

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Új sejtvonalak létrehozása és jellemzése kémiai rákkeltőkkel
előidézett kísérletes daganatokból**

Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Új sejtvonalak létrehozása és jellemzése kémiai rákkeltőkkel előidézett kísérletes daganatokból

Trencsényi György

Témavezetők:

Dr. Bánfalvi Gáspár
Dr. Hunyadi János



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Témavezetők:

Prof. Dr. Bánfalvi Gáspár, az MTA doktora

Prof. Dr. Hunyadi János, az MTA doktora

Doktori Iskola:

Klinikai Orvostudományok

A Szigorlati Bizottság elnöke:

Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora

A Szigorlati Bizottság tagjai:

Dr. Tóth Sára, Ph.D.

Prof. Dr. Kovács Péter, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

2010. március 04. 11:00, DE OEC Patológiai Intézet

A Védési Bizottság elnöke:

Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora

Opponensek:

Prof. Dr. Szentirmay Zoltán, az MTA doktora

Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora

Védési Bizottság tagjai:

Dr. Tóth Sára, Ph.D.

Prof. Dr. Kovács Péter, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja:

2010. március 4., 13 óra, DE OEC I. Belgyógyászati Klinika

1. Bevezetés

Az utóbbi két évtizedben az idő előtti halálozások 80%-áért felelős szív- és érrendszeri betegségek, valamint a daganatos betegségek kemoprevenciója felé fordult a figyelem. A kutatások intenzitására mi sem jellemzőbb, mint az, hogy néhány év alatt a daganatos betegségek kemoprevenciójára vonatkozó irodalom áttekinthetlenné vált.

Az a tény, hogy a kutatások intenzitása ellenére a daganatok kemoprevenciója ma még alig mutathat fel eredményt, módszertani nehézségekkel magyarázható. Egy új molekula kipróbálása elvileg nem különbözhet a praeklinikai és klinikai farmakológia módszereitől, a gyakorlatban azonban számos probléma vetődik fel. Sejttenyészetek, vagy molekuláris biológiai módszerek ma még nem alkalmasak a preventív hatások (különösen az áttét-képződést gátló tulajdonságok) mérésére, ezért daganatos állatokra van szükség. Nem világos, hogy mivel idézhető elő legmegbízhatóbban a kísérleti állatokban daganat: kémiai rákkeltőkkel, vírusokkal, vagy ionizáló sugárzással. A kérdés azért jogos, mert ha a kemopreventív molekula ígéretesnek tűnik, nem biztos, hogy a hatás általánosítható, hanem csak arra a kémiai rákkeltőre, vagy állati vírusra specifikus, amelyekkel a daganatot előidéztek. Az is bizonytalan, hogy a kifejlődő daganat carcinoma, sarcoma, vagy leukaemia lesz-e, és a kipróbálandó molekula melyik daganattípusra lesz hatással. Az sem bizonyos, hogy az így keletkezett tumor áttétet ad-e, holott a humán daganatos betegségek halálos kimenetele az áttétek képződésére vezethető vissza. További probléma, hogy mivel egyik rákkeltő anyag, vírus, vagy besugárzás sem 100%-os hatású, viszonylag nagyszámú kontroll és kezelt állatot kell használni, a lappangási idő pedig több hónap, esetleg 1-2 év lehet. Az előbbi az állatvédők heves tiltakozását váltja ki, az utóbbi pedig sok időt és pénzt emészt fel. Mindezek elvégzése után kerülhet sor az emberi kipróbálásra, amely azonban – eltérően a klinikai farmakológiai vizsgálatoktól – szokatlanul nagyszámú önkéntes kontroll és kezelt csoportot igényel, és az eredmények kiértékelésére csak hosszú évek, még inkább évtizedek múlva kerülhet sor. Ezek azok a módszertani nehézségek, amelyek miatt a kemoprevenációs tudományos kutatások olyan nehezen haladnak előre.

Azok a kísérletek, amelyeket az elmúlt években végeztünk, a praeklinikai vizsgálatok egyszerűsítését és megbízhatóságát szolgálták. Olyan módszert kívántunk kidolgozni, amely viszonylag kevés állaton, rövid idő alatt megbízható eredményt ad, miközben figyelembe veszi mindhárom daganattípust, és figyelemmel kíséri a képződő áttéteket. Ezen vizsgálatok során azt a

kísérleti rendszert tartottuk a legalkalmasabbnak, amelyekben kémiai rákkeltőkkel előidézett hepatocarcinómák, mesoblastos nephromák és myelomonoblastos leukaemiák sejtjeinek 10^6 (~ 1 mg) mennyiségét kontroll, illetve a vizsgálandó vegyülettel előkezelt patkányok vesetokja alá ültettük.

1.1 Kémiai karcinogének

Kémiai rákkeltőknek nevezi a szakirodalom azon a szervetlen és szerves molekulák összességét, amelyek az emberi szervezetbe jutva fokozzák a daganatok gyakoriságát, vagy kísérleti állatokba juttatva rosszindulatú daganatokat idéznek elő.

A kémiai rákkeltők létezését sejtető megfigyelések indították újtára a kísérletes rákkutatást is. Japán kutatók egerekben bizonyították a kátrány és a kátránytermékek rákkeltő hatását, és ezzel az egyszerű modellel elindították az első rákkeltő csoport, a **policiklikus szénhidrogének** izolálását, szerkezetük meghatározását és előfordulásuk vizsgálatát az emberi környezetben. A második csoportba az **aromás aminok** tartoznak, amelyek felfedezésében nagy szerepe volt az emberben megfigyelt anilin okozta hólyagráknak. A harmadik csoport tagjai a **nitrozaminok**, amelyek felfedezése a véletlennek köszönhető. Angol kutatók írták le, hogy a gyógyszernek szánt dimetil-nitrozamin patkányokban elsődleges májtumort okoz orális és subcutan adagolással egyaránt. Azóta számos, ebbe a csoportba tartozó vegyületről (dietyl-nitrozamin, nitrozo-metil és –etiluretán, stb.) kiderült, hogy valamennyi laboratóriumi állatfajban tumor idézhető elő velük már kis koncentrációban is. A rákkeltő vegyületek negyedik nagy csoportját az **aflatoxinok** alkotják, amelyek a máj és az epeutak tumorait okozták madarakban és patkányokban egyaránt. Az ötödik nagy csoportba egymástól távol álló vegyületeket sorolunk: **szervetlen vegyületeket** (pl. azbeszt), **természetes anyagokat** (pl. gombafajok hidrazinjait), és **szintetikus szerves termékeket** (pl. peszticidek).

A nagyszámú karcinogén közül kísérleteinkben a dimetil-nitrozamint és a 7,12-dimetilbenzantracént használtuk. Az előbbivel újszülött F344 patkányokban hepatocarcinómát és mesoblastos nephromát indukáltunk, míg az utóbbival 50 napos Long-Evans patkányokban myelomonoblastos leukaemiát.

1.2. Kémiai rákkeltők hatásmechanizmusa

A molekuláris biológiai kutatások legfőbb eredménye az, hogy bármilyen nagyszámú és

eltérő kémiai csoportról legyen is szó, a hatásmechanizmus közel azonos. Általános szabály, hogy a szervezetbe kerülő rákkeltő molekulák változatlan formában vagy átalakulás után a DNS valamelyik bázisához kötődnek (adduktumképződés). Ha a kötődés helyén mutációk vagy egyenértékű bázisváltozások következnek be, s azok onkogéneket vagy onkoszupresszor géneket érintenek, és a mutációk rögzülnek (hiányos repair mechanizmusok esetén), akkor bekövetkezik a célsejt transzformációja és normál sejtekből lappangó daganatsejtek lesznek.

A rákkeltők jelentős része enzimatisz aktiválás, biotranszformáció (citokróm P-450 függő monoamino-oxidázok) után fejti ki hatását. A folyamat során a hatástalan „prokarcinogénból” először gyenge hatású „közbülső karcinogén”, majd erős hatású „végső karcinogén” keletkezik.

Az általunk használt karcinogének közül a dimetil-nitrózamin (DMNA) mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* metabolizálódik. *In vivo*, patkány máj mikroszómális vizsgálatokban bizonyították, hogy oxidatív N-dealkilációs folyamatok során formaldehid keletkezik. A folyamat során aktív alkilgyökök keletkeznek, amely végső karcinogénként a DNS megfelelő bázisához kötődik. A DMNA a guanint képes kovalensen módosítani (metilezni). Leggyakrabban a guanin 7-es nitrogén, ritkábban a 6-os oxigén atomjaihoz kapcsolódik, ezáltal 7-nitro-metilguanint (N⁷-MeG) vagy 6-oxi-metilguanint (O⁶-MeG) képez. A O⁶-MeG úgy viselkedik, mintha adenin lenne, és a timinnel alkot bázispárt. Az egymást követő sejtosztódások alkalmával tehát az eredeti GC párból előbb 6-oxi-metil guanin – timin pár, majd adenin – timin pár lesz, így a kód megváltozik.

A xenogén policiklikus szénhidrogéneket – így a dimetilbenz-antracén-t (DMBA) is – mikroszómális monooxidázok 7,8-epoxid származékokká alakítják át. A keletkező vegyületeket a mikroszómális epoxid-hidráz 7,8-dihidrodiollá redukálja. A biotranszformáció során „közbülső karcinogének” is keletkeznek. A metabolizáció további lépéseiben a vegyes funkciójú oxidázok hozzák létre a „végső karcinogént”, a 7, 8-dihidrodiol-9, 10-epoxidot.

