

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Tirozin-kináz gátló anyagok kemopreventív
hatásának vizsgálata állatkísérletes modellekben**

Dr. Gergely Péter Attila

Témavezető: Dr. Hortobágyi Tibor



DEBRECENI EGYETEM
Idegtudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2019

**TIROZIN-KINÁZ GÁTLÓ ANYAGOK KEMOPREVENTÍV HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEKBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban*

Írta: Dr. Gergely Péter Attila

Készült a Debreceni Egyetem Idegtudományi doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Hortobágyi Tibor, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Keller Éva, PhD
Dr. Pórszász Róbert, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Antal Miklós, MTA doktora
tagok: Dr. Diószeghy Péter, PhD
Dr. Ficzer Andrea, PhD
Prof. Dr. Keller Éva, PhD
Dr. Pórszász Róbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Patológia Intézet Tanterme
2019. május 28. 13 óra

1. BEVEZETÉS

A protein kinázok (PK) kulcsfontosságú szerepet töltenek be olyan sejtszintű folyamatokban, mint például a metabolizmus, proliferáció, apoptózis, immunválasz vagy idegrendszeri funkciók. A PK-k celluláris fehérjék foszforilálásán keresztül szabályozzák a különböző enzimműködéseket, meghibásodásuk pedig számos patológiás állapothoz vezethet, mint például daganatos megbetegedések vagy gyulladós folyamatok.

A rosszindulatú daganatok összetett betegségek, melyekre a sejtek kontrollálatlan osztódása jellemző. Jelenleg nyolc fő tulajdonságot említhetünk az efféle daganatos sejtekkel kapcsolatban, melyeket a tumorfejlődés során sajátítanak el, és melyekkel jól magyarázható a természetük. Ezek a tulajdonságok a következők: folyamatos osztódás, a növekedési szabályozók kikerülése, a programozott sejthalállal szembeni ellenállás, replikációs immortalitás elérése, invázió, áttétképzés, elrejtőzés az immunrendszer elől, valamint az energiaháztartás újraprogramozása. A protein kinázok a tumorfejlődés több különböző állomásán játszanak szerepet, mint például a folyamatos osztódás, a növekedési szabályozók kikerülése vagy az invázió és áttétképzés. Ezekből kifolyólag, a PK-k az egyik legintenzívebben tanulmányozott gyógyszer-célponttá váltak az elmúlt 2 évtizedben a daganatokkal szembeni küzdelemben.

Kanner és mtsai 1991-ben felvetették, hogy a p120 mind a non-receptorális, mind a ligand-aktivált transzmembrán tirozin kinázoknak és szerin/treonin kinázoknak (Ser/ThrK) szubsztrátja. Ezen túl pedig a mitogén-stimulált és tirozin kináz onkogén-indukált szignalizációs útvonalaknak is alkotóeleme. Ez az elmélet bizonyítást nyert, és elkezdődött a „protein kinázok kora”.

Napjainkig a humán PK családnak 518 tagját fedezték fel, melyeket 9 csoportba oszthatunk. Közülük a tirozin kinázok (TK) – és gátló molekuláik – a daganatterápia legígéretesebb célpontjai. A TK-ok további két csoportra oszthatók: receptor és nem receptor tirozin kinázok. A receptor tirozin kinázok (RTK) transzmembrán fehérjék, melyek egy extracelluláris ligand-kötő és egy intracelluláris kináz doménből állnak. A nem receptor tirozin kinázok pedig a citoszolban, a sejtmagban vagy a plazma membrán belső felszínén találhatóak, és a sejtosztódásban, valamint a differenciáció szabályozásában vesznek részt. A TK-ok működése szigorú kontroll alatt áll. A nem osztódó sejtekben a kináz aktivitás alacsony. Ezzel ellentétben, a rákos sejtekben mérhető TK expresszió extrém mértékben megemelkedik, amely a különböző mechanizmusok eredményeképpen kialakuló ligand vagy receptor túlexpresszióknak köszönhető. Amennyiben protein kináz inhibitorokkal (PTKi) csökkenthetnénk a másodlagos szignalizációs útvonal intenzitását, az hatékony lehetne a daganatellenes terápiában. Sőt, a molekuláris folyamatok mérséklésével talán a daganatok prevenciójára is lehetőségünk nyílna nagyfokú karcinogén ártalomnak kitett egyéneknél (pl. vegyiparban, mérgező vegyszerekkel dolgozók esetében), mely – mint minden betegség tekintetében – kiemelt fontosságú a daganatos betegségek csökkentése szempontjából. Kutatásainkat abban a szellemben végeztük, hogy megpróbáljunk részben

ismert, részben kísérleti fázisban lévő, tirozin-kináz gátló hatással bíró molekulákat vizsgálni abban a tekintetben, használhatók lennének-e daganatmegelőző (un. kemopreventív) hatású gyógyszerként vagy táplálékkiegészítőként.

Hollósy és Kéri számos olyan PTKi aktivitással rendelkező vegyületet azonosított, melyek másodlagos növényi metabolitból származnak. A szerkezeti aktivitás azonosítását és a kémiai módosítással történő optimalizációt követő *in vitro* tesztelés után több daganatellenes gyógyszerjelölt molekula született.

A 7,12-dimetilbenz[*a*]antracén (DMBA) egy széleskörűen alkalmazott policiklikus aromás szénhidrogén vegyület, mely karcinogenezist kezdeményez különböző onkogén mutációk indukálásán keresztül, mint pl. a *Hras* és *Kras*, melyeknek expressziója megemelkedik. Ezen mutációk eredményeképpen tüdő tumor, laphámsejt karcinóma, vaszkuláris daganatok (hemangiómák), intesztinális, emlő, méh vagy hematológiai eredetű malignus betegségek alakulnak ki. Kutatócsoportunk kifejlesztett egy állatmodellt a külső karcinogének hatására bekövetkezett onko/szuppresszor génexpresszió változás vizsgálatára, melyhez a DMBA jelentős kémiai karcinogénitását használtuk fel. A DMBA-t „rövid-távú” *in vitro* kísérletekhez használják potenciális antikarcinogén vegyületek lehetséges kemopreventív hatásának felderítésére, amely – ha létezik – megszünteti a DMBA-indukált onkogén expressziót. Ezt a modellt korábban már alkalmazták humán citosztatikus vegyületek karcinogén hatásának vizsgálatára.

Kísérleteink első felében 4, egyelőre preklinikai kísérletekben szereplő PTKi molekula, a (1*Z*)-1-(3,4-dihidroxibenzilidén)-3,4-dihidro[1,4]oxazino[3,4-*b*]quinazolon-6(1*H*)-egy, N-(3-bromofenil)-6,7-dimetoxi quinazolin-4-amin, 2-benzil-1-(4-hidroxifenil)-3-metil-2,3-dihidroimidazo[5,1-*b*]quinazolin-9(1*H*)-egy és 2-[(2*E*)-2-(3,4-dihidroxibenzilidén)hidrazino]-N-(3-nitrofenil)-2-oxoacetamid potenciális antineopláziás és kemopreventív tulajdonságait tanulmányoztuk DMBA-val kezelt egereken.

