot analízis a (A) CAKI-2 és (B) A-498 humán vesedaganat sejtvonalakban (* $p < 0,05$).

A Foszfataz és Tensin Homológ (PTEN) mint multifunkcionális tumorszuppresszor gátolja a foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát (PIP3) sejten belüli expresszióját, valamint negatívan szabályozza az AKT/Protein Kináz B (AKT/PKB) jelátviteli útvonalat, emellett megfigyelhető, hogy fontos szerepet játszik a shikonin által indukált apoptózisban is [94].

A PTEN fehérjeszinten történő kimutatását humán vesedaganat (CAKI-2 és A-498) sejtvonalakon Western blot technikával vizsgáltuk („Anyagok és módszerek” IV.15.). A 22./A, B Ábra eredményei szerint mindkét sejtvonala esetében már igen korán jelentős csökkenést figyeltünk meg a PTEN expressziójában, majd a kezelés időtartama alatt enyhe növekedést tapasztaltunk.



22. Ábra. A PTEN fehérje kimutatása Western blot technikával a humán (A) CAKI-2 és (B) A-498 vesedaganat sejtvonalakban (* $p < 0,05$)

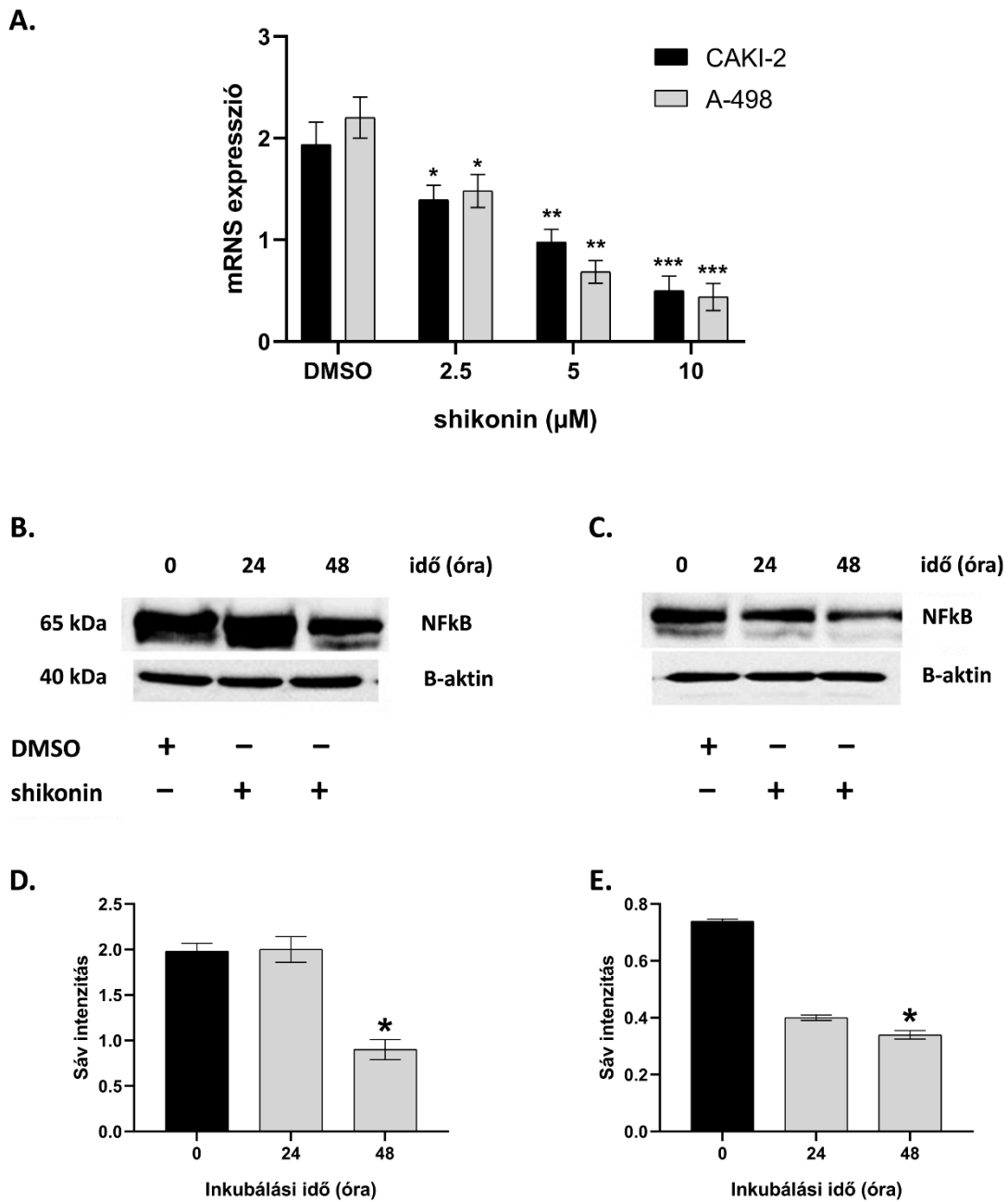
V.11. A MAPK/PI3K útvonalak szerepe a shikonin által indukált apoptózisban

A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK-k) és a PI3K/AKT útvonalak kulcsszerepet játszanak a sejtek proliferációjának, túlélésének és apoptózisának szabályozásában [94]. Annak detektálására, hogy a shikonin képes-e módosítani az extracelluláris jelátviteli kinázok (ERK) által szabályozott jelátviteli útvonalakat, megvizsgáltuk a shikonin hatását a p44/42 MAPK (tErk) foszforilációjára. Ahogyan a 20. Ábrán látható, az A-498 és CAKI-2 sejtek esetében a 2,5 μM shikoninnal történő 24 órás kezelése jelentős mértékben gátolta a foszfo-p44/42 MAPK (pErk) expressziós szintjét a teljes p44/42 MAPK fehérje expressziós szintjéhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a shikonin időfüggő módon csökkentheti ezeknek a fehérjéknek a foszforilációját.

Összességében az eredmények azt mutatják, hogy a shikonin az apoptotikus sejthalál indukálásán keresztül gátolta a vesedaganat sejtek proliferációját. Emellett az eredmények arra is utalnak, hogy a shikonin által indukált apoptózis a vesedaganat sejtekben feltehetőleg egy mitokondrium-függő úton keresztül valósulhat meg [93].

A nukleáris faktor-kappaB (NF- κ B) egy indukálható transzkripció faktor, amely a sejtekben közvetíti a jelátvitelt a citoplazma és a sejtmag között. Az aktivált NF- κ B upregulálja azoknak a kulcsgéneknek az expresszióját, amelyek részt vesznek a tumor progressziójában és a metasztázis elősegítésében [95]. Számos tanulmány beszámolt már a shikonin NF- κ B DNS-kötődési aktivitását gátló hatásáról [96]. Ez a háttérismeret arra készítetett minket, hogy megvizsgáljuk, vajon a shikonin gátolja-e az NF- κ B expresszióját az A-498 és CAKI-2 sejtekben.

A CAKI-2 és A-498 sejtekben a növekvő dózisu shikoninnal (2,5–10 μM) végzett 24, 48 és 72 órás inkubációs periódusokat követően elvégeztük az a NF- κ B gén expressziójának qRT-PCR-el történő elemzését is. Ahogyan a 23. Ábrán látható, körülbelül ötödére csökkent az NF- κ B mRNS expressziója a shikoninnal kezelt A-498 és CAKI-2 sejtekben a kezeletlen kontroll csoporthoz képest. A qRT-PCR adatokkal (23./A Ábra) összhangban az NF- κ B fehérje szintjének jelentős csökkenését (~kétszeres) észleltük 48 óránál a Western blot analízissel (23./B-E Ábra).

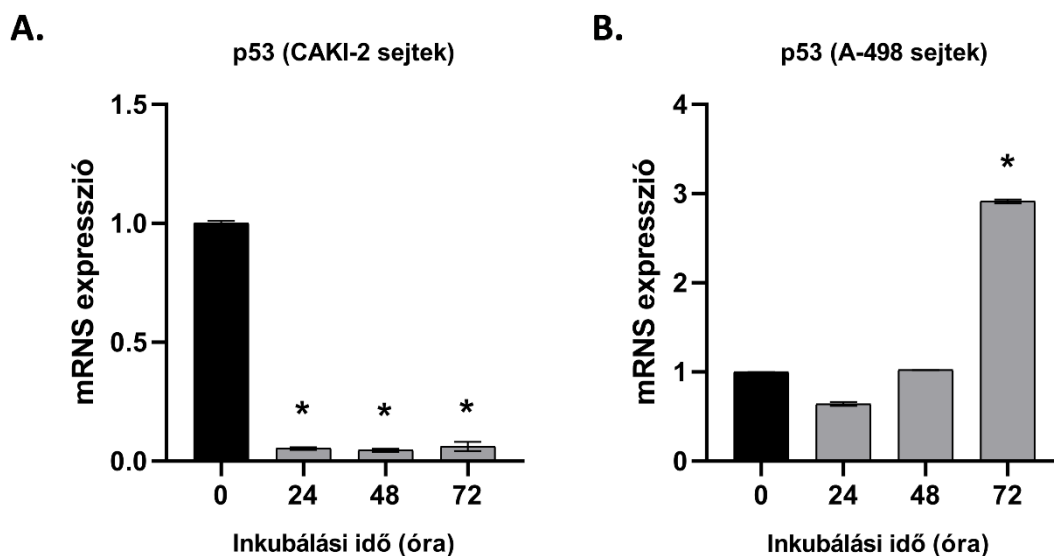


23. Ábra. A shikonin hatása az NF- κ B expressziójára. (A) Az NF- κ B mRNS expresszióját 48 órás shikonin kezelést követően qRT-PCR-rel kvantifikáltuk. (B) A-498 sejtek és (C) CAKI-2 sejtek az NF- κ B mRNS expresszióját mutatják a kezelt sejtekben a kezeletlen kontroll csoporthoz (DMSO) képest. (D, E) Az NF- κ B fehérje expressziójának kvantifikált adatai a shikonin kezelést követően (* $p < 0,05$, ** $p < 0,0021$ és *** $p < 0,0002$).

Célunk volt továbbá az NF- κ B és az apoptózissal kapcsolatos faktorok, mint például a p53 közötti összefüggés vizsgálata, amelyek hatással lehetnek a tumorgenezisre, és szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában, a kialakuló vagy már meglévő gyógyszer-

rezisztenciában és apoptózisban, valamint a gyakran előforduló felnőtt vesedaganatok progressziójában [95].

A p53 expresszióját mRNS szinten tanulmányoztuk a CAKI-2 és A-498 sejtekben shikonin kezelés hatására („Anyagok és módszerek” IV.8.) qRT-PCR segítségével. A 24./A Ábra a p53 jelentős csökkenését mutatja a CAKI-2 sejtekben ($p < 0,05$) a 24 órás shikonin kezelést követően. Az A-498 sejtekben a p53 expressziójában viszont enyhe csökkenés volt kimutatható 24 órás shikoninnal való inkubáció elteltével, míg 72 órás kezelés után mintegy háromszoros növekedés volt megfigyelhető a kontroll sejtekhez viszonyítva ($p < 0,05$) (24./B Ábra).

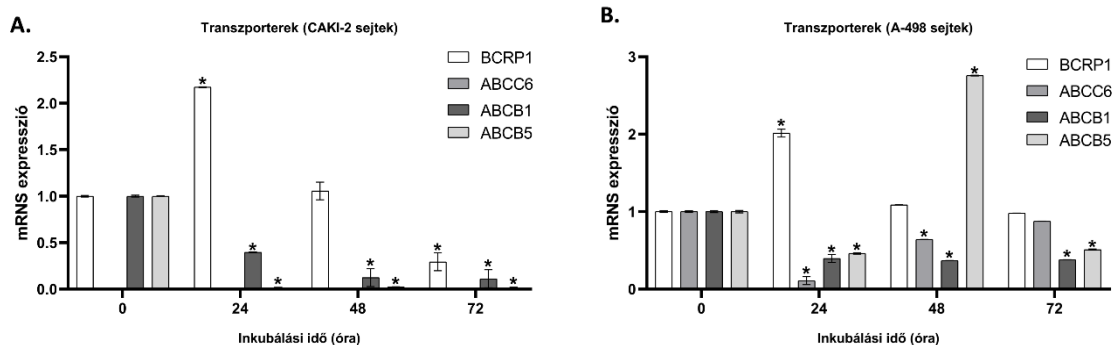


24. Ábra. A p53 gén expressziójának elemzése a humán (A) CAKI-2 és (B) A-498 vesedaganat sejtvonalakban (* $p < 0,05$).

V.12. A shikonin hatása a multidrog-transzporter gének expressziójára

A multidrog rezisztencia (MDR) egyedi és kritikus pontot képvisel a gyógyszer-rezisztencia kialakulásában, súlyos terápiás következményekkel jár, melynek leküzdése még mindig kihívás a tumorok kemoterápiája esetén [97]. A MDR-ek fokozott expressziója multidrog rezisztenciát jelenthet a tumoros sejtek számára, ugyanakkor a tumorsejt effluxának gátlása hatékonyan növelheti a tumoros sejtek érzékenységét a kemoterápiás szerekkel szemben [97].

Ezen megfontolásból volt célunk megvizsgálni a leggyakoribb multidrog-transzporter gének (Breast Cancer Resistance Protein 1 (BCRP1), ATP Binding Cassette Subfamily C Member 6 (ABCC6), ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1 (ABCB1), ATP Binding Cassette Subfamily C Member 5 (ABCB5)) expresszióját a shikoninnal kezelt A-498 és CAKI-2 sejtekben. A shikoninnal történő 24 órás kezelést követően körülbelül kétszeres növekedést figyeltünk meg a BCRP1 gén expressziójában úgy az A-498, mint a CAKI-2 sejtekben, amelyek előzőleg csökkent expressziót mutattak a kontroll sejtekben a 72 órás shikonin kezelés után (25./A, B Ábra). Szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) figyeltünk meg a BCRP1 gén expressziójában mindkét sejtvonal esetében a 24 órás kezelést követően. Az ABCC6 expressziója szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent a 24 órás shikoninnal történő inkubáció elteltével az A-498 sejtekben, ami 72 óra után visszatért a kontroll szintre (25./A, B Ábra). Az ABCC6 transzporter gén expressziója nem volt kimutatható sem a kontroll, sem a shikoninnal kezelt a CAKI-2 sejtekben. Az ABCB1 expressziója szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent mindkét sejtvonalban már 24 órával a kezelés után. Az ABCB5 expressziója szinte teljesen lecsökkent a shikoninnal kezelt CAKI-2 sejtekben. Az A-498 sejtek ABCB5 expressziója 24 óra után kb. 50%-kal csökkent, majd a shikonin kezelést követően 48 órával majdnem háromszorosára nőtt a kontroll, kezeletlen A-498 sejtekhez viszonyítva (25./A, B Ábra).

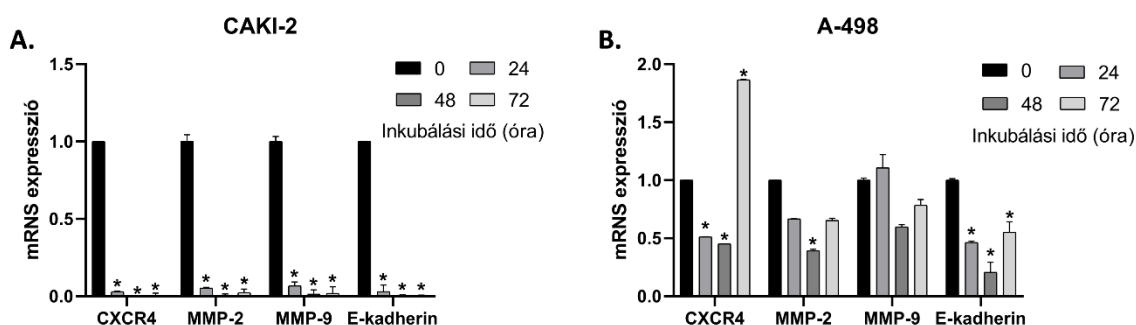


25. Ábra. Transzporter gének expressziója a shikoninnal kezelt (A) CAKI-2 és (B) A-498 humán vesedaganat sejtvonalakban. A shikoninnal kezelt minták expressziós szintjeit a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítottuk (* $p < 0,05$).

