

# **EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**Trencsényi György**

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



**Témavezetők:**

Prof. Dr. Bánfalvi Gáspár

Prof. Dr. Hunyadi János

**DEBRECENI EGYETEM**

**KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2009**

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>7</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Kémiai karcinogének</b>	10
<i>2.1.1. Kémiai rákkeltők hatásmechanizmusa</i>	11
<i>2.1.2. N-nitrozo-dimetilamin (DMNA)</i>	13
<i>2.1.3. A 7,12 - dimetilbenz(a) antracén (DMBA)</i>	17
<b>2.2. A kísérletes daganatok transzplantációja</b>	19
<b>2.3. Metastasis modellek</b>	20
<b>3. Anyagok és módszerek</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Felhasznált vegyszerek és oldatok</b>	24
<b>3.2 Kísérleti állatok</b>	25
<b>3.3 Kísérletes daganatok</b>	25
<b>3.4. Műtéti eljárás</b>	26
<b>3.5. Daganatos sejtvonal létrehozása</b>	27
<b>3.6. Fibroblast sejtek izolálása Fischer 344 patkányból</b>	28
<b>3.7. Hepatocyta sejtek izolálása Fischer 344 patkány májból</b>	28
<b>3.8. Regenerálódó májsejtek vizsgálata</b>	29
<b>3.9. <sup>18</sup>FDG akkumulációs mérések</b>	29
<b>3.10. Immuncitokémia</b>	31
<b>3.11. Immunhisztokémia</b>	31
<b>3.12. Western blot analízis</b>	32
<b>3.13. Áramlási citometriás mérések</b>	32
<b>3.14. Kromatinszerkezetek izolálása</b>	33
<b>3.15. Adatok feldolgozása</b>	34
<b>4. Eredmények</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Hepatocelluláris carcinoma (He/De)</b>	<b>35</b>
<i>4.1.1. A He/De jelzésű májcarcinoma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve szolid tumor formájában növekedésnek indulnak</i>	35

<b>4.1.2. A He/De jelzésű májcarcinoma szolid tumorok sejtjeiből sejtvonal alakítható ki, amely tenyészetből közvetlenül, vagy Kelvinátorban történő tárolás után ismét visszaültethető a vesetok alá</b>	36
<b>4.1.3. A He/De sejtek kromatin kondenzációs folyamatai jelentősen különböznek mind a nyugvó (G0/G1) májsejtek, mind a regenerálódó máj nagyrészt a sejtciklus S fázisában levő sejtjeinek kondenzációs folyamataitól</b>	37
4.1.3.1. Kromatinformák a nyugvó hepatocytákban	37
4.1.3.2. Kromatinformák a regenerálódó hepatocytákban	39
4.1.3.3. Kromatinformák a hepatocelluláris carcinoma sejtekben	40
4.1.3.4. Kromatin képek fluoreszcens intenzitás-hisztogram elemzése	41
<b>4.1.4. A He/De jelzésű sejtek 15, 30 és 60 perc múlva jelentősen több <sup>18</sup>FDG-t vesznek fel, mint a kontrollnak használt fibroblast sejtek</b>	42
4.1.4.1. In vitro <sup>18</sup> FDG akkumulációs mérések	42
4.1.4.2. He/De sejtek megoszlása a sejtciklus fázisaiban	43
<b>4.1.5. Immunfluoreszcens és Western blot analízissel egyaránt kimutatható, hogy a He/De jelzésű sejtekben a GLUT-1 és GLUT-3 glükóz transzporter fehérjék mennyisége és eloszlása jelentősen különbözik a kontrollnak használt fibroblast sejtektől</b>	44
4.1.5.1. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és He/De sejtekben immunfluoreszcens technikával	44
4.1.5.2. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és He/De sejtekben Western blot analízissel	45
4.1.5.3. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban immunfluoreszcens technikával	45
4.1.5.4. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban Western blot analízissel	47
<b>4.1.6. A He/De jelzésű májcarcinoma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba</b>	48
<b>4.1.7. Tus alkalmazásával bizonyítható, hogy a vesetok nyirokerei és a parathymicalis nyirokcsomók között összeköttetés van</b>	50
<b>4.1.8. Autoradiográfiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok egyaránt azt erősítették meg, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő He/De jelzésű tumorok „sentinel” nyirokcsomói</b>	52
4.1.8.1. Teljes test autoradiográfiás vizsgálatok	52
4.1.8.2. Szerv-eloszlás vizsgálatok	54

<b>4.1.9. A nyirokcsomók transzplantációjával, illetve sorozatos veseírtásokkal kimutatható, hogy a He/De metastasisok 10<sup>6</sup> primaer daganatsejt beültetése esetén a 6. naptól jelennek meg</b>	56
4.1.9.1. Nyirokcsomó transzplantációk	56
4.1.9.2. Nephrectomiás vizsgálatok	57
<b>4.2. Mesoblastos nephroma (Ne/De)</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1. Ne/De jelzésű mesoblastos nephroma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve szolid tumor formájában növekedésnek indulnak</b>	59
<b>4.2.2. A Ne/De jelzésű szolid tumorok sejtjeiből sejtvonal alakítható ki, amely tenyészetből közvetlenül, vagy Kelvinátorban történő tárolás után ismét visszaiültethető a vesetok alá</b>	60
<b>4.2.3. A Ne/De jelzésű sejtek 15, 30 és 60 perc múlva jelentősen több <sup>18</sup>FDG-t vesznek fel, mint a kontrollnak használt fibroblast sejtek</b>	60
4.2.3.1. In vitro <sup>18</sup> FDG akkumulációs mérések	60
4.2.3.2. Ne/De sejtek megoszlása a sejtciklus fázisaiban	62
<b>4.2.4. Immunfluoreszcens és Western blot analízissel egyaránt kimutatható, hogy a Ne/De jelzésű sejtekben a GLUT-1 és GLUT-3 glükóz transzporter fehérjék mennyisége és eloszlása jelentősen különbözik a kontrollnak használt fibroblast sejtektől</b>	62
4.2.4.1. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és Ne/De sejtekben immunfluoreszcens technikával	62
4.2.4.2. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és Ne/De sejtekben Western blot analízissel	63
4.2.4.3. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban immunfluoreszcens technikával	64
4.2.4.4. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban Western blot analízissel	66
<b>4.2.5. A Ne/De jelzésű mesoblastos nephroma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba</b>	66
<b>4.2.6. Autoradiográfiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok egyaránt azt erősítették meg, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő Ne/De jelzésű tumorok „sentinel” nyirokcsomói</b>	67
4.2.6.1. Teljes test autoradiográfiás vizsgálatok	67
4.2.6.2. Szerv-eloszlásos vizsgálatok	69

<b>4.2.7. A nyirokcsomók transzplantációjával, illetve sorozatos veseírtásokkal kimutatható, hogy a Ne/De metastasisok 10<sup>6</sup> primer daganatsejt beültetése esetén a 6. naptól jelennek meg</b>	<b>70</b>
4.2.7.1. Nyirokcsomó transzplantációk	70
4.2.7.2. Nephrectomiás vizsgálatok	71
<b>4.3. Myelomonoblastos leukaemia (My1/De)</b>	<b>73</b>
<b>4.3.1. A My1/De jelzésű myeloblastos sejtek LE patkányok vesetokja alá ültetve szolid tumor (myelomonoblastos sarcoma) formájában növekedésnek indulnak, amely végül leukaemiához vezet</b>	<b>73</b>
<b>4.3.2. A leukaemiás patkányok csontvelő sejtjei tenyésztethetők, tenyészetből közvetlenül, vagy Kelvinátorban történő tárolás után ismét visszaiültethetők a vesetok alá</b>	<b>76</b>
<b>4.3.3. A My1/De jelzésű myeloblastos sejtek 15, 30 és 60 perc múlva jelentősen több <sup>18</sup>FDG-t vesznek fel, mint a kontroll, illetve a leukaemiás patkányok csontvelő sejtjei</b>	<b>77</b>
4.3.3.1. In vitro <sup>18</sup> FDG akkumulációs mérések	77
4.3.3.2. My1/De és csontvelő sejtek megoszlása a sejtciklus fázisaiban	78
<b>4.3.4. A My1/De jelzésű myeloblastos sejtek LE patkányok vesetokja alá ültetve áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba</b>	<b>79</b>
<b>4.3.5. Autoradiográfiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok egyaránt azt erősítették meg, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő My1/De jelzésű tumorok „sentinel” nyirokcsomói</b>	<b>79</b>
4.3.5.1. Teljes test autoradiográfiás vizsgálatok	79
4.3.5.2. Szerv-eloszlásos vizsgálatok	82
<b>5. Megbeszélés</b>	<b>84</b>
<b>6. Összefoglalás</b>	<b>95</b>
<b>7. Summary</b>	<b>96</b>
<b>8. Irodalomjegyzék</b>	<b>97</b>
<b>9. Tárgyszavak</b>	<b>114</b>
<b>10. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>115</b>
<b>11. Függelék (Közlemények másolatai)</b>	<b>116</b>