1.3. A kísérletes daganatok transzplantációja

Mivel a XIX. század végén egyre több kutató érezte úgy, hogy a spontán daganatok kórfejlődésének követése mind emberben, mind a kísérleti állatokban elégtelen, megpróbálkoztak az állatok spontán tumorának transzplantációjával, hogy így nagyszámú, megfigyelésre alkalmas anyaghoz jussanak. Először állatorvosok próbálkoztak több-kevesebb sikerrel háziállatok spontán tumorainak átültetésével más, ugyanazon fajú háziállatokba, majd 1889-ben Hanau olyan patkánydaganatot talált, amelyet sikerrel oltott át más patkányokba, és öt évvel később Moreau

olyan spontán egérrákra bukkant, amelyet sikerrel oltott tovább más egerekbe. A XX. század első éveiben Jensen, Bashford és Murray megállapították, hogy az átoltott tumorok mindenben úgy viselkednek, mint az emberek rosszindulatú daganatai, és a daganatok átoltásakor az új daganat nem a gazdaállat, hanem az átoltott daganat sejtjeiből fejlődik – azaz valódi transzplantációról van szó. Az 1934-es év újabb fordulatot hozott: ekkor mutatta ki Andervont, hogy nemcsak a spontán tumorok transzplantálhatók, hanem a kémiai úton előállított kísérletes daganatok is.

A transzplantációk során nemcsak azt figyelték meg, hogy a daganattörzsek a gazdától eltérő fajú állatokba nem ültethetők át, hanem azt is, hogy ugyanazon fajon belül is problémák adódhatnak. Így pl. Michaelis a Jensen típusú egérrákot nem tudta átültetni a Koppenhágában tenyésztett egerekből a Berlinben tenyésztett egerekbe. Ez a felismerés vezette Little-t, hogy előállítsa az első, genetikailag azonos egyedekből álló beltenyésztett egértörzseket, és ezzel új fejezetet nyitott nemcsak a tumor-, hanem a transzplantációs immunológia területén is.

A további kísérletekből kiderült, hogy áttörve a transzplantációs rezisztenciát, bármely állatfaj és az ember daganata sikerrel átültethető thymushiányos csupasz egerekbe. Ebből az észlelésből indultak ki Bogden és mtsai is, akik emberi tumor-darabkákat helyeztek thymushiányos csupasz egerek vesetokja alá abból a célból, hogy emberi tumorok elleni kemoterápiás szerek hatékonyságát próbálják ki.

1.4. Metastasis modellek

A metastasis kutatásban használt úgynevezett transzplantációs modellek két nagy csoportba oszthatók. A szingenikus transzplantációs modellek leggyakrabban egér vagy patkány tumoros sejtvonalakra, szövetekre vonatkoznak, amelyek az eredeti sejtvonallal, illetve szövettel megegyező genetikai háttérrel rendelkező beltenyésztett állatokban daganatot eredményeznek. A közelmúltig a szingenikus sejtvonalakat vagy karcinogének által indukált, vagy spontán kialakuló egér – vagy patkánytumorból nyerték. A szingenikus modellek előnye, hogy a transzplantált szövet, a tumor mikrokönyezetete és a befogadó egyazon genetikai háttérrel rendelkező fajtól, vagy azon belül törzstől származik. Ezek a modellek azonban nélkülözik a humán daganatok számos fontos jellemzőjét.

A metastasis vizsgálatában alkalmazott transzplantációs modellek másik nagy csoportját a xenograft modellek alkotják. Ezek olyan humán tumoros sejtvonalak, szövetek, amelyek teljes vagy részleges immunhiányos állatokba beültethetőek és ott tumorrá fejlődnek. Fontos

megjegyezni, hogy a rákos és stroma sejtek között kölcsönhatások alakulnak ki. A xenograft modellek alkalmazása során figyelembe kell venni, hogy egyes esetekben a fajspecifikusság nem teszi lehetővé ilyen, a fajok közötti határt átlépő kölcsönhatások megjelenését. Mivel ezekben a modellekben a befogadó szervezet immunhiányos, lehetetlenné válik az immunrendszer tumorra gyakorolt hatásának vizsgálata.

A metastasis képződés vizsgálatának számos módja ismeretes. Az egyik legelterjedtebb módszer, hogy közvetlenül a keringésbe (intravénásan, intraartériásan és intracardiálisan) juttatják a tumor sejteket. A bejuttatás helyétől és a tumoros sejt „tropizmusától” függően alakul vagy nem alakul ki a test távolabbi pontján metastasis. A módszer kikerüli a lokális tumor növekedésének lépéseit és a daganatos sejtek vérerekbe jutását azáltal, hogy a tumor sejteket közvetlenül a keringésbe juttatják. Máj - áttét kialakulásához a lépbe vagy a portális vénába injektálják a sejtuszpenziót. Közvetlenül a szívbe történő fecskendezés számos helyen okoz metastasist, beleértve a csontot is. A Paget által megfogalmazott „mag - talaj” hipotézis szerint tehát a tumor növekedését a tumorsejt (=mag) egyedi jellemzői és a mikrokönyezetből (=talaj) jövő megfelelő növekedési és túlélési jelzéseket befogadó képességei határozzák meg.

A tumoros sejtek kísérleti állatokba történő juttatásának másik csoportjába azok a módszerek tartoznak, amelyek során a sejteket szöveti környezetbe juttatják (subcutan, intradermalisan, intramuscularisan vagy specifikus szervekbe, szövetekbe). Ennek eredményeképpen lokális daganat alakul ki, amely az esetek egy részében metastasist ad. Igen elterjedt transzplantációs modell a tumorok subcutan beültetése. Ezekben az esetekben ritkán figyeltek meg spontán metastasist a távolabbi szövetekben, ezért az ilyen modelleket gyakran „nem metastatizáló” modellként emlegetik. A „mag - talaj” hipotézis transzplantációs modellekben történő alkalmazása azt eredményezte, hogy a daganatos sejteket az egerekbe ortotopikus transzplantáció során ültették be. Ez a sejtek olyan szövetbe vagy szervbe történő beültetését jelenti, amelyből az szövettanilag származik. Az így kifejlesztett modellek jobban megközelítik a modellezett humán rendszert. Az ortotopikus implantáció gyakran eredményez metastasist, és relevánsabb kolonizációs mintázatot mutat, mint az azonos körülmények között végzett heterotopikus beültetés.

2. Célkritériumok

A daganat-kemoprevenációs vizsgálatokhoz olyan módszert kívántunk kidolgozni, amely viszonylag kevés állaton, rövid idő alatt megbízható eredményt ad, miközben figyelembe veszi mindhárom daganattípust – a carcinomát, a sarcomát és a leukaemiát –, és követi a képződő áttéteket. Ennek a feladatnak a megvalósításához a következő célokat tűztük ki:

1. A rendelkezésünkre álló kémiai indukált hepatocelluláris carcinomát (He/De), a mesoblastos nephromát (Ne/De), illetve a myelomonoblastos leukaemiát (My1/De) mindaddig állatról-állatra tumordarabkákkal ültettük tovább, ami a tumortörzs mutációjának kockázatát hordozza, lehetetlenné teszi az implantátum sejtszámának meghatározását, és nagyszámú állat feláldozását kívánja. Munkánk során a kémiai indukált tumorkok *in vitro* tenyésztettségét vizsgáltuk. Be kívántuk bizonyítani, hogy a tenyészetből kialakíthatóak olyan sejtvonalak, amelyek fagyasztott állapotban is fenntarthatóak, és reimplantálhatóak vesetok alá.
2. Igazolni kívántuk, hogy vesetok alá ültetett kémiai indukált 10^6 daganatsejt minden esetben nyirokcsomó metastasis képez, illetve célul tűztük ki a metastasis kialakulásához szükséges idő meghatározását.
3. A kémiai indukált daganatsejtek eloszlását képalkotó módszerekkel kívántuk vizsgálni. Célul tűztük ki a három kémiai úton keletkezett daganattípus, valamint a normál sejtek ^{18}F FDG felvételi mechanizmusának összehasonlítását, illetve annak bizonyítását, hogy a humán gyakorlatban már bevált ^{18}F FDG radiofarmakkal végzett tumordiagnosztikai módszerek a kémiai indukált tumorkok, illetve az ezeket hordozó patkányok esetében is használhatóak.
4. Vizsgálni kívántuk az általunk kémiai indukált hepatocarcinoma daganatsejtek kromatinszerkezetét, kromatin kondenzációs folyamatait, illetve ezek eltéréseit a normál sejtekhez és a regenerálódó májsejtekhez képest.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket 120 db 120-160 g-os beltenyésztett nőtény és hím Fischer 344, illetve nőtény Long-Evans patkányon végeztük. Az állatokat konvencionális laboratóriumi körülmények között tartottuk, szemiszintetikus diétával (Charles River Kft., Gödöllő, Magyarország) etettük, és csapvízzel ad libitum itattuk. A kísérleteket az UK Állatkísérletes bizottságának előírása szerint a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának engedélyével (eng. sz: 22/2007) folytattuk.

3.2. Kísérletes daganatok

Háromféle, kémiai karcinogenezissel indukált kísérletes tumort használtunk, egy epitheliális eredetű májcarcinomát (He/De), egy mesenchymális eredetű mesoblastos nephromát (Ne/De) és egy myelomonoblastos leukaemiát (My1/De).

A nephromát és a carcinomát olyan Fischer 344 patkányokból izoláltuk, amelyeknek újszülött korukban (24 órával születésük után) 125 µg/állat n-nitrozodimetilamin fiziológias konyhasó oldatát fecskendeztük be i.p.. 5-7 hónapos várakozási idő után a tumorokat eltávolítottuk, kisebb darabokra szeleteltük, F344 patkány vesetokja alá ültettük (*in vivo* fenntartás). A myelomonoblastos leukaemiát Huggins és Sugiyama módszerével hoztuk létre 50 napos nőtény Long-Evans patkányokban, amelyek 3 X 40 mg/kg 7,12-dimetilbenz(a) antracén oldatát kapták i.v.. A kezelés három egymást követő héten egy alkalommal történt. 9 hónap elteltével a megnagyobbodott lépet eltávolítottuk, kisebb darabokra szeleteltük, sorozatosan Long-Evans patkány vesetokja alá ültettük, vagy folyékony nitrogénben tároltuk.