Kutatásunk második felében pedig az imatinib mezilát esetleges kemopreventív hatásait vizsgáltuk szintén DMBA-kezelt egereken, a *Hras*, *Kras*, *Myc* és *Trp53* gének csontvelőben, agyban, vesében, májban, tüdőben, nyirokcsomóban, lépben és csecsemőmirigyben mért expresszióinak tanulmányozásán keresztül.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A kutatás első felében a 4 kísérleti vegyület hatásának vizsgálata a *Hras* gén expressziójára DMBA-val kezelt egerek májában, tüdejében, csontvelőjében és veséjében.
2. A 4 kísérleti vegyület hatásának vizsgálata a *Trp53* gén expressziójára DMBA-val kezelt egerek májában, tüdejében, csontvelőjében és veséjében.
3. A kutatás második felében az imatinib mezilát hatásának vizsgálata DMBA-val kezelt egerekben a *Hras*, *Kras*, *Myc*, *Trp53* gén csontvelői, agyi, vese, máj, tüdő, nyirokcsomó, lép és csecsemőmirigy expressziójára.
4. Lehetséges géncapcsolatok felderítése a *Hras*, *Kras*, *Myc*, *Trp53* gének esetében.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kutatásban alkalmazott valamennyi protokollt a Pécsi Orvostudományi Egyetem Állatkísérleti Bizottsága engedélyezte (BA 02/2000-16/2011). Az állatokat konvencionális állatházban, standard méretű ketrecekben tartottuk, egy-egy ketrecben 6 állatot helyeztünk el. Az állatházban 22-24 °C közötti átlaghőmérséklet uralkodott, illetve 12-12 órás sötét és világos periódusok váltották egymást. Az állatoknak szabad hozzáférést biztosítottunk a vízhez és a standard rágcsálótáplálékhoz a kísérlet teljes időtartama alatt.

3.1. A 4 kísérleti vegyület (Vichem Chemie Kft., Budapest, Magyarország) hatásának vizsgálata a *Hras* és *Trp53* gének expressziójára DMBA-val kezelt egerek májában, tüdejében, csontvelőjében és veséjében

3.1.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés

6-8 hetes (20±4 g), konvencionális körülmények között nevelt, CBA/Ca fajtájú H-2^K haplotípusú egereket vizsgáltunk (minden csoportban 6 nőtényt). Két kontrollcsoportot alakítottunk ki (egy pozitív és egy negatív) az eredmények összehasonlításához (1. ábra). Minden egyes vizsgálandó vegyület hatásának tanulmányozásához 4 kísérleti csoportot hoztunk létre. 24 órával az utolsó DMBA vagy kísérleti vegyülettel történő kezelést követően az állatok életét kíméletesen kioltottuk.

Első csoport - negatív kontroll: 6 egér DMSO	Második csoport - pozitív kontroll: 6 egér DMBA
Harmadik csoport - párhuzamos kezelés	Negyedik csoport - előkezelés a vegyülettel
6 egér 1. vegyület és DMBA együtt	6 egér 1. vegyület, 24 óra múlva DMBA
6 egér 2. vegyület és DMBA együtt	6 egér 2. vegyület, 24 óra múlva DMBA
6 egér 3. vegyület és DMBA együtt	6 egér 3. vegyület, 24 óra múlva DMBA
6 egér 4. vegyület és DMBA együtt	6 egér 4. vegyület, 24 óra múlva DMBA
Ötödik csoport - utókezelés a kísérleti vegyülettel	Hatodik csoport - önálló kezelés a vegyülettel
6 egér DMBA, 24 óra múlva 1. vegyület	6 egér 1. vegyület (DMBA adás nincs)
6 egér DMBA, 24 óra múlva 2. vegyület	6 egér 2. vegyület (DMBA adás nincs)
6 egér DMBA, 24 óra múlva 3. vegyület	6 egér 3. vegyület (DMBA adás nincs)
6 egér DMBA, 24 óra múlva 4. vegyület	6 egér 4. vegyület (DMBA adás nincs)

1. táblázat. A kísérlet első fázisának elrendezése. DMSO: 10 mg/kg i.p., DMBA: 20 mg/kg i.p., 1-4. vegyület: 10 mg/kg i.p.

3.1.2. RNS izolálás és génexpresszió vizsgálatok

Az állatok életének kíméletes kioltása után eltávolítottuk a májukat, a tüdeiket, a csontvelőjüket, illetve a veséjüket, és minden szervből 100-100 mg-ot eltettünk további feldolgozás céljából. A minták homogenizálása után totális mennyiségű celluláris RNS-t izoláltunk TRIZOL reagens segítségével (Invitrogen, Paisley, UK). Az RNS minőségét denaturáló gél-elektroforézis és 260/280 nm-en történő abszorpció mérésével ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) állapítottuk meg. A szükséges hígítás elvégzése után 10 μ g RNS-t dot-blottoltunk Hybond N⁺ nitrocellulóz membránra (ECL kit, Amersham, Little Chalfont, Egyesült Királyság), majd pedig *Trp53* és *Ha-ras* génekre specifikus kemilumineszcens próbákkal hibridizáltuk (Szeberényi J. Professzor, Pécsi Orvostudományi Egyetem, Magyarország). Az RNS izolációja, hibridizálása és detektálása a gyártó instrukcióinak megfelelően történt. A kemilumineszcens jeleket rtg filmekken detektáltuk, a filmeket beszkeneltük, és a Quantiscan (Biosoft, Cambridge, Egyesült Királyság) nevű számítógépes szoftver segítségével értékeltük. A konstitutívan kifejeződő β -aktin-nal rehibridizált membránok szolgáltak a gén expresszió összehasonlításának bázisaként. Az eredményeket a β -aktin expressziójának hányadosaként fejeztük ki.

3.1.3. Statisztikai analízis

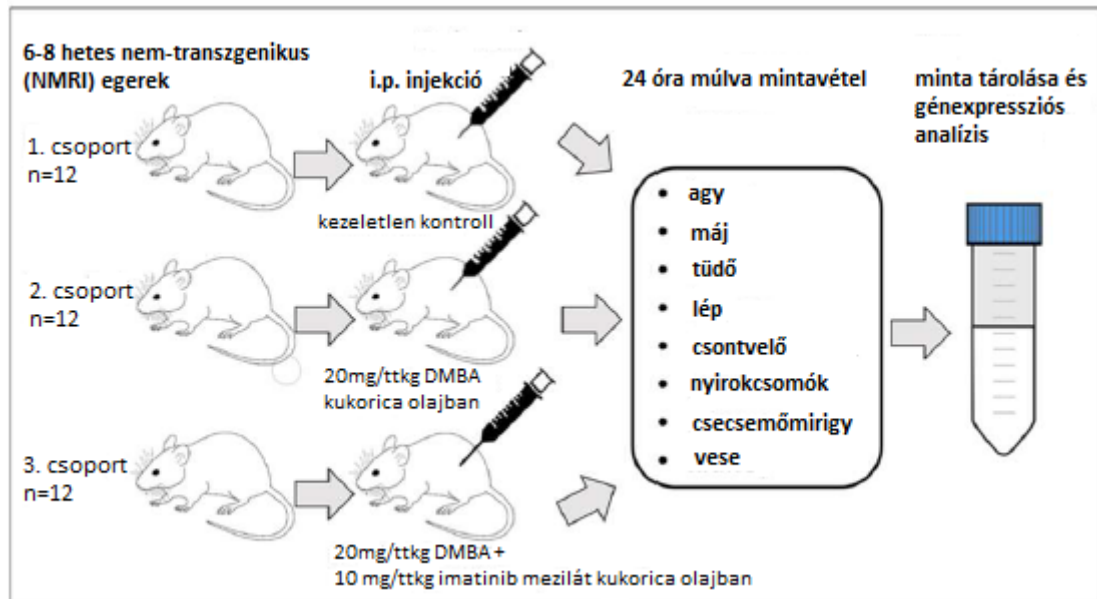
A statisztikai analízist t-teszttel végeztük, melyet az SPSS statisztikai szoftver segítségével hajtottunk végre. Az oszlopok fölötti sávok kétszeres standard deviációt jeleznek. Az expressziós arányokban tapasztalható különbségek szignifikanciáját a t-teszt alapján határoztuk meg, és statisztikailag szignifikánsnak minősítettük a különbséget, ha a $p < 0,05$ volt.