## Rövidítések jegyzéke:

**<sup>18</sup>FDG:** 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz

**<sup>18</sup>FDG-6-P:** 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz-6-foszfát

**ATCC:** American Type Culture Collection

**DAPI:** 2,6-diamino-2-fenilindol

**DMBA:** 7,12 - dimetilbenz(a) antracén

**DMNA:** N-nitrozo-dimetilamin, dimetil-nitrózamin

**DSMZ:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

**FBS:** magzati borjú szérum

**FITC:** fluoreszcein izotiocianát

**GLUT:** glükóz transzporter

**H&E:** hematoxin-eozin festés

**He/De:** patkány eredetű hepatocelluláris carcinoma

**i.p.:** intraperitoneális

**ID %:** inkubáló dózis radioaktivitás %-os felvétele (10<sup>6</sup> sejtre vonatkoztatva)

**i.v.:** intravénás

**My1/De:** patkány eredetű myelomonoblastos leukemia

**Ne/De:** patkány eredetű mesoblastos nephroma

**PET:** Pozitron Emissziós Tomográfia

**ROI:** Region of Interest

**s.c.:** subctan (bőr alá oltva)

**SDS:** nátrium dodecil szulfát

**SGLT:** sodium/glucose cotransporter

**SPECT:** (Single Photon Emission Computed Tomography) egy foton emissziós tomográfia

**WHO:** World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

## 1. Bevezetés

Az értekezés, amelyet a tisztelt bírálók és az érdeklődő olvasók a kezükben tartanak, a megelőző orvostan, és azon belül is a kemoprevenció tárgyköréhez áll a legközelebb. A kemoprevenció a XX. század második felének a terméke, és eredetileg a fertőző betegségek megelőzésére alkalmazták. Feladata olyan molekulák szintézise, amelyek a behatoló kórokozókat még az előtt pusztítják el, mielőtt azok jelentős szaporodásnak indulnának, és tüneteket okoznának. Sajnos, ilyen hatású vegyületünk ma még kevés van, de a létezőket nagy sikerrel alkalmazzák a malária, az álomkór, vagy a gennyes agyhártyagyulladás tüneteinek a megelőzésére. Később kiderült, hogy a kemoprevenció a nem fertőző betegségekre is kiterjeszhető, és jelentős sikereket értek el a fluoridokkal a fogszúvasodás, a folsavval a fejlődési rendellenességek, vagy az aminotiolokkal és foszforotioátokkal a sugárbetegség megelőzésében. 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 farmakologia 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, amellyel a daganatot előidézték. 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 áttét 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 csoportokat 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 hepatocarcinomák, mesoblastos nephromák és myelomonoblastos leukaemiák sejtjeinek  $10^6$  (~ 1 mg) mennyiségét kontroll, illetve a vizsgálandó vegyülettel előkezelt patkányok vesetokja alá ültettük. A beültetés után két héttel a kísérleti állatokat elaltattuk, felboncoltuk és összehasonlítottuk a növekedő daganatok nagyságát és áttétképző képességét. Engem személy szerint ezekből a kísérletekből elsősorban a három daganattípus biológiai tulajdonságai érdekeltek: transzplantálhatóságuk, explantálhatóságuk, tárolásuk, reimplantációjuk, anyagcseréjük, áttétképző tulajdonságuk. Mivel ezeknek a vizsgálatoknak a kulcsszavai a kémiai karcinogenezis, a transzplantáció, illetve a metastasisok kísérletes vizsgálata, az irodalmi áttekintésben is ezt a sorrendet igyekszem követni.

## **Célkitűzések**

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 tűztem ki:

1. A rendelkezésünkre álló kémiaileg indukált hepatocelluláris carcinomát (He/De), a mesoblastos nephromát (Ne/De), illetve a myelomonoblastos leukaemiát (My1/De) mindeddig 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 kémiaileg indukált tumorok *in vitro* tenyésztetőségét 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 kémiaileg indukált  $10^6$  daganatsejt minden esetben nyirokcsomó metastasist képez, illetve célul tűztük ki a metastasis kialakulásához szükséges idő meghatározását.
3. A kémiaileg indukált daganatsejtek eloszlását képalkotó módszerekkel kívántam vizsgálni. Célul tűztük ki a három kémiai úton keletkezett daganattípus, valamint a normál sejtek  $^{18}\text{F}$ FDG felvételi mechanizmusának összehasonlítását, illetve annak bizonyítását, hogy a humán gyakorlatban már bevált  $^{18}\text{F}$ FDG radiofarmakonnal végzett tumordiagnosztikai módszerek a kémiaileg indukált tumorok, illetve az ezeket hordozó patkányok esetében is használhatóak.
4. Vizsgálni kívántuk az általunk kémiaileg indukált hepatocarcinoma daganatsejtek kromatinsztruktúráját, kromatin kondenzációs folyamatait, illetve ezek eltéréseit a normál sejtekhez és a regenerálódó májsejtekhez képest.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Kémiai karcinogének

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

Az összefüggés közel 240 éve ismert, amióta Percival Pott angol sebész a kéményseprők herezacskó rákjának a kórfejlődésében – nagyon helyesen – a koromszemcséknek tulajdonított elsődleges szerepet. Az azóta elmúlt évszázadok alatt egyre több olyan felismerés történt, amely arra utalt, hogy az emberi környezetben előforduló kémiai anyagok a daganatos betegségek egy részének előidézésért felelősek. Ezek közé a megfigyelések közé tartozik, hogy meghatározott foglalkozási ágakban egyes szervek daganatai gyakoribbak, hogy egyes népcsoportokban, vagy földrajzi területeken a daganatos betegségek különösen elterjedtek, ami a levegő, az ivóvíz, vagy az élelmiszerek szennyezettségére utal. Ismert az is, hogy a mintegy 4000 kémiai anyagot tartalmazó dohányfüst beszívása, vagy alkoholtartalmú italok mértéktelen fogyasztása a légutak, illetve a gyomor – bélcsatorna daganatainak a számát fokozza, végül az, hogy egyes gyógyszerek fogyasztása mind a fogyasztóban, mind azok utódaiban növeli a daganatok kialakulásának gyakoriságát (Kertai, 1973, 1997; Németh, 2006).

A kémiai rákkeltők létezését sejtető megfigyelések indították útjára a kísérletes rákkutatást is. 1914 és 1916 között Yamagiwa és Ichikawa nyulakon, majd 1918-ban Tsutsui és mtsai. 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 (Yamagiwa és mtsai., 1915; Tsutsui, 1918). 15 évvel az állatkísérletek megindulása után már angol kutatók bebizonyították, hogy a kátrányból származó 1,2,5,6-dibenzantracén a rákkeltő policiklikus szénhidrogén. Azóta számos erősen vagy gyengén rákkeltő policiklikus szénhidrogént izoláltak, amelyek a beadás helyén (subcutan sarcomák, lépbe juttatva leukaemiák, uterusba ültetve uterustumor, stb.) daganatokat idéztek elő.

A policiklikus szénhidrogének felismerését csakhamar egyéb, rákkeltő hatású vegyületcsoportok felfedezése követte. Ezek közé tartoznak – kronológiai sorrendet követve - az **aromás aminok**, amelyek felfedezésében nagy szerepe volt az emberben megfigyelt anilin okozta hólyagráknak. Később kiderült, hogy nem az anilin, hanem technológiai

szennyezőként benne található  $\beta$ -naftilamin okozza a daganatokat, ami szintén aromás amin. Japán kutatók primer májrákot idéztek elő patkányokban o-amino-azotoluol, illetve dimetil-amino-azobenzol *per os* adagolásával.