3.3. Műtéti eljárás

A műtétek célja az volt, hogy a Fischer 344 és Long-Evans patkányok májtokja, illetve a későbbiekben a baloldali vese tokja alá tumordarabot, Gelaspon^R korongon sejteket, illetve nyirokcsomót helyezünk el. Első lépésben Galaspon^R (Germed, Rudolstadt, Németország) lapokból 4 mm átmérőjű és 1 mm vastagságú korongokat készítettünk, és azokat sterilizáltuk. A kísérletek egy részében a Gelaspon^R korongra 10 µl fiziológias sóoldatban 10⁶ He/De, 10⁶ Ne/De, illetve 10⁶ My1/De sejtet helyeztünk el. A kísérletek további részében a baloldali parathymicalis

nyirokcsomókat 12 kontroll patkányból és 12 tumoros patkányból kipreparáltuk, eltávolítottuk és a környező zsírszövetől megtisztítottuk. A kísérletek más részében korongokra 10 µl tust (Gunther Wagner, Pelikan Werke, Hannover) pipettáztunk. Az implantációt a következő módon végeztük. A kísérleti állatokat 60 mg/kg Nembutal i.p. adásával elaltattuk, a baloldali lumbális tájékat szőrtelenítettük, fertőtlenítettük, a retroperitoneumot lumbális metszéssel megnyitottuk, és az előhúzott vese tokja alá tust, vagy tumorsejteket tartalmazó korongot, illetve nyirokcsomót elhelyeztünk. A kísérletek más részében ugyancsak lumbális metszésből baloldali nephrectomiát végeztünk. A sebeket sebészeti öltéssel zártuk, a boncolást, illetve az autoradiográfiás vizsgálatokat két hét múlva végeztük.

3.4. Daganatos sejtvonalak létrehozása

A frissen eltávolított tumor-szeleteket (He/De, Ne/De) 2x2x2 mm-es darabokra aprítottuk, és 3 óra hosszat 5 ml RPMI 1640 tápfolyadékban inkubáltuk 37 °C -on, amelynek 100 ml-e 100 mg kollagenáz I-et, 10 mg hialuronidázt, és 30 µl DN-ázt tartalmazott. Emésztés után a szuszpenziót 4 réteg steril gézen átszűrtük, 5 percig 1000 rpm-en centrifugáltuk, majd a sejteket 10 %-os FBS-t és antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban szuszpendáltuk. Miután a szuszpenziót 37 °C-on 5 %-os CO₂ atmoszférában egy éjszakán keresztül sejttenyésztő edényben inkubáltuk, a szuszpenzióban maradt sejteket tartalmazó felülúszót elöntöttük. A myelomonoblastos leukaemia tenyészték indításához olyan Long-Evans patkányokat használtunk, amelyek fehérvérsejtszáma 70-100 G/L volt. Az állatokat Nembutal i.p. adásával túlaltattuk, majd a combcsontból a csontvelőt fiziológiás sóoldatos mosással távolítottuk el. A csontvelőt steril pipettával szuszpendáltuk, majd centrifugálás (5 perc, 800 g) után a sejtsuszpenziót 10 %-os FBS-t és antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban vettük fel és 37 °C-on 5 %-os CO₂ atmoszférában tenyésztettük.

3.5. Fibroblast sejtek izolálása Fischer 344 patkányból

A vemhesség 7. napján a nőstény patkányt 3 mg/100g Nembutal i.p. adásával elaltattuk. Az embriókat eltávolítottuk és steril PBS-be helyeztük. Az embriókat ≈ 2x2 mm-es darabokra aprítottuk és 3 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on 0.25% tripszint tartalmazó HBSS oldatban. Emésztés után a szuszpenziót 4 réteg steril gézen átszűrtük, 5 percig 800 g-n centrifugáltuk, majd a sejteket 10 %-os FBS-t és antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban

szuszpendáltuk. Miután a szuszpenziót 37 °C-on 5 %-os CO₂ atmoszférában egy éjszakán keresztül inkubáltuk, a nem adherens sejteket eltávolítottuk. A primer tenyészeteket 1 hétig tartottuk fenn.

3.6. Hepatocyta sejtek izolálása Fischer 344 patkány májból

A kísérletekhez 200-250 g-os, beltenyésztett hím Fischer 344 patkányokat használtunk. A kísérleti állatokat 60 mg/kg Nembutal i.p. adásával elaltattuk, majd medián laparatómiát végeztünk. Szabaddá tettük a *vena portae*-t, amelybe 21G méretű szárnyas tűt helyeztünk a perfúziós oldatok májba juttatásához. Az *arteria hepatica*-t elkötöttük. A mellkas megnyitása után a *vena cava inferior*-t átvágtuk és elindítottuk a perfúziós pumpát, amelynek áramlási sebességét 25 ml/percre állítottuk be. Először a heparint tartalmazó perfúziós folyadékot áramoltattuk át a májon, majd 10 perc elteltével kicseréltük a perfúziós oldatot heparinmentes, kollagenáz tartalmazó oldatra. Mindkét folyadék hőmérséklete 39 °C volt. 15 perc elteltével a májlebenyeket eltávolítottuk. A kivett szöveteket 2-3 mm-es darabokra vágtuk és 40 ml 4 °C-os kollagenáz tartalmú perfúziós oldatba helyeztük. A keletkező szuszpenziót átszűrtük és a sejteket tartalmazó szuszpenziót 5 percig centrifugáltuk 800 g-n. A felülúszót elöntöttük, majd a hepatocytákat friss tenyésztőoldatban (Ham's F-12 + 17% FBS) vettük fel és 37 °C-on 5 %-os CO₂ atmoszférában tartottuk fenn 2 hétig.

3.7. Regenerálódó májsejtek vizsgálata

A májregenerációs vizsgálatokat hím, 250 g-os F344 patkányokon végeztük. Az állatokat előzetesen 24 óráig éhezettük, majd 3 mg / 100g Nembutal i.p. adásával elaltattuk. Medián laparatómiát végeztünk, majd a seben keresztül kibújtattuk a mediális (*lobus medialis*) és a bal májlebenyt (*lobus lateralis sinister*). A lebenyek felhajtásával előbukkanó, ereket tartalmazó kötőszövetes köteget két ligatúra között átvágtuk. A megfelelő *vv. hepaticae* lekötése után a két lebenyt kiirtottuk és a sebet zártuk. Mivel a májregeneráció a műtétet követő 4. napon a legnagyobb intenzitású, ezért az állatokat a 4. napon túlaltattuk. A regenerálódó májsejtek kinyeréséhez alkalmazott módszer megegyezett a hepatocyták izolálásának módszerével.

3.8. ¹⁸FDG akkumulációjának mérése in vitro

A sejteket (1x10⁶/ml) 10 percig, 5 mM D-glükózt tartalmazó PBS-ben 36 C^o-on

előinkubáltuk. Ezt követően a mintákhoz 0,37 MBq/ml ^{18}F FDG-t adtunk. A sejteket az ^{18}F FDG-vel tovább inkubáltuk a kísérletekben meghatározott ideig. A radiofarmakon felvételt hideg PBS hozzáadásával állítottuk le. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk hideg PBS-ben. A sejtek által felvett radioaktivitást kalibrált gammaszámlálóval mértük (Canberra Packard) 1 perces beütésszám gyűjtéssel, az ^{18}F -energia szinten. A bomlásra korrigált radiofarmakon felvételt beütésszám perc $^{-1}$ (10^6 sejt) $^{-1}$ [cpm] egységekben számoltuk ki. A sejtekben akkumulálódott ^{18}F FDG mértékét az úgynevezett inkubáló dózis százalékában is (ID%) kifejeztük, ami azt mutatja meg, hogy a külső, inkubáló oldatban lévő ^{18}F FDG aktivitás hány százalékát veszi fel 1 millió sejt. A ^{18}F FDG felvételét 5 μM cytochalasine B jelenlétében gátoltuk.

3.9. Teljes-test autoradiográfia

A kontroll és tumoros patkányoknak 15 MBq ^{18}F FDG-t fecskendeztünk be i.v. a bal *vena femoralis*-ba, majd 1 óra múlva az állatokat túllattuk, 1 %-os carboxymethyl-cellulose oldatba ágyasztuk, és folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A beágyazott állatokat tartalmazó blokkokból - 20 °C-on 60 μm vastagságú szagittális metszeteket készítettünk Leica CM 3600 cryomacrotom (Nussloch, Németország) segítségével. A metszeteket „PhosphorImager” lemezekre exponáltuk (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). A „Phosphorimage”-analízis során a vizsgálati tervben rögzített anatómiai területekre ROI-kat (Region of Interest) helyezve számítottunk ki 16 szelet átlagából a relatív intenzitás értékeit az Image QuantTM TL 1.5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) képanalizáló szoftver segítségével.

3.10. Szerv-eloszlásos vizsgálatok

Azokban a kísérletekben, amelyekben az i.v. adott ^{18}F FDG szervi eloszlását vizsgáltuk, az 1 órás inkubációs idő után a daganatos állatok aortájából vért vettünk (a plazma aktivitásának meghatározására), és egy-egy darabot távolítottunk el a májból, a veséből, a lépből, a hasfal izomzatából és a tumorból, illetve kipreparáltuk a teljes thymust és a parathymicalis nyirokcsomókat. A minták tömegét és radioaktivitását lemértük, és az értékeket DAR-ban (Differential Absorption Ratio) fejeztük ki.

$$\text{DAR} = \frac{\text{Radioaktivitás/g szövet}}{\text{Befecskendezett össz-radioaktivitás/testtömeg}}$$

3.11. Immuncitokémia, immunhisztokémia

A glükóz transzporter molekulák (GLUT-1 és GLUT-3), illetve a TGF β 1 kimutatására a vizsgálni kívánt hepatocelluláris carcinomát és mesoblastos nephromát tartalmazó patkány veséket, illetve a metastasiszt tartalmazó parathymicalis nyirokcsomókat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd 3-5 μ m vastag metszeteket készítettünk. A tárgylemezeket deparaffináltuk, végül desztillált vízzel mostuk. A He/De és Ne/De sejteket steril fedőlemezen tenyésztettük. A sejteket 15 percig 4% paraformaldehidben fixáltuk, majd PBS-ben mostuk. A nem specifikus kötőhelyeket 1% BSA tartalmú PBS-el blokkoltuk 30 percig 37 °C-on, majd mosás után a mintákat anti-GLUT-1, anti-GLUT-3 és anti TGF β 1 antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. A primer antitesteket PBS-ben hígítottuk 1:250 arányban. Az elsődleges antitestek megjelenítésére Texas Red konjugált szekunder antitestet használtunk 1:1000 hígításban, a citoszkeleton aktin filamentumainak megjelenítésére FITC-Phalloidin-t 1:500 hígításban, illetve a sejtmagok megjelenítéséhez Vectashield Hard Set DAPI-t használtunk. A fényképek készítése Nikon Eclipse E800 (Nikon Corporation, Tokyo) típusú fluoreszcens mikroszkóppal történt.