3.2. Az imatinib mezilát esetleges kemopreventív hatásának vizsgálata DMBA-val kezelt egerekben

3.2.1. Kísérleti állatok és kísérleti elrendezés

6-8 hetes (25 ± 5 g), hagyományosan nevelt NMRI tenyésztésű egereket (csoportonként $n=12$, 6 hím és 6 nőstény) vizsgáltunk. Három állatcsoportot alakítottunk ki (2. ábra). Az első csoport tagjait – akik negatív kontrollként szolgáltak – intraperitoneálisan (i.p.) kezeltük a hatóanyagok vivőanyagával (kukorica olaj). A második csoport állatai – pozitív kontroll csoport – kukorica olajban oldott DMBA kezelésben részesültek egyszeri 20 mg/ttkg i.p. dózisban (mindkét anyagot a Sigma Aldrich Kft. Budapest, Magyarország-tól vásároltuk). A harmadik csoport állatait szimultán kezeltük i.p. 10 mg/ttkg dózisu imatinib meziláttal (4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamid-metánszulfonát – Novartis Pharma GmbH termék, gyári nevén Glivec) és 20 mg/ttkg dózisu kukorica olajban oldott i.p. DMBA-val. 24 órával az injekciók beadása után az állatok életét kíméletesen, túllatással (ketamin/xylazin 50/5 mg/ttkg) kioltottuk, majd eltávolítottuk a májukat, lépüket, veséjüket, tüdejüket, csecsemőmirigyüket, csontvelőjüket és az

agyukat. A szerveket gyorsfagyasztás céljából folyékony nitrogénbe helyeztük, majd további vizsgálatokhoz -80 °C-on tároltuk.



2. ábra. A kísérlet második felének elrendezése.

3.2.2. RNS izolálás

Minden szervből 100 mg szövetmintát homogenizáltunk MagNA Lyzer Green Beads csövekben (Roche (Magyarország) Kft.) a MagNA Lyzer eszköz segítségével (Roche (Magyarország) Kft.). Teljes RNS mennyiséget izoláltunk a szövet homogenizátumokból az EXTRAzol RNS izoláló kit segítségével (Invitrogen Life Technologies Magyarország Kft.). Az RNS minőségét 260/280 nm-en történő abszorpcióméréssel (A_{260}/A_{280} nagyobb, mint 1,8) állapítottuk meg.

3.2.3. Génextpresszió vizsgálatok

Egylépes PCR vizsgálatot végeztünk a Kapa SYBR FAST Egylépes RTqPCR KIT (Kapa Biosystems) segítségével LightCycler 480 qPCR platformon, egy 96-lyukú lemezen. A vizsgálat magában foglalt reverz transzkripciót és target amplifikációt is.

A következő egér tumorszuppresszor génekre specifikus primereket (IDT) használtuk: *Hras*, (5'-AATTGGGGGAGCAAGGACAT-3'); *Kras* (5'-TATCCTGCTTCCCATCAGTGTTC-3'); *Myc* (5'-GTTGTGCTGGTGAGTGGAGA-3'); *Trp53* (5'-CTTCACTTGGGCCTTCAAAA-3'), kontroll génnek pedig a *Gapdh*-t (5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3') alkalmaztuk a kvantitatív amplifikáció során.

Az RTqPCR-t 5 percig 42 °C-on, illetve 3 percig 95 °C-on történő inkubációt követően kezdtük el, amely inkubációt 50 ciklus (95 °C-on 10 mp-ig, 55 °C-on 20 mp-ig, 72 °C-on 20 mp-ig) követett, és minden kör végén fluoreszcens értékelést végeztünk. Minden próbát olvadáspont analízissel fejeztünk be (95 °C-on 5 mp-ig, 65 °C-on 60 mp-ig, végül 97 °C-on tovább), hogy biztosítsuk az amplifikáció

specificitását. A fluoreszcens értékeket a $\Delta\Delta C_p$ módszert követően számoltuk ki az Exor4 szotver (Roche (Magyarország) Kft.) segítségével, a gén expressziókat pedig relatív mennyiségi értékeként jelenítettük meg.

3.2.4. Adatelemzés, statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzését az R szotver és az SPSS 21.0 szotver (SPSS Inc., IL, USA) segítségével végeztük. Az mRNS-ek expressziós szintjében megjelenő különbséget kétmintás Student t-próbával számoltuk ki, és akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$. A különböző kísérleti csoportokban/szervekben megjelenő génkapcsolatok bemutatására szolgáló gén-gén interakciós hálózatot a GeneMania Cytoscape 3.4.0. alkalmazás használatával készítettük el. Fizikai, koexpressziós és gén-gén interakciót elemeztünk. A hőmérséklet-térképet pedig a Gene-E program 3.0.204 verziójával rajzoltuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A 4 kísérleti vegyület (Vichem Chemie Kft., Budapest, Magyarország) hatásának vizsgálata a *Hras* és *Trp53* gének expressziójára DMBA-val kezelt egerek májában, tüdejében, csontvelőjében és veséjében

A DMBA önmagában adva emelte a vizsgált kulcsszerepű onko/szuppresszor gének expresszióját, közel az összes szervben, majdnem minden kísérleti részben. A DMSO önmagában – ami negatív kontrollként szolgált, és a DMBA oldószereként használtuk –, valamennyi szervben elenyésző befolyással bírt a vizsgált gének expressziójára. Általánosságban elmondható, hogy a kísérleti vegyületek – párhuzamosan, 24 órával a DMBA kezelés előtt vagy 24 órával a DMBA kezelés után adva – jelentősen csökkentették a vizsgált gének DMBA-indukált túlzott mértékű expresszióját.

4.1.1. Máj

Mind a 4 vegyület csökkentette a *Hras* DMBA-indukált fokozott kifejeződését. Az 1. vegyület leginkább utókezelésként (a DMBA adminisztráció után 24 órával) alkalmazva, az ötödik részben csökkentette a *Hras* expresszióját. A 2. és 3. vegyülettel történő előkezelés (24 órával a DMBA előtt) szignifikánsan ($p < 0,05$), egészen a negatív kontroll állapotokban detektált szintre csökkentette a *Hras* kifejeződését. A DMBA és a 4. vegyület párhuzamos adminisztrációja (harmadik rész) szintén mérsékelte a *Hras* fokozott expresszióját. A májban mérhető *Trp53* kifejeződést az 1. és 4. vegyület volt képes csökkenteni a harmadik, negyedik és ötödik rész protokollja szerint alkalmazva. Az 1. vegyület nem ért el statisztikailag szignifikáns változást a génexpresszió szintjében. A 4. vegyület, a DMBA-val párhuzamosan adagolva szignifikánsan (a negatív kontroll szintjére) csökkentette a *Trp53* mRNS mennyiségét.