A harmadik csoport tagjai a **nitrózaminok**, amelyek felfedezése a véletlennek köszönhető. Angol kutatók írták le, hogy a gyógyszernek szánt dimetil-nitrózamin patkányokban elsődleges májtumort okoz orális és subcutan adagolással egyaránt. Azóta számos, ebbe a csoportba tartozó vegyületről (dietyl-nitrózamin, nitrozo-metil és – etiluretán, stb.) kiderült, hogy valamennyi laboratóriumi állatfajban tumor idézhető elő velük már kis koncentrációban is. A csoport képviselői vegyületenként eltérő szervspecifitást mutatnak: a dietyl- és dimetil-nitrózamin elsősorban máj- és vesedaganatokat, a nitrozo-metil-uretán tüdőtumorsejtet, a nitrozo-etil-urea központi idegrendszeri daganatot okoz.

A rákkeltő vegyületek negyedik nagy csoportját az **aflatoxinok** alkotják, amelyek jelentőségére az állattenyésztők hívták fel a figyelmet. Az állattápokat fertőző penészgombák termékei az aflatoxinok, amelyek a máj és az epeutak tumorait okozták pisztrángokban, pulykákban, kacsákban és patkányokban egyaránt.

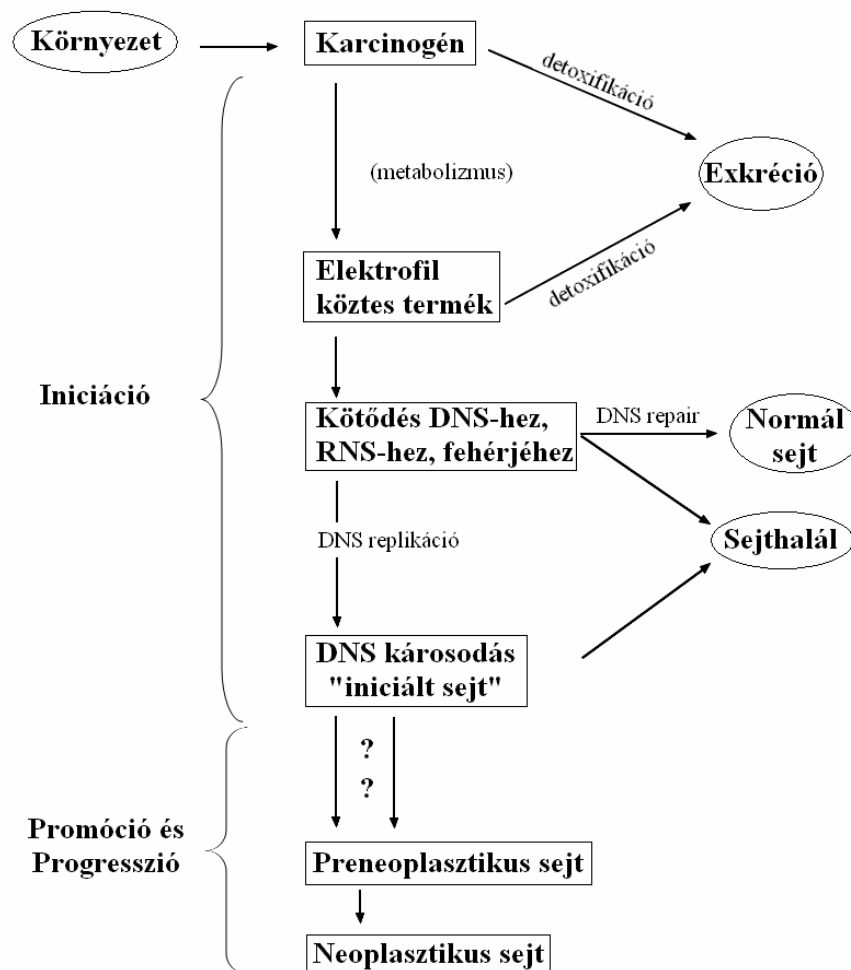
Az ötödik nagy csoportba egymástól távol álló vegyületeket sorolunk: **szervetlen vegyületeket** (azbeszt, króm- és nikkelvegyületek), **természetes anyagokat** (pl. gombafajok hidrazinjait) és **szintetikus szerves termékeket** (pl. peszticidek, mustárgázszármazékok, stb.).

Ma már több mint 1000 többé-kevésbé hatásos rákkeltő vegyületet tartunk nyilván, amelyeknek különböző könyvsorozatokban nézhetünk utána. Meg kell azonban jegyezni azt, hogy a legtöbb kémiai rákkeltővel foglalkozó tudományos publikáció az 1900-as évek közepéből származik, ma az olvasó ritkábban találkozhat ilyen témájú közleményekkel.

### **2.1.1. Kémiai rákkeltők hatásmechanizmusa**

A molekuláris biológiai kutatások legfőbb eredménye az, hogy bármilyen nagyszámú és eltérő kémiai csoportról is legyen szó, a hatásmechanizmus közel azonos. Általános szabály, hogy a szervezetbe kerülő rákkeltő molekulák változatlan formában vagy átalakulás után a DNS valamelyik bázisához kötődnek (adductumképződés). Ha a kötődés helyén mutációk vagy egyenértékű bázisváltozások következnek be, s azok onkogéneket, onkoszupresszor géneket érintenek, és a mutációk rögzülnek (hiányos repair mechanizmusok esetén), akkor bekövetkezik a célsejt transzformációja és normál sejtekből lappangó daganatsejtek lesznek (1. ábra).

A rákkeltők egy része közvetlenül, kémiai átalakulás nélkül hat (pl. dimetil-szulfát), nagyobb részük azonban enzimatiszus aktiválás, biotranszformáció (citokróm P-450 függő monoamino-oxidázok) után fejti ki hatását. A folyamat során a hatástalan „prokarcinogénből” először gyenge hatású „közbülső karcinogén”, majd erős hatású „végső karcinogén” keletkezik. Analitikai vizsgálatok kimutatták, hogy a végső karcinogének kötődése a guanin 6-os számú oxigén- és 7-es számú nitrogénatomján, az adenin 1-, 3- és 7-es nitrogénatomján, a citozin 3-as számú nitrogénatomján és a timin 4-es oxigénatomján a leggyakoribb.

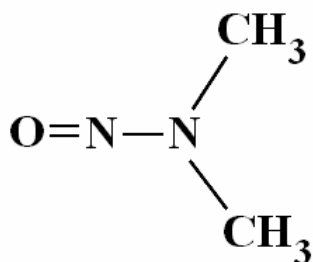


**1. ábra.** A kémiai karcinogének hatásmechanizmusának általános sémája  
(Hill, 1987 nyomán)

A továbbiakban – az értekezés terjedelmének korlátozottsága miatt – mindössze az általunk használt két karcinogén, a dimetil-nitrozaminnak és a 7,12-dimetilbenz(a) antracénnek a hatásmechanizmusát és a patkányokra kifejtett hatását tárgyalom részletesen.

### 2.1.2. *N*-nitrozo-dimetilamin (DMNA)

A nitrózaminok nagy csoportjába tartozó kémiai rákkeltő, amely a nemzetközi besorolás szerint (WHO) az úgynevezett „2A” kategóriába tartozik, azaz emberben valószínűleg rákkeltő hatású vegyi anyag (2. ábra).



2. ábra. A dimetil-nitrózamin szerkezeti képlete

A vegyületet ipari oldószerként használják a textil és műanyagiparban, illetve rakéta hajtóanyag előállításánál (Simoneit és mtsai., 1971). Paraziták (*Nematoda*) elleni védekezésben is használatos.