V.13. A shikonin hatása az extracelluláris mátrix fehérjék expressziójára

A metasztázis lépései során szükség van az extracelluláris mátrix (ECM) alkotóelemeinek proteolitikus enzimek általi lebontására, ideértve a mátrix metalloproteinázokat (MMP-k), mint fő ECM-lebontó enzimeket [98]. Mivel az MMP-k expressziója és aktivációja kritikus a sejtinvázióhoz szükséges ECM lebontásában, ezért a shikonin hatásának vizsgálatokor kitértünk a Kadherinekre, valamint a C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 (CXCR4) és az MMP-k expressziójának elemzésére is.

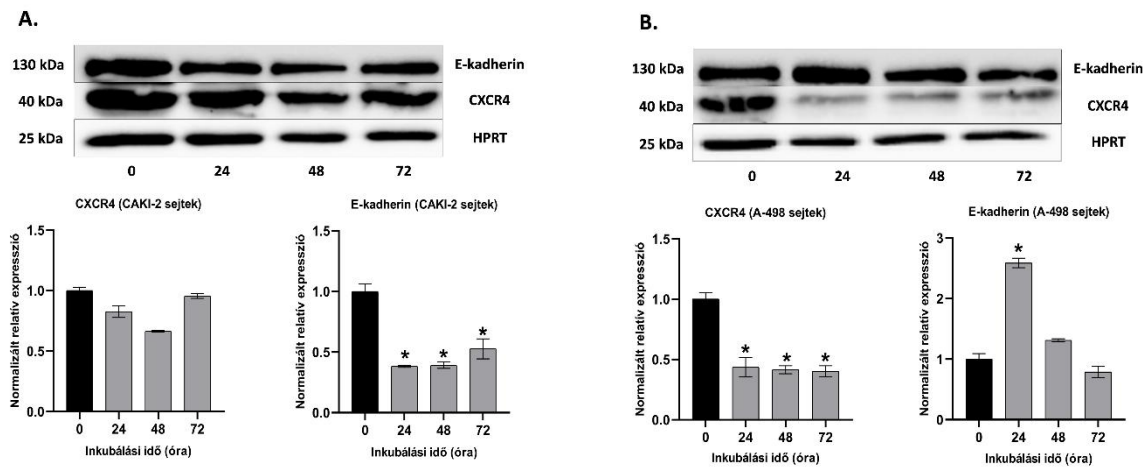
Az RT-qPCR eredményeink azt mutatták, hogy a shikonin kezelés szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a CXCR4, az MMP-2, az MMP-9 és az E-kadherin expresszióját a CAKI-2 sejtekben (26./A Ábra). A CXCR4, az MMP-2 és az E-kadherin kifejeződésének csökkenése volt megfigyelhető az A-498 sejtekben is (26./B Ábra), azonban a CXCR4 expressziójában mintegy kétszeres növekedést lehetett megfigyelni a 72 órás kezelés után a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva. Az MMP-9 enyhe növekedést mutatott már alig 24 óra elteltével, majd csökkent a shikoninnal történő 48 óra inkubációt követően (26./B Ábra).



26. Ábra. Az extracelluláris mátrix gének expressziója a shikoninnal kezelt (A) CAKI-2 és (B) A-498 humán vesedaganat sejtvonalakban (* $p < 0,05$).

Az E-kadherin és CXCR4 expresszióját fehérje szintjén is elemeztük. A CAKI-2 sejtek esetében szignifikáns csökkenést észleltünk az E-kadherin expressziójában, és mindössze enyhe csökkenést a CXCR4 szintjében. A kezelés után 72 órával hirtelen jelentkező emelkedést figyeltünk meg mindkét fehérje expressziójában a 24 és 48 órás mintákhoz képest (27./A Ábra). Az A-498 sejtekben az E-kadherin expressziója szignifikáns növekedést mutatott 24 óra shikonin kezelés után, azonban 48–72 óra shikoninnal történő inkubáció esetén az E-kadherin expressziója a kontroll sejtekben mért szint alá csökkent. A CXCR4 expressziója már 24 órával

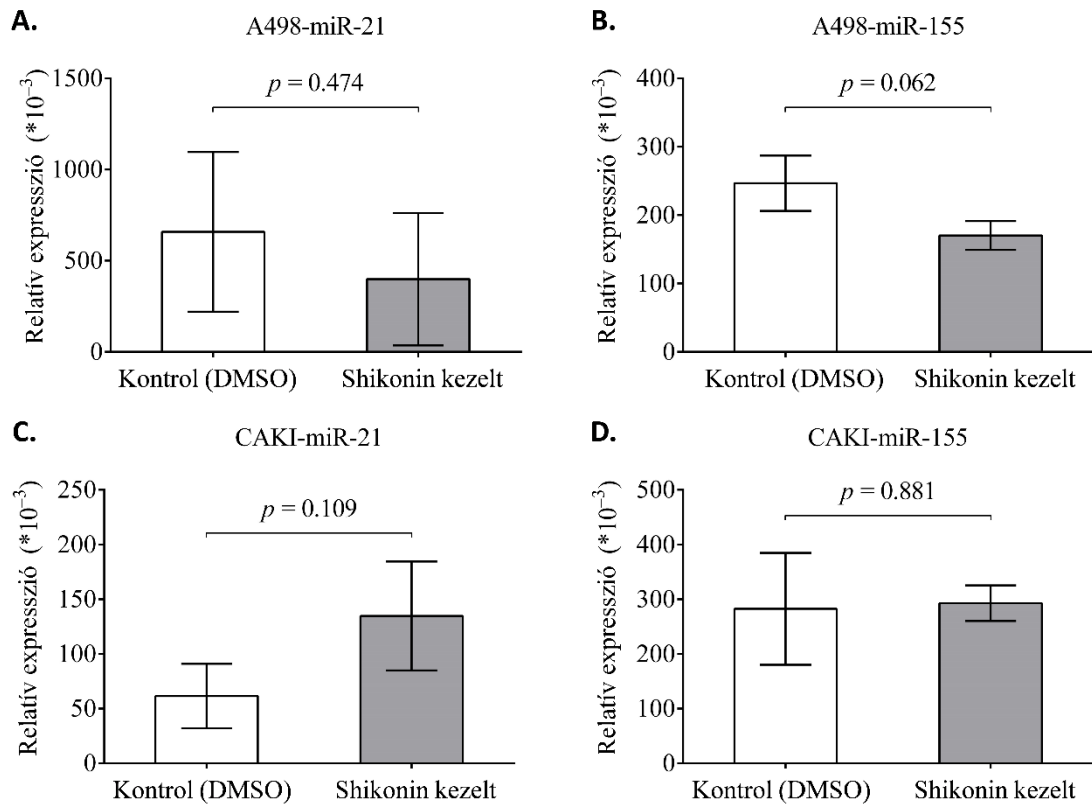
a shikoninnal történő kezelés után szignifikánsan csökkent, és nem mutatott növekedést a 48 és 72 órás kezelés után sem (27./B Ábra).



27. Ábra. Western blot analízis alapján végzett extracelluláris mátrix fehérjék expressziójának vizsgálata a (A) CAKI-2 és (B) az A-498 humán vesedaganat sejtvonalakban a shikonin kezelést követően. (A sávok intenzitásának kiértékelése során a shikoninnal kezelt mintákban mért sávintenzitást viszonyítottuk a kezeletlen kontroll mintákhoz (* $p < 0,05$)).

V.14. A shikonin hatása a miR-21 és a miR-155 expressziójára

A mikro-RNS-ek (miRNS-ek) a különböző daganatokban onkogénként vagy tumorszuppresszorként működhetnek, és szabályozhatják a biológiai folyamatokat, beleértve a sejtciklust és az apoptózist is [99]. Ahogyan a miR-155, úgy a miR-21 is onkogén miRNS-ként szolgálhat, melyek széles körben fejeződnek ki különböző humán szövetekben, és számos daganat típusban mutatták már ki a fokozott expressziójukat. Feltehetőleg szabályozzák a sejtosztódást, a migrációt és inváziót, valamint gátolhatják az apoptózist [32, 100, 101]. Ezen irodalmi háttér alapján különösen érdekelt minket, hogy a miR-21 és miR-155 viselkedését vizsgáljuk a CAKI-2 és az A-498 sejtekben a shikonin kezelés hatására. A CAKI-2 és az A-498 sejteket 48 órán keresztül shikoninnal kezeltük, majd a kezelt és kontroll sejtekből RNS-t izoláltunk, és a miRNS-ek expressziós szintjét qRT-PCR segítségével vizsgáltuk. Az eredményeket a 28. Ábra prezentálja, mely szerint érdekes módon szignifikáns változás nem volt megfigyelhető a vizsgált miRNS-ek expressziós szintjében a kezelt sejtek esetében.



28. Ábra. A shikonin hatása a miR-21 és miR-155 expressziójára az A-498 és a CAKI-2 humán vesedaganat sejtvonalakban. A vizsgált miR-ek expressziós szintje qRT-PCR segítségével detektáltuk (A, B) A-498 és (C, D) CAKI-2 humán vesedaganat sejtekben.

Az eredmények leírását követően ezek értelmezését, megbeszélését és ezzel kapcsolatos következtetéseket szeretném bemutatni a következő fejezetben.

VI. Megbeszélés

Ahogy az irodalmi részben már említésre került, a vesesejtes karcinóma (RCC) a vese leggyakoribb daganata, az összes rosszindulatú daganatoknak kb 3%-át teszi ki, és magas halálozási rátával (40%) rendelkezik [1,2]. Az elmúlt néhány évben az RCC előfordulása még rohamosabban megemelkedett, ami a nem megfelelő időben történő diagnózis és terápia eredménye. A vesetumorok jobb terápiája, prognózisa és eredményesebb klinikai kimenetele érdekében a diagnosztikai értékű biomarkerek azonosításának nagy szerepe van. Az angiogenesis kialakulását jelző markerek és ezeket befolyásoló miRNS-ek potenciális lehetőséget mutatnak ezen a téren már a betegség kialakulásának kezdeti stádiumában is [6, 102-104]. Nemcsak biomarker szereppel bírnak, de terápiás célpontnak is tekinthetők, ami még inkább arra utal, hogy az ezzel a kérdéssel foglalkozó kutatásoknak a vesetumorok diagnosztikája és terápia szempontjából mindenképpen jelentősége van [1,2].

Ezen kulcsgondolatok megfogalmazásával szeretnék rátérni az eredményeim értékelésére, megbeszélésére és a következtetésekre.

Az angiogenesis egy összetett folyamat, amely magában foglalja a különböző pro- és antiangiogén faktorok szinkron aktivitását [6, 102-104]. Létfonosságú szerepet játszik az RCC kialakulásában és annak szövettani típusait is meghatározza [102, 105, 106]. A vese tumorigenezise során kialakuló angiogenesis genetikai és epigenetikai szinten is szabályozott lehet [102]. A tumoros sejtekben egyes gének (VHL, PTEN, BAP1, MET, stb.) inaktivációja genetikai eltérések, mutációk eredménye lehet. Az epigenetikai szinten kialakuló változások upregulálhatják ezen tumorszuppresszor géneket vagy éppen inaktívalhatja ezen gének onkogén funkcióit, ami igen fontos szerepet játszik a tumor fejlődésében úgy a korai, mint a késői stádiumban [102, 105, 106]. Az irodalomban az RCC angiogenesisének szabályozási mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. A diszregulált angiogenesishez kapcsolódó gének, az angiogenesishez kapcsolódó specifikus markerek és az ezeket szabályozó miRNS-ek azonosítása igen kulcsfontosságú a vesetumorigenezis teljes folyamatának szabályozásában betöltött szerepük megértéséhez [104, 105]. Az RCC miRNS expressziós profiljának ismerete új prognosztikai tényezők meghatározására ad lehetőséget, és magyarázatul szolgálhat a betegség kialakulásában és progressziójában szerepet játszó molekuláris mechanizmusokra [5, 22]. Az angiogenesis folyamatában részt vevő fontosabb gének egy vagy akár több miRNS aktivitásával is szabályozhatóak [2]. Bár jelentős számú miRNS-t írtak már le a

szakirodalomban, azonban a miRNS expressziós profilok és az RCC patológiás állapota vagy prognózisa közötti összefüggést még nem sikerült teljesen igazolni [5, 19, 22].

A hsa-miR-15b-5p, a hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-181a-5p szerepe az angiogenezis folyamatában még szintén nem teljesen tisztázott. A vizsgálatunkban tanulmányozott 20-20 vesetumoros és az egészségesnek vélt, kontroll szövetként szolgáló ép minták alapján kapott eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy az összes vizsgált mintában a figyelmünk középpontjába kerülő és vizsgált miRNS-ek expressziója szignifikánsan csökkent a tumoros szövetekben a szomszédos ép párokban mutatott expresszióhoz képest. A miRNS-ek expressziós szintje és a betegek patológiai grádusa közötti negatív korrelációt a lineáris regressziós analízis is alátámasztotta. Összességében véve a vizsgált miRNS-ek mindegyike alacsony expressziót mutatott az összes patológiai grádusban (1-es, 2-es és 3-as grádusok).

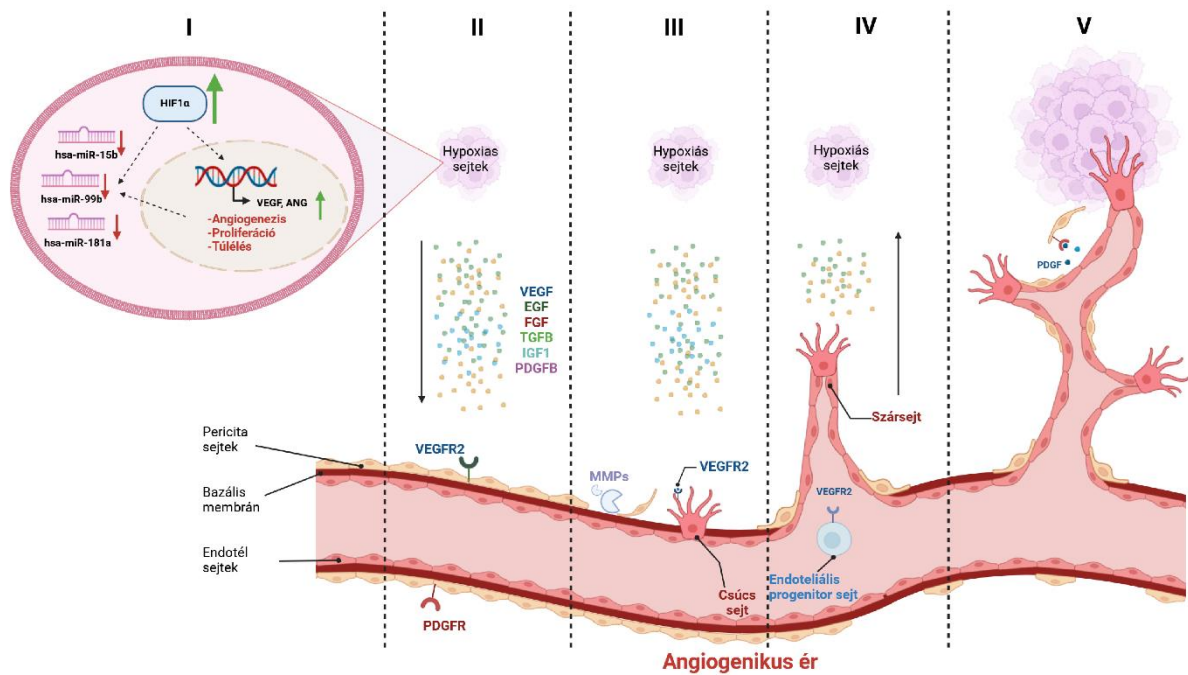
A vizsgált miRNS-ek mindegyikét külön-külön megvizsgálva azt találtuk, hogy a hsa-miR-15b-5p szignifikánsan downregulált. Ezek az eredmények összhangban vannak Kumar és mtsai 2022-es jelentésével, amely szerint a nem-kissejtes tüdőrákban (Non-Small Cell Lung Cancer: NSCLC) diagnosztizált betegek szöveteiben a miR-15a-5p szignifikáns csökkenését figyelték meg [107]. Kao és mtsai (2017) kimutatták, hogy a miR-15a közvetlenül szabályozza a Programozott sejthalál ligand 1 (Programmed Cell Death-Ligand 1: PD-L1) expresszióját rosszindulatú pleurális mesotheliomában [108]. Más jelentések alapján a miR-15a tumorszuppresszor szerepét is leírták [107-110].