4.1.2. Tüdő

Mind a 4 tirozin kináz gátló vegyület csökkentette a *Hras* gén kifejeződésének mértékét a negatív kontroll szintjére. A pozitív kontrollhoz hasonlítva ez a csökkenés szignifikáns mértékű ($p < 0,05$). A 2. vegyület hatékony gátlószernek bizonyult a negyedik részben. A DMBA-val párhuzamosan alkalmazva (harmadik rész), a 4. vegyület jelentősen ($p < 0,05$) (a negatív kontroll szintjére) csökkentette a *Hras* expresszióját. Az 1. vegyület szignifikánsan csökkentette a DMBA által megemelt *Trp53* mRNS szintet a harmadik, negyedik és ötödik részben. A 2. és 3. vegyülettel történő kezelés szintén csökkentette a *p53* expresszióját a harmadik, negyedik és ötödik részben, melyek közül a negyedik és ötödik részben bekövetkezett változás tekinthető szignifikánsnak ($p < 0,05$).

4.1.3. Csontvelő

A kísérleti vegyületek mérsékeltek a DMBA-indukált emelkedett *Hras* mRNS szintet. A 2., 3. és 4. vegyület szignifikánsan csökkentette a *Hras* expresszióját ($p < 0,05$) a kísérlet harmadik, ötödik és hatodik részében. Az 1. vegyület szintén szignifikáns ($p < 0,05$) redukciót ért el a *Hras* kifejeződésében,

elő-, illetve utókezelésként alkalmazva (negyedik és ötödik rész). Mind a négy vegyület csökkentette a *Trp53* expresszióját valamennyi kísérleti részben (harmadik, negyedik és ötödik rész). Az 1. és 3. vegyület egészen a negatív kontroll szintjéig mérsékelte a *Trp53* kifejeződését. A 4. vegyület szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a *Trp53* expresszióját mindhárom kísérleti részben (harmadik, negyedik és ötödik rész). A 2. vegyület által kifejtett mérséklő hatás nem bizonyult szignifikánsnak a harmadik részben, de az elő- és utókezelési kísérleti elrendezésben (negyedik és ötödik rész) jelentősen csökkent a *Trp53* expressziója.

4.1.4. Vese

Mind a 4 vizsgált vegyület csökkentette a *Hras* gén kifejeződésének mértékét a pozitív kontrollhoz viszonyítva. Az 1., 2. és 3. vegyület szignifikánsan redukálta a *Hras* gén expresszióját a harmadik, negyedik és ötödik kísérleti elrendezésben ($p < 0,05$). Az 1. és 2. vegyület a negatív kontroll szintjére csökkentette a *Hras* mRNS mennyiségét. A harmadik és negyedik kísérleti részhez viszonyítva a 3. vegyület nagyobb mértékű redukción eredményezett a *Hras* gén kifejeződésében az ötödik részben. A *Trp53* tumorszuppresszor gén expressziójának mértéke magasabbnak bizonyult a vesében, mint bármelyik másik vizsgált szervben. A DMBA-kezelés (pozitív kontroll) nem okozott további növekedést a gén kifejeződésében. Az 1. és 2. vegyület csökkentette a *Hras* és *Trp53* gének expresszióját minden kísérleti elrendezésben. Ez a mérséklődés szignifikáns volt ($p < 0,05$), kivéve a 2. vegyület hatása a *Trp53* tekintetében, a negyedik részben. A 3. és 4. vegyület szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a *Hras* kifejeződését a harmadik, negyedik és ötödik részben. A 3. vegyület – a DMBA-kezelés előtt és után alkalmazva (harmadik és negyedik rész) – növelte a *Trp53* gén expresszióját az állatok veséjében. A 4. vegyület önmagában, illetve a DMBA-val párhuzamosan alkalmazva szintén növelte a *Trp53* mRNS szintet a vesékben.

4.2. Az imatinib mezilát esetleges kemopreventív hatásának vizsgálata DMBA-val kezelt egerekben

4.2.1. Génexpresszió

Csontvelő

A csontvelőben a DMBA injekció csökkentette a *Hras*, *Kras* és *Myc* expresszióját, és növelte a *Trp53* kifejeződését. A DMBA+imatinib mezilát kombináció még tovább csökkentette a *Hras*, *Kras* és *Myc* expressziót. A negatív kontrollhoz viszonyítva, szignifikánsan alacsonyabb *Kras* expresszió volt kimutatható a második ($p < 0,05$) és harmadik ($p < 0,05$) kísérleti csoportban. A kombinált kezelés szintén szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a tumorszuppresszor *Trp53* gén kifejeződését, összehasonlítva az első (kontroll) és harmadik (DMBA+imatinib mezilát) csoportot.

Agy

A negatív kontrollhoz viszonyítva, a DMBA adminisztráció emelkedett proto-onkogén és tumorszuppresszor génexpressziót eredményezett az agyban, bár ezek az eltérések nem bizonyultak szignifikánsnak. A DMBA-val és imatinib meziláttal folytatott kombinált kezelés csökkentette a vizsgált gének kifejeződését, mindazonáltal ez a változás sem volt szignifikáns.

Vese

A DMBA fokozta a *Hras*, *Kras* és *Myc* proto-onkogének, illetve a *Trp53* tumorszuppresszor gén expresszióját. A szimultán DMBA és TKI kezelés csökkentette a vizsgált gének kifejeződését.

Máj

A DMBA adminisztráció csökkentette a *Hras*, *Kras*, *Myc* és *Trp53* gének kifejeződését. A kombinált DMBA+TKI kezelés hatására a gének expressziójában bekövetkezett csökkenés mérséklődött.

Tüdő

A tüdőben a *Kras* ($p < 0,05$), *Myc* és *Trp53* mRNS szintje emelkedett, míg a *Hras* gén kifejeződése csökkent a DMBA injekció hatására. A DMBA és TKI szimultán adagolása csökkentette a proto-onkogének (*Hras*, *Kras*, *Myc*) expresszióját, és növelte a *Trp53* mRNS szintjét.

Nyirokcsomó

A nyirokcsomókban a DMBA csökkentette a *Hras* kifejeződését, míg a *Kras* és *Trp53* gének expresszióját növelte, amely növekedés változatlanul megmaradt a kombinált DMBA és TKI kezelést követően is. Mindazonáltal a *Myc* expressziója növekedett a DMBA kezelés hatására, de csökkent a DMBA és TKI együttes adásának eredményeképpen. Azonban az mRNS szintjében bekövetkezett változás statisztikailag nem volt szignifikáns.

Lép

A *Hras* és *Kras* gének kifejeződése csökkent a DMBA injekció hatására, azonban nem változott a kombinált DMBA és TKI adminisztrációt követően. A DMBA injekció növelte a *Myc* expresszióját ($p < 0,05$), a kombinált kezelés (DMBA+TKI) pedig csökkentette a *Trp53* kifejeződését.

Csecsemőmirigy

A csecsemőmirigyben emelkedett a *Kras*, *Myc* és *Trp53* expressziója DMBA hatására, míg a *Hras* kifejeződése csökkent. A kombinált DMBA és imatinib mezilát adminisztráció következményeként a *Kras* és *Trp53* kifejeződését alacsonyabbnak mértük, mint a negatív kontroll állatok esetében. Ráadásul, a *Myc* expressziója emelkedést mutatott, míg a *Hras* kifejeződése változatlan maradt a kombinált kezelést követően.