Analitikai vizsgálatok kimutatták, hogy nyomokban megtalálható többek között birkák tápszerében (Ender és mtsai., 1964), az Afrikában őshonos *Solanum incanum* nevű növényben (Du Plessis és mtsai., 1969), amely a Dél-Afrikában élő bantuk élelmiszer növénye. Bizonyított a jelenléte a búzalisztben, sajtban, füstölt húsban és halban, illetve egyéb élelmiszerekben (Howard és mtsai., 1970). Fazio és mtsai. (1971) 4-26 µg/kg mennyiséget találtak nyers füstölt halakban és húsokban. Különböző nitrózaminok, így dimetil-nitrózamin képződhet a gyomorban, elfogyasztott aminokból és nitritekből (Lijinsky és mtsai., 1970). Asahina és mtsai. (1971) állatkísérletekkel bebizonyították, hogy nagy mennyiségű nitrit és dimetilamin egyidejű orális adagolásával akut májkárosodás idézhető elő egerekben, a máj aminosavai metilálódnak, jelezvén a gyomorban keletkező nitrozo-dimetilamint. A jelenséget leírták patkányokban is (Magee, 1968). Nitrózaminok létrejöhetnek az emberi szervezetben „természetes” körülmények között is másodlagos aminokból és nitrátokból bizonyos baktériumok jelenlétében az emésztő- és kiválasztó szervrendszer fertőzésekor (Alam és mtsai., 1971 a és b; Hawksworth és mtsai., 1971 a és b; Klubes és mtsai., 1971). A még

elviselhető mennyiség 5–10 µg/kg ételmszer körülire tehető; az átlagember évente mintegy 50 µg nitrózamint fogyaszt az ételmszerekkel.

A karcinogének kísérleti állatba juttatásának számos módja ismeretes. A nitrozodimetilamin orális adagolása esetén megfigyelték, hogy ha a kezelés idejét időben megnyújtják, és kis mennyiségeket adagolnak, akkor májtumor (hepatocarcinoma) alakul ki, ha pedig rövidebb idő alatt nagy mennyiségű karcinogént juttatnak a kísérleti állatba, akkor vesedaganatok (nephroblastoma) jönnek létre (Magee és mtsai., 1956, 1959, 1962; Kozhevnikova és mtsai., 1976). Nagyon nagy dózis, károsodást okozhat a DMNA toxikus volta miatt is, *haemorrhagiákat* okozva a májban és a bélben (Sýkora és mtsai., 1985). Nagyon ritkán tüdő daganatok is kialakulhatnak orális adagolás esetén (Zak és mtsai., 1960; Argus és mtsai., 1961).

Intraperitoneális adagolás során 18 mg/kg egyszeri beadása vese tumort eredményezett (Murphy és mtsai., 1966). 125 µg dimetil-nitózamin újszülött (24 órás) patkányba fecskendezése i.p., vesetumort, illetve hepatocelluláris carcinomát eredményez (Terracini és mtsai., 1964, 1969). Hard (1984, 1985) megfigyelte, hogy az eltérő korú kísérleti patkányok különböző módon reagálnak nagy mennyiségű karcinogén egyszeri i.p. adására. Azt tapasztalta, hogy ha újszülött vagy infantilis állatba fecskendezik a DMNA-t, akkor mesenchymális vese tumor keletkezik, ha pedig idősebb (3-5 hónapos) állatba, akkor a vese cortex epitheliális daganatai alakulnak ki.

Murphy és mtsai. (1966) szintén 18 mg/kg karcinogént juttattak vesedaganatok létrehozására intramuscularisan, intraretroperitoneálisan, illetve direkt a vesébe injektálva.

Druckrey és mtsai. (1967) egyszeri, illetve ismétlődő inhalációs kísérleteket végeztek, amelyek során a vesedaganatok mellett orrüregi tumorok is kialakultak.

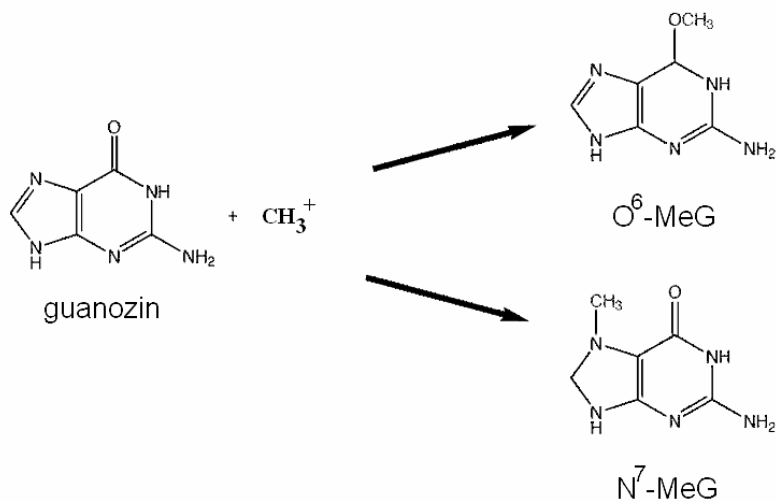
Az elváltozások általában a májat és a vesét érintik. A DMNA hatására sokféle hiperplastikus epitheliális növekedés, egyéb morfológiai elváltozás alakulhat ki: tubulusok vagy glomerulusok epithéliumának hiperpláziája, esetleg mindkettő, a karcinogén koncentrációjától függően. A DMNA vesében főként a glomerulusokban okozhat elváltozást (Kolesnichenko és mtsai., 1975). Elsősorban (és rövid idő alatt) a vese kérgi állományában alakul ki a tumor (Kozhevnikova és mtsai., 1976). A vesében *mesenchymalis* tumor (legismertebb a gyermekkori Wilms tumor, mely morfológiájában hasonlít az általunk vizsgáltakéhoz) ill. *nephroblastoma* (az embrionális vesetelepből az ún. *metanephrogen blastomából* származtatható) alakul ki. A *mesenchymalis* formában a tumorsejtek tubulusszerű képleteket alkotnak; ezek nagyon hasonlóak a normál veséhez, és teljesen eltérnek az embrionálistól és a *nephroblastomától* (Turusov és mtsai., 1980.). A kialakuló

tumor jellemzői függenek az adagolás idejétől és módjától (pl. *oralis* v. *subcutan*) (Sýkora és mtsai., 1985.) A szénhidrát-anyagcserére vonatkozóan megállapították, hogy megnövekedett szintűvé válik a glikolízis, hexokináz- és laktát-dehidrogenáz aktivitás (Kozhevnikova és mtsai., 1976.). Kicsit részletesebb leírás született 1990-ben (Dezso és mtsai., 1990), a DMNA okozta vesetumorok gyors növekedésű *mesenchymalis* eredetű daganatoknak bizonyultak. A vizsgált tumorok egyszeri DMNA kezelés hatására alakultak ki 52 hét alatt, és igen nagyra nőttek (4-10 cm-es átmérővel, a vesét teljesen infiltrálták). A vizsgálatok szerint a daganat inkább sejtes elemekből állt, a sejtek alakja *pleomorf*; a tumorban megtalálhatók voltak egyes helyeken a glomerulusok. A sejtek között kis mennyiségű kollagént találtak. A tumor jellemzői és növekedési rátája 4 éves passzálás során nem változott. Néhány területen nagy sejteket találtak nagy citoplazmával és Mallory-PATH (foszforwolfrámsavas hematoxilin) pozitív fibrillumokkal; elektronmikroszkópos vizsgálatok tanúsága szerint ezekben a sejtekben miofilamentumok találhatóak. *Thrombus*okat, infarktus jeleit, és kiterjedt nekrotikus területeket, bevérzéseket mindenfelé láttak a tumorban. Lektin-hisztokémiai vizsgálatokkal a tumorsejtek keratin-negatívnak bizonyultak, ezzel a daganat hám eredetét kizárták. A vimentin-pozitivitás és dezmin-filamentumok kifejeződése alapján feltételezhető a daganat *mesenchymalis* eredete (Dezso és mtsai., 1990.).

Bár jelen disszertációnak nem témája a karcinogének sejttenyészetekre gyakorolt közvetlen hatásának vizsgálata, mégis érdemes megemlíteni Hard és Borland (1974) munkáit, akik normál vese sejttenyészeteket kezeltek különböző mennyiségű karcinogénnel, illetve 1975-ben megjelent tanulmányukban normál (kontroll) primer vese cortex sejttenyészetek és DMNA hatására keletkezett mesenchymalis vese tumorokból izolált primer kultúrák morfológiai különbségeit vizsgálták.