3.12. Western blot analízis

Teljes sejtlizátumot vizsgáltunk Western blot analízissel. A vizsgálatához nátrium-laurilszulfát-poliakrilamid-gél-elektroforézist (SDS-PAGE) használtunk, amely során a mintákhoz 100 μ l ötszörös koncentrációjú elektroforézis puffert adtunk és 10 percig forraltuk. 60 μ g fehérjét választottunk el 7.5 %-os SDS-PAGE gélen a GLUT-1, GLUT-3 és TGF β 1 detektálásához. A gél fehérje tartalmát nitrocellulóz membránra vittük át. A nem-specifikus fehérje kölcsönhatásokat a membrán és az antitest fehérjék között blokkolással akadályoztuk meg 5% tejpor tartalmú PBST-vel. Blokkolás után a membránokat mostuk, majd a primer antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. A poliklonális anti-GLUT-1 antitestet 1:250-ben, a szintén poliklonális anti-GLUT-3 antitestet és a monoklonális TGF β 1 antitestet 1:400-ban hígítottuk. A membránokat 30 percig mostuk PBST-ben, majd a másodlagos antitestekkel (anti-rabbit IgG) 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A másodlagos antitesteket 1:1000-ben hígítottuk 1 % nem zsíros, száraz tej(por) tartalmú PBS-ben. A jeleket kemilumineszcens kimutatási módszerrel jelenítettük meg a gyártó utasításai alapján.

3.13. Kromatinszerkezetek izolálása

3.13.1. Reverzibilis permeabilizálás

A sejteket centrifugálással üleptítettük, majd reszuszpendáltuk. 10^6 sejtet 1 ml permeabilizáló (hipotóniás) pufferben 0 °C-on 2 percig inkubáltunk. A permeabilizálás során a sejteket a pufferhez adott 4.5 % (w/w) dextran T-150 védte meg a dezintegrációtól.

3.13.2. Sejtek regenerálása

A permeabilis sejtekhez 9 ml 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumot adtunk, majd a hipotóniás puffert centrifugálással (500g, 5 perc) eltávolítottuk és friss, 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumban tartottuk 37 °C-on, 5% széndioxid és 95% relatív nedvesség tartalmú inkubátorban.

3.13.3. Sejtmagok preparálása

A 3 órás regenerálódás után metafázisos blokkot alkalmaztunk 0,1 ng/ml Colcemid-el történő kezeléssel. További két óra 37 °C-os inkubáció és tripszines kezelés után a sejteket PBS-sel mostuk. Ezután 37 °C-on 10 percig 10 ml duzzasztó pufferrel kezeltük őket. A duzzasztó puffert centrifugálással (500g, 5 perc) távolítottuk el. A magizolálás 20x térfogatú jégacet: metanol (1:3) elegy lassú hozzáadásával történt. A sejtmagokat ezzel a fixálószerrel mostuk kétszer, majd 2 ml fixáló elegyben vettük fel.

A sejtmag preparátum tárgylemezre való felvitele körülbelül 30 cm magasról való lecseppentéssel történt.

3.13.4. Kromatin struktúrák fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata

A dehidratált, majd levegőn szárított tárgylemezeket DAPI-val festettük, majd Opton fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.14. Adatok feldolgozása

A kísérleti adatok minimum három mérés átlag és szórás értékeit tartalmazzák. Az adatokat Student t próbával értékeltük. A szignifikancia szintnek a $p=0.01$ vagy ennél kisebb értéket vettük. Az eredményeket középérték \pm standard deviációban fejeztük ki.

4. Eredmények

4.1. A hepatocelluláris carcinomával (He/De) végzett kísérletek eredményei

4.1.1. Sejtvonal létrehozása hepatocelluláris carcinoma tumorból és reimplantációs vizsgálatok

A szolid tumorból enzimes emésztéssel kinyert sejtek 3×10^6 sejtszámban kerültek a sejttenyésztő edénybe. A sejtszám 24 óra elteltével több, mint kétszeresére nőtt. A sejtek morfológiája, daganat – és metastasis képző jellemzői a 100. passzálás után sem változtak. Ugyanezeket az eredményeket kaptuk a Kelvinátorban történő 3 illetve 9 hónapos tárolás után is. A folyékony nitrogénből, illetve a sejttenyésztetekből származó daganatos sejteket F344 hím patkányok vesetokja alá ültettük, majd 7 nap elteltével az állatokat elaltattuk és felboncoltuk. Makroszkóposan megfigyelve az eltávolított vesét, jól látható a világos színű, erősen vaszkularizált tumor. A daganat növekedése lassabb, azonban infiltratív, és az angiogenezis hamar elkezdődik (rövid idő elteltével kis erek láthatók a világos színű tumor felületén). A tumor a vese méretének többszörösére nőtt. A daganatot hordozó ép veserész megnagyobbodott. Fénymikroszkóppal vizsgálva megállapítható (H&E festés alapján), hogy a hepatocelluláris carcinoma sejtek alakja és mérete sokféle, de alapvetően kis (7-8 μm) átmérőjű, erősen bazofil sejtek.

4.1.2. Kromatin kondenzációs vizsgálatok hepatocelluláris carcinoma (He/De), nyugvó (G0/G1) és regenerálódó máj sejteken

4.1.2.1. Kromatinformák a nyugvó hepatocytákban

A fluoreszcens mikroszkóppal végzett kromatinstruktúrák vizsgálata feltárta a nyugvó, G_0 fázisban levő sejtek magjaiban található kromatinstruktúrák szerkezetét.

Bár a reverzibilis permeabilizálás megengedi a nukleáris struktúrák felnyílását a sejtciklus bármely fázisában, a fibrózus (rostos) kromatin „fátyol” „ragadósága” következtében a nyugvó sejtek magjai megőrizték a lekerekített formájukat még akkor is, ha a magi membrán szétesett. A nyugvó hepatocyták kromatin állománya jelentősen dekondezál állapotban van jelen a sejtben. A fixált magok kromatinja homályos, „fátyolszerű” szerkezetként jelenik meg. A kromatin „fátyol” széteső, laza foszlányokká alakul. A maganyag szintén megőrizte a gömbölyű, lekerekített formáját, vagy megnyúlt szupertekercselt szerkezetűvé alakult. A tipikus szupertekercselt

struktúra hat kromatin csoportból, „fűrtből” tevődik össze. A szupertekercselt hurkok kromatinfonatból állnak, ahol a kromatin folyamatos szupertekercselt szerkezetüként látható, megkülönböztethető kromoszómák nélkül.

4.1.2.2. Kromatinformák a regenerálódó hepatocytákban

A regenerálódó májból származó hepatocyták gyorsan növekvő sejtpopulációt reprezentálnak. Ezekben a sejtekben, amelyek nagy része a sejtciklus S fázisában van, a kromatin kondenzáció számos intermedierje fellelhető. Ez a sejtpopuláció további bizonyítékokat szolgáltat a folytonos, összefüggő kromatinállomány jelenlétére, illetve megfigyelhető volt a kromatinkondenzáció intermedierjeinek teljes spektruma. Megtalálható a dekondezált, „fátyolszerű” kromatin, a polarizált kondenzáció a kromatin fátyolban, ami szupertekercselt kromatin szalaggá alakul. A szupertekercselés kromatin testek kialakulásához vezet. A további szupertekercselés során a fibrózus, „rostos” kromatin struktúrák vastag, szalagos, gyöngysorszerű szerkezetté alakulnak. Néhány esetben a kromoszómák korai formái is megkülönböztethetőek.

4.1.2.3. Kromatinformák a hepatocelluláris carcinoma sejtekben

A hepatocelluláris carcinoma sejtek magjában fellelhető legjellemzőbb kromatin szerkezetek a szupertekercselt szalagok és a fibrózus struktúrák. Ezen sejtek magjaiban is megtalálhatóak voltak a dekondezált formák, így az elmosódott kromatin „fátyol”. További jellemző formák az erősen szupertekercselt szerkezet különböző formái, amelyek ezekben a sejtekben a kromatin kondenzáció teljes folyamatán megfigyelhetőek. A legfontosabb különbség a nyugvó és regenerálódó májsejtek kromatin állományához képest az apoptotikus testek megjelenése.

4.1.3. A He/De jelzésű sejtek ¹⁸FDG felvételének kinetikája

In vitro kísérleteink során a kontrollként használt, frissen izolált F344 patkány fibroblast sejtek ¹⁸FDG felvételét hasonlítottuk össze a szintén F344 patkányból származó, 100 passzálon átesett hepatocelluláris carcinoma (He/De) sejtvonal glükóz-analóg felvételével. A malignus He/De sejtek minden mért időpontban (15, 30, 60 perc) körülbelül háromszor annyi ¹⁸FDG-t vettek fel, mint a kontroll sejtek. A különbség minden időpontban szignifikáns ($p < 0.01$). 5 μ M cytochalasin B jelenlétében 60 perces felvételeket néztünk mindkét sejt típuson. Az eredmények

alapján mind a fibroblast, mind pedig a He/De sejtek közel 11-szer kevesebb ¹⁸FDG-t vettek fel cytochalasin B jelenlétében.