4.2.2. Génkapcsolatok

Szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg a csontvelő, tüdők és lép génexpressziós mintázatában. A hálózati analízisünk pedig azt mutatja, hogy a *Hras*, *Kras* és *Myc* proto-onkogének, valamint a *Trp53* tumorszuppresszor gén kiterjedt kapcsolati rendszerben áll más szabályozó génekkel. A *Zhx2* (amely RAF-ként is ismert) egy homodimer transzkripciós faktor, amely a cinkujjú és homeobox géncsaládhoz tartozik, az *Abi1* (abl interaktor 1) egy adaptor fehérje, amely számos szignáltranszdukciós útvonalat serkent, szabályozza az aktin polimerizációját és a citoskeleton átépülését, ezáltal szerepe van a sejtosztódásban. A *Tcf4* (transzkripciós faktor 4) esszenciális a neuronális fejlődéshez, a *Tsc2* (TSC komplex alegység 2) gén egy tumorszuppresszor fehérjét kódol (tuberin), melynek mutációi (a *Tsc1* által kódolt hamartin fehérje mutációival együtt) felelősek a sclerosis tuberosa komplex kialakulásáért. A *Huwe1* gén kódolja az E3 ubikvitin ligáz proteint, amely az MCL1 (mieloid sejt leukémia szekvencia 1 (*Bcl-2* kapcsolt)) anti-apoptotikus fehérje ubikvitinációjáért és degradációjáért felelős. A *Cdkn2a* (ciklindependens kináz inhibitor 2a) egy fontos tumorszuppresszor gén, amelynek legalább 3 alternatív splicing variánsa ismert. Ezen variánsok közül kettő CDK4 inhibitort kódol, egy pedig egy p53 stabilizáló fehérjét, ezáltal a *Cdkn2a* kiemelkedő szerepet játszik a sejtciklus G1 kontrolljában. Az *Nde1* (nudE idegrendszeri fejlődést szabályozó fehérje 1) gén egy olyan fehérjét kódol, melynek fontos szerepe van a mikrotubulus organizációban, mitózisban és neuronális vándorlásban, és melynek mutációja összefüggésbe hozható a lisszenkefáliával. A *Kmt5a* (lizin metiltranszferáz 5a) egy transzkripciós represszor fehérjét kódol, és fontos a sejtosztódáshoz, valamint a kromatin kondenzációhoz. Az *Mcm4* (minikromoszóma fenntartó komplex komponens 4) gén egy nagymértékben konzervált fehérjét kódol, és az eukarióta genom replikációjának iniciációjában van szerepe. Az *Eif4e* (eukarióta transzláció iniciációs faktor 4E) proto-onkogénként funkcionál, mivel a terméke elősegíti a transzláció elindulását.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A 4 kísérleti vegyület (Vichem Chemie Kft., Budapest, Magyarország) hatásának vizsgálata a *Hras* és *Trp53* gének expressziójára DMBA-val kezelt egerek májában, tüdejében, csontvelőjében és veséjében

Az általunk vizsgált *Hras* onko- és *Trp53* tumorszuppresszor gének, mint a kémia karcinogenezis korai biomarkerei, expresszió fokozódással jelzik a szövetet ért karcinogén ártalmat. A DMBA növelte a vizsgált gének expresszióját az egerek májában, tüdejében és veséjében. Mindazonáltal, a DMBA – a lipofil megoszlásnak és metabolikus aktiváció hiányának köszönhetően – nem gyakorolt jelentős hatást a p53 vesében bekövetkező kifejeződésére. A DMBA leginkább a tüdőre (ahol a CYP1A1 nagy mennyiségben van jelen), a májra (ahol a CYP1A2 nagy mennyiségben van jelen), illetve olyan szövetekre nézve bír jelentős karcinogén hatással, ahol az aktiváló enzimek nagymértékben megtalálhatóak.

Az 1., 2. és 3. vegyület önmagában adva valamennyi kísérleti elrendezésben, valamennyi vizsgált szervben csökkent mértékű expresszió növekedést eredményezett, mint a DMBA-kezelés, ami a vizsgált quinazolin-típusú molekulák lehetséges kemopreventív hatására utal.

Az 1. és 2. vegyület csökkentette a DMBA által megnövelt *Hras* és *Trp53* expressziót is valamennyi vizsgált szervben, minden kísérleti elrendezésben, a PTKi hatásnak köszönhetően. A PTKi vegyületek gátló hatása a tirozin kináz (TK) másodlagos jelátviteli útvonalra legalább 48 óráig érvényesül. Ez a tény alátámasztja az általunk alkalmazott protokollt, a DMBA-kezelés előtt 24 órával, a DMBA-val párhuzamosan, illetve a DMBA után 24 órával adott kísérleti vegyületekkel nyert eredményeket.

A *Hras* gén kifejeződésében bekövetkezett redukció összefügg a Ras extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) útvonal gátlásával (ami az azonnali-korai génekhez közvetít jelet, mint pl. a *c-fos*, *c-jun*, a különböző transzkripciós faktorok expressziójának növelése, a sejtproliferáció serkentése érdekében), ezáltal kemopreventív jellegűnek tekinthető. Sőt, Liu és mtsai, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) teszt segítségével kimutatták, hogy a PTK gátlás csökkentette a ciklin D1, egy sejtciklus szabályozó fehérje szintjét. Ez a folyamat csökkentette az ERK útvonal aktivitását, illetve a ciklin D1 indukálhatóságát, aminek alacsonyabb mértékű sejtosztódás lett a következménye.

Hasonló a helyzet a 3. és 4. vegyület esetében is, annyi különbséggel, hogy a vesékben csak a *Hras* kifejeződését tudták mérsékelten csökkenteni. Ez magyarázható részben a lipofil ágensek vesében történő felszaporodásával, részben pedig a *Trp53* malignus betegségekben megfigyelhető túlzott mértékű expressziójával: a *Trp53* korai túlexpresszációja részben a *Hras* (és a *c-Myc*) – karcinogén ártalmak miatti – túlzott kifejeződésének a következménye. A *Trp53* fokozott mértékű megjelenése kulcsszereppel bír az EGFR TK útvonal elindításában, aminek eredményeként csökken a sejtciklus

intenzitása a G0G1 fázisban történő megállás és apoptózis indukció következtében. Ennek hatalmas klinikai jelentősége van, pl. nem kissejtes tüdőkarcinómában (NSCLC) szenvedő betegekben.

A 4. vegyülettel kezelt csoport állatainak veséiben – a 3. és a 6. részben egyaránt – emelkedett *Trp53* mRNS szintet detektáltunk. Ez az eredmény különbözik attól, amit korábbi *in vitro* vizsgálatok alapján vártunk. Mivel az 1., 2. és 3. vegyület által kialakított génexpressziós mintázat megerősíti ezeket az *in vitro* kísérleteket, további vizsgálatok szükségesek a 4. vegyület vesére kifejtett hatását illetően. A p53 Janus-arcú tulajdonságú, egyszerre van pro-apoptotikus hatása, és képes transzaktiválni olyan géneket, melyeknek a terméke anti-apoptotikus fehérjeként funkcionál. A vizsgálati rendszerünk képes más apoptotikus útvonalak jelzésére is, annak érdekében, hogy a 4. vegyület *p53* expressziót emelő hatása mögötti eseményeket is meghatározhassuk, így a jövőben más apoptotikus géneket is igyekszünk vizsgálni.