A daganatos veseszövetmintákon végzett vizsgálatunkban a hsa-miR-99b-5p szintén szignifikánsan csökkent a vizsgált ép mintákhoz képest. Ezek az eredmények összhangban vannak Cui és mtsai (2012) vizsgálatával [4].

A hsa-miR-181a-5p-ről korábban kimutatták, hogy létfontosságú szerepet játszik a humán daganatos megbetegedésekben [111]. A jelenlegi tanulmányban a hsa-miR-181a-5p elemzése egyértelmű downregulációt mutatott a tumoros mintákban, ami összhangban van azokkal a korábbi tanulmányokkal, amelyek a miR-181a-5p downregulációját igazolták agresszív humán emlő- és vastagbélrákban, ahol a miR-181a-5p expressziója az MMP-14 expressziós szintjével fordítottan korrelált [111, 112].

Yulin Lai és mtsai (2024) kimutatták, hogy a miR-181a-5p upregulált az RCC-vel azonosított betegek mintáiban és a humán vesedaganat sejtvonalakban, ami összefüggésben áll a sejtmigrációval, proliferációval és apoptózissal. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a miR-181a-5p onkogénként vagy tumorszuppresszorként működhet egy, vagy több jelátviteli útvonalon keresztül különböző típusú daganatokban [111, 112].

Az angiogenezis egy többlépcsős folyamat, amelyben egy angiogén inger hatására új vérerek fejlődnek ki a már meglévő erekből [6, 111]. Ezenkívül a csökkent oxigénkoncentráció a HIF felhalmozódását idézi elő, és a VEGF fokozott expressziójához vezet. A HIF, a VEGF, a PDGF és az FGF felhalmozódása fokozott angiogenezissel és az RCC metasztázisával jár [3, 22, 102, 104, 113, 114]. A VEGF-A molekula a VEGFR-1, a VEGFR-2 és a VEGFR-3-hoz kötődve intracelluláris jelátviteli mechanizmusokat közvetít az endothél sejtekben. A VEGFR-2 az angiogenezis folyamatára jellemző receptor. Míg a VEGFR-1 gátolja az angiogén folyamatokat, addig a VEGFR-2 az angiogenezist szinten tartja. A VEGFR-3, mint a VEGF-C receptora a korai embrionális fázisban vesz részt a vaszkularizációban (29. Ábra), [5]. Mindhárom receptor expressziója az általunk vizsgált mintákban már önmagában is olyan eredmény, amely alátámasztja a kialakuló angiogenezist [5, 20, 115].



29. Ábra. Az angiogenezis folyamatának szabályozása. Az angiogén ingerek hatására a már meglévő erekből új erek fejlődnek. Tumorokban a csökkent oxigénkoncentráció a HIF felhalmozódását idézi elő, ami a VEGF és más angiogén faktorok fokozott expressziójához vezet. Ez a hypoxiás környezet valószínűleg az általunk tesztelt miRNS-ek upregulációját eredményezi (I). A pro-angiogén faktorok fokozott expressziója, beleértve a VEGF-A-t is, stimulálja a VEGFR-2 receptorokat az erek endothél sejtjein (II). Ez a periciták MMP-k általi bazális membránról történő leválásához vezet, melynek eredményeként az erek elongáció (III) irányítását végző csúcssejtek termelődnek. A szársejtek szaporodnak és megnyúlnak a hypoxiás sejtek irányába (IV), és az új véredényt a PDGFR-t expresszáló (V) periciták stabilizálják [5]. (Ez az ábra már az Irodalmi áttekintésben is bemutatásra került. Ebben a fejezetben a vizsgált miRNS-ek és angiogenezis faktorok közötti kapcsolatát hivatott bemutatni).

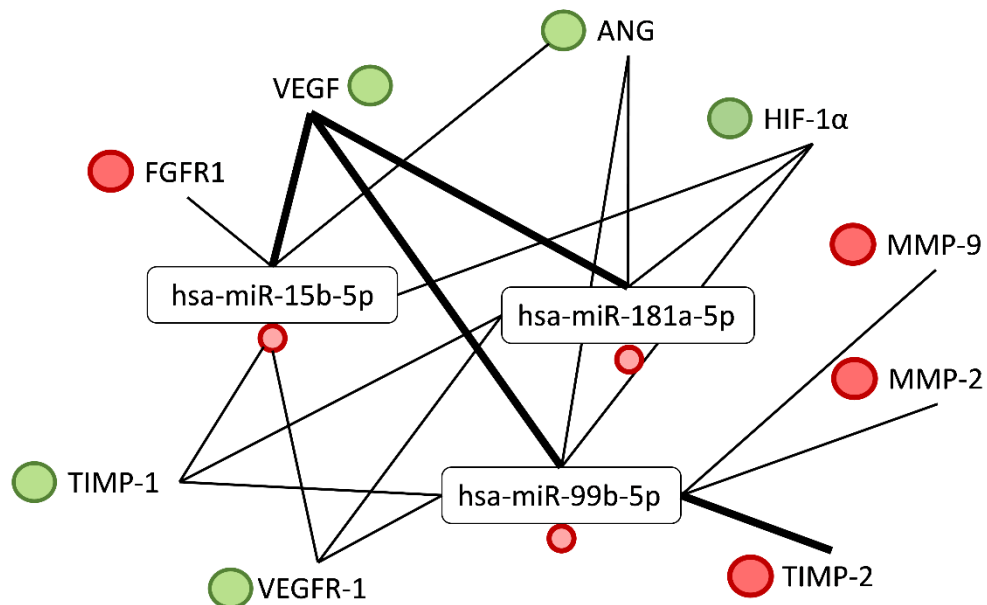
A VEGF expressziója további angiogenezishez kapcsolódó gének, például MMP-k és az MMP-eket gátló fehérjék, a TIMP-1 és TIMP-2 expressziójának diszregulációját is elősegíti (29. Ábra). A VHL/HIF1 vonalon történő jelátvitel a ciklikus adеноzin-monofoszfát (cAMP) válaszelemkötő fehérje (CREB) szintjének növekedéséhez vezet. Ez egy olyan transzkripció faktor, amely a VEGF expressziójának elősegítésével fokozza a pro-angiogén miRNS-ek expresszióját [3, 5, 20, 115-119].

Az általunk vizsgált három különböző miRNS adatbázisokkal történő *in silico* elemzése egyértelműen olyan közös célpontokat tárt fel, amelyek kulcsszerepet játszhatnak az angiogenezisben: a HIF-1 α , a VEGF, a FGF-1, az MMP-k és a TIMP-ek (30. Ábra) [120]. Vizsgálatunkban ezen célpontok expresszióját kezdetben szűrés céljából fehérje szinten csupán néhány (8-8 ép/tumoros) mintán teszteltük, majd ezután az egyes gének expresszióját mintánként mRNS szinten elemeztük. A csökkent oxigén koncentráció elsősorban a HIF-1 α felhalmozódását idézi elő, ami a VEGF-A fokozott expressziójához vezet [5, 115, 117, 120]. Ezzel összhangban, a vizsgált humán RCC mintákban szignifikáns növekedést figyeltünk meg a VEGF-A expressziójában a tumoros szövetekben a szomszédos ép szövetmintákhoz képest. Ez a növekedés korrelál a hasonló funkciót betöltő fehérjék, például az ANG fokozott expressziójával, amely szintén intenzíven hozzájárul a vesetumorok angiogeneziséhez [121]. Ezen történések lehetnek elsősorban a miRNS downreguláció fő okai [112]. Majd a downregulált miRNS-ek, a hsa-miR-15b-5p, a hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-181a-5p specifikus miRNS-célpont kölcsönhatások révén feltehetőleg az angiogenezis későbbi lépéseiben átvehetik az angiogenezis epigenetikai szabályozásának szerepét a korai, primerként azonosított tumorokban, ahogyan feltehetőleg az általunk vizsgált esetekben is ez történhetett (30. Ábra). Azt is feltételezzük, hogy a vizsgált miRNS-ek valószínűleg angiomiR-ként működnek, elősegítve az angiogenezis előrehaladását új erek képződésén keresztül [3, 16, 109]. Az is elképzelhető, hogy mindhárom vizsgált miRNS specifikus kölcsönhatásba lép olyan erős angiogenezis-induktorokkal, mint az ANG és a VEGF, ami új vérerek kialakulásához vezethet. Ezen angiogén faktorok továbbá olyan kölcsönhatásba kerülnek az endothéliális és simaizomsejtekkel, amely lehetővé teszi számukra, hogy tovább aktiválják az angiogenezis folyamatát, újabb véredények keletkezésével, melyek tovább fejlődnek és érett tubuláris struktúrákat alakítanak ki (29-30. Ábra), [5, 115, 118-120, 122]. A VEGF expressziós mintázatát értékelve a vizsgált mintáinkban, feltételezhetjük, hogy leginkább az upregulált VEGF lehet kulcsfontosságú szabályozó az új erek képződésében és a miRNS-ek downregulációjában [5, 115]. Chun-Yan Sun (2013) szerint a hsa-miR-15a feltételezett

tumorszuppresszorként hat az onkogén B-sejtes limfóma sejtekre (BCL-2), így az apoptózisban és a sejtproliferációban is szerepet játszik. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a miR-15a méhen kívüli túlzott expressziója a daganatos sejtek pro-angiogén aktivitásának csökkenéséhez vezetett, valamint azt is igazolták, hogy a miR-15a jelentős szerepet játszik a daganatképződésben, ha nem is teljesen, de legalább részben az angiogenezis modulációja révén a VEGF-A-t célozza meg és interakciót alakít ki vele [15]. A programozott sejthalál ligand 1 (PD-L1), a VEGF, az MMP-9 és a Ki-67 expressziója közötti kapcsolatot korábban gliómában tanulmányozták [16, 109]. A PD-L1 expressziós mértéke pozitívan korrelált a tumorok patológiai grádusával és a VEGF szinttel, ami arra utal, hogy a PD-L1 szerepet játszik az angiogenezisben és a sejtproliferációban egyaránt [110]. Számos tanulmány számolt már be arról, hogy a miR-15a alacsonyabb expressziója rossz prognózissal korrelál más humán daganatok esetében [107]. Azt is kimutatták, hogy a miR-99a bizonyos mértékig történő deregulációja felelős az RCC tumorgeneziséért azáltal, hogy közvetlenül az mTOR útvonalat célozza meg. Ez arra utal, hogy a miR-99a ígéretes diagnosztikai és terápiás célpontként szolgálhat a vesetumorokat illetően [3, 109, 110, 113].

● Emelkedett mRNS expresszió

● Csökkent mRNS expresszió



30. Ábra. A miRNS-ek és az angiogenetikus célpontok közötti lehetséges kölcsönhatások a vizsgált vesetumoros mintákban. Az egyes pontokat összekötő vonalak a vizsgált miRNS-ek és a feltételezett célpontok közötti kölcsönhatásokat mutatják. A vastagabb vonalak a mindhárom adatbázisban található közös célpontokat azonosítják.

A hypoxia-indukálható-1 α faktor, a VEGF-et követően, az érrendszer kialakulásának másik kulcsszereplője, más pro-angiogén faktorokat upregulál, amelyek magasabb expressziót mutattak a daganatos szövetekben, mint az ép szomszédos szövetminták az általunk végzett vizsgálatban. Feltételezhetjük, hogy a vizsgált miRNS-ek hozzájárulnak az angiogenezis kezdetleges, úgynevezett „csírázó” folyamatához, és ráadásul ezen miRNS-ek expressziója a VEGF és a HIF-1 α fokozott expressziójához vezet [16, 120]. A hypoxia kulcsszerepet játszik az angiogenezisben azáltal, hogy csökkenti a HIF-1 α transzkripciós faktor ubiquitináció általi lebomlását, ami a pro-angiogén faktorok, például a VEGF-A expressziójának indukcióját eredményezi [5, 122].

Az angiogenezis során a meglévő, endothéllel bélelt erekből új erek fejlődnek ki, hozzájárulva az érhalózat alapmembránjának lebomlásához és az extracelluláris mátrix (ECM) átalakulásához, amit az MMP-k részvétele segít. A specifikus MMP-k fokozzák az angiogenezist azáltal, hogy segítik a periciták leválását az angiogenezis során megjelenő erekről. Ezen túlmenően az MMP-k csökkentik az új erek képződését endogén angiogenezisgátlók létrehozása révén [5, 115, 123, 124].

Vizsgálatunkban specifikus MMP-k és TIMP-ek, nevezetesen az MMP-9/MMP-2 és TIMP-1/TIMP-2 együttes expresszióját figyeltük meg. Az MMP-k esetében az MMP-9 expressziójának enyhe csökkenése és a TIMP-1 szintjének emelkedése volt tapasztalható; azonban az MMP-2 és TIMP-2 alacsonyabb szintjeit mutattuk ki a vizsgált tumoros szövetekben, mint a szomszédos ép szövetmintákban. Feltételezhető, hogy az MMP-k részt vesznek a tumor neovaszkularizációjában és a metasztázisok kialakulásában. Másrészt a metalloproteinázok szöveti inhibitorai (TIMP-ek) gátolják az MMP-k aktivitását [117, 124].

Figyelembe véve az angiogenezis teljes folyamatát a vizsgált RCC-mintákban, az MMP-k közreműködésével kialakuló események a hsa-miR-15b-5p, a hsa-miR-99b-5p, a hsa-miR-181a-5p hatásának tulajdoníthatók. A vizsgált miR-ek interakciót képeznek az MMP-ekkel, különösen az MMP-9-cel és az MMP-2-vel való tumorsuppresszorként való interakciójuknak lehet kifejezett szerepe az angiogenezis folyamatában (30. Ábra). Az RCC angiogenezis során az új érhalózat bazális membránjának kialakulásakor és az extracelluláris mátrix (ECM) átalakulásakor a miRNS-ek specifikus szerepet játszhatnak különösképpen az extracelluláris mátrix lebontásában, így gátolják az új érképződést [5, 92, 104, 115].

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a specifikus MMP-k, például az MMP-14 (MT1-MMP) szintjének emelkedése rossz prognózissal hozható összefüggésbe a daganatos betegeknél. Azt is leírta már az irodalom, hogy agresszív humán emlő- és vastagbélrákban a miR-181a-5p szignifikánsan lecsökken, és szintje fordítottan korrelál az MMP-14

expressziójával. A klinikai mintákban magasabb MMP-14 expressziót figyeltek meg a daganatok invazívabb szakaszain, amikor a miR-181a-5p szintje már lecsökkent a szomszédos ép sejtekhez képest [112]. Feltételezhetjük azt is, hogy Yiyi (2015) közleményében leírtakhoz hasonlóan, a mi tanulmányunkban a vizsgált miRNS-ek kismértékben csökkentik az MMP-9 expressziós szintjét. A megnövekedett TIMP-1 szint gátolja az MMP-k aktivitását, míg a TIMP-2 alacsony szintje nagy valószínűséggel az MMP-k aktivitását próbálja stabilizálni, elősegítve a sejtinváziót és az angiogenezist [5, 112, 115]. Azt is érdemes megjegyezni, hogy mindezen feltételezések leginkább az RCC kialakult metasztatizais esetén teljesülnének. Az RCC-vel diagnosztizált vese daganatos részének nefrektómiája és rezekciója azonban megakadályozhatja a betegben ezen kóros állapotnak kialakulását [20, 110].

Az szakirodalomban azt is közölték, hogy a hsa-miR-181a expressziója emelkedett gliómákban [16, 21, 92]. Egy korábbi, humán kolorektális karcinómával (CRC) kapcsolatos vizsgálatban a magas miR-181a expressziós szint szignifikánsan összefüggött a vastagbélrákos betegek rosszabb túlélésével, és negatív összefüggést mutatott az előrehaladott májmetasztázisokkal rendelkező CRC-s betegek teljes túlélésével [16, 112]. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a tanulmányban vizsgált miRNS-ek feltételezett célpontjaik révén szabályozzák az angiogenezis folyamatát, ami befolyásolja a betegek klinikai állapotának kimenetelét. Ezt a feltevést támasztja alá a miRNS-ek és a vizsgálatunk során a betegek patológiai grádusa között megfigyelt statisztikai összefüggés is.

Az eredményeinket összehasonlítva az irodalomban korábbi, már jól megalapozott eredményekkel, arra a következtetésre jutottunk, hogy a tanulmányunkba vizsgált miRNS-eknek tumorsuppresszor szerepe lehet.