4.1.4. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és He/De sejtekben immunfluoreszcens és Western blot technikával

A fibroblastokban (kontroll) a GLUT-1 transzporterek expressziója alacsonyabb volt, mint a tumoros (He/De) sejtekben. A GLUT-3 transzporterek mennyiségét tekintve szintén a kontroll sejtekben alacsonyabb a jelintenzitás. A malignus He/De sejtek nagy mennyiségben expresszálták az 1-es típusú glükóz transzportert. Ezek az eredmények alátámasztják a tumoros sejtek magas ¹⁸FDG felvételét és a Western blot analízis eredményeit. A Western blot eredményekből kitűnik, hogy mind a GLUT-1, mind pedig a GLUT-3 mennyisége a kontrollként használt fibroblastokban a legalacsonyabb. A várakozásnak megfelelően a tumorsejtek magas GLUT szintet mutatnak.

4.1.5. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban immunfluoreszcens és Western blot technikával

Megfigyelhető, hogy mind a glükóz transzporter fehérjék, mind pedig a hepatocelluláris carcinomákra jellemző TGF- β 1 fehérje szignifikánsan nagyobb mennyiségben vannak jelen a tumorból készült metszeteken, mint a kontrollokon. A kapott eredmények hasonlóak a He/De sejtes *in vitro* eredményekhez, hiszen a GLUT-1 transzporter mennyisége a tumorban is magasabb, mint a GLUT-3. A patkány hepatocelluláris carcinomán végzett Western blot analízis eredménye a GLUT transzportereket illetően rendkívüli hasonlóságot mutatott a sejtes eredményekhez. A GLUT transzporterek közül a tumorban is az 1-es típusú mennyisége volt nagyobb. A GLUT-3 mennyisége - a He/De sejt vonal sejtjeihez hasonlóan - alacsony. A tumorból nagy mennyiségben mutattuk ki a TGF- β 1 fehérjét, ami a hepatocelluláris carcinoma egyik jellemző markere.

4.1.6. A He/De jelzésű májcarcinoma sejtek metastasis formáló képességének vizsgálata

Kísérleteink során véletlenül ismertük fel, hogy a patkányok mellüregében található parathymicalis nyirokcsomóban áttét képződik. A tumor a nyirokcsomót teljesen infiltrálja, a szervben *haemorrhagiák* és zsírsejtek jelennek meg, végül a teljes szerv tumorossá válik. A tumorsejtek nagyon hasonlóak a primer tumorban látottakhoz; jellemző rájuk a méretbeli és

formabeli gazdagság, a sejtmaghoz képest kis citoplazma (a nagyméretű, nagy citoplazmájú sejtek itt is megtalálhatók), az intenzív bazofília, a rendellenes formájú magok és a sok mitotikus sejt. Előrehaladott állapotban a nyirokcsomóban szétszórva, vagy bevézéryszerűen összetömörülve vörösvértestek jelennek meg, illetve itt is előfordul a zsírsejtek megjelenése. A parathymicalis nyirokcsomó daganatos érintettségét immunhisztokémiai (GLUT-1, GLUT-3, TGF- β 1) vizsgálatokkal is bizonyítottuk. A metastasis vizsgálata során is azt tapasztaltuk, hogy a kontrollhoz képest, akárcsak a primer tumorban, mindhárom fehérje – különösen a GLUT-1 – expressziója kifejezettebb.

4.1.7. A vesetok nyirokerei és a parathymicalis nyirokcsomók között összeköttetés vizsgálata

Kísérleteinkben F344 patkányok bal oldali vesetokja alá olyan Gelaspon^R korongot ültettünk, amelyet előzőleg 10 μ l tussal itattunk át. A beültetést követő 3., 6., 24. és 48. órában 2-2 állatot elaltattunk, és mind a veséből, mind a parathymicalis mirigyekből szövettani metszeteket készítettünk. A nyirokcsomók elszíneződése 24 óra múlva volt a legkifejezettebb, és a mikroszkópos képen számos tusszemcse volt felismerhető. A kísérletek azt bizonyítják, hogy a vesetok és a parathymicalis mirigy nyirokerei között összeköttetés van.

4.1.8. Autoradiográfiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok

He/De sejtek metasztatikus potenciálját vizsgáltuk teljes test autoradiográfia és „phosphorimage” analízis segítségével 10^6 He/De sejt *subcapsularis* transzplantációja után 14 nappal. A szervek közül kitűnt a tumor, illetve a parathymicalis nyirokcsomók aktivitása. A harántcsíktolt izomzatra vonatkoztatott relatív intenzitás tumorokban 14.23 ± 2.6 , a parathymicalis mirigyben 10.82 ± 2 , míg a vérben 2.35 ± 0.2 , a májban 1.57 ± 0.4 volt. A szerv-eloszlásos vizsgálatok során ^{18}F FDG beadása után egy óra múlva az aortából vért vettünk, majd eltávolítottuk a daganat, a máj, a vese, a tímusz, a *m. rectus abdominalis* 3-3 darabkáját, illetve a parathymicalis mirigyét, aktivitásukat gammaszámlálóval lemértük, és a DAR értékeket kiszámítottuk. A tumor, illetve a parathymicalis mirigy DAR értéke kiemelkedő, ez utóbbi közel háromszorosa a megfelelő kontrollnak. A vesék magas aktivitása nem meglepő, hiszen a ^{18}F FDG ezen keresztül választódik ki. A parathymicalis mirigy kivételével nincs szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest. A kísérlet-sorozatból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vesetok alatt növekvő daganatok jelentős mértékű metastasist adnak a parathymicalis nyirokcsomókba.

4.1.9. Metastasis megjelenésének idejét célzó vizsgálatok nyirokcsomók transzplantációjával, illetve sorozatos veseírtásokkal

A továbbiakban azt vizsgáltuk, mennyi idő múlva jelennek meg az áttétek. A kísérletek első részében 6 db F344 hím patkány vesetokja alá 10^6 He/De sejtet implantáltunk, majd beültetést követő 1., 3. és 6. napon 2-2 patkányt elaltattunk, parathymicalis mirigyeket eltávolítottuk, és azokat újabb 2-2 (összesen 6 db) érintetlen hím patkány vesetokja alá ültettük. Feltételeztük, hogy amennyiben a nyirokcsomókban áttét van, két hét alatt a vesetok alatt daganat nő. Azt találtuk, hogy az 1 és 3 napos nyirokcsomók felszívódtak, míg a 6 napos nyirokcsomók beültetése után 14 nappal a daganatok tömege 1.5, illetve 2.0 g volt. A nephrectomiás vizsgálatok során az 1., 3. és 6. napon nem a parathymicalis mirigyeket, hanem az implantált tumorsejteket hordozó b.o. vesét távolítottuk el. A nephrectomia után 13, 11, illetve 8 napot vártunk (így minden esetben 14 napot), majd a parathymicalis mirigyeket eltávolítottuk, és azokat érintetlen hím patkányok vesetokja alá ültettük, majd újabb 14 napig vártunk. Az eredmények megegyeztek az előző kísérletsorozat eredményeivel. Azok a parathymicalis mirigyek, amelyeket a nephrectomia után 13, illetve 11 nap után transzplantáltunk érintetlen hím patkányok vesetokja alá, felszívódtak, bizonyítva, hogy 1, illetve 3 nap után a He/De sejtek még nem képeztek áttétet. Ezzel szemben azok a nyirokcsomók, amelyeket a nephrectomia után 8 nappal távolítottunk el, jelentős mértékben tartalmaztak daganatsejteket. Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy a 10^6 sejtet tartalmazó primaer tumorokból a 3. és a 6. nap között indul meg a metastasis-képződés.

4.2. A mesoblastos nephromával (Ne/De) végzett kísérletek eredményei

4.2.1. Sejtvonal létrehozása mesoblastos nephroma tumorból és reimplantációs vizsgálatok

A szolid tumorból enzimes emésztéssel kinyert sejtek 3×10^6 sejtszámban kerültek a sejttenyésztő edénybe. A sejtszám 24 óra elteltével kb. a két és félszeresére nőtt, a kultúrák 100%-os konfluenciát mutattak. A kontakt gátlás jelei nem ismerhetők fel. A sejteknél rendkívül gyors növekedési ütemet tapasztaltunk. A morfológia, illetve daganat – és metastasis képző jellemzők a 100. passzálás után sem változtak.

A folyékony nitrogénből, illetve a sejttenyészetekből származó daganatos sejteket F344 nőstény patkányok vesetokja alá ültettük, majd 7 nap elteltével az állatokat túlaltattuk és

felboncoltuk. Makroszkóposan megfigyelve a tumor gyorsan nő, infiltratív, az angiogenezis hamar elkezdődik. A tumor a vese méretének többszörösére is megnőhet, a vese nagy része azonban még ebben az állapotban is jól felismerhető. Fénymikroszkóppal vizsgálva megállapítható (H&E festés alapján), hogy a tumorsejtek kicsik (8-12 μ m), alakjuk és méretük változatos (pleomorfia), jellemző a citoplazmához képest nagy mag, a bazofília. A tumor állománya alapvetően laza, kevés kötőszövetet tartalmaz. A tumor először a vesetok alatt, a vese felszínén nő, a növekedés előrehaladtával azonban elkezdődik a veseszövet infiltrációja.

4.2.2. A Ne/De jelzésű sejtek ¹⁸FDG felvételének kinetikája

Frissen izolált F344 patkány fibroblast sejtek ¹⁸FDG felvételét hasonlítottuk össze a szintén F344 patkányból származó, 100 passzálon átesett mesoblastos nephroma (Ne/De) sejtvonal glükóz-analóg felvételével. Az eredmények alapján a Ne/De sejtek ¹⁸FDG felvétele minden mért időpontban több mint kétszeres volt a kontroll sejtekhez viszonyítva. A különbség minden időpontban (15, 30 és 60 perc) szignifikáns ($p < 0.01$). 5 μ M cytochalasin B jelenlétében mind a fibroblast, mind pedig a Ne/De sejtek közel 11-szer kevesebb ¹⁸FDG-t vettek fel.