A receptor tirozin kináz útvonalak, mint pl. az EGFR, magas aktivitása számos malignus betegség (mint pl. a magas grádusú glióma vagy a hemangioblasztóma) kifejlődésében szerepet játszik. Sőt, Chang és mtsai kimutatták, hogy a primer tüdődaganatokban szenvedő betegekben (akikben nyirokcsomó áttéteket is diagnosztizálnak) a p53 és EGFR mutációk gyakran megelőzik a nyirokcsomó áttétek kialakulását (az EGFR expresszió heterogenitása terápiás aspektusban tekintendő). Ezáltal az EGFR komplex biológiai természetűe potenciális lehetőséget teremt az EGFR inhibitorok terápiás alkalmazására a rákkezelés számos területén, úgymint proliferatív, agiogén, invazív vagy metasztatikus aspektusban. Például az alkaloid típusú staurosporin potens inhibitor a protein kináz C (PKC)-nek és a különböző PDGFR fehérjéknek. Azok a molekulák, melyek növekedési faktor szignalizációs útvonalakat mérsékelnek, a PKC, a foszfoinozítid specifikus foszfolipáz C és inozitol(1,4,5) trifoszfát indukált Ca^{2+} -kiáramlás gátlásán keresztül, azok *in vivo* antitumoros hatással rendelkeznek, és a kemopreventív vegyületek jótékony egészségügyi hatását erősítik. Az említett szignalizációs útvonalak gátlása magyarázhatja a kísérleti vegyületeink hatását, és jelentős összhangban áll az *in vivo* kísérleteink eredményeivel. Az *in vivo* modellen végzett előző kísérletünk során azt a megállapítást tettük, hogy a vizsgált vegyület génexpressziót csökkentő hatása függ az adminisztrációs protokolltól is. Egy kemopreventív hatóanyag több ponton is interakcióba léphet a többlépcsős karcinogenezis folyamatával, például módosíthatja a membrán transzportot, a metabolizmust, reaktív szabadgyököket semlegesíthet, gátolhatja a sejtsztódást, védheti a DNS szerkezeti integritását, befolyásolhatja a DNS metabolizmust és javítást, valamint kontrollálhatja a gén expressziót. Ezek alapján példaként említhető, hogy egy olyan vegyület, amely gátolja a karcinogén szervezeten belüli aktiválódását, több eredménnyel jár, ha a karcinogén ágens előtt kerül be a szervezetbe. Ezzel ellentétben egy olyan hatóanyag, ami a metabolizmust befolyásolja, később kezd el dolgozni. Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a vizsgált vegyületeknek a tirozin kináz gátláson kívül van-e más hatása, illetve, hogy a DMBA karcinogenezisre kifejtett hatásuk függ-e az adminisztráció idejétől, három kísérleti elrendezést alakítottunk ki a DMBA és a vizsgált vegyületek

adagolási sorrendjének alapján. A kísérletünk eredményei talán hozzájárulhatnak ezen vegyületek kemopreventív hatásának jövőbeli feltérképezéséhez.

5.2. Az imatinib mezilát esetleges kemopreventív hatásának vizsgálata DMBA-val kezelt egerekben

A kísérletünk legfontosabb eredményei közé tartozik, hogy a rövidtávú DMBA kezelés i) növelte mindhárom proto-onkogén (*Hras*, *Kras*, *Myc*) expresszióját az agyban és a vesében; ii) növelte a *Kras* és *Myc* szintjét a tüdőben, nyirokcsomókban és a csecsemőmirigyben; iii) fokozta a *Trp53* tumorszuppresszor gén kifejeződését, amely egy kémiai karcinogénnel szemben tett adaptív fiziológiás ellenlépésnek tekinthető.

Kísérletünkben azt figyeltük meg, hogy a DMBA csökkentette a *Hras*, *Kras* és *Myc* expresszióját a májban és a csontvelőben. Ez a megfigyelés azzal lehet magyarázható, hogy a DMBA egy karcinogenezist indukáló vegyület, melyet rendszerint egy karcinogenezist promotáló vegyülettel pl. 12-O-tetradekanoilforbol 13 acetáttal (TPA) szimultán alkalmaznak. Ebből következően előfordulhat, hogy a máj és csontvelő esetében a DMBA önmagában nem elég a tumorgenezishez. A lépben az emelkedett *Myc* szint volt az egyetlen prominens és szignifikán genexpressziós változás. Számos tanulmány számolt már be a *Myc* tumorfejlődésben betöltött szerepéről. Talán a legismertebb összefüggés az, hogy majdnem minden Burkitt limfóma sejtvonal hordoz mutációt, ezáltal a *Myc* túlzott expressziója jellemző rájuk, együttesen valamely immunoglobulin nehéz vagy könnyű lánc szabályozó egységének vagy más, nem véletlenszerű szomatikus mutációval. Ezek a tények jól korrelálnak a mi eredményeinkkel.

A *Hras*, *Kras*, *Myc* és *Trp53* túlzott mértékű expressziója nagyobb jelentőséggel bír, tekintve, hogy kiterjedt génhálózattal rendelkeznek, a gén-gén interakciók pedig kiemelt jelentőségűek a daganat evolúció szempontjából. A *Zhx2*-t (más néven RAF) korábban összefüggésbe hozták a Hodgkin limfómával és a hepatocelluláris karcinómával; az *Abi1*-nek (Abl interaktor 1) szerepe van a rosszindulatú daganatok fejlődésében és inváziójában, csakúgy, mint a neuroblasztómák propagációjában. A *Tcf4* (transzkripció faktor 4) aberráns működését kimutatták glioblasztómákban és kolorektális daganatokban. A *Tsc2* gén (TSC komplex 2. alegység) egy tumorszuppresszor fehérjét kódol (tuberin), amelynek mutációját összefüggésbe hozták már agydaganatokkal, valamint tüdő, vese, bőr, szív, méh és szem eredetű tumorokkal. A *Huwe1* egy E3 ubikvitin ligáz fehérjét kódol, amely szükséges a kolorektális karcinóma és ováriumtumrok fejlődéséhez. A *Cdkn2* (ciklin dependens kináz inhibitor 2a) egy fontos tumorszuppresszor gén, melynek mutációja számos daganatos elváltozásra hajlamosít, mint pl. uroteliális karcinóma, örökletes melanóma, hasnyálmirigy daganat vagy nem-kissejtes tüdő karcinóma. Az *Nde1* (nudE neuron fejlődéshez szükséges fehérje 1) egy olyan proteint kódol, mely esszenciális a mikrotubulus organizációhoz és a mitózishoz, illetve korábbi tanulmányok rávilágítottak az akut és krónikus leukémiák fejlődésében betöltött szerepére. Az *Mcm4*

(mikrokromoszóma fenntartó komplex komponens 4) upregulációját írták le ovárium, bőr és nyelőcső daganatokba. Az *Eif4e* (eukarióta transzláció iniciációs faktor 4) proto-onkogénként funkcionál, mivel a fehérje termékéről az a feltételezés terjedt el, hogy olyan proteinek expresszióját szabályozza, melyek elengedhetetlenek a sejtciklus progresszióhoz, sejt túléléshez és motilitáshoz. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy ez a transzlációs faktor irányítja a sejt transzformációt, tumorgenezist vagy tumor progressziót a prosztata karcinómákban, limfómákban, krónikus mieloid leukémiában (CML), illetve tüdő daganatokban.

Ez a kiterjedt gén-gén interakciós hálózat számos lehetőséget kínál, hogy hatékonyan tudjuk befolyásolni a tumorgenezis folyamatát.