A DMNA mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* metabolizálódik, az *in vivo* metabolikus folyamatokat először Heath (1962) írta le. Mizrahi és mtsai. (1962) patkány máj mikroszómális vizsgálataikban bizonyították, hogy oxidatív N-dealkilációs folyamatok során formaldehid keletkezik. Összehasonlító *in vitro* kísérletek fényt derítettek arra, hogy a DMNA a humán máj szeletekben ugyanolyan mértékben és sebességgel metabolizálódik, mint a patkány máj szeletekben (Montesano és mtsai., 1970). Számos biokémiai hatást leírtak, amelyek jelzik a DMNA metabolizmusakor keletkező vegyületek toxikus és karcinogén hatását (Magee és mtsai., 1967). A DMNA átalakulását mikroszómális enzimek végzik. A folyamat során aktív alkilgyök keletkezik, 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 ( $N^7$ -MeG) vagy 6-oxi-metilguanint ( $O^6$ -MeG) képez (3. ábra). A  $O^6$ -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.

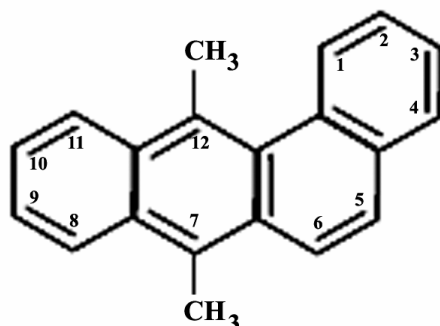


**3. ábra.** DMNA által keletkezett adduktumok

A humán DMNA okozta megbetegedések irodalma igen szegényes, de ismert, hogy DMNA expozíciónak kitett emberekben emelkedett az akut nekrozisok előfordulása, illetve két éven át tartó expozíció cirrhotikus megbetegedéseket okoz (Freund, 1937). Ez a vegyület tehető felelőssé az Afrikában megfigyelhető nagyszámú nyelőcső- és gyomordaganatokért is.

### 2.1.3. A 7,12 - dimetilbenz(a) antracén (DMBA)

A policiklikus szénhidrogének csoportjába tartozó vegyület a WHO besorolása alapján a DMNA-hoz hasonlóan szintén 2A kategóriás karcinogén (4. ábra).



4. ábra. A dimetilbenz-antracén szerkezeti képlete

A DMBA megtalálható a levegő aerosol frakciójában, koncentrációja nagyobb városokban, különösen a téli időszakban  $3,2-39 \mu\text{g}/1000 \text{ m}^3$  (Grimmer, 1968). A légkörbe kerülésének számos oka ismeretes. Hoffman és mtsai. (1962 a és b, 1963) számos tanulmányukban kimutatták, hogy a gépjárművek kipufogó gázai  $0,16 \text{ mg}/\text{kg}$  mennyiségben tartalmazzák. A cigarettafüst kondenzátum is nagy mennyiségben ( $0,1-0,15 \text{ mg}/\text{kg}$ ) tartalmazza (Elmenhorst és mtsai., 1968). Lijinsky és mtsai. (1963) kimutatták, hogy különösen a szénfeldolgozó iparágak nagy mennyiségű ( $64-705 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) policiklikus szénhidrogént juttatnak a levegőbe.

Számos élelmiszerben is előfordul különböző mennyiségben. Néhány példa: füstölt sonka (Hamm és mtsai., 1970), saláta ( $0,6-1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), kelkáposzta ( $0,1-2,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), spenót ( $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Grimmer és mtsai., 1965, Hettche, 1971). Természetesen a DMBA tartalom nagyban függ a termesztés, feldolgozás körülményeitől.

A korai állatkísérletek során inhalációval juttattak patkányokba különböző koncentrációjú ( $0,5-20 \text{ mg}/\text{állat}/30 \text{ hónap}$ ) karcinogént. A kísérletek eredményeképpen tüdő tumorok alakultak ki (Ianysheva és mtsai., 1966). Subcutan és intramuscularis adagolás során (zsírban oldva) sarcomákat hoztak létre állatokban (Roussy és mtsai., 1942).

Talán a legismertebbek a DMBA indukálta leukaemiák. Huggins és mtsai., (1961 a és b, 1962) Sprague-Dawley patkányokban emlő daganatokat indukáltak a vegyülettel. Észrevették azonban, hogy Long-Evans patkányokban a különböző leukaemiák jóval nagyobb

gyakorisággal fordulnak elő, mint az emlő tumorok (Huggins és mtsai., 1966). Ők intravénásan juttatták a karcinogént a kísérleti állatokba. Nekik köszönhetően az 1960-as évektől robbanásszerűen megindult a DMBA indukálta kísérleti leukaemiák vizsgálata (Rich, 1968; Yamamoto és Sugano, 1972). A DMBA által indukált leukaemiáknak 4 típusa ismeretes, amelyeket patológiai és haematológiai jellemzők alapján határoztak meg (Huggins, 1966 és 1979). A négy típus („diffúz máj”, myeloblastos, lymphoid és „thymus típus”) közül csak a „máj típusúra” térek ki, hiszen vizsgálatainkban mi is ezt használtuk. Ebbe a típusba tartozik a DMBA indukált leukaemiák 80%-a. Jellemzője a megnagyobbodott máj és lép. A perifériás vér fehérvérsejtszáma 50 ezer/ $\mu$ l, a vérkenet atipikus erythroblastokat (pronormoblast, basophyl normoblast) tartalmaz. Gyakoriak a polikromáziás és acidophil normoblastok. Nagyszámú blast sejt figyelhető meg a vérkenetben, csontvelőben, lépben és a májban.

Számos tanulmány született a DMBA *in vitro* hatásairól. Széles irodalma van a patkány emlő epithelium sejtenyészeteken történt vizsgálatoknak (Anisimov, 1987). Szubjektív megítélés szerint talán legfontosabbak a kromoszómális vizsgálatok, ismerteve azt a tényt, hogy a DMBA csontvelői sejtekben ismert helyeken pontmutációt, illetve a 2. kromoszóma triszómiáját okozza patkányokban (Sugiyama és mtsai., 1967, 2002; Kurita és mtsai., 1968).

A xenogén policiklikus szénhidrogéneket – így a DMBA-t is – mikroszomális monooxidázok 7,8-epoxid származékokká alakítják. A keletkező vegyületeket a mikroszomális 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.

DMBA expozíció okozta humán megbetegedésekről sem dolgozatok, sem pedig epidemiológiai tanulmányok nem jelentek meg.

## 2.2. A kísérletes daganatok transzplantációja

A transzplantáció eredetileg normál sejtek, szövetek, vagy szervek átültetését jelentette az egyik szervezetből a másikba, vagy ugyanannak a szervezetnek egy másik helyére, hogy új helyén megtapadjon és a gazdaszervezet organikus részévé váljon. A transzplantációt különös sikerrel alkalmazták a fejlődéstani, immunológiai és endokrinológiai kutatásokban, míg a gyakorlatban, a növénynevelésben, a transfuziológiában és a sebészetben.

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 (Baló, 1962; Cardiff, 2007). 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 (Andervont, 1934). Ettől kezdve számos olyan spontán, vagy kémiai karcinogénekkal indukált tumorféleséget – közismert néven tumortörzset – írtak le, amelyek egerekbe, vagy patkányokba ültetve számos passage-on keresztül fenntarthatók voltak, és alkalmasnak tűntek a daganatok biológiai tulajdonságainak vizsgálatára, illetve új kemoterápiás szerek kipróbálására. A továbbiakban néhány, kizárólag patkányra adaptált „tumor-törzs”-et sorolunk fel, megjegyezve, hogy azokat rendszerint első leírójukról nevezték el: Jensen patkánysarcoma, Flexner-Jobling patkányrák, Guérin patkányrák, Walker-patkányrák, Novikoff patkányhepatoma, Yoshida ascites sarcoma, Shay chloroleukaemia.

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 (Baló, 1962). Ez a felismerés vezette Little-t, hogy előállítsa az első, genetikailag azonos egyedekből álló beltenyésztett

egértörzseket, és ezzel új fejezetet nyitott nemcsak a daganat, hanem a transzplantációs immunológia területén (Little, 1979).