4.2.3. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és Ne/De sejtekben immunfluoreszcens és Western blot technikával

Az immunfluoreszcens vizsgálatok alapján a fibroblastok és a tumoros (Ne/De) sejtek GLUT-1 expressziója között nem tapasztaltunk jelentős eltérést. A fibroblastok esetében a transzporterek a lamellopódiumok membránjában lokalizáltak, kevés diffúz jel figyelhető meg a citoplazmában. A mesoblastos nephroma sejtek a kontrollhoz képest jelentős GLUT-3 expressziót mutatnak. A GLUT-1 és GLUT-3 transzporterek nem csak a membránban lokalizáltak, hanem ennél a sejtvonalnál is diffúzan fellelhetőek a citoplazmában. Ezek az eredmények is korrelálnak a tumorsejtek magas ¹⁸FDG felvételével és a Western blot analízissel, ahol a GLUT-3 transzporterek mennyisége jóval magasabb mind a kontrollhoz, mind pedig a GLUT-1 szinthez képest a daganatos Ne/De sejtekben.

4.2.4. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban immunfluoreszcens és Western blot technikával

A kontrollhoz képest mindkét transzporter fehérje nagyobb mennyiségben van jelen a

tumorból készült metszeteken és a tumorlizátumokban, illetve a GLUT-3 transzporter mennyisége a tumorban magasabb, mint a GLUT-1.

4.2.5. Ne/De jelzésű mesoblastos nephroma sejtek metastasis formáló képességének vizsgálata

A Ne/De esetében is a patkányok mellüregében található parathymicalis nyirokcsomóban képződik áttét. A tumor a szervet teljesen infiltrálja, a szervben *haemorrhagiák* és zsírsejtek jelennek meg, végül a teljes szerv tumorossá válik. Előrehaladott állapotban a nyirokcsomóban szétszórva, vagy bevézésszerűen összetömörülve vörösvértestek találhatóak. A metastasis vizsgálata során is azt tapasztaltuk, hogy a kontrollhoz képest mindkét transzporter fehérje expressziója kifejezettebb, különösen az 3-as típusú transzporteré. Megfigyelhetőek itt is a bevézések, illetve a normál szöveti állomány fellazulása. A Ne/De tumorlizátumon végzett vizsgálatok eredménye alátámasztotta az immunfluoreszcens kísérleteket, miszerint a glükóz-transzporterek közül a GLUT-3 expressziója magasabb.

4.2.6. Autoradiográfiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok

A hepatocelluláris carcinomához hasonlóan a Ne/De sejtek metastatikus potenciálját is teljes test autoradiográfia és „phosphorimage” analízis segítségével vizsgáltuk. 10^6 Ne/De sejt subcapsuláris transzplantációja után 14 nappal 15.0 MBq aktivitású ^{18}F FDG-t fecskendeztünk i.v. az állatokba. Egy óra múlva az állatokat túllattattuk, majd a módszertani részben ismertetett módon teljes-test autoradiográfiát és „phosphorimage” analízist végeztünk. Az autoradiográfiás kísérletek szerint a legnagyobb aktivitást a tumor mutatta, illetve a kontrollhoz képest a metastasist tartalmazó parathymicalis nyirokcsomók aktivitása emelkedett. A „phosphorimage” analízis alapján a harántcsíkolt izomzatra vonatkoztatott relatív intenzitás értékek rendkívül hasonlóak voltak a hepatocelluláris carcinoma esetén mért értékekhez, vagyis a tumor és a parathymicalis nyirokcsomók aktivitása kiemelkedő a többi szervhez viszonyítva. A ^{18}F FDG szervi megoszlása alapján a DAR értékeket kiszámítottuk. Ne/De esetében is a tumor, illetve a metastasis (parathymicalis nyirokcsomó) DAR értéke kiemelkedő. Ez a kísérlet is alátámasztja eddigi eredményeinket a parathymicalis mirigyeknek a metastasis-képződésben játszott szerepéről.

4.2.7. *Metastasis megjelenésének idejét célzó vizsgálatok nyirokcsomók transzplantációjával, illetve sorozatos veseírtásokkal*

A nyirokcsomó transzplantációs vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a transzplantált 1 és 3 napos nyirokcsomók felszívódtak, míg a 6 napos nyirokcsomók beültetése után 14 nappal a daganatok tömege 0.5, illetve 0.9 g volt.

A veseírtásos vizsgálatok során az 1., 3. és 6. napon nem a parathymicalis mirigyeket, hanem a tumorsejteket hordozó b.o. vesét távolítottuk el. A nephrectomia után a mesoblastos nephroma esetén is 13, 11, illetve 8 napot vártunk, majd a parathymicalis mirigyeket eltávolítottuk, és azokat érintetlen nőstény F344 patkányok vesetokja alá ültettük, majd újabb 14 napig vártunk. Az eredmények megegyeztek az előző kísérletsorozat eredményeivel. A nephrectomia után 13, illetve 11 nappal érintetlen nőstény patkányok vesetokja alá transzplantált parathymicalis mirigyek felszívódtak, bizonyítva, hogy 1, illetve 3 nap után a Ne/De sejtek nem képeztek áttétet. Ezzel szemben a nephrectomia után 8 nappal eltávolított nyirokcsomók daganatsejteket tartalmaztak, de a He/De és a Ne/De között különbséget észleltünk. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a 10^6 sejtet tartalmazó primer tumorokból a 3. és a 6. nap között indul meg a metastasis-képződés, és úgy tűnik, a lassabban növekvő He/De-nek nagyobb a metastasis-képző potenciája, mint a gyorsabban növvő Ne/De-nek.

4.3. A myelomonoblastos leukaemiával (My1/De) végzett kísérletek eredményei

4.3.1. *Sejtvonal létrehozása leukaemiás csontvelőből, és reimplantációs vizsgálatok*

A leukaemiás Long-Evans patkányok csontvelő szuszpenziójából induló My1/De sejttenyészetek körülbelül 2 - 2,5 hónapig fenntarthatóak *in vitro* standard sejttenyésztési körülmények között. Ennek oka, hogy a 100% blast sejtet tartalmazó tenyészetek 50-60 nap elteltével tovább már nem osztódó macrophagokká differenciálódnak, majd a sejttenyészet elpusztul. Mielőtt megkezdődne a sejtek makrofágokká történő átalakulása, a myelomonoblastos sejtek igen intenzíven osztódnak. Megfigyeléseink szerint a sejtszám 1,5 – 2 naponta a duplájára emelkedik. A sejttenyészetekből transzplantációs kísérletekre körülbelül a 45. napig használhatók fel. A vesetok alá ültetett myelomonoblastos sejtek (My1/De) 2 hét elteltével a vese jelentős részét infiltrálják. A hypercelluláris myelosarcoma bazofil festődésű blast sejteket tartalmaz. A diffúz infiltrációs mintázatot adó blast sejtek nagyméretűek, sejmagjuk kerek vagy enyhén behúzott, citoplazmájuk keskeny.

A My1/De sejtek vesetok alá történő transzplantációja után két héttel a leukaemiás Long-Evans patkányok perifériás vérkenetében a fehérvérsejtek száma a normál 6 G/L helyett 60-80 G/L volt. A fehérvérsejtek 50-70%-a blast. Makroszkóposan megfigyelhető volt a kontrollhoz képest megnagyobbodott, világosabb színű máj, ugyancsak megnagyobbodott lép és parathymicalis nyirokcsomó. Mind a májból és lépből készített szövettani metszetek, mind pedig a csontvelő, lép és parathymicalis nyirokcsomó kenetek mikroszkópos vizsgálatai megerősítették a szervek leukaemiás érintettségét.

4.3.2. A My1/De jelzésű sejtek ¹⁸FDG felvételének kinetikája

In vitro ¹⁸FDG akkumulációs méréseinknél kontroll és leukemiás Long-Evans patkányok frissen izolált csontvelő szuszpenzióját hasonlítottuk össze 20 passzálon átesett My1/De leukemiás (myelomonoblast) sejttenyészettel. A kontroll és leukaemiás csontvelő szuszpenzió sejtjeinek ¹⁸FDG felvétele között egyik mért időpontban sem nem volt szignifikáns különbség. A My1/De sejtek radioaktívan jelzett glükóz analóg felvétele minden mért időpontban jelentős különbségeket mutatott a csontvelő szuszpenziókhöz képest. Ez a különbség minden időpontban szignifikáns ($p < 0.01$). Az eredmények oka lehet, hogy amíg a My1/De sejttenyészet 100% daganatos (blast) sejtekből állt, addig a csontvelő szuszpenziók egy rendkívül heterogén sejtpopulációból állnak, eltérő glükóz-igénnyel.

5 μ M glükóz transzporter blokkoló cytochalasin B jelenlétében a ¹⁸FDG felvétel a tized részére esett vissza.

4.3.3. A My1/De jelzésű myelomonoblastos sejtek metastasis formáló képességének vizsgálata

A vesetok alá implantált myelomonoblastos sejtek e modell esetében is a patkányok mellüregében található parathymicalis nyirokcsomóba adnak áttétet. A blast sejtek a szervet teljesen infiltrálják, a szerv - makroszkóposan vizsgálva – vöröses színezetű. A tumorsejtek (blastok) megegyeznek a vesében látottakkal. Jellemző rájuk a nagy méret (kb. 10-12 μ m), keskeny citoplazma kerek vagy enyhén behúzott sejttaggal. A magkromatin laza szerkezetű, benne 1-2 nukleólusz azonosítható.