Összességében ez a vizsgálat sikeres volt a hsa-miR-15b-5p, a hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-181a-5p expressziójának elemzésében. Ezen miRNS-ek downregulációja arra utal, hogy szerepet játszanak az angiogenezishez kapcsolódó célmolekulák upregulációjában, így hozzájárulva a folyamat epigenetikai szabályozásához. A kóros állapot és a vizsgált miRNS-ek expressziója közötti statisztikailag szignifikáns negatív korreláció arra utal, hogy az RCC kialakulásának kóros folyamatában mindhárom vizsgált miRNS szerepet játszhat. A három miRNS-adatbázisban közös célpontok átfogó keresésével adathalmazt hoztunk létre a potenciális angiogenezishez kapcsolódó célgénekről, és egyes célpontokat illetően meghatároztuk lehetséges szerepüket az RCC angiogenezisében. Feltételezzük, hogy ez a tanulmány segített rámutatni a hsa-miR-15b-5p, a hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-181a-5p lehetséges szerepére az RCC angiogenezisének mechanizmusában. Minden bizonnyal mindenképpen szükség van olyan további, a specifikus miRNS-eket érintő és validáló kísérletes

és funkcionális vizsgálatokra, amelyek azok angiogén célpontjait vizsgálják. A jövőbeli kísérletek a miRNS-célmolekula kölcsönhatásokat is tovább tisztázhatják, így például a TIMP-ek szerepét az angiogenezis folyamatában.

A vesedaganatok terápiájában igen fontos lehet a vesedaganatok kialakulásában szerepet játszó jelátviteli útvonalakban, az *in vitro* kezelések hatására bekövetkező változások tanulmányozása, újabb lehetséges terápiás célpontok keresése.

Ahogy már korábban többször is említésre került, a vesesejtes karcinóma (RCC) előfordulása világszerte növekszik. Egészen a közelmúltig, az RCC igen nagy kihívást jelentő betegség volt a korlátozott terápiás lehetőségek miatt [1, 34]. A betegek nagy csoportja a hagyományos kemoterápiás szerekkel és sugárterápiás terápiákkal szembeni rezisztenciában szenved [1, 8, 9]. Azonban vannak olyan újonnan felfedezett molekulák, amelyek a jövőben rendkívül hatékonyak lehetnek a veserák kezelésében [8, 9, 12-14]. Számos természetes, alacsony toxicitású növényi kivonat, köztük a kurkumin és a shikonin, *in vitro* gátolja a jelátviteli útvonalak indukálásával vagy elnyomásával a tumoros sejtek növekedését [29, 125]. Egyes tanulmányok azt mutatják, hogy a shikonin dózis- és időfüggő módon gátolta a limfoblaszt sejtvonalak (K562) proliferációját. A shikoninról és származékairól kimutatták, hogy számos daganat típusban antiproliferatív és proapoptotikus hatást fejtenek ki, beleértve a glioblasztómát, a 180-as szarkómát (S-180), a gyomorrákot, a vastagbél adenokarcinómát és a szájüregi daganatos elváltozásokat [12, 28, 126, 127]. A korábbi eredményeket is figyelembe véve, a shikoninnal a humán vesedaganat sejteken végzett vizsgálatokat a sejtproliferáció gátlás, valamint az apoptózis indukálására kifejtett hatásának tanulmányozása érdekében végeztük [76, 128]. A shikonin a sejtproliferáció szignifikáns gátlását 2,5 μM *in vitro* koncentrációnál mutatta. A szer dózisfüggő sejtproliferáció-gátlást fejtett ki mindkét vizsgált sejtvonalon, és ezek az eredmények összhangban vannak a szakirodalomban leírtakkal is. Markowitsch és mtsai (2022) tanulmánya szerint a shikonin sejtproliferációra gyakorolt hatása kevésbé volt kifejezett, de a növekedés gátlásában a dózisfüggő lefolyást követte a terápiára érzékeny és a terápiára rezisztens CAKI-1, 786-O, valamint a KTCTL-26 és az A-498 RCC sejtek esetében [129]. A shikoninnal történő kezelés a prosztata karcinóma sejtek dózisfüggő proliferációjának csökkenését is eredményezte [130]. Hasonlóképpen, a shikonin dózisfüggő proliferáció-gátlása nyilvánvaló volt a glióma sejteken és az MCF-7 emlőrák sejtvonalon is [27, 129, 131].

Korábban nem volt bizonyíték a shikonin daganatos sejtek proliferációjára kifejtett hatásának mögöttes mechanizmusára. Jelen tanulmányunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a shikonin mögött meghúzódó molekuláris mechanizmusokat és hatásait. Ebből a célból a

shikonin hatására a fő multidrog transzporterek expressziójában bekövetkező változásokat is megfigyeltük. Érdekes megjegyezni, hogy úgy a BCRP1, mint az ABCC6 szignifikáns csökkenést mutatott a shikoninnal kezelt A-498 sejtekben közvetlenül a 24 órás inkubáció után. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy a shikonin az ABC transzporter expressziójának gátlásával fokozza a daganatellenes hatásokat. Ezen MDR gének növekvő expressziója hozzájárulhat néhány más gyógyszer daganatellenes hatásához, vagy magyarázatot adhat arra, hogy a shikonin miért léphet túl a sejtek sunitinib-rezisztenciáján, amelyet Markowitsch és munkatársai (2022) is már korábban leírtak [129]. Az ABCC6 transzporter hiányának valószínűleg genetikai háttere is van a CAKI-2 sejtekben, ami egyben okozhatja ennek a sejtvonalnak az A-498 sejtvonaltól mutatott eltérő viselkedését a shikonin kezelés és más terápiás gyógyszerek hatására. Az A-498 sejtvonalban igazolt ABCC6 aktivitás magyarázatot adhat a shikoninnal kezelt sejtek hosszabb túlélésére, valamint a szer apoptotikus hatásának növekedésére [132, 133]. Az ABCB5 multidrog transzporter expressziója a shikonin kezelés hatására mindkét sejtvonalban csökkent. Ez a transzporter szabályozza azt a gyógyszereffluxot, amely kemorezisztenciát biztosít a humán vesedaganatos sejtek esetében [134].

A shikonin sokkal alacsonyabb koncentrációban gátolja a vesedaganatos sejtek telepképződését, mint a sunitinib. Korábbi tanulmányok azt találták, hogy a shikonin apoptotikus sejthalált indukál különféle tumoros megbetegedések esetén, amelyek több, specifikus, célpontot érintenek [25, 30]. Leukémiában, húgyhólyag- és méhnyakrákban végzett vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a shikonin apoptózist indukálhat a kaszpáz-3 aktiválásával, ami az általunk végzett kísérletek során is igazolódott [76, 128]. A shikonin gátolja a topoizomeráz II és az NF- κ B aktivitását, amelyek potenciális célpontok lehetnek a kemoterápiában. Igen figyelemreméltó, hogy a shikonin tumorelles aktivitását az antiapoptotikus fehérjék, köztük a Bcl-2 és a Bcl-xL upregulációja követte. Feltehetőleg ez a szer mindenekelőtt a Bcl-2 működését gátolja, majd felszabadítja a citokróm-c-t, ami a kaszpáz-3 és a kaszpáz-7 aktiválása révén apoptózishoz vezet [135]. Számos más tanulmány is igazolta, hogy a shikonin által kiváltott apoptózis a kaszpáz-3 és a PARP aktiválódásával járt együtt, ami végül apoptózist eredményezett [29]. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a shikonin hatására az MCF-7 és HeLa sejtekben bekövetkező kaszpáz-3 aktiváció és a PARP hasítása alátámasztja az A-498 és CAKI-2 sejtekben ezzel kapcsolatban kapott eredményeinket is [29, 131].

Jelen tanulmányunkban a sejtproliferációs vizsgálat eredményei és a kaszpáz-3-aktivitás mérése alapján kimutattuk, hogy a shikonin in vitro apoptózist indukált a humán CAKI-2 és A-498 vesetumoros sejtekben. A shikonin azonban erősebb hatást fejt ki az A-498-ra, mint a

CAKI-2 sejtekre. A shikonin jelentősen fokozza daganatellenes hatását az NF- κ B - Bcl-2 és ezen génekhez kapcsolódó útvonalak modulálásával [31].

A P53 fehérje tumorokban általában nagyon alacsony szintű expresszióval rendelkezik, vagy egyáltalán nem mutatható ki. Funkciója van a sejtciklus szabályozásában, a gyógyszer-rezisztenciában és az apoptózisban. A vad típusú p53 a sejtciklus szabályozásában részt vevő gének transzkripciós szabályozójaként működik; azonban a mutáns p53 „előnyösebb” viselkedést mutat a sejtekben hypoxiás körülmények között, ugyanis a mutáns p53-mal rendelkező tumorsejtek hosszabb ideig képesek fenntartani a sejtproliferációt [136]. Vizsgálatainkban a p53 expressziójának szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető a CAKI-2 sejtekben ($p < 0,05$) közvetlenül a 24 órás shikonin kezelés után. Az A-498 sejtek azonban enyhe csökkenést mutattak a p53 expressziójában 24 órás shikoninnal végzett inkubációt követően, míg a 72 órás kezelés a p53 gén expressziójának ~ háromszoros növekedését váltotta ki ($p < 0,05$), összehasonlítva a kontroll sejtekkel. A p53 változásaira a CAKI-2 és A-498 sejtekben a shikoninnal való inkubáció után az lehet a magyarázat, hogy a PI3K/AKT útvonalon az AKT szabályozza a p53 expresszióját. A PI3K közvetíti az AKT aktiválását a Thr308-on és a Ser473-on a piruvát-dehidrogenáz kináz 1 (PDK1) és a PDK2 foszforilációján keresztül, majd a továbbiakban a P53 fehérje szabályozza a Bcl-2 fehérjecsald szintjét és állapotát. A proapoptotikus és antiapoptotikus Bcl-2 család fehérjék szintje közötti egyensúly pedig pozitívan szabályozza a további proapoptotikus faktorok felszabadulását a mitokondriumokból, melyek felszabadulása után a citokrom-c először a kaszpáz-9-et, majd a kaszpáz-3-at, -6-ot és -7-et is aktiválja [76, 137].

A shikoninnal kezelt A-498 és CAKI-2 sejtekben az NF- κ B expressziójának nagymértékű csökkenésének oka (mRNS-szinten az NF- κ B nagyfokú csökkenése) egyik feltevés alapján az lehet, hogy a nem kezelt kontroll csoporthoz képest a shikonin indukálja a Ras/MAPK és PI3K/AKT jelátviteli útvonalakat. Normál sejtekben az NF- κ B aktiválása fokozza a célgének transzkripcióját. A daganatos sejtekben a különböző típusú molekuláris változások az NF- κ B aktiváció szabályozásának károsodását eredményezhetik. Egyes esetekben az NF- κ B elveszti indukálhatóságát és konstitutívan aktiválódik, ami az NF- κ B kontroll alatt álló gének deregulált expressziójához vezet [95].

A CAKI-2 és A-498 sejtvonalakban a kaszpáz-3 és -7 aktivitást figyeltük meg a kontroll sejtekkel szemben. Mivel a kaszpáz-dependens apoptózis a PARP hasításával függ össze, a PARP expressziós szintjét is vizsgáltuk a shikonin kezelést követően. A PARP szignifikánsan megnövekedett fehérje expressziót mutatott a kezelés után 24 órával, 48 óra elteltével pedig jelentősen nőtt. Hasonló eredményekről számoltak be Soon Yang és mtsai (2014) [76]. Ebből

arra következtethetünk, hogy a shikoninnak a CAKI-2 és A-498 humán daganatos sejtekkel szemben kifejtett daganatellenes aktivitását az antiapoptotikus fehérjék, köztük a Bcl-2, downreguláltságán keresztül közvetítheti. A Bcl-2 gátlása citokróm-c felszabadulását eredményezi, és a kaszpáz-3 és -7 aktiválása révén apoptózishoz vezet. Ez hozzájárulhat a p53 és NF- κ B gének proapoptotikus aktivitásához. Azonban a 48 órás shikoninnal kezelt A-498 és CAKI-2 sejtekben az NF- κ B mRNS expressziójának qRT-PCR-rel kimutatott gátlása azt jelzi, hogy a shikonin a kaszpáz-3 és -7 aktivációt indukál a mitogén protein kináz (MAPK) útvonal révén, ami dózisfüggő változásokat eredményezhet az NF- κ B és Bcl-2 apoptotikus génekben [138]. Feltételezzük, hogy a shikonin által kiváltott apoptózis a MAPK jelátvitelen keresztül is befolyásolhatja a sejtciklust [10].

A shikonin hatásának mögöttes jelátviteli mechanizmusok további tisztázása érdekében vizsgáltuk a shikonin hatását a PTEN/PI3K/AKT jelátviteli útvonal célpontjaira. A tirozin-kináz-gátlókat (TKI-ket) általában a veserák kezelésére használják; a gyógyszer-rezisztencia és a metasztatikus esetek azonban korlátozzák a TKI-k klinikai alkalmazását. A shikonin indukálhatja a PTEN/PI3K/AKT jelátviteli útvonalat specifikus célpontjain keresztül. Vizsgálatainkban a shikonin idő- és dózisfüggő módon csökkentette az A-498 és CAKI-2 sejtek proliferációját és elősegítette a sejtek apoptózisát. Ezenkívül a shikonin 48 órás inkubáció után intenzíven növelte a PI3K és p-AKT szintet a CAKI-2 sejtekben. Az A-498 sejtek növekvő tendenciát mutattak a PI3K esetében, de egyértelmű csökkenést mutattak ki a p-AKT fehérjék expressziójában. Az eredmények szerint a shikonin a legnagyobb valószínűséggel gátolja a CAKI-2 és A-498 proliferációt és migrációt a PTEN/PI3K/AKT útvonal célpontjaira hatva, ezáltal feltárva a shikonin lehetséges terápiás célpontjait és arra kifejtett hatásait a vesetumorok esetleges terápiájában. A shikonin PTEN/PI3K/AKT útvonalra gyakorolt hatásának hasonló viselkedését Yu Chen és mtsai (2018) írták le egy krónikus myeloid leukemia (CML)-sejtekkel foglalkozó tanulmányban [139].

A PTEN egy multifunkcionális tumorszuppresszor, amely általában elvész a humán tumorok fejlődése során. A 24, 48 és 72 órás 5 μ M shikoninnal végzett inkubáció esetén a PTEN fehérje expressziója szignifikáns csökkenést mutatott úgy a CAKI-2, mint az A-498 sejtvonalban, majd enyhe növekedés jelentkezett a PTEN expressziójában a kezeletlen sejtekhez képest. A Western blot analízis fehérjeszinten is igazolta eredményeinket. A PTEN valószínűleg negatív hatással van a foszfátidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát intracelluláris szintjének szabályozására a sejtekben, és tumorszuppresszorként működik az AKT/PKB jelátviteli útvonal negatív szabályozásával, így kulcsszerepet játszik a shikonin- indukált apoptózisban.

A PTEN szint emellett inaktiválta a PI3K/AKT jelátviteli útvonalat, majd ezt követően a Bcl-2 és Bax szintjét is downregulálta a CAKI-2 és A-498 sejtekben. Az extracelluláris mátrix fehérjék, például a CXCR4, az MMP-9 és az E-kadherin egyértelmű csökkenése arra utalhat, hogy az apoptotikus és gátló hatás mellett a shikonin valószínűleg blokkolhatja a sejtmigrációt. A CXCR4/sztróma sejtéből származó 1-es faktor (CXCR4/Stromal cell-Derived Factor 1 (SDF-1)) által képzett jelátviteli szabályozó tengelyen keresztül a shikonin jelentősen gátolja a vesetumoros sejtek proliferációját és elősegíti az apoptózist, nagyon hasonló módon, mint ahogyan ez történik a krónikus myeloid leukémiás (CML) betegekből izolált sejtek esetén [139].

A p-ERK expressziós szintjének szignifikáns csökkenése az ERK teljes fehérje expressziós szintjéhez képest az A-498 és CAKI-2 sejtek 5 μ M sikoninnal történő 48 órás kezelést követően arra utalhat, hogy a shikonin ezen fehérjék foszforilációját időfüggő módon csökkentheti [29, 138].