A további kísérletekből kiderült, hogy áttörve a transzplantációs rezisztenciát, bármely állatfaj és az ember daganata sikerrel átültethető thymushiányos csupasz egerekbe (Rygaard és mtsai., 1969). Ebből az észlelésből indultak ki Bogden és mtsai is, akik emberi tumor-darabkákat helyeztek thymus-hiányos csupasz egerek vesetokja alá abból a célból, hogy emberi tumorok elleni kemoterápiás szerek hatékonyságát próbálják ki (Bogden és mtsai., 1979). Később ezt a rendkívül költséges kísérletet egyszerűsítették oly módon, hogy a daganatokat immunkompetens, de konvencionális és nem előkezelt egerek vesetokja alá ültették, és a kísérletet már a hatodik napon kiértékelték. Ez volt ugyanis a végső határidő, amikor a beültetett emberi tumorok spontán pusztulása még nem kezdődött el (Kangas és mtsai., 1985). Az ismertetett módszer használhatóságát kemoterápiás vizsgálatokra később megkérdőjelezték (Tueni és mtsai., 1987), de ezzel a továbbiakban a disszertáció nem foglalkozik. A mi számunkra az a lényeges, hogy a vesetok alá történő transzplantáció egyszerű és igen hatásos módszer a daganatok növekedésének és biológiai hatásának a vizsgálatára.

### **2.3. Metastasis modellek**

Az előrehaladott malignus kórképek kimenetelét jelentősen meghatározza a tumorsejtek távoli szövetekbe történő elvándorlása, az áttétképzés, amely a megbetegedések túlnyomó részében a beteg halálához vezet. A metastasis, vagyis a tumoroknak az eredeti helyétől a test más részeibe való szétterjedése a rákkutatás továbbra is legfontosabb problémája. Régóta ismert, hogy a metastasis a tumor „leszakadó” sejtjeiből keletkezik (Fidler, 2003), amelyek képesek átjutni a tumor tokján, az erek endothel sejtjein keresztül vagy azok között, bejutnak a keringésbe (intravazáció) és elhagyják az eredeti tumor helyét (Muraoka és mtsai., 2002). A keringés segítségével egy távolabbi helyre jutó tumoros sejt vagy kilép az érrendszerből, vagy azon belül indul osztódásnak és alkalmazkodik új mikrokozonyzetéhez (Khanna és mtsai., 2004). Új ereket hoz létre (angiogenesis), vagy már meglévő ereket használ és klinikailag releváns metastastatikus elváltozást hoz létre (Al-Mehdi és mtsai., 2000). A metastasis tanulmányozása – annak biológiai komplexitása miatt – összetett kísérleti rendszereket igényel, ami csak állatkísérletek révén lehetséges, ezért elengedhetetlen az *in vivo* modellek megfelelő használata. Egy modell értékét az állati és a

modellezett humán daganat közötti hasonlósággal fejezik ki. Mindazonáltal a humán tumor a maga komplexitásában valószínűleg nem írható le tökéletesen egyetlen modellel. A modellek előnyeinek és hátrányainak megismerésével lehetővé válik az egyedi kérdések és problémák vizsgálatához megfelelő modell(ek) kiválasztása.

Régóta ismert a csirke chorioallantois-membrán rendszer, mint hatékony módja a metastasisok tanulmányozásának. Ennek nagy előnye az egyszerű kivitelezhetőség, azonban fontos, hogy a madarak és emlősök közti evolúciós különbségek miatt nagyon nehéz az összehasonlítása az emberi tumorokkal (Gorden és mtsai., 1986).

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 szövetel 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 mikrokönyezete és a befogadó egyazon genetikai háttérrel rendelkező fajtól, vagy azon belül azonos törzstől származik. Azonban ezek a modellek nélkülözik a humán daganatok számos fontos jellemzőjét. Például a sejtvonalak általában homozigóta beltenyésztett kísérleti állatokból származnak, ezért hiányzik a humán tumorokra jellemző genetikai komplexitás (Gonzalez és mtsai., 2001).

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. Az így kialakuló tumor humán rákos sejtek és rágcsáló stroma sejtek mozaikja. 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 (Schmidt-Hansen és mtsai., 2004). Mivel ezekben a modellekben a befogadó szervezet immunhiányos, lehetetlenné válik az immunrendszer tumorra gyakorolt hatásának vizsgálata. Az immunszuppresszió mellett minden egér-törzsnek megvannak a specifikus jellemzői, amelyek befolyásolják a metastasis biológiáját és vizsgálatát (Garofalo és mtsai., 1993). Példának okáért megfigyelték, hogy az immunszuppresszált nude egerekben az angiogenesis képessége csökkent (Takizawa és mtsai., 1997).

A vizsgálni kívánt daganatok, daganatos sejtek kísérleti állatba juttatásának számos módja ismeretes. Az egyik legelterjedtebb, hogy közvetlenül a keringésbe (intravénásan,

intraartériásan és intracardiálisan) juttatják a tumor sejteket. A bejuttatás helyétől és a tumoros sejt „tropizmusától” függően alakul ki, vagy nem fejlődik 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. Leggyakrabban a kísérleti állat laterális farok vénájába fecskendezik a tumor sejteket. Az aggregált tumor sejtek elsősorban a tüdő kapillárisaiban fennakadva okoznak mikroembolizációt és daganatot. 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 tumorprogresszióban túlnyomóan érvényesül az áttétképzés mag és talaj (seed and soil) elmélete, amely azt jelenti, hogy az áttétképző tumorsejtek klonális fejlődés során, génexpresszió-változás eredményeként alakulnak ki a primer tumorban, azonban mikrokörnyezeti tényezők irányítják az áttétképzés egész folyamatát, beleértve az alkalmas befogadó szövet megtalálását (Fidler, 2003). Ezt figyelték meg abban a kísérletben, amelyben a kevertsejtes basalooid laphámrák invazív jellegű növekedést kizárólag az ortotopikus xenotranszplantációkor mutatott, ugyanakkor növekedési üteme még kifejezettebb volt heterotranszplantáció esetén. A szövettani vizsgálatban megfigyelhető volt, hogy a szájjüregből származó kevertsejtes laphámrák behatolt az egészséges szövetekbe és MMP-9-et termelt, ha a xenotranszplantáció a szájjüregi submucosába történt (Babó és mtsai., 1999). Paget (Ribatti és mtsai., 2006) által megfogalmazott „mag - talaj” hipotézis szerint tehát a tumor növekedését a tumorsejt (=mag) egyedi jellemzői és a mikrokörnyezetből (=talaj) jövő megfelelő növekedési és túlélési jelzéseket befogadó képességei határozzák meg. Az elméletet alátámasztják azok a sejtvonalak, amelyek a farokvénába történő injektálást követően nem a tüdőben hoznak létre metastasist (Bogenmann, 1996). Közvetlenül a keringésbe juttatott sejtek alkalmazásának fontos eredménye az eltérő metastatizáló képességű variánsok kifejlesztése. Fidler és mtsai. olyan sejtvonalat fejlesztett ki ugyanazon tumorból, amelyek egyre nagyobb metastatikus potenciállal jellemezhetőek (Fidler és mtsai., 1977 a és b). Fontos megjegyezni számos modell hátrányaként, hogy a „metastatikus kaszkád” korai fázisai hiányoznak.

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 erekbe ortotopikus transzplantáció során ültették be (Nagamachi és mtsai., 1998; Bibby, 2004). Ez a sejtek olyan szövetbe vagy szervbe történő beültetését jelenti, amelyből az szövettanilag származik. Az így kifejlesztett modellek jobban megközelítik a modellezett humán rendszert (Bibby, 2004; Khanna, 2000). Az ortotopikus implantáció gyakran eredményez metastasist, és relevánsabb kolonizációs mintázatot mutat, mint az azonos körülmények között végzett, de más szövetbe vagy szervbe történő ectopikus beültetés. Ezt támasztják alá azok a vizsgálatok, amelyek során például a colorectalis tumor sejteket a vakbélbe (Schackert és mtsai., 1989), vese carcinoma sejteket a vesébe, vagy a vesetok alá (Naito és mtsai., 1986, 1987), melanoma sejteket a bőrbe (Kozlowski és mtsai., 1984), illetve osteosarcoma sejteket csontba (Berlin és mtsai., 1993) ültettek.