4.3.4. Autoradiográfias és szerv-eloszlásos vizsgálatok

A My1/De sejtek metasztatikus potenciálját is teljes test autoradiográfia és

„phosphorimage” analízis segítségével vizsgáltuk azzal a különbséggel, hogy Long-Evans patkányok vesetokja alá 10^6 My1/De sejtet transzplantáltunk. 14 nappal a transzplantáció után a *vena femoralis*ba 15.0 MBq aktivitású ^{18}F FDG tartalmú fiziológiás konyhasó-oldatot fecskendeztünk. Az autoradiográfiás kísérletek szerint a legnagyobb aktivitást a vesetok alatt kialakult myeloid sarcoma mutatta, illetve a kontrollhoz képest a metastasiset tartalmazó parathymicalis nyirokcsomók, illetve a máj, a lép és a mesenterialis nyirokcsomók aktivitása volt kiemelkedő, amit az izomzatra vonatkoztatott relatív intenzitás értékek is alátámasztottak. Ezt a megállapítást erősítik a kiszámított DAR értékek is. A szervek közül a legnagyobb aktivitása a primer tumornak, a májnak, a parathymicalis mirigynek, illetve a lépnek volt. A többi kontroll és leukemiás szerv aktivitása között nem volt szignifikáns különbség. Ez a kísérlet is alátámasztja eddigi eredményeinket, a parathymicalis mirigyeknek a metastasis-képződésben játszott szerepéről.

5. Megbeszélés

A dimetil-nitrozaminnal indukált primer hepatocelluláris carcinoma és mesoblastos nephroma daganatokból sikerült sejtvonalat létrehozni, azokat *in vitro* vizsgálni, illetve kísérleti állatokba reimplantálni. Hasonló eredményeket kaptunk a dimetilbenz-antracénnel Long-Evans patkányokban létrehozott myelomonoblastos sejtekkel is. Az így létrehozott sejtvonalak folyékony nitrogénben tartva *in vivo* szaporodóképességüket még 2 év után is megtartják. A primer kultúrából létrejövő sejtvonalt fontos tulajdonsága, hogy képes az ismétlődő vizsgálatokhoz egy folyamatosan megújuló populációt biztosítani. A sejtvonalt modelleknek tükrözniük kell annak a tumornak a tulajdonságait, amelyből eredetileg származnak. Például, ha immundeficiens egérbe ültetjük a sejteket, akkor a keletkező tumor histopathológiai jellemzőinek (genotípus, fenotípus, génexpresszió, drog szenzitivitás) meg kell egyeznie az eredeti tumoréval. Ezért fontosnak tartottuk, hogy a daganatból nyert sejtek és a daganatból létrehozott sejtvonaltak tumorképző és metastatikus potenciálját mindhárom általunk vizsgált tumor féleségnél (He/De, Ne/De, My1/De) ellenőrizzük.

A laboratóriumunkban létrehozott sejtvonaltakat mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* vizsgálatokra egyaránt felhasználtuk. Az *in vivo* vizsgálatokhoz a daganatos sejteket a kísérleti állatba juttattuk. A daganatos sejtek – akár primer kultúrából, akár már karakterizált sejtvonaltból származnak – kísérleti állatba juttatásának számos módja ismeretes (subcutan, intradermalis,

intramuscularis, intravénás, intraartériás és intracardiális, vagy specifikus szervekbe, szövetekbe). A sejtek keringésbe juttatásának számos előnye ismert. Először is a sejtek direkt keringésbe juttatása jelentősen csökkenti a kísérlet időtartamát, hiszen a primer tumor kifejlődését nem kell megvárni, azonban ez a módszer a metastasis kialakulásának több lépését kikerüli, szignifikánsan csökkentve a statisztikai variabilitást, illetve a sejtek befecskendezése során a vérbe kerülő nagyszámú tumor sejt önmagában nem jelenti szükségképpen azt, hogy makroszkópikus metastasis fog kifejlődni. A daganatos sejtek befecskendezésének másik igen elterjedt módja a subcutan „beültetés”, mivel könnyen kivitelezhető, és a tumor növekedése jól látható. Azonban a leggyorsabban növekedő tumorok innen nem adnak metastasist. Mi az *in vivo* tumor vizsgálatainkhoz szingénikus szövet-, illetve sejt heterotopikus transzplantációt alkalmaztunk, és egy új metastatikus tumor modellt hoztunk létre a tumor darabkák ill. sejtek vesetok alá ültetésével.

Bebizonyítottuk, hogy a patkányok vesetokja alá implantált epitheliális, illetve mesodermiális eredetű daganatsejtek, valamint a myelomonoblastos leukaemia sejtek áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba. Ezt azzal igazoltuk, hogy: 1. a vesetok alá ültetett tusszemcsék 24 órán belül megjelennek a nyirokcsomókban, 2. teljes-test autoradiográfiás, illetve szerv-eloszlásos vizsgálatokban a ¹⁸FDG mind a vesetok alatt növekedő tumorokban, mind a parathymicalis mirigyekben jelentősen feldúsul, 3. a primer daganatok, illetve a metastasist hordozó parathymicalis nyirokcsomók a ¹⁸FDG transzportját végző GLUT-1 és GLUT-3 transzportereket overexpresszálják, bár különböző mértékben, 4. hat nap elteltével a baloldali alsó nyirokcsomó a vesetok alá ültetve úgy viselkedik, mintha szolid tumor lenne. Felmerül a kérdés, hogy juthatnak a leváló tumorsejtek a vesetok alól a parathymicalis nyirokcsomókba. A kérdés azért is érdekes, mert az általunk létrehozott metastasis modell egy „skip” vagy kikerülő metastasis modell, hiszen a vesetok közelében levő regionális nyirokcsomókban nem detektálható áttét a daganatos sejtek vesetok alá történő beültetését követő 10-12 napban. A „skip metastasis” jelenségét már mások is megfigyelték osteosarcoma, tüdő - és emésztőrendszeri daganatok esetében.

Tisztában vagyunk számos ellenvetéssel. A vesetok alatt növekedő tumor számos áttétet ad a mesenterialis nyirokcsomók felé is, a leszakadt daganatsejtek az érpályán keresztül is elérhetik a parathymicalis nyirokcsomókat, és vitatott, de nem kizárt, hogy a vesetok és a veseparenchyma nyirokcapillárisai közt anastomosis van, ami némiképp megváltoztatja a metastasisok

lokalizációját. Mindezek ellenére a komplexust a kísérletes analízis szempontjából olyan izolált rendszernek tekinthetjük, amelyben jól tanulmányozható egyetlen nyirokcsomó angiogenesis és daganatos transzformációja. Meghatározhatók továbbá az összefüggések az elsődleges daganatok sejtszáma és a metastasisok megjelenési ideje között, valamint egyes rágszáló-daganatok metastatikus potenciálja. A vesetok alá ültetett nyirokcsomók viszonylagos nagy tömege lehetőséget ad az elsődleges, másodlagos tumorok kémiai analízisére, és így a különbségek tanulmányozására. Végül a módszer alkalmas az áttétképződés kémiai prevenciójának kísérletes vizsgálatára.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a kémiaileg indukált daganatok és a metastasisok magas TGF- β expressziót mutatnak, amely ismert, tumorsejtek által termelt immunszuppresszív faktor. Ez érthető, hiszen egyrészt a limfogén áttétképzés során fellépő immunológiai folyamatok erős immunrezisztenciára történő szelekciót várnak el a daganatos sejtektől, másrészt a kémiai karcinogének által indukált állati daganatokban gyakrabban található mutált celluláris fehérjék, mint a spontán kialakuló humán daganatokban, a mutált fehérjéket pedig az immunrendszer hatékonyan képes felismerni. Ismert az is, hogy a kémiai karcinogének eleve immunszuppresszív hatásúak, így az immunkompetens gazdaszervezetben keletkező daganat kikerül az immunológiai felügyelet („immune surveillance”) alól.

Bebizonyítottuk, hogy a hepatocarcinoma kromatin kondenzációs folyamatai és kromatinstruktúrája jelentősen különbözik mind a nyugvó, mind a regenerálódó máj sejtjeinek kromatinstruktúrájától. Normál, regenerálódó és daganatos májsejtek kromatin struktúráit összehasonlítva a nyugvó májsejtekben dekonzenzált fátyolszerű kromatin, a regenerálódó sejtek sejtmagjaiban változatos szerkezetű kromatin struktúrák figyelhetők meg. A daganatos sejtek kromatinjára a nagyfokú szupertekercseltség jellemző. A tumoros sejtekben tapasztalható megemelkedett növekedési ütem közvetlenül összefügg a topoizomerázok magasabb aktivitásával, amely a sejtciklus rövidüléséhez vezet. A rövidebb sejtciklus miatt nagyobb eséllyel alakulnak ki mutációk, amelyek a sejt halálához vezethetnek. A hepatocelluláris carcinoma sejteknél megfigyelt apoptózis másik oka lehet a tumoros sejtek növekedésének gátlása (pl. elégtelen vaszkularizáció). Az eukaryota DNS szupertekercselődéséért a DNS topoizomeráz I enzim felelős. A részleges hepatektómia után a visszamaradó májszövet regenerálódik, a sejtosztódás nagyrészt a májkapu periportális zónájában történik. Először a hepatocyták proliferálódnak, melyeket az epevezeték sejtjeinek regenerálódása követ. A DNS szintézis első maximumát a 24.,

majd további maximumokat a 36. és a 48. órában ér el hepatocytákban. Regenerálódó sejtekben a DNS szintézis aktiválódásával emelkedett topoizomeráz I enzim aktivitást és szintet váránk. Ezzel szemben nem tapasztaltunk jelentős változást a topoizomeráz I aktivitásában és szintjében a morfológiai képek alapján. A fluoreszcensen festett regenerálódó májsejteken mi sem láttunk erőteljes szupertekercselődést, ami a topoizomeráz megemelkedett működésére utalna. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a megemelkedett topoizomeráz szint miatt jelentős mértékű topológiai változások mehetnek végbe a kromatin szerkezetekben. Ezeket a változásokat a tumoros sejtek kromatin szerkezetének erőteljes szupertekercselődésében figyeltük meg. Eredményeinket alátámasztja az is, hogy a tumorelles terápiaiban sikeresen alkalmazták a topoizomeráz I enzim gátlóit (kamptotecin és származékai).