A MAPK által történő jelátvitel és a mitokondriális apoptotikus útvonalak szabályozása bizonyos onkogén miRNS-ek jelenlétét is magukba foglalhatják. Az irodalom alapján a miR-21 részt vesz a karcinogenezis valamennyi fázisában, beleértve az iniciációt, a promóciót, a progressziót és a metasztázisokat. Tanulmányok kimutatták, hogy az upregulált miR-21 a MAPK jelátviteli útvonalán keresztül képes indukálni a reaktív oxigén szintetáz (reactive oxygen synthetase: ROS) termelődését, és részt vesz a kemoterápiás szerekekkel szembeni rezisztencia kialakulásában is [140].

Az emlő-, prosztata- és hepatocelluláris karcinómában azt találták, hogy a miR-21 a PTEN által szabályozza a migrációt és sejtinváziót [100]. A miRNS-ekkel kapcsolatos eredményeink arra utalnak, hogy a MAPK nem közvetlen célpontja a miR-21-nek a shikonin által kiváltott apoptózisban. Ha a miR-21 expressziós mintázatát a PTEN expressziójával együttesen értékeljük, arra a következtetésre juthatunk, hogy a miR-21 valószínűleg nem tartozik azon miRNS-szabályozók közé, amelyek sejtmigrációt és sejtinváziót okozhatnak a PTEN tumorszuppresszor gént célozva [100].

A miR-155 az egyik legjelentősebb miRNS, olyan létfontosságú szabályozó tényező, amely számos fiziológiai folyamatban vesz részt, beleértve a hematopoietikus vonal differenciálódását, az immunválaszt és a gyulladási folyamatokat. A miRNS-profil célzó vizsgálatok azt mutatják, hogy a miR-155 szintje a humán rákos megbetegedések különböző típusaiban inkább upregulált, és rossz túlélési aránnyal jár, ezért onkogén miRNS-ként működik [101]. Bár a miR-21 és miR-155 egy erős onkogén miRNS-ek, egyik sem lehet közvetlen célpontja a MAPK jelátviteli útvonalának a shikonin által kiváltott patológiai folyamatban. A

miR-155 és a miR-21 viszonylag állandó szintje a shikoninnal kezelt sejtekben arra enged következtetni, hogy úgy a CAKI-2, mint az A-498 sejtek erős genetikailag szerzett gyógyszer-rezisztenciával rendelkeznek, ami valószínűleg magyarázat lehet a sejtek magas TKI-rezisztencia jellegű viselkedésére. Ezt a feltevést néhány korábbi irodalom is már megerősítette, amelyek szerint az erősen expresszálandó miR-155 és a szerzett gyógyszer-rezisztencia szoros összefüggését figyelték meg számos humán daganattípusban, beleértve az emlőkarcinómát, a B-sejtes limfómát, a vastagbél-, a tüdő-, a prosztata- és a méhnyakrákot is [141].

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a shikonin úgy a PI3K/AKT, mint a RAS/MAPK jelátviteli útvonalat indukálja azáltal, hogy szabályozza a jelátviteli útvonalak specifikus célpontjait, valószínűleg a CXCR4/SDF-1 jelátviteli tengelyen keresztül. A miRNS expressziós analízis eredményei arra engednek következtetni, hogy a miR-21-nek és a miR-155-nek jelen esetben nincs szignifikáns szerepe a vizsgált humán vesedaganat sejtekben a shikonin által szabályozott útvonalban, és itt ebben az esetben ezen miR-ek nem nyilvánvaló epigenetikai szabályozói a shikonin által kiváltott apoptózisnak. Ugyanakkor más típusú humán vesedaganat sejtek reakciója a szerre valószínűleg eltérő lehet, valamint további, általunk nem vizsgált, de onkogén jelleggel bíró miRNS-ek is részesei lehetnek a shikonin által szabályozott útvonalaknak. Ezen megfontolások viszont további vizsgálatok, kísérletek elvégzését igénylik. Érdekes módon számos, az apoptózist szabályozó miRNS-ről kimutatták, hogy befolyásolják a tumorok kialakulását. Az apoptózis szabályozásának általános folyamatában korábbi szakirodalmak elsősorban a miR-15b-t, a miR-16-ot és a miR-17b-t említik [142]. Azt is meg kell jegyeznünk, hogy a vesesejtes karcinóma patofiziológiája elsősorban a von Hippel-Lindau/hypoxia-indukálható 1- α faktor (VHL/HIF) jelátviteli útvonalon alapul. Mind a VHL, mind a HIF-1 α génekről kimutatták, hogy a miR-17-5p közvetlen célpontjai lehetnek vesetumorokban. Ez tekinthető az egyik kiemelkedő miRNS-nek az apoptózis folyamatának szabályozásában. Ezenkívül a miR-138 a HIF-1 α -t célozza meg és gátolja annak expresszióját, ezáltal befolyásolja az apoptózist és a ccRCC sejtek migrációját is [48]. A miR-708, amelyet RCC tumorszuppresszorként is leírtak, fontos szerepet játszik a sejtnövekedésben, a klónozhatóságban, az invázióban, a migrációban és az apoptózisban egyaránt [143].

Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a shikonin egyben erős antiproliferatív és apoptotikus hatással rendelkezik. Tanulmányunk lényegében bizonyítja, hogy a shikonin potenciálisan rákellenes és antiangiogén gyógyszerként továbbfejleszhető a vesetumorok terápiájában. Nevezetesen, a shikonin rendkívül magas citotoxicitást fejt ki a vesetumoros sejteken, de rendkívül alacsony citotoxicitást mutatott olyan humán normál hámsejteken, mint például a nazális epithelium [12, 29]. Mindezek alapján feltehetőleg a jövőben a shikonin és

származékai kiváló gyógyszerjelöltnek tekinthetők az elsődleges és áttétes tumorok, akár a veserák kezelésében. Figyelemre méltó az is, hogy a shikonin új megközelítést kínálhat az apoptózis által közvetített gyógyszer-rezisztencia leküzdésére a humán vesetumoros sejtekben. Korábbi tanulmányok szerint a shikonin RGD-módosított (arginin-glicin-aszparaginsav tripeptid) liposzómális formában történő alkalmazása hatékony stratégiát jelenthet az emlőrák elleni terápiában, és valószínűleg más tumorok esetében is [12]. A shikonin ezen tulajdonsága is azt sugallja, hogy a jövőben a shikonin más kemoterápiás szerekkel kombinálva hatékony terápiás lehetőséget kínál a különböző humán daganatok, és így akár vesetumorok kezelésére egyaránt [14].

Végezetül szeretném összegezni a munkám lényegét. A munkám egy részében betegmintákkal, azaz vesetumoros betegekből származó tumoros és ép szövetmintákkal foglalkoztam. Vizsgálataim során a vesetumoros minták és azok ép párjaiban sikerült igazolni, hogy a vizsgált miRNS-eknek a vesetumorokat illetően diagnosztikai és prognosztikai szerepük lehet. A jövőben tervezett humán szérum mintákkal végzett kísérletek pedig még inkább növelik ezen kísérletes eredmények értékét. Az *in vitro* sejtes vizsgálatokkal kapott eredményeink mindenképpen rávilágítottak egy növényi eredetű szer, pontosabban a shikonin terápiában esetlegesen betöltött szerepére, melynek a sejtproliferácót gátló és apoptózist kiváltó hatásán túl akár angiogenezist gátló szerepe is lehet. Talán további nanotechnológiai fejlesztések lehetővé tennék a shikonin megfelelő gyógyszermolekulává történő fejlesztését akár mono- vagy kombinált terápiás alkalmazásban.

Itt érdemes megemlíteni, hogy a szer angiogenezist gátló hatására irányuló ko-kultúras (a HUVEC sejtvonallal együtt kialakított ko-kultúra) *in vitro*, valamint *in vivo* kísérletek elvégzése mindenképpen fontos.

Összességében véve, remélem, hogy ezen tudományos munkával bizonyos mértékben sikerül hozzájárulni a vesetumorok időben történő diagnosztikai továbbfejlesztéséhez és a célzott, akár személyre szabott terápia fontosságának megértéséhez egyaránt.

VII. Új megállapítások

- A hsa-miR-15b, a hsa-miR-99b, valamint a hsa-miR-181a alacsonyabb expressziót mutat a tumoros mintákban, továbbá ezen miRNS-ek expressziójának mértéke összefügg a tumoros minták patológiai grádusával.
- A hsa-miR-15b, a hsa-miR-99b és a hsa-miR-181a angiogenezisben potenciálisan résztvevő targetjeit in silico adatbáziselemzéssel azonosítottuk.
- Megfigyeltük az ANG, a VEGF és a HIF-1 α emelkedését a tumoros mintákban, továbbá a VEGF receptorai közül a VEGFR-1 és a VEGFR-3 emelkedett expresszióját.
- Megállapítottuk továbbá, hogy a VEGF és a HIF-1 α erősebb expressziót mutat a daganatos szövetekben a patológiai grádus előrehaladásával.
- Az MMP-9/MMP-2 és TIMP-1/TIMP-2 ko-expresszióját figyeltük meg, melyek szerepet játszhatnak a tumorok vaszkularizálásában.
- A már terápiában alkalmazott sunitinibhez hasonlóan, in vitro a shikonin a sunitinibbel ellentétben jóval alacsonyabb koncentrációban fejt ki tirozin-kináz inhibitor szereppel bíró hatását.
- A shikonin sokkal alacsonyabb koncentrációban gátolja a vesedaganatos sejtek telepépződését, mint a sunitinib.
- A shikonin jelentősen fokozza daganatellenes hatását az NF- κ B, a Bcl-2, valamint ezen génekhez kapcsolódó útvonalak modulálásával.
- A shikonin az apoptózisra kifejtett hatását a PI3K/AKT és MAPK útvonalak szabályozásán keresztül éri el.
- A shikonin az extracelluláris mátrix fehérjék (CXCR4, MMP-2/-9, E-kadherin) expressziójának csökkentése révén gátolja a sejtek invázióját.
- Megfigyelésünk szerint a shikonin kezelés eredményesen csökkenti egyes multidrog transzporterek expresszióját, ezáltal jelentős szerepe lehet a kialakult gyógyszerrezisztencia „áthidalásában”.

VIII. Összegzés

Munkánk során a vesetumorok kialakulásában szerepet játszó egyes epigenetikai faktorok (miRNS-ek) expressziós mintázatát vizsgáltuk a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumorra diagnosztizált betegek mintáin. A hsa-miR-15b, a hsa-miR-99b valamint a hsa-miR-181a expressziós szintjeit vizsgálva nemcsak azt figyeltük meg, hogy a tumoros szövetminták szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszálják az említett miRNS-eket, hanem azt is, hogy ezen miRNS-ek expressziójának mértéke összefügg a tumoros minták patológiai grádusával. Számos miRNS kapcsolódik az RCC tumorképződésében részt vevő molekuláris jelátviteli útvonalak szabályozásához, mely miRNS-ek alapot szolgáltathatnak az RCC terápiájához, mivel képesek kiegyensúlyozni a pro- és antiangiogén folyamatokat, és képesek szabályozni az angiogenezis egyes lépéseit. A hsa-miR-15b, a hsa-miR-99b és a hsa-miR-181a angiogenezisben potenciálisan szerepet vállaló célmolekuláit *in silico* adatbáziselemzéssel azonosítottuk. A célpontok expressziós szintjeit qRT-PCR-al vizsgálva megfigyeltük az ANG, a VEGF és a HIF-1 α emelkedését a tumoros mintákban, továbbá a VEGF receptorai közül a VEGFR-1 és a VEGFR-3 is növekedett expressziót mutatott. Megállapítottuk továbbá, hogy a VEGF és a HIF-1 α erősebb expressziót mutat a daganatos szövetekben a patológiai grádus előrehaladásával. A mátrix metalloproteinázok és inhibitorai közül az MMP-9/MMP-2 és TIMP-1/TIMP-2 ko-expresszióját figyeltük meg, melyek szerepet játszhatnak a tumorok vaszkularizálásában. A metasztatikus vesedaganatok terápiáját érintően vizsgáltuk egy természetes hatóanyag, a shikonin sejtproliferációra és apoptózisra kifejtett hatását humán vesedaganat sejtvonalakon. A shikonin a már terápiában alkalmazott sunitinibhez hasonlóan tirozin-kináz inhibitoroként fejt ki hatását, és mint az a vizsgálatainkból kiderült, a sunitinibbel ellentétben jóval alacsonyabb koncentrációban is hatásos. Az apoptózisra kifejtett hatását a PI3K/AKT és MAPK útvonalak szabályozásán keresztül fejt ki, az extracelluláris mátrix fehérjék (CXCR4, MMP-2/-9, E-kadherin) expressziójának csökkentése révén pedig gátolja a sejtek invázióját. Megfigyelésünk szerint a shikonin kezelés eredményesen csökkenti egyes multidrog transzporterek expresszióját, ezáltal jelentős szerepe lehet a kialakult gyógyszer-rezisztencia ellen.

Remélhetőleg eredményeink a jövőben jelentősen hozzájárulnak az vesedaganatok korai diagnosztikájának felállításához, a szükséges biomarkerek vagy akár angiogén markerek időben történő azonosításához, továbbá az *in vitro* kísérleteink alapján eredményes hatóanyagként bizonyult shikonin fontos szerepet kaphat a jövőben elsősorban kombinált-, de akár monoterápiás alkalmazásként is.

IX. Summary

In the course of our work, we investigated the expression pattern of certain epigenetic factors (miRNAs) that might play a role in the development of kidney tumors in the samples of patients diagnosed with kidney tumors at the Urology Clinic of the University of Debrecen. Examining the expression levels of hsa-miR-15b, hsa-miR-99b and hsa-miR-181a, we not only observed that the tumorous tissue samples express the mentioned miRNAs at a significantly lower level, but we also could see that the level of expression is related to the pathological grade of the tumorous samples. Several miRNAs are related to the regulation of molecular signaling pathways involved in RCC tumorigenesis, which miRNAs can provide a basis for RCC therapy, as they can balance pro- and antiangiogenic processes and regulate individual steps of angiogenesis. Targets of hsa-miR-15b, hsa-miR-99b and hsa-miR-181a potentially involved in angiogenesis were identified by in silico database analysis. Examining the expression levels of the targets by qRT-PCR, we observed an increase in the expression of ANG, VEGF and HIF-1 α in the tumorous samples, and among the VEGF receptors, VEGFR-1 and VEGFR-3 also showed increased expression. We also found that VEGF and HIF-1 α show stronger expression in tumorous tissues as the pathological grade progresses. Among matrix metalloproteinases and their inhibitors, we observed the co-expression of MMP-9/MMP-2 and TIMP-1/TIMP-2, which may play a role in tumor vascularization.

Regarding the therapy of metastatic kidney tumors, we investigated the effect of a natural active ingredient, shikonin, on cell proliferation and apoptosis in human kidney tumor cell lines. Similarly to sunitinib, which is already used in therapy, shikonin exerts its effect as a tyrosine kinase inhibitor, and as it turned out from our studies, unlike sunitinib, it is also effective at a much lower concentration. It exerts its effect on apoptosis through the regulation of the PI3K/AKT and MAPK pathways, and by reducing the expression of specific extracellular matrix proteins (CXCR4, MMP-2/-9, E-cadherin) that may inhibit cell invasion. We have observed that shikonin treatment effectively reduces the expression of some multidrug transporters, thus it can play a significant role against existing drug resistance.

It is hoped that our results will contribute to the identification of biomarkers necessary for the early diagnosis of kidney tumors, and shikonin, which has proven to be an effective active ingredient based on our in vitro experiments, may play an important role as a therapeutic application in the future (whether used as a monotherapeutic or combination therapy agent).