A tüdőben a proto-onkogének (*Hras*, *Kras*, *Myc*) kifejeződése és kapcsolataik más, transzkripció faktorot vagy sejtosztódást szabályozó fehérjét kódoló génekkel (*Tcf4*, *Abi1* és *Zhx2*) látványosan csökkent a kombinált DMBA+TKI kezelés hatására, míg a *Trp53* expressziója növekedett. A negatív kontrollhoz viszonyítva a *Kras* expressziójában bekövetkezett csökkenés szignifikáns volt. A csontvelőben a DMBA+TKI kombinált terápia szignifikánsan csökkentette a *Kras* proto-onkogén és *Trp53* tumorszuppresszor gén kifejeződését és kapcsolatait. A DMBA+TKI kezelés szignifikánsan tudta csökkenteni a DMBA által indukált *Myc* proto-onkogén emelkedett expresszióját és géncapcsolatait. A *Trp53* tumorszuppresszor gén kifejeződése szintén csökkent a kombinált kezelést követően, habár ez a csökkenés nem bizonyult szignifikánsnak.

A rövidtávú kísérletünk eredményei azt sugallják, hogy a protein tirozin kináz gátló (imatinib mezilát) kezelés - a DMBA kémiai karcinogénnel szimultán adagolva - befolyásolhatja a vizsgált proto-onkogének és tumorszuppresszor gén kifejeződési mintázatát, ezáltal az ezen gének által irányított tumorgenezist is.

Az imatinib mezilát képes volt szignifikánsan csökkenteni a *Kras* onkogén expresszióját a csontvelőben és a tüdőben, csakúgy, mint a *Myc* onkogén kifejeződését a lépben. Ezekon kívül a *Myc* mRNS szintje alacsonyabbnak mutatkozott a csontvelőben, agyban, vesékben, tüdőben, nyirokcsomókban. A *Hras* mRNS-el kapcsolatban hasonló eredményeket kaptunk, miszerint csökkent a mennyisége a csontvelőben, vesékben és a tüdőben, habár ezek az eltérések statisztikailag nem voltak szignifikánsak. Ezen onkogének csökkent expressziója valószínűsíthetően az imatinib mezilát tirozin kináz gátló hatásának tulajdonítható, mint azt már a közelmúltban megjelent tanulmányok igazolták. Többek között, Lorri Puil és mtsai. publikálták, hogy a BCR-Abl mutáció képes aktiválni a Ras szignalizációs útvonalat CML-ben úgy, hogy direkt kapcsolatot létesít a Grb2 és mSos1 között, melyek felelősek az inaktív, GDP-kötött Ras, GTP-kötött aktív formává való átalakításáért. Ezáltal, a BCR-ABL kináz aktivitásának gátlása csökkentheti a Ras szignalizáció intenzitását CML-ben. A Ras jelátvitel mellett a BCR-Abl indirekt módon képes aktiválni a *Myc*-t vagy a Janus-aktivált kináz 2 (JAK2), vagy a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalon keresztül. Ezen információk

birtokában azt feltételezhetjük, hogy az imatinib csökkentette a *Myc* expresszióját még a DMBA-indukált fokozott mértékű kifejeződés előtt.

A *Kras*, *Hras* és *Myc* több különböző onkogén útvonalnak is a végrehajtói, és kedvező lenne, ha egy molekulával a tumorigenezisnek egy későbbi, közös pontját tudnánk gátolni. A p53 a legismertebb tumorszuppresszor fehérje, mivel képes sejtciklus leállást vagy sejthalált indukálni, amennyiben hipoxiás körülményeket vagy helyrehozhatatlan genetikai mutációkat észlel, ugyanakkor a *Trp53* gén mutációi a humán daganatok több, mint felével összefüggésbe hozható. Egyre nő azon bizonyítékok száma, melyek szerint ezek a mutációk ún. "funkcióvesztő" mutációk, mindazonáltal az ún. "misszensz" mutációk (nem megfelelő bázispár beépülése a DNS-be) olyan párhuzamos "funkciónyerés"-hez vezethet, mely általában káros hatással bír a sejtre nézve. Számos tanulmány bizonyította, hogy a mutáns p53-nak kulcsszerepe van a tumorfejlődésben, progresszióban és invázióban, mint pl. a mellrák, tüdőrák, kolorektális daganat, különböző agydaganatok, illetve gasztrikus adenokarcinóma esetében. Jelen tanulmányunkban a rövid távú imatinib mezilát kezelés - szimultán alkalmazva a DMBA-val - szembetűnően fokozta a *Trp53* expresszióját a tüdőben, míg csökkentette azt más szervekben. Ezek az eredmények a p53 tumorszuppresszor fehérje génjében bekövetkező "funkciónyerő" mutációt valószínűsítene, melyet az imatinib mezilát igyekezett korrigálni az aberráns fehérje szintjének csökkentésével.

A mostani és korábbi eredményeink alapján az a véleményünk, hogy az imatinib mezilát egy ígéretes kemoterápiás molekula különböző malignus daganatok kezelésére és megelőzésére egyaránt azáltal, hogy csökkenti a proto-onkogének és a mutáns tumorszuppresszor *Trp53* gén expresszióját.

6. FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Az első kísérleti fázisban vizsgált 1. és 2. vegyület csökkentette a DMBA által megnövelt *Hras* és *Trp53* expressziót is valamennyi vizsgált szervben, minden kísérleti elrendezésben, a PTKi hatásnak köszönhetően.
2. Hasonló eredményt igazoltunk a 3. és 4. vegyülettel kapcsolatban is, annyi különbséggel, hogy a vesékben csak a *Hras* kifejeződését tudták mérsékelten csökkenteni, de ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vegyületeknek lehet kemopreventív hatása.
3. A második kísérleti fázisban a DMBA növelte a legtöbb vizsgált szervben növelte a *Hras*, *Kras* és *Myc* gének expresszióját, amely megfelel a vegyület karcinogén tulajdonságának, illetve fontos, hogy ezen gének rendkívül széles génhálózattal rendelkeznek, mely tény számos lehetőséget kínál, hogy hatékonyan tudjuk befolyásolni a tumorgenezis folyamatát .
4. Kiemelendő eredményünk, hogy a DMBA+TKI (imatinib mezilát) kezelés képes volt csökkenteni a vizsgált proto-onkogének szintjét számos szervben, pl. tüdőben, csontvelőben, vesében, amely a vegyület lehetséges kemopreventív hatására utal.
5. További fontos eredmény, hogy az imatinib mezilát csökkentette a valószínűsíthetően funkcióvesztő mutáción átesett *Trp53* gén expresszióját számos vizsgált szervben, melynek DNS-védő szerepe lehet karcinogén ártalmak esetén.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/77/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gergely Péter
Neptun kód: EIF9IY
Doktori Iskola: Idegtudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10036942

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gergely, P.**, Murnyák, B., Bencze, J., Kurucz, A., Varjas, T., Gombos, K., Hortobágyi, T.: Tyrosine kinase inhibitor Imatinib mesylate alters DMBA-induced early onco/suppressor-gene expression with tissue-specificity in mice.
Biomed. Res. Int. 2019, 1-12, 2019.
IF: 2.583 (2017)
2. **Gergely, P.**, Budán, F., Szabó, I., Mezey, G., Németh, Á., Huszár, A., Iványi, J., Gombos, K., Knapp, Á., Órfi, L., Kéri, G., Ember, I.: Kinase inhibitors reduce 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced onco-suppressor gene expression in short-term experiments.
Eur. J. Oncol. 17 (1), 11-21, 2012.
IF: 0.75

További közlemények

3. R. Szabó, R., **Gergely, P.**: Az intenzív transzport jogi és finanszírozási besorolása.
In: Intenzív Transzport. Szerk.: Kádár Balázs, Trust Air Kft., Budapest, 511-517, 2018.
4. Bán, Á., Patonai, Z., Fogarasi, K., Schneider, P., Boda, R., **Gergely, P.**: Fogászati sérülésekről készült láttelepek komplex terminológiai, fogászati és igazságügyi orvosszakértői elemzése.
Orv. hetil. 159 (51), 2154-2161, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.31212>
IF: 0.322 (2017)
5. Schneider, P., Patonai, Z., **Gergely, P.**, Fogarasi, K.: Testi sértés vagy emberölési kísérlet?: a pontatlan orvosi szakkifejezések használatának hatása a büntetőeljárás kimenetelére.
Belügyi szle. 66 (9), 147-163, 2018.