Az ortotopikus transzplantáció tumorsejtjei származhatnak a sejtek közvetlen befecskendezéséből, illetve tumordarabok sebészeti beültetéséből. Az olyan ortotopikus modellekben, ahol a tumor növekedése gyors, gyakran szükséges sebészeti beavatkozás a túl nagyméretű primer tumor miatti halálozás szabályozásához (Sharkey és mtsai., 1984). Bebizonyosodott, hogy az elsődleges tumor eltávolítása a vizsgált modelltől függően fokozhatja, vagy elnyomhatja a metastasist. Ennek megfelelően a spontán metastasis modelleket két csoportra osztják. Az egyik csoportban a kísérleti állatok primer tumora a vizsgálat végéig megmarad. A másik csoportban a primer tumort eltávolítják, hogy a metastasis detektálható méretűvé növekedhessen. Természetesen a primer daganat eltávolításának időpontja kritikus. Általában a tumor mérete arányos a metastasis kialakulásának valószínűségével (Price és mtsai., 1990).

Bármelyik transzplantációs modellt is alkalmazzuk, figyelembe kell venni a kísérleti állat fiziológiai tulajdonságait és állapotát is. Igen fontos tényező például az életkor (Baumgart és mtsai., 1991). Ennek egyik oka, hogy a daganatos sejtek tapadását és átjutását az erek intima rétegén befolyásolják az erek architektúrája és haemodinamikai jellemzői (endothel sejtek integritása, atherosclerosis, lumen átmérő, gyulladásos folyamatok, stb.) (Taniguchi, 1992), amely jellemzők az életkorral változnak. A másik ok, hogy az életkor előrehaladtával a szervek is változnak. Megfigyelték (Khazaie és mtsai., 1993), hogy ha transzformált patkány máj epithel sejteket fiatal állatokba i.p., s.c., illetve májba injektálnak, akkor szignifikánsan eltérő gyakorisággal alakul ki daganat.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Felhasznált vegyszerek és oldatok

Az N-nitroso-dimethylamin a Sigma-Aldrich Kft, Budapest terméke, a 7,12 - dimetilbenz(a) antracén a Serva, USA terméke, amelyet Intralipidben (Kabi-Vitrum AB, Svédország) oldottunk. HBSS (Hank's balanced salt solution).

Beágyzáshoz CMC (Carboxymethylcellulose sodium salt, Sigma C5013, High Viscosity) 1%-os oldatát használtuk.

*A patkány máj átmosásához használt perfúziós folyadék összetétele HBSS oldat  $\text{Ca}^{++}$  és  $\text{Mg}^{++}$  mentes formája, amely 0.5% albumint, 1.0 mM  $\text{MgSO}_4$ -ot, 2.0 U/ml heparint, 10.0 mU/ml inzulint és 25.0 mM  $\text{NaHCO}_3$ -ot tartalmazott. A sejtizoláláshoz használt perfúziós oldat az előbbi heparinmentes formája, amely I-es típusú 20 U/ml kollagenázt tartalmazott. Az oldatok pH-ját 7,4-re állítottuk be és 0,22  $\mu\text{m}$ -es szűrőn keresztül sterilizáltuk.*

*A sejtek tenyésztéséhez használt tápfolyadékok a következők voltak: RPMI 1640 + 10 % FBS, DMEM + 10% FBS, Ham's F-12 + 17% FBS. Minden sejtenyésztéshez használt oldat a GIBCO (Invitrogen) terméke.*

*Az immuncitokémiához és immunhisztokémiához használt anyagok a következők voltak: Borjú szérum albumin (BSA, Fermentas International Inc. Burlington, Canada), rabbit anti-rat-GLUT-1, anti-rat-GLUT-3 és anti-TGF  $\beta$ 1 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), Texas red-konjugált anti-rabbit másodlagos antitest (Vector Laboratories, Ltd. Peterborough, England), Vectashield Hard Set DAPI (Vector Laboratories, Ltd. Peterborough, England), FITC-Phalloidin (Sigma, Budapest, Hungary).*

*A Western blot analízishez (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.01 % brómfenolkék oldva 10 % SDS-ben, 100 mM  $\beta$ -mercapthoethanol) összetételű elektroforézis puffert használtunk. A blokkoló oldat összetevői a következők voltak: 5 % nem zsíros, száraz tej(por) PBST-ben (PBS, 0.1 % Tween 20, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 115 mM NaCl; pH 7.4) oldva.*

*A 2,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a Braunschweig Chemie terméke. A dextran T-150 a Pharmacia, a colcemid a Boehringer gyártmány. Az izotóniás puffer 140mM szacharóz,*

60mM KCl, 10mM Hepes, pH 7.4, 5,0 mM KPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, összetételű volt.

*Az antifade médium komponensei:* 1,4-diazobiciklo-(2,2,2)-oktán (90% w/w), 20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.02% nátrium-azid és 25 ng/ml DAPI a kék fluoreszcens festéshez.

A permeabilizáláshoz használt hipotóniás puffer összetevői: 9 mM Hepes, pH 7.8, 5.8 mM ditiotritol, 4.5 % dextran T-150, 1 mM EGTA és 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

*A magizoláláshoz használt duzzasztó puffer:* (50 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub> , 3 mM ditiotritol és 5 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 8.0 )

A frissen készült fixáló oldat jégcet és metanol 1:3 arányú elegyéből állt.

### **3.2 Kísérleti állatok**

A kísérleteket 120 db 120-160 g-os beltenyésztett nőstény és hím Fischer 344, illetve nőstény Long-Evans patkányon végeztük. Az állatokat konvencionális laboratóriumi körülmények között tartottuk, szemisztetikus diétával (Charles River Kft., Gödöllő, Magyarország) etettük, és csapvízzel ad libitum itattuk. A kísérleteket az UK Állatkísérletes bizottságának előírása szerint (Workman és mtsai., 1988) a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának engedélyével (eng. sz: 22/2007) folytattuk.

### **3.3 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).

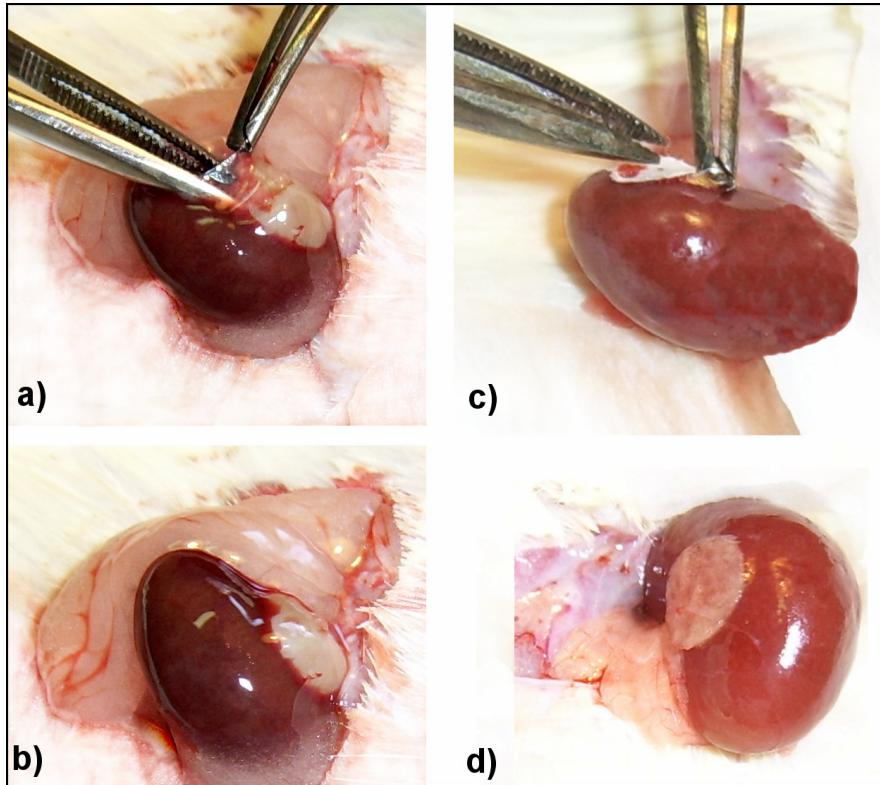
A nephromát és a carcinomát olyan Fischer 344 patkányokból izoláltuk, amelyeknek újszülött korukban (24 órával születésük után) 125 µg/állat n-nitrozodimetilamin fiziológiás konyhasó oldatát fecskendeztük be i.p.. 5-7 hónapos várakozási idő után a tumorokat eltávolítottuk, kisebb darabokra szeleteltük, F344 patkány vesetokja alá ültettük (*in vivo* fenntartás), belőlük sejtvonalat alakítottunk ki, vagy folyékony nitrogénben tároltuk (Dezső és mtsai., 1991; Paragh és mtsai., 2003; Trencsenyi és mtsai., 2007).