X. Mellékletek

1. Melléklet: Az RT-PCR protokollja

Sorszám	Összemért reagensok	Mennyiség
1.	Totál RNS	n μ l (mintánként eltér)
2.	Primer: Random Hexamer	1 μ l
3.	10mM dNTP mix	1 μ l
4.	5x RT puffer	4 μ l
5.	RiboSafe RNáz Inhibitor	1 μ l
6.	Tetro Reverz Transzkriptáz	1 μ l
7.	DEPC-kezelt víz	20 - (n+8) μ l
Végtérfogat	Összes reagens	20 μ l

2. Melléklet: A reverz transzkripcióhoz használt miRNS szekvenciák és primerek

miRNS	Érett miRNS szekvencia	Stem-loop primerek
hsa-miR-21-5p	<p style="text-align: center;">5' -</p> <p>UAGCUUAUCAGACUGAUGUUG</p> <p style="text-align: center;">A - 3'</p>	<p style="text-align: center;">5' -</p> <p>GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA</p> <p style="text-align: center;">TTCGCACCAGAGCCAAC TCAACA - 3'</p>
hsa-miR-155-5p	<p style="text-align: center;">5' -</p> <p>UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGG</p> <p style="text-align: center;">GU - 3'</p>	<p style="text-align: center;">5' -</p> <p>GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA</p> <p style="text-align: center;">TTCGCACCAGAGCCAAC ACCCCT - 3'</p>
hsa-RNU-43	<p style="text-align: center;">5' -</p> <p>GAACUUAUUGACGGGCGGACA</p> <p>GAAACUGUGUGCUGAUUGUCA</p> <p style="text-align: center;">CGUUCUGAUU - 3'</p>	<p style="text-align: center;">5' -</p> <p>GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTA</p> <p style="text-align: center;">TTCGCACCAGAGCCAAC AATCAG - 3'</p>

3. Melléklet: A qRT-PCR reakcióhoz használt primer szekvenciák a szövetekkel végzett vizsgálatokhoz

Primerek	Forward	Reverse
Timp-1	GGA GAG TGT CTG CGG ATA CTT C	GCA GGT AGT GAT GTG CAA GAG TC
Timp-2	ACC CTC TGT GAC TTC ATC GTG C	GGA GAT GTA GCA CGG GAT CAT G
Angiogenin	TGG CAA CAA GCG CAG CAT CAA G	GCA AGT GGT GAC CTG GAA AGA AG
MMP-2	TAC TGG ATC TAC TCA GCC AGC A	CTT CAG GTA ATA GGC ACC CTT G
MMP-9	GCC ACT ACT GTG CCT TTG AGT C	CCC TCA GAG AAT CGC CAG TAC T
VEGF	TTG CCT TGC TGC TCT ACC TCC A	GAT GGC AGT AGC TGC GCT GAT A
HIF-1α	ATC CAT GTG ACC ATG AGG AAA TG	TCG GCT AGT TAG GGT ACA CTT C
FGF-1	ATG GCA CAG TGG ATG GGA CAA G	TAA AAG CCC GTC GGT GTC CAT G
VEGFR-1	CTT TTA CCG AAT GCC ACC TC	ACA GCC CCG ACT CCT TAC TT
VEGFR-2	ACC CAC CCC CAG AAA TAA AA	CAT ACA CAA CCA GAG AGA CCA CA
VEGFR-3	GTC CTT TGG GGT GCT TCT CT	ATC CTT GTG CCG TCT CTC A

4. Melléklet: A qRT-PCR reakcióhoz használt primer szekvenciák a sejtekkel végzett vizsgálatokhoz

Primer	Forward	Reverse
NF-κB	5'-GCAAAGGGAACATTCGGATAT-3'	5'-GCGACTCACATGGAAATCTA-3'
p53	5'-CCTCAGCATCTTATCCTAGTGG-3'	5'-TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC-3'
MMP-2	5'-TACTGGATCTACTCAGCCAGCA-3'	5'-CTTCAGGTAATAGGCACCCTTG-3'
MMP-9	5'-GGGCTTAGATCATTCTCAGTG-3'	5'-GCCATTCACGTCGTCCTTAT-3'
E-cadherin	5'-GAAAGCGGCTGATACTGACC-3'	5'-CGTACATGTCAGCCGCTTC-3'
BCRP1	5'-GTTCTCAGCAGCTCTTCGGCTT-3'	5'-TCCTCCAGACACACCACGGATA-3'
ABCC6	5'-AGGCTTTCCTGCCCTTCCCAT-3'	5'-CCAGAGGAACTTGAGTCTACGAC-3'
ABCB1	5'-GCTGTCAAGGAAGCCAATGCCT-3'	5'-TGCAATGGCGATCCTCTGCTTC-3'
ABCB5	5'-TTTGCCTATGCGGCAGGGTTTC-3'	5'-CAAACGAGCGTTTCTCCGATGG-3'
GAPDH	5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3'

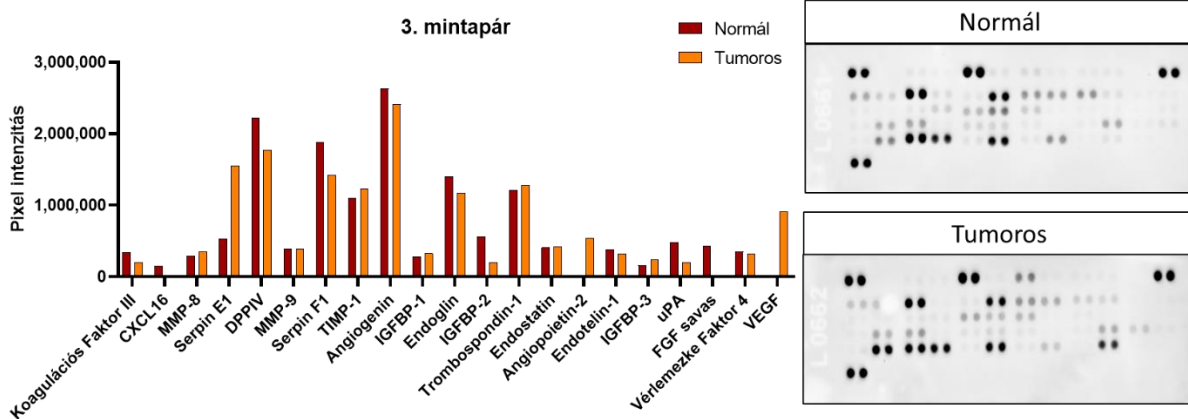
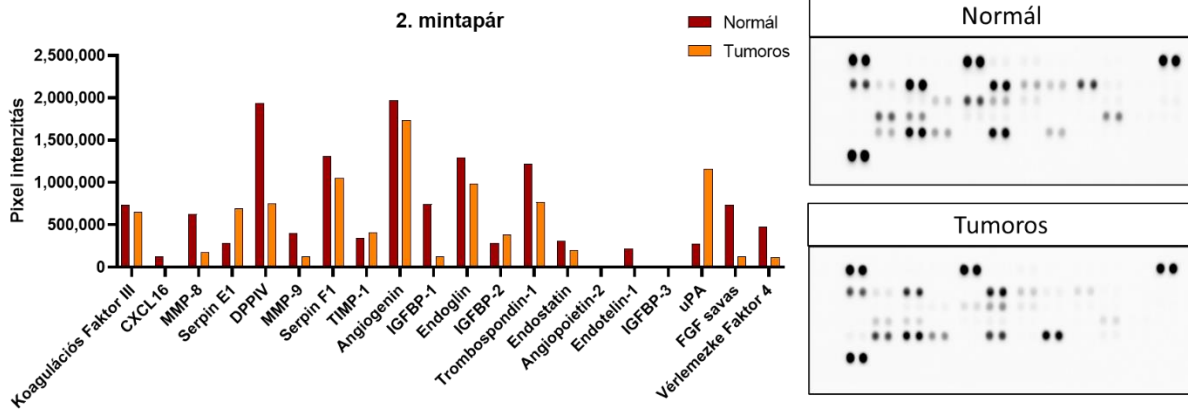
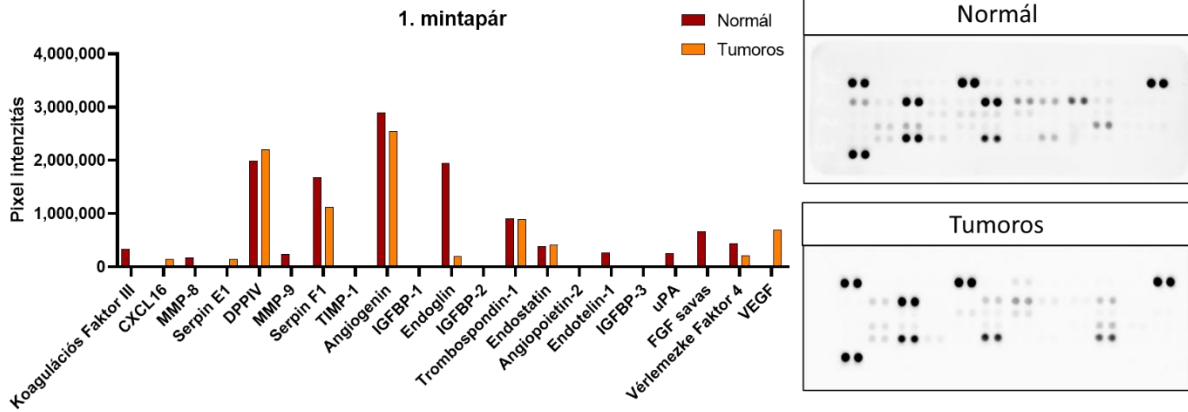
5. Melléklet: A Western blot kísérletekhez használt antitestek listája

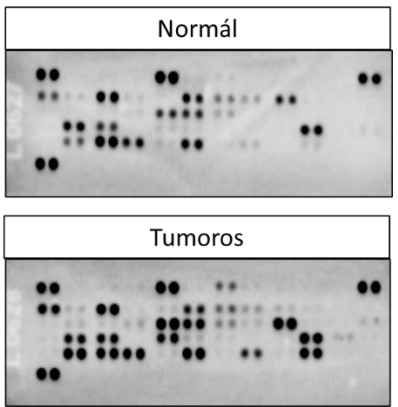
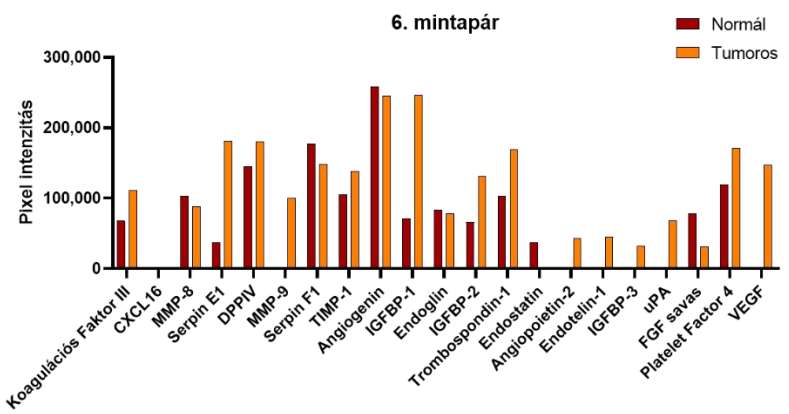
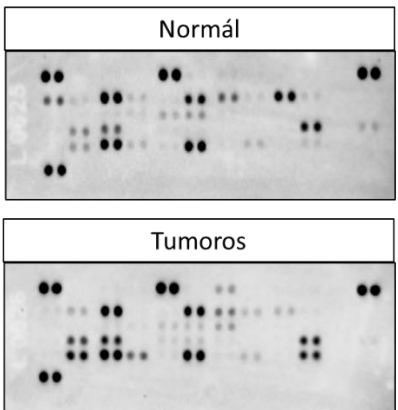
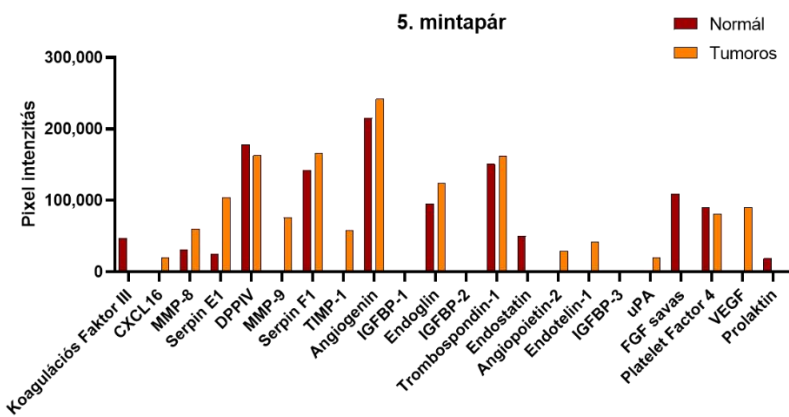
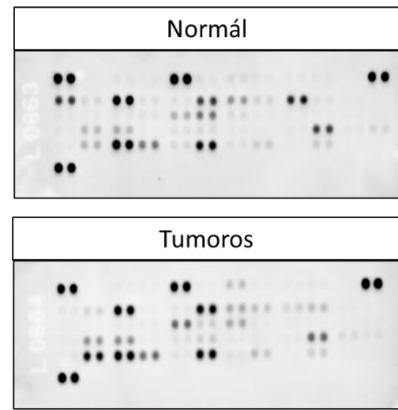
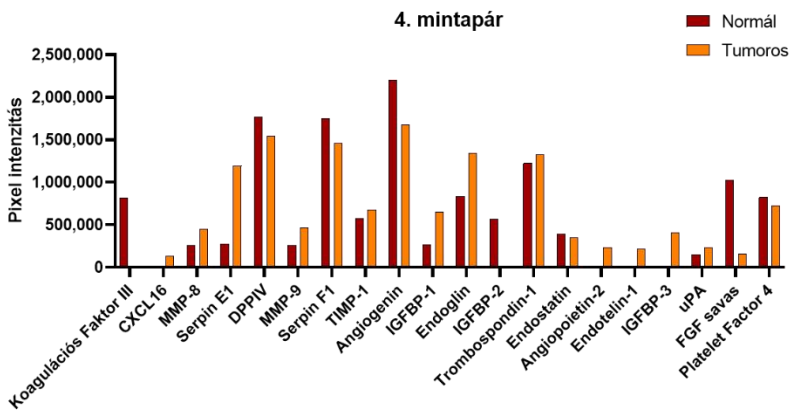
Antitest	Származás, katalógus szám	Alkalmazott hígítás
PARP (46D11) nyúl mAb	Cell Signalling, #9665	1:1000
NF-kappaB p65 (D14E12) XP nyúl mAb	Cell Signalling, #8242	1:1000
Bcl-2(D5568) nyúl mAb	Cell Signalling, #4223	1:1000
Bax (D2E11) nyúl mAb	Cell Signalling, #5023	1:1000
Phospho-p44/42MAPK (ERK1/2) Thr202/Tyr 204 nyúl mAb	Cell Signalling, #9101	1:1000
p44/42MAPK (ERK1/2) Thr202/Tyr 204 nyúl mAb	Cell Signalling, #9102	1:1000
AKT (pan) (11E7) nyúl mAb	Cell Signaling #4685S	1:1000
Phospho-AKT (S473) (D9E) nyúl mAb	Cell Signaling #4060S	1:1000
PI3K p110alpha (C73F8) nyúl mAb	Cell Signaling #4249S	1:1000
PTEN (D4.3) XP(R) nyúl mAb	Cell Signaling #9188L	1:1000
CXCR4 (771) nyúl mAb	Affinity Biosciences #AF5279	1:1000
Anti-HPRT HPRT1 (P00492) nyúl mAb	BOSTER Biological Technology #M00668	1:2000
Anti β -actin egér mAb	Sigma #A5316	1:2000