6. Bencze, J., Pocsai, K., Murnyák, B., **Gergely, P.**, Juhász, B., Szilvássy, Z., Hortobágyi, T.: The melanin-concentrating hormone system in human, rodent and avian brain.
Open Med. 13 (1), 264-269, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/med-2018-0040>
IF: 0.484 (2017)
7. **Gergely, P.**, Kádár, B.: A prehospitalis ellátás igazságügyi vonatkozásai.
In: Diagnosztikus és terápiás eljárások a prehospitalis gyakorlatban. Szerk.: Kádár Balázs, TrustAir Kft, Budapest, 527-537, 2014.
8. Szabó, G. T., Nagy-Baló, E., Kracsó, B., Rácz, I., Vajda, G., Rácz, K., **Gergely, P.**, Herczeg, L., Édes, I., Kőszegi, Z.: Pathological validation of a new angiographic area at risk prediction.
Exp. Clin. Cardiol. 20 (1), 422-427, 2014.
9. Hrabovszky, E., Molnár, C. S., Borsay, B. Á., **Gergely, P.**, Herczeg, L., Liposits, Z.: Orexinergic Input to Dopaminergic Neurons of the Human Ventral Tegmental Area.
PLoS One. 8 (12), e83029, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083029>
IF: 3.534
10. Hrabovszky, E., Sipos, M. T., Molnár, C. S., Ciofi, P., Borsay, B. Á., **Gergely, P.**, Herczeg, L., Bloom, S. R., Ghatei, M. A., Dhillo, W. S., Liposits, Z.: Low degree of overlap between kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin immunoreactivities in the infundibular nucleus of young male human subjects challenges the KNDy neuron concept.
Endocrinology. 153 (10), 4978-4989, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-1545>
IF: 4.717
11. Ember, Á., Budán, F., Nowrasteh, G., Varjas, T., Prantner, I., Göbel, G., Horváth, Ö. P., Illényi, L., Cseh, J., Perjési, P., Orsós, Z., **Gergely, P.**, Fehér, K., Ember, I., Kiss, I.: Application of molecular epidemiological biomarkers by monitoring the effects of treatment in colorectal cancer during follow-up study.
Eur. J. Oncol. 16 (2), 99-104, 2011.
IF: 0.531
12. Budán, F., Szabó, I., Varjas, T., Nowrasteh, G., Dávid, T., **Gergely, P.**, Varga, Z., Molnár, K., Kádár, B., Orsós, Z., Kiss, I., Ember, I.: Mixtures of *Uncaria* and *Tabebuia* extracts are potentially chemopreventive in CBA/Ca mice: a long-term experiment.
Phytother. Res. 25 (4), 493-500, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3281>
IF: 2.086
13. Szabó, G. T., Veisz, R., **Gergely, P.**, Rácz, K., Herczeg, L., Rácz, I., Kolozsvári, R., Fülöp, L., Édes, I., Kőszegi, Z.: A Holistic Coronary Care program algoritmusának validálása kórbonctani és CT-eredmények alapján.
Cardiol. Hung. 40 (3), 191-196, 2010.





14. Szabó, G. T., Veisz, R., **Gergely, P.**, Balkay, L., Herczeg, L., Varga, J., Kolozsvári, R., Ungvári, T., Rác, I., Édes, I., Kószegi, Z.: Integration of Standard Myocardial and Epicardial Segmentation: validation by Computed Tomography and Autopsy Studies.
Comput. Cardiol. 36, 349-351, 2009.
15. Ember, Á., Budán, F., Nowrasteh, G., Varjas, T., Göbel, G., Horváth, Ö. P., Illényi, L., Cseh, J., Perjési, P., **Gergely, P.**, Ember, I., Kiss, I.: Molekuláris biomarkerek alkalmazása a colorectális carcinómás betegeken, a műtéti hatás monitorozására követéses vizsgálattal.
Egészségtudomány. 53 (2), 50-60, 2009.
16. Ghodrattollah, N., Varjas, T., Benkő, Á., Szabó, L., **Gergely, P.**, Papp, A., Horváth, Ö. P., Ember, I.: Fruit Café, egy növényi eredetű kivonat hatása génextpressziókra: klinikai epidemiológiai előkísérletek.
Magy. epidemiol. 5 (1), 41-54, 2008.
17. **Gergely, P.**, Kékes, N., Dombi, Z.: Gén-, ill. kromoszómaszintű változások a fontosabb daganatokban.
In: Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája. Szerk.: Ember István, Kiss István, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 284-315, 2005.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,007

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
3,333**

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

Debrecen, 2019.03.20.



8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

In memoriam Ember István professzor (1952-2013)

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Kiss Istvánnak, Dr. Bencze Jánosnak, Dr. Budán Ferencnek, Dr. Ember Ágostonnak, Dr. Fogarasi-Nuber Katalinnak, Dr. Fülöp Péternek, Dr. Gombos Katalinnak, Dr. Holló Krisztinának, Dr. Huszár Andrásnak(†), Dr. Iványi Jánosnak, Dr. Kádár Balásznak, Dr. Kéri Györgynek(†), Dr. Kurucz Andreának, Dr. Mezey Gézának, Dr. Murnyák Balásznak, Dr. Németh Árpádnak, Dr. Orsós Zsuzsának, Dr. Örfi Lászlónak, Dr. Szabó Istvánnak, Dr. Török Péternek, Dr. Varjas Tímeának, Brunnerné Bayer Zsuzsának, Csidei Jánosnének, Csörge Tímeának, Déri Tibornének, Fóris Máriának, Harth Csabánének, Herczeg Mónikának, Nádasdi Norbertnek, Oláh Zsuzsannának, Pál Erzsébetnek, Rónai Krisztinának, Szabolcsi Péternek, Szántódiné Molnár Ágnesnek, Varga Szilviának és Wenczler Máriának, hogy munkájukkal hozzájárultak ahhoz, hogy ez az értekezés elkészülhessen.

Külön köszönetet mondok témavezetőmnek, Prof. Dr. Hortobágyi Tibornak az aktív témavezetésért és a publikáció anyagi forrásának megteremtéséért, Prof. Dr. Antal Miklósnak és Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak a jó tanácsokért, Dr. Herczeg Lászlónak, volt főnökömnek, hogy a napi rutin munkavégzés melletti kutatásra lehetőséget adott.

Örök hálával tartozom családomnak, Dr. Szombathy Zitának, Gergely Nórának és Sárának; szüleimnek, Dr. Gergely Pálnak és Dr. Bagyó Juliannának, testvéremnek, Gergely István Dánielnek soha nem múló szeretetükért, támogatásukért és kitartó bátorításukért.