6. Összefoglalás

Kísérletes eredményeink alapján a célkitűzéseinkben megfogalmazottaknak eleget tettünk. A kísérletek során a primer hepatocelluláris carcinoma (He/De) és a mesoblastos nephroma (Ne/De) sejtenyészetből sejtvonalat indítottunk. A létrehozott sejtvonalak fagyasztva tárolhatók, illetve reimplantálhatóak kísérleti állatokba. A My1/De jelzésű myelomonoblastos sejtek, ha korlátozott ideig is, de sejtenyészetben 50-60 napig fenntarthatóak és szintén reimplantálhatóak. A kémiai karcinogenezissel nyert sejtvonalak lehetővé teszik a gyógyszeres kezelés előzetes *in vitro* kipróbálását, majd az eredmények alapján annak állatkísérletes ellenőrzését, mely a későbbi humán terápia alapjait veti meg.

Patkány hepatocarcinoma (He/De), mesoblastos nephroma (Ne/De), illetve myelomonoblastos leukaemia (My1/De) sejtek patkányok vesetokja alá ültetve áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba. Tus alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy a vesetok nyirokerei és a parathymicalis nyirokcsomók között összeköttetés van. Szövetteni, GLUT transzporterekkel végzett immuncitokémiai, immunhisztokémiai, ¹⁸FDG-vel végzett autoradiographiás és szerveloszlásos vizsgálatok ugyancsak azt bizonyították, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő tumorok „sentinel” nyirokcsomói. A nyirokcsomók transzplantációjával kimutattuk, hogy a metastasisok 10⁶ daganatsejt jelenléte esetén a 3-6. napon mutathatók ki, és a metastasis-képző potenciál független a primer tumorok növekedési sebességétől. A vesetok-

prathymicalis nyirokcsomó komplex alkalmasnak tűnik az áttétképződés izolált vizsgálatára *in vivo*, illetve a secunder tumorok tulajdonságainak alaposabb vizsgálatára.

A kémiaailag indukált hepatocarcinoma sejtek kromatin kondenzációs folyamatai és kromatinstruktúrája jelentősen különböznek mind a nyugvó, mind a regenerálódó máj sejtjeinek kromatinstruktúrájától. Normál, regenerálódó és daganatos májsejtek kromatin struktúráit összehasonlítva a nyugvó májsejtekben dekondezálalt fátyolszerű kromatin, a regenerálódó sejtek sejtmagjaiban változatos szerkezetű kromatin struktúrák figyelhetők meg. A daganatos sejtek kromatinjára a nagyfokú szupertekercseltség jellemző.

7. Új eredmények

1. A kémiai úton előidézett hepatocarcinoma, mesoblastos nephroma és myelomonoblastos leukaemia törzsek folyékony nitrogénben, vagy Kelvinátorban tárolva még három év múlva is alkalmasak arra, hogy Fischer-344, illetve Long-Evans beltenyésztett patkányok b.o. vesetokja alá ültetve növekedésnek induljanak, és két hét elteltével több grammos daganattá fejlődjenek.

2. Ezzel párhuzamosan kimutattuk azt is, hogy mind a hepatocarcinoma, mind a mesoblastos nephroma sejtek *in vitro* tenyészthetők, és a tenyészetekből olyan sejtvonalak alakíthatók ki, amelyek lefagyasztott állapotban ugyancsak fenntarthatók, és patkányokba sikerrel reimplantálhatók. A myelomonoblastos leukaemia sejtek *in vitro* ugyancsak jól szaporodnak, passzálhatók és reimplantálhatók, azonban a 20. *in vitro* passzázs után macrophágokká differenciálódnak.

3. Az első két pontban ismertetett eredmények jól használhatók a preklinikai kemoprevenziós vizsgálatok során. A kísérleteket megrövidítő, gyorsan növvő tumortörzsek adóttak, és nincs szükség a tumorsejtek *in vivo* fenntartására. Ezzel nemcsak a tumortörzsek, vagy vonalak stabilitása biztosított, de jelentős mennyiségű kísérleti állat takarítható meg.

4. Bebizonyítottuk, hogy a klinikai diagnosztikában alkalmazott ¹⁸FDG radiofarmakon módszerek kémiai úton létrehozott daganatokat hordozó patkányban is alkalmazhatók, és segítségükkel a kemoprevenziós próbálkozások hatása rövid idő alatt ellenőrizhető.

5. Új megfigyelés, hogy a vesetok alá ültetett 10⁶ hepatocarcinoma és mesoblastos nephroma sejtek már 6 nap múlva megjelennek a parathymicalis nyirokcsomókban, és ezzel lehetővé vált egy gyors és biztos modell kidolgozása a metastasis képződésének, illetve megelőzésének tanulmányozására.

6. Végül bebizonyítottuk, hogy amíg a nyugvó májsejtekben dekondezálta fátyolszerű kromatin, a regenerálódó sejtek sejtmagvaiban pedig változatos szerkezetű kromatin struktúrák figyelhetők meg, addig a daganatos sejtek kromatin szerkezetére a nagyfokú szupertekercseltség jellemző.

8. Közlemények

A Ph.D. értekezéshez felhasznált közlemények:

Trencsényi G, Kertai P, Somogyi C, Nagy G, Dombradi Z, Gacsi M, Banfalvi G. Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat hepatocarcinoma cells. *DNA Cell Biol.* 2007 Sep;26(9):649-655. **IF:** 1,861

Trencsenyi G, Kertai P, Bako F, Hunyadi J, Marian T, Hargitai Z, Pocsi I, Muranyi E, Hornyak L, Banfalvi G. Renal capsule-parathyroid lymph node complex: a new *in vivo* metastatic model in rats. *Anticancer Res.* 2009 Jun;29(6):2121-2126. **IF:** 1,390

Rozsa D, **Trencsenyi G**, Kertai P, Marian T, Nagy G, Banfalvi G. Lymphatic spread of mesenchymal renal tumor to metastatic parathyroid lymph nodes in rat. *Histology and Histopathology.* 2009, 24, 1367-1379. **IF:** 2,194

Trencsenyi G, Juhasz T, Bako F, Marian T, Pocsi I, Kertai P, Hunyadi J, Banfalvi G. Comparison of the tumorigenic potential of liver and kidney tumors induced by N-nitrosodimethylamine. *Histology and Histopathology.* 2009, 25, 309-320. **IF:** 2,194

Egyéb közlemények:

Banfalvi G, Klaisz M, Ujvarosi K, **Trencsenyi G**, Rozsa D, Nagy G. Gamma irradiation induced apoptotic changes in the chromatin structure of human erythroleukemia K562 cells. *Apoptosis.* 2007 Dec;12(12):2271-2283. **IF:** 3,043

Trencsenyi G, Ujvarosi K, Nagy G, Banfalvi G. Transition from chromatin bodies to linear chromosomes in nuclei of murine PreB cells synchronized in S phase. *DNA Cell Biol.* 2007 Aug;26(8):549-556. **IF:** 1,861

Banfalvi G, **Trencsenyi G**, Ujvarosi K, Nagy G, Ombodi T, Bedei M, Somogyi C, Basnakian AG. Supranucleosomal organization of chromatin fibers in nuclei of Drosophila S2 cells. DNA Cell Biol. 2007 Jan;26(1):55-62. **IF:** 1,861

Banfalvi G, Ujvarosi K, **Trencsenyi G**, Somogyi C, Nagy G, Basnakian A. Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. Apoptosis. 2007 Jul;12(7):1219-1228. **IF:** 3,043

A közlemények összesített impakt faktora: 17,447

Az értekezéshez kapcsolódó idézhető kongresszusi absztraktok:

Gy. Trencsenyi, P. Kertai, F. Bako, J. Hunyadi, T. Marian, S. Kiss, G. Opposits, M. Emri, I. Pocsi and G. Banfalvi. Renal capsule parathymic lymph node complex: Imaging of a new *in vivo* metastatic model in rats with ¹⁸F-FDG. Nuclear Medicine Review, 2009, (12)1:39.

Gy. Trencsenyi, T. Juhasz, F. Bako, T. Marian, R. Salanki, P. Kertai, J. Hunyadi and G. Banfalvi. Comparison of tumorigenicity of liver and kidney tumors induced by N-nitrosodimethylamine by ¹⁸F-FDG uptake and the expression of glucose transporters. Nuclear Medicine Review, 2009, (12)1:50.

T. Nagy, S. Kis, M. Emri, P. Mikecz, **Gy. Trencsenyi**, Z. Hendrik, G. Opposits, L. Trón, T. Marian. Investigation of the distribution of biologically active molecules in tissues of small animals using autoradiography and miniPET imaging. Nuclear Medicine Review, 2009, (12)1:51.

Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek:

Trencsenyi Gy, Nagy T, Bako F, Hunyadi J, Emri M, Pocsi I, Banfalvi G, Marian T and Kertai P. A New *In Vivo* Metastatic Model In Rats: Renal Capsule - Parathymic Lymph Node Complex. I. Közép- és Kelet Európai Laborállat-Tudományi Konferencia (CEELA-2009), Budapest, 2009. (Poszter)

Trencsényi Gy., Juhász T., Bakó F., Márián T., Salánki R., Kertai P., Hunyadi J., Bánfalvi G. N-nitrozodimetilamin indukálta máj és vese tumorok malignitásának *in vitro* vizsgálata ¹⁸F-FDG felvétel és glükóz transzporterek expressziója alapján. Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság (MONT) XVI. országos kongresszus, Debrecen, 2009. (Poszter)

Nagy T., Kis S.A., Emri M., Mikecz P., **Trencsényi Gy.**, Hendrik Z., Opposits G., Trón L., Márián T. Pet radioligandok eloszlásának meghatározása laboratóriumi kisállatok szöveteiben autoradiográfiás és minipet módszerrel. Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság (MONT) XVI. országos kongresszus, Debrecen, 2009. (Poszter)

Trencsényi Gy., Kertai P., Bakó F., Hunyadi J., Márián T., Kiss S., Opposits G., Emri M., Pócsi I. és Bánfalvi G.. A vesetok-parathymicalis nyirokcsomó komplexus – egy új *in vivo* metastasis modell vizsgálata ¹⁸F-FDG radiopharmakonnal patkányokban. Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság (MONT) XVI. országos kongresszus, Debrecen, 2009. (Előadás)