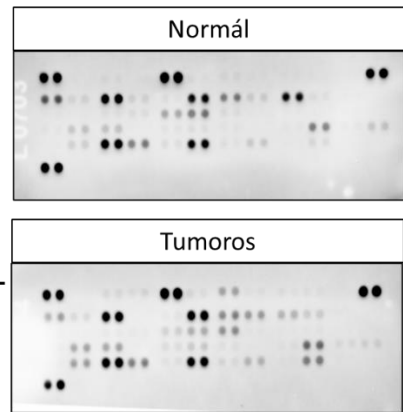
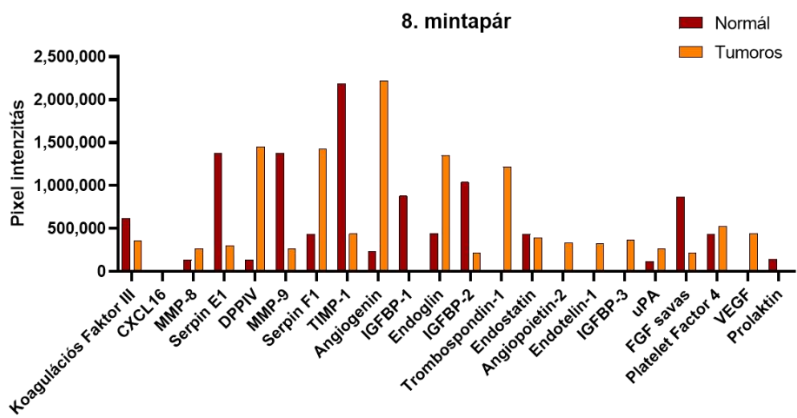
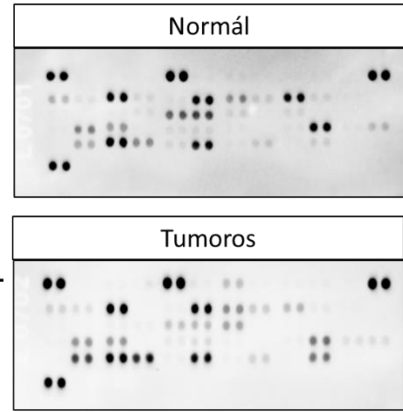
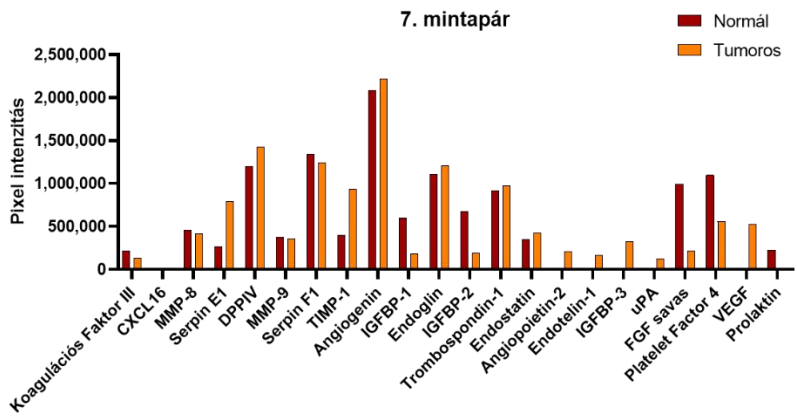
6. Melléklet: Az össze angiogenezishez kapcsolható célpont, melyeket az adatbázis elemzés során azonosítottunk

Adatbázis	miRDB	TargetScan	Tarbase
miRNS			
has-miR-15b-5p	FGF2, ATG14, EPHB2, RECK, SPRED1, APLN, AKT3, TMEM100, PTPN3, HIPK2, VEGFA, MYBL1, PLXNA4, SOCS6, HSPG2, AMOTL1, MEOX2, PCDH17, CLOCK, AMOT, PARVA, EGLN1, NRP2, PDE3B, TARBP2, CDK8, RSPO3, ACVR2B, FGF9, RGMA, RORA, E2F7, DLL4, HPSE2, FGF18, LATS2, SCUBE3, PPM1D, UNC5B, CD40, SAMD4A, GLCE, ADORA2A, PTPRM, EPHA1, VEGFD, PTPN14, NRARP, DCN, CXCR3, EFN2B, CAPN6, PIK3C2A, RNF213, HOXA3, FBXO22, MACC1, IDH3A, PTEN, MMP19, FGFR1, ACVR2A,	FGF2, ATG14, RECK, SPRED1, APLN, AKT3, TMEM100, PTPN3, HIPK2, VEGFA, MYBL1, PLXNA4, SOCS6, HSPG2, AMOTL1, MEOX2, PCDH17, CLOCK, AMOT, EGLN1, NRP2, PDE3B, CDK8, RSPO2, RSPO3, ACVR2A, ACVR2B, FGF9, FGF1, FGF18, RGMA, RORA, E2F7, DLL4, HPSE2, LATS2, SCUBE3, PPM1D, UNC5B, SAMD4A, GLCE, ADORA2A, PTPRM, EPHA1, VEGFA, NRARP, EFN2B, CAPN6, PIK3C2A, RNF213, HOXA3, MACC1, IDH3A, MMP24, FGFR1,	FGF2, RECK, SPRED1, PTPN3, HIPK2, VEGFA, MYBL1, PLXNA1, SOCS6, AMOTL1, ACVR2A, FGF9, LATS2, UNC5B, RNF213, ACVR1B, ADAMTS5, CXCL5, GFRA1, HGF, PDGFA, PDGFC, SERPINB9, TIMP3, AGO1, AKT3, AMOT, B4GALT1, E2F7, RORA, GLCE, FGFR1, S1PR1,
has-miR-99b-5p	FZD8, TIMP2, CTDSPL, MBNL1, AGO2, VEGFA,	FZD8, FZD5, VEGFA, CTDSPL, MBNL1, AGO2, FGFR3, TIMP2, RASGRP3,	MBNL1, AGO2, FGFR3, FGF5, VEGFA, ATP2B1, VEGFA, TIMP2, MMP7, MMP9, VCAN, TIMP2,
has-miR-181a-5p	S1PR1, PROX1, ACVR2B, ATP2B1, TGFBRI, UBPI, ADGRB3, AKT3, IL1A, KLF6, BCLAF1, HSP90B1, ETS1, IGF2BP2, B4GALT1, MYBL1, KDM5A, RORA, ADAMTS18, DCN, CNOT2, PBX3, TNS1, RASSF8, RECK, AKIRIN2, E2F7, ESM1, DEPTOR, PIK3R3, MAP3K2, METAP2, PSG9, MBNL1, SGK3, ITGB8, SERPINE1, MEF2A, HDAC9, SRPK2, TIMP3, HIPK1, MMP14, VCAN, GREM1, RIN2, VHL, ERO1A, PTEN, PF4V1, TGFBI, FLT1, CACNA2D2, PDPK1, CCN1, ANTXR1, SIRT1, ADM, HK2, ITGA6, HECW2, SPAG9, CLOCK, GPLD1, EGR3, SRSF10, CDK8, NAA15, JCAD, PIK3C2A, PAK4, PLG, PPP3CB, PDGFRA,	S1PR1, PROX1, ACVR2B, ATP2B1, TGFBRI, UBPI, AKT3, IL1A, KLF6, BCLAF1, HSP90B1, ETS1, IGF2BP2, B4GALT1, MYBL1, KDM5A, RORA, ADAMTS18, CNOT2, PBX3, TNS1, RECK, E2F7, ESM1, DEPTOR, PIK3R3, MAP3K2, METAP2, MBNL1, SGK3, ITGB8, SERPINE1, MEF2A, HDAC9, SRPK2, TIMP3, HIPK1, MMP14, VCAN, RIN2, VHL, PTEN, FLT1, CACNA2D2, PDPK1, SIRT1, ITGA6, HECW2, SPAG9, CLOCK, EGR3, SRSF10, CDK8, NAA15, PIK3C2A, PAK4, HGF, PDGFRA,	S1PR1, PROX1, ACVR2B, ATP2B1, UBPI, AKT3, IL1A, KLF6, HSP90B1, ETS1, B4GALT1, MYBL1, KDM5A, RORA, AKIRIN2, E2F7, PIK3R3, MAP3K2, MBNL1, SERPINE1, SRPK2, TIMP2, HIPK1, MMP14, PTEN, TGFBRI, FLT1, PDPK1, SIRT1, ADM, HK2, EGR3, AGO1, AMOT, AMOTL1, ANGPT2, PIK3C2A, PPP3CB, RECK, SPRED1, TIMP3, ITGB8, SPAG9,

7. Melléklet: Az angiogenesis array vizsgálat során detektált membránok







XI. Tárgyszavak

humán vesekarcinóma, human renal cancer

világossejtes vesekacinóma, clear cell renal cell carcinoma

mikroRNS-ek, microRNAs

hsa-miR-15b, hsa-miR-99b, hsa-miR-181a

angiogenezis, angiogenesis

természetes hatóanyag, natural products

onkogén, oncogene

tumorsuppresszor, tumorsuppressor

apoptózist érintő jelátviteli útvonalak, signaling pathways of apoptosis

XII. A kutatást támogató pályázatok

Köszönettel tartozunk pályázati támogatóinknak a munka anyagi támogatásáért:

- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (H.G.), Szív és érkeutatósi kiválóágközpont (IRONHEART)
- EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (H.G.)
- NKFIH-1150-6/219 (H.G.) Felsőoktatási Intézményi Kiválóági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- TKP2020-IKA-04 (H.G.), Felsőoktatási Intézményi Kiválóági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- A Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-4-I-DE-157 számú Új Nemzeti Kiválóág Programjának a nemzeti kutatási, fejlesztési és innovációs alapból finanszírozott szakmai támogatása

A projektek az Európai Unió támogatásával, a Magyar Állam és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

XIII. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabó Zsuzsannának, a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar munkatársának, hogy az évek alatt doktori munkámat fáradhatatlanul támogatta, motivált, tudást és segítséget biztosított számomra kísérleteim elvégzéséhez, eredményeim publikálásához és nem utolsósorban a disszertációm elkészítéséhez. Köszönet Dr. Szabó Erzsébetnek, aki szintén rengeteg szakmai támogatást nyújtott kutatásaim során. Köszönet illeti Dr. Flaskó Tibort, a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikájának igazgatóját és Dr. Szegedi Krisztiánt, akik a veseszövet minták gyűjtésében voltak a segítségünkre. Köszönettel tartozom Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikónak, a Debreceni Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományi Kar Dékánjának, aki anyagi támogatásaival járult hozzá kutatásaimhoz. Köszönettel tartozom Professzor Dr. Halmos Gábornak, aki biztosította számomra, hogy doktori munkámat a Biofarmácia Tanszéken végezhessem. Továbbá szeretném megköszönni a Biofarmácia Tanszék valamennyi munkatársának a támogatást.

XIV. Irodalom

1. Capitanio, U., et al., *Epidemiology of Renal Cell Carcinoma*. Eur Urol, 2019. **75**(1): p. 74-84.
2. Gu, L., et al., *MicroRNAs as prognostic molecular signatures in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 32545-60.
3. Li, H.C., et al., *Identification of angiogenesis-related miRNAs in a population of patients with renal clear cell carcinoma*. Oncol Rep, 2014. **32**(5): p. 2061-9.
4. Cui, L., et al., *MicroRNA-99a induces G1-phase cell cycle arrest and suppresses tumorigenicity in renal cell carcinoma*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 546.
5. Guillaume, Z., et al., *Renal Carcinoma and Angiogenesis: Therapeutic Target and Biomarkers of Response in Current Therapies*. Cancers (Basel), 2022. **14**(24).
6. Miller, C.P., et al., *A 3D Human Renal Cell Carcinoma-on-a-Chip for the Study of Tumor Angiogenesis*. Neoplasia, 2018. **20**(6): p. 610-620.
7. Yang, L., et al., *A Review of Recent Research on the Role of MicroRNAs in Renal Cancer*. Med Sci Monit, 2021. **27**: p. e930639.
8. Larkin, J.M. and T. Eisen, *Renal cell carcinoma and the use of sorafenib*. Ther Clin Risk Manag, 2006. **2**(1): p. 87-98.
9. Le Tourneau, C., E. Raymond, and S. Faivre, *Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST)*. Ther Clin Risk Manag, 2007. **3**(2): p. 341-8.
10. Piao, J.L., et al., *Excessive Oxidative Stress in the Synergistic Effects of Shikonin on the Hyperthermia-Induced Apoptosis*. Curr Mol Med, 2018. **18**(5): p. 322-334.
11. Ranieri, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic*. Curr Med Chem, 2006. **13**(16): p. 1845-57.
12. Boulos, J.C., et al., *Shikonin derivatives for cancer prevention and therapy*. Cancer Lett, 2019. **459**: p. 248-267.
13. Wang, H., et al., *Shikonin causes apoptosis by disrupting intracellular calcium homeostasis and mitochondrial function in human hepatoma cells*. Exp Ther Med, 2018. **15**(2): p. 1484-1492.
14. Wang, Z., et al., *Combination of shikonin with paclitaxel overcomes multidrug resistance in human ovarian carcinoma cells in a P-gp-independent manner through enhanced ROS generation*. Chin Med, 2019. **14**: p. 7.
15. Sun, C.Y., et al., *miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF*. Carcinogenesis, 2013. **34**(2): p. 426-35.
16. Sun, L.L., et al., *The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(10): p. 4568-4587.
17. Aveta, A., et al., *Urinary MicroRNAs as Biomarkers of Urological Cancers: A Systematic Review*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(13).
18. Zaravinos, A., et al., *New miRNA profiles accurately distinguish renal cell carcinomas and upper tract urothelial carcinomas from the normal kidney*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91646.
19. Redova, M., et al., *MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma*. Tumour Biol, 2013. **34**(1): p. 481-91.
20. Stubbs, C., et al., *A Study of Angiogenesis Markers in Patients with Renal Cell Carcinoma Undergoing Therapy with Sunitinib*. Anticancer Res, 2017. **37**(1): p. 253-259.
21. Salinas-Vera, Y.M., et al., *Angiomirs: MicroRNAs driving angiogenesis in cancer (Review)*. Int J Mol Med, 2019. **43**(2): p. 657-670.
22. Oliveira, R.C., et al., *Expression of micro-RNAs and genes related to angiogenesis in ccRCC and associations with tumor characteristics*. BMC Urol, 2017. **17**(1): p. 113.
23. Yadav, S., et al., *Review of Shikonin and Derivatives: Isolation, Chemistry, Biosynthesis, Pharmacology and Toxicology*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 905755.
24. Li, Y.L., et al., *Shikonin sensitizes wild-type EGFR NSCLC cells to erlotinib and gefitinib therapy*. Mol Med Rep, 2018. **18**(4): p. 3882-3890.

25. Gara, R.K., et al., *Shikonin selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through the endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic pathway*. J Biomed Sci, 2015. **22**(1): p. 26.
26. Su, Y., et al., *Shikonin-mediated up-regulation of miR-34a and miR-202 inhibits retinoblastoma proliferation*. Toxicol Res (Camb), 2018. **7**(5): p. 907-912.
27. Wei, Y., et al., *Shikonin Inhibits the Proliferation of Human Breast Cancer Cells by Reducing Tumor-Derived Exosomes*. Molecules, 2016. **21**(6).
28. Yang, J.T., et al., *An oxidative stress mechanism of shikonin in human glioma cells*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94180.
29. Liu, Y., et al., *Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019. **47**(1): p. 626-635.
30. Shan, Z.L., et al., *Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and c-Myc*. Mol Med Rep, 2017. **16**(3): p. 3055-3060.
31. Yang, Q., et al., *Shikonin promotes adriamycin-induced apoptosis by upregulating caspase-3 and caspase-8 in osteosarcoma*. Mol Med Rep, 2017. **16**(2): p. 1347-1352.
32. Zhang, A., et al., *miR-21 modulates cell apoptosis by targeting multiple genes in renal cell carcinoma*. Urology, 2011. **78**(2): p. 474.e13-9.
33. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
34. Bahadoram, S., et al., *Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment*. G Ital Nefrol, 2022. **39**(3).
35. Ljungberg, B., et al., *European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2022 Update*. Eur Urol, 2022. **82**(4): p. 399-410.
36. Hsieh, J.J., et al., *Renal cell carcinoma*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17009.
37. Capitanio, U. and F. Montorsi, *Renal cancer*. Lancet, 2016. **387**(10021): p. 894-906.
38. van Beijnum, J.R., et al., *Integrating Phenotypic Search and Phosphoproteomic Profiling of Active Kinases for Optimization of Drug Mixtures for RCC Treatment*. Cancers (Basel), 2020. **12**(9).
39. Cairns, P., *Renal cell carcinoma*. Cancer Biomark, 2010. **9**(1-6): p. 461-73.
40. Shuch, B., et al., *Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity*. Eur Urol, 2015. **67**(1): p. 85-97.
41. Linehan, W.M., et al., *The Metabolic Basis of Kidney Cancer*. Cancer Discov, 2019. **9**(8): p. 1006-1021.
42. Gherardi, E., et al., *Targeting MET in cancer: rationale and progress*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(2): p. 89-103.
43. Toro, J.R., et al., *Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(1): p. 95-106.
44. Grubb, R.L., 3rd, et al., *Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer*. J Urol, 2007. **177**(6): p. 2074-9; discussion 2079-80.
45. Pavlovich, C.P., et al., *Renal tumors in the Birt-Hogg-Dubé syndrome*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(12): p. 1542-52.
46. Hallscheidt, P., et al., *[Preoperative and palliative embolization of renal cell carcinomas: follow-up of 49 patients]*. Rofo, 2006. **178**(4): p. 391-9.
47. Redova, M., M. Svoboda, and O. Slaby, *MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **405**(2): p. 153-6.
48. Li, M., et al., *MicroRNAs in renal cell carcinoma: a systematic review of clinical implications (Review)*. Oncol Rep, 2015. **33**(4): p. 1571-8.
49. Gul, A. and B.I. Rini, *Adjuvant therapy in renal cell carcinoma*. Cancer, 2019. **125**(17): p. 2935-2944.

50. Posadas, E.M., S. Limvorasak, and R.A. Figlin, *Targeted therapies for renal cell carcinoma*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(8): p. 496-511.
51. Van Poppel, H., et al., *A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma*. Eur Urol, 2011. **59**(4): p. 543-52.
52. Mir, M.C., et al., *Partial Nephrectomy Versus Radical Nephrectomy for Clinical T1b and T2 Renal Tumors: A Systematic Review and Meta-analysis of Comparative Studies*. Eur Urol, 2017. **71**(4): p. 606-617.
53. Wagner, B., et al., *Prognostic value of renal vein and inferior vena cava involvement in renal cell carcinoma*. Eur Urol, 2009. **55**(2): p. 452-9.
54. Lay, A.H., et al., *Oncologic Efficacy of Radio Frequency Ablation for Small Renal Masses: Clear Cell vs Papillary Subtype*. J Urol, 2015. **194**(3): p. 653-7.
55. Kim, E.H., et al., *Comparison of laparoscopic and percutaneous cryoablation for treatment of renal masses*. Urology, 2014. **83**(5): p. 1081-7.
56. Ali, M., et al., *The Role of Stereotactic Ablative Body Radiotherapy in Renal Cell Carcinoma*. Eur Urol, 2022. **82**(6): p. 613-622.
57. Flanigan, R.C., et al., *Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis*. J Urol, 2004. **171**(3): p. 1071-6.
58. Alt, A.L., et al., *Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma*. Cancer, 2011. **117**(13): p. 2873-82.
59. Bracarda, S., et al., *Sunitinib administered on 2/1 schedule in patients with metastatic renal cell carcinoma: the RAINBOW analysis*. Ann Oncol, 2016. **27**(2): p. 366.
60. Bedke, J., et al., *Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma*. World J Urol, 2017. **35**(2): p. 179-188.
61. Kamli, H., L. Li, and G.C. Gobe, *Limitations to the Therapeutic Potential of Tyrosine Kinase Inhibitors and Alternative Therapies for Kidney Cancer*. Ochsner J, 2019. **19**(2): p. 138-151.
62. Battelli, C. and D.C. Cho, *mTOR inhibitors in renal cell carcinoma*. Therapy, 2011. **8**(4): p. 359-367.
63. Ross, K. and R.J. Jones, *Immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(21): p. 2627-2642.
64. Rassy, E., R. Flippot, and L. Albiges, *Tyrosine kinase inhibitors and immunotherapy combinations in renal cell carcinoma*. Ther Adv Med Oncol, 2020. **12**: p. 1758835920907504.
65. Massari, F., et al., *Metabolic alterations in renal cell carcinoma*. Cancer Treat Rev, 2015. **41**(9): p. 767-76.
66. Fresno Vara, J.A., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(2): p. 193-204.
67. Guo, H., et al., *The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma*. J Genet Genomics, 2015. **42**(7): p. 343-53.
68. Jiang, B.H. and L.Z. Liu, *PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis*. Adv Cancer Res, 2009. **102**: p. 19-65.
69. Su, H., C. Peng, and Y. Liu, *Regulation of ferroptosis by PI3K/Akt signaling pathway: a promising therapeutic axis in cancer*. Front Cell Dev Biol, 2024. **12**: p. 1372330.
70. Haase, V.H., *The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(33): p. 3895-903.
71. Yang, C., et al., *HIF-1: structure, biology and natural modulators*. Chin J Nat Med, 2021. **19**(7): p. 521-527.
72. Baldewijns, M.M., et al., *VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis*. J Pathol, 2010. **221**(2): p. 125-38.
73. Ikeda, H. and H. Kakeya, *Targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling with natural products toward cancer chemotherapy*. J Antibiot (Tokyo), 2021. **74**(10): p. 687-695.
74. Roskoski, R., Jr., *Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2023 update*. Pharmacol Res, 2023. **187**: p. 106552.

75. van Erp, N.P., et al., *Pharmacogenetic pathway analysis for determination of sunitinib-induced toxicity*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4406-12.
76. Zhang, S., et al., *Shikonin inhibits cancer cell cycling by targeting Cdc25s*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 20.
77. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
78. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
79. Teixeira, A.L., et al., *Circulating biomarkers in renal cell carcinoma: the link between microRNAs and extracellular vesicles, where are we now?* J Kidney Cancer VHL, 2014. **1**(8): p. 84-98.
80. Huang, X., et al., *Extracellular microRNAs in urologic malignancies: chances and challenges*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(7): p. 14785-99.
81. Lodish, H.F., et al., *Micromanagement of the immune system by microRNAs*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 120-30.
82. Al-Ali, B.M., et al., *MicroRNAs in renal cell carcinoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy*. Anticancer Res, 2012. **32**(9): p. 3727-32.
83. Faragalla, H., et al., *The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma*. J Mol Diagn, 2012. **14**(4): p. 385-92.
84. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
85. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
86. Long, X., et al., *MicroRNA-99a Suppresses Breast Cancer Progression by Targeting FGFR3*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1473.
87. Wei, F., et al., *miR-99b-targeted mTOR induction contributes to irradiation resistance in pancreatic cancer*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 81.
88. Yang, C., V. Passos Gibson, and P. Hardy, *The Role of MiR-181 Family Members in Endothelial Cell Dysfunction and Tumor Angiogenesis*. Cells, 2022. **11**(10).
89. Fejes, Z., et al., *Hyperglycaemia suppresses microRNA expression in platelets to increase P2RY12 and SELP levels in type 2 diabetes mellitus*. Thromb Haemost, 2017. **117**(3): p. 529-542.
90. Fejes, Z., et al., *Endothelial cell activation is attenuated by everolimus via transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms after drug-eluting coronary stenting*. PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0197890.
91. Czimmerer, Z., et al., *A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e55168.
92. Sun, W., et al., *MicroRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting SRCIN1 to promote the SRC/VEGF signaling pathway*. Cell Death Dis, 2018. **9**(4): p. 438.
93. Liu, B., et al., *Shikonin exerts antitumor activity by causing mitochondrial dysfunction in hepatocellular carcinoma through PKM2-AMPK-PGC1 α signaling pathway*. Biochem Cell Biol, 2019. **97**(4): p. 397-405.
94. Ni, F., et al., *Shikonin exerts antitumor activity in Burkitt's lymphoma by inhibiting C-MYC and PI3K/AKT/mTOR pathway and acts synergistically with doxorubicin*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3317.
95. Dolcet, X., et al., *NF- κ B in development and progression of human cancer*. Virchows Arch, 2005. **446**(5): p. 475-82.
96. Yang, C., et al., *Shikonin exerts anti-inflammatory effects in LPS-induced mastitis by inhibiting NF- κ B signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **505**(1): p. 1-6.
97. Allen, J.D. and A.H. Schinkel, *Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(6): p. 427-34.
98. Klein, T. and R. Bischoff, *Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases*. Amino Acids, 2011. **41**(2): p. 271-90.

99. Lokeshwar, S.D., et al., *Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma: A Potential Three-MicroRNA Prognostic Signature*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018. **27**(4): p. 464-472.
100. Bautista-Sánchez, D., et al., *The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020. **20**: p. 409-420.
101. Li, S., et al., *microRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells*. *Mol Med Rep*, 2012. **5**(4): p. 949-54.
102. Asprițoiu, V.M., et al., *Epigenetic Regulation of Angiogenesis in Development and Tumors Progression: Potential Implications for Cancer Treatment*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 689962.
103. Paner, G.P., et al., *Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers*. *Eur Urol*, 2018. **73**(4): p. 560-569.
104. Patil, K., et al., *An integrated in silico analysis highlighted angiogenesis regulating miRNA-mRNA network in PCOS pathophysiology*. *J Assist Reprod Genet*, 2022. **39**(2): p. 427-440.
105. Goradel, N.H., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art*. *J Cell Physiol*, 2019. **234**(2): p. 1099-1110.
106. Joosten, S.C., et al., *Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications*. *Nat Rev Urol*, 2018. **15**(7): p. 430-451.
107. Kumar, S., et al., *Analysis of miR-375-3p, miR-197-3p, and miR-15a-5p Expression and Their Clinical Relevance as Biomarkers in Lung Cancer*. *Technol Cancer Res Treat*, 2022. **21**: p. 15330338221080981.
108. Kao, S.C., et al., *Tumor Suppressor microRNAs Contribute to the Regulation of PD-L1 Expression in Malignant Pleural Mesothelioma*. *J Thorac Oncol*, 2017. **12**(9): p. 1421-1433.
109. Palamarchuk, A., et al., *PDCD1 (PD-1) is a direct target of miR-15a-5p and miR-16-5p*. *Signal Transduct Target Ther*, 2022. **7**(1): p. 12.
110. Xue, S., et al., *Relationship between expression of PD-L1 and tumor angiogenesis, proliferation, and invasion in glioma*. *Oncotarget*, 2017. **8**(30): p. 49702-49712.
111. Lai, Y., et al., *[Corrigendum] microRNA-181a-5p functions as an oncogene in renal cell carcinoma*. *Mol Med Rep*, 2024. **29**(4).
112. Li, Y., et al., *miR-181a-5p Inhibits Cancer Cell Migration and Angiogenesis via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-14*. *Cancer Res*, 2015. **75**(13): p. 2674-85.
113. Jing, X.G., et al., *MiR-15a expression analysis in non-small cell lung cancer A549 cells under local hypoxia microenvironment*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017. **21**(9): p. 2069-2074.
114. Cheng, H.S., et al., *A miRNA/CXCR4 signaling axis impairs monopoiesis and angiogenesis in diabetic critical limb ischemia*. *JCI Insight*, 2023. **8**(7).
115. Ceci, C., et al., *Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(4).
116. Neal, C.S., et al., *The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer*. *BMC Med*, 2010. **8**: p. 64.
117. Duch, P., et al., *Aberrant TIMP-1 overexpression in tumor-associated fibroblasts drives tumor progression through CD63 in lung adenocarcinoma*. *Matrix Biol*, 2022. **111**: p. 207-225.
118. Tang, Y., et al., *MicroRNAs and angiogenesis: a new era for the management of colorectal cancer*. *Cancer Cell Int*, 2021. **21**(1): p. 221.
119. Lei, Z., et al., *Control of Angiogenesis via a VHL/miR-212/132 Axis*. *Cells*, 2020. **9**(4).
120. Lv, X., et al., *The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism*. *Genes Dis*, 2017. **4**(1): p. 19-24.
121. Ramani, P., et al., *Angiogenin expression in human kidneys and Wilms' tumours: relationship with hypoxia and angiogenic factors*. *Int J Exp Pathol*, 2013. **94**(2): p. 115-25.
122. Hillen, F. and A.W. Griffioen, *Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(3-4): p. 489-502.
123. Rundhaug, J.E., *Matrix metalloproteinases and angiogenesis*. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(2): p. 267-85.

124. Quintero-Fabián, S., et al., *Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1370.
125. Fu, Z., et al., *The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 580.
126. Chen, Y., et al., *Shikonin inhibits triple-negative breast cancer-cell metastasis by reversing the epithelial-to-mesenchymal transition via glycogen synthase kinase 3 β -regulated suppression of β -catenin signaling*. Biochem Pharmacol, 2019. **166**: p. 33-45.
127. Zhang, F.Y., et al., *Shikonin Inhibits the Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells by Targeting Phosphorylated β -Catenin and Phosphorylated PI3K/Akt: A Potential Mechanism for the Anti-Glioma Efficacy of a Traditional Chinese Herbal Medicine*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(10): p. 23823-48.
128. Liu, T., X. Sun, and Z. Cao, *Shikonin-induced necroptosis in nasopharyngeal carcinoma cells via ROS overproduction and upregulation of RIPK1/RIPK3/MLKL expression*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 2605-2614.
129. Markowitsch, S.D., et al., *Shikonin Inhibits Cell Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma by Activating the Necrosome Complex and Inhibiting the AKT/mTOR Signaling Pathway*. Cancers (Basel), 2022. **14**(5).
130. Markowitsch, S.D., et al., *Shikonin Reduces Growth of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells Mainly through Necroptosis*. Cancers (Basel), 2021. **13**(4).
131. Guo, N., et al., *Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via downregulation of CD147*. Mol Med Rep, 2019. **19**(5): p. 4335-4343.
132. Boswell-Casteel, R.C., Y. Fukuda, and J.D. Schuetz, *ABCB6, an ABC Transporter Impacting Drug Response and Disease*. Aaps j, 2017. **20**(1): p. 8.
133. Liu, X. and G. Sun, *Shikonin enhances Adriamycin antitumor effects by inhibiting efflux pumps in A549 cells*. Oncol Lett, 2017. **14**(4): p. 4270-4276.
134. Volpicelli, E.R., et al., *The multidrug-resistance transporter ABCB5 is expressed in human placenta*. Int J Gynecol Pathol, 2014. **33**(1): p. 45-51.
135. Kim, H.J., et al., *Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells*. J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 123.
136. Royds, J.A., et al., *Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NF κ B*. Mol Pathol, 1998. **51**(2): p. 55-61.
137. Neophytou, C.M., et al., *Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance*. Cancers (Basel), 2021. **13**(17).
138. Zhao, Q., et al., *Inhibition of c-MYC with involvement of ERK/JNK/MAPK and AKT pathways as a novel mechanism for shikonin and its derivatives in killing leukemia cells*. Oncotarget, 2015. **6**(36): p. 38934-51.
139. Chen, Y., et al., *The Critical Role of PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway in Shikonin-Induced Apoptosis and Proliferation Inhibition of Chronic Myeloid Leukemia*. Cell Physiol Biochem, 2018. **47**(3): p. 981-993.
140. Akhtarkhavari, T., A.R. Bahrami, and M.M. Matin, *Downregulation of miR-21 as a promising strategy to overcome drug resistance in cancer*. Eur J Pharmacol, 2022. **932**: p. 175233.
141. Bayraktar, R. and K. Van Roosbroeck, *miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics*. Cancer Metastasis Rev, 2018. **37**(1): p. 33-44.
142. Jovanovic, M. and M.O. Hengartner, *miRNAs and apoptosis: RNAs to die for*. Oncogene, 2006. **25**(46): p. 6176-87.
143. Saini, S., et al., *MicroRNA-708 induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in renal cancer cells*. Cancer Res, 2011. **71**(19): p. 6208-19.



Nyilvántartási szám: DEENK/414/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Király József

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Király, J.**, Szabó, E., Fodor, P., Vass, A., Choudhury, M., Gesztelyi, R., Szász, C., Flaskó, T., Dobos, N., Zsebik, B., Steli, Á. J., Halmos, G., Szabó, Z.: Expression of hsa-miRNA-15b, -99b, -181a and Their Relationship to Angiogenesis in Renal Cell Carcinoma. *Biomedicines*. 12 (7), 1-18, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12071441>
IF: 3.9 (2023)
2. **Király, J.**, Szabó, E., Fodor, P., Fejes, Z., Nagy, B. J., Juhász, É., Vass, A., Choudhury, M., Kónya, G., Halmos, G., Szabó, Z.: Shikonin Causes an Apoptotic Effect on Human Kidney Cancer Cells through Ras/MAPK and PI3K/AKT Pathways. *Molecules*. 28 (18), 1-22, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28186725>
IF: 4.2





További közlemények

3. Farkasinszky, G., Péli-Szabó, J., Károlyi, P. K., Rácz, S., Dénes, N., Papp, T., **Király, J.**, Szabó, Z., Kertész, I., Mező, G., Halmos, G., Képes, Z., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Acute Hindlimb Ischaemia in Rat Model: a Pre-Clinical PET Study.

Pharmaceutics. 16 (4), 1-14, 2024.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16040542>

IF: 4.9 (2023)

4. Szegedi, K., Szabó, Z., Kállai, J., **Király, J.**, Szabó, E., Bereczky, Z., Juhász, É., Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors.

J Clin Med. 12 (13), 1-18, 2023.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12134538>

IF: 3

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,1**

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

Debrecen, 2024.07.24.



Függelék