A myelomonoblastos leukaemiát Huggins és Sugiyama (1966) módszerével hoztuk létre 50 napos nőstény Long-Evans patkányokban, amelyek 3 X 40 mg/kg 7,12-dimetilbenz(a)

antracén oldatát kapták i.v. (Huggins 1966). 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 (*in vivo* fenntartás), vagy folyékony nitrogénben tároltuk.

### 3.4. 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 (5. ábra a, b), Gelaspon<sup>R</sup> korongon sejteket (5. ábra c, d) (Uzvölgyi és mtsai., 1990), illetve nyirokcsomót helyezünk el. Első lépésben Galaspon<sup>R</sup> (Germed, Rudolstadt, Németország) lapokból 4 mm átmérőjű és 1 mm vastagságú korongokat készítettünk, és azokat sterilizáltuk. A kísérletek egy részében a Gelaspon<sup>R</sup> korongra 10 µl fiziológiás sóoldatban  $10^6$  He/De,  $10^6$  Ne/De, illetve  $10^6$  My1/De sejtet helyeztünk el. A kísérletek további részében a baloldali parathymicalis nyirokcsomókat 12 kontroll patkányból és 12 tumoros patkányból kiperaráltuk, eltávolítottuk és a környező zsírszövetből 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 a nyirokcsomót elhelyeztük. A kísérletek más részében ugyancsak lumbális metszésből baloldali nephrectomiát végeztünk. A sebeket sebészeti öltéssel zártuk, a boncolást (autopsiát), illetve az autoradiográfias vizsgálatokat két hét múlva végeztük.



*5. ábra. Tumordarab (a és b) és daganatos sejtek Gelaspon<sup>R</sup> korongon (c és d) vesetok alá ültetése.*

### **3.5. 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 CO<sub>2</sub> atmoszférában egy éjszakán keresztül sejtenyésző edényben inkubáltuk, a szuszpenzióban maradt sejteket tartalmazó felülúszót elöntöttük. A letapadt sejteket gyors növekedési ütemük miatt naponta tovább passzáltuk, és a 20-ik passzázs után használtuk fel kísérletre, vagy helyeztük újból folyékony nitrogénbe.

A myelomonoblastos leukaemia tenyészetek 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 fiziológias 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 CO<sub>2</sub> atmoszférában tenyésztettük. A szuszpenziós sejteket gyors növekedési ütemük miatt 2-3 naponta passzáltuk, illetve folyékony nitrogénbe helyeztük.

A kísérlethez felhasznált élő tumor-sejtek számát tripán-kék kizárásos teszttel határoztuk meg.

### **3.6. 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 in 0.25% tripszint tartalmazó HBSS (Hank's balanced salt solution) 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 CO<sub>2</sub> atmoszférában egy éjszakán keresztül inkubáltuk, a nem adherens sejteket eltávolítottuk. A primer tenyészeteket 1 hétig tartottuk fenn. A sejtek életképességét Bürker-kamrában tripánkék festéssel vizsgáltuk.

### **3.7. Hepatocytá sejtek izolálása Fischer 344 patkány májából**

A nyugvó hepatocyták izolálásához Oldham és mtsai. (1979), illetve Liu és mtsai. (2002) által kidolgozott módszert vettük alapul. 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, kollagenázt tartalmazó oldatra. Mindkét folyadék hőmérséklete 39 °C volt. 15 perc elteltével a perfúziós pumpát leállítottuk és eltávolítottuk a májlebenyeket. A kivett szöveteket 2-3 mm-es darabokra vágtuk és 40 ml 4 °C-os kollagenáz tartalmú perfúziós oldatba helyeztük. Rázogatás után a keletkező

szuszpenziót átszűrtük először 250 µm-es, majd 62 µm-es steril szűrőkön, hogy a nagyobb szövetdarabokat elválasszuk a sejtektől. 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.  $1,5 - 2,0 \times 10^6$  sejtet indítottunk tenyésztőedényenként. A sejteket 37 °C-on 5 %-os CO<sub>2</sub> atmoszférában tartottuk. A hepatocyták életképességét Bürker-kamrában tripánkék festéssel vizsgáltuk. Az adherens sejteket 2 hétig tartottuk fenn, a tápfolyadékot 48 óránként cseréltük.

### **3.8. Regenerálódó májsejtek vizsgálata**

A májregenerációs vizsgálatokat hím, 250 g-os Fischer 344 patkányokon végeztük. A kísérletben Higgins és Anderson (1931) Drabkin (1950) által továbbfejlesztett módszerét alkalmaztuk. 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 eltávolítottuk. Az izmot és a bőrt összevarrtuk. 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.

### **3.9. <sup>18</sup>FDG akkumulációs mérések**

#### **3.9.1. Radiofarmakon előállítása**

Az 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz (<sup>18</sup>FDG) PET radiofarmakont a Debreceni Egyetem OEC PET Centrumának radiokémiai laboratóriumában szintetizálták (Mikecz és mtsai. 2002), a Hamacher és mtsai. (1986) által megadott módszer alapján.

#### **3.9.2. A radiofarmakonok akkumulációjának mérése in vitro**

A sejteket ( $1 \times 10^6$ /ml) 10 percig, 5 mM D-glükózt tartalmazó PBS-ben 36 °C-on előinkubáltuk. Ezt követően a mintákhoz 0,37 MBq/ml <sup>18</sup>FDG-t adtunk. A sejteket az <sup>18</sup>FDG-vel tovább inkubáltuk a kísérletekben meghatározott ideig, miközben rendszeresen rázogattuk.

A további radiofarmakon felvételt hideg PBS hozzáadásával állítottuk le. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk hideg PBS-ben. A centrifugálásokat 600 g-n 5 percig végeztük. A sejtek által felvett radioaktivitást kalibrált gammaszámlálóval mértük (Canberra Packard) 1 perces beütésszám gyűjtéssel, az  $^{18}\text{F}$ -energia szinten. Minden esetben meghatároztuk az inkubáló oldat radioaktivitás-koncentrációját is. A bomlásra korrigált radiofarmakon felvételt beütésszám  $\text{perc}^{-1}$  ( $10^6$  sejt) $^{-1}$  [cpm] egységekben számoltuk ki. A sejtekben akkumulálódott  $^{18}\text{F}$ FDG mértékét az úgynevezett inkubáló dózis százalékában is (ID%) kifejeztük, ami azt mutatja meg, hogy a külső, inkubáló oldatban lévő  $^{18}\text{F}$ FDG aktivitás hány százalékát veszi fel 1 millió sejt. A  $^{18}\text{F}$ FDG felvételét 5  $\mu\text{M}$  cytochalasine B jelenlétében gátoltuk. A kísérleteket háromszori ismétlésben végeztük, és a mérési eredményeket az átlag  $\pm$  szórás értékével jellemeztük.

### **3.9.3. Teljes-test autoradiográfia**

A kontroll és tumoros patkányoknak 15 MBq  $^{18}\text{F}$ FDG-t fecskendeztünk be i.v. a bal *vena femoralis*-ba, majd 1 óra múlva az állatokat túlaltattuk, 1 %-os carboxymethyl-cellulose oldatba ágyasztuk, és folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A beágyazott állatokat tartalmazó blokkokból  $-20$  °C-on 60  $\mu\text{m}$  vastagságú szagittális metszeteket készítettünk Leica CM 3600 cryomacrotom (Nussloch, Németország) segítségével. A metszeteket „PhosphorImager” lemezekre exponáltuk (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Ezzel egyidejűleg az anatómiai képletek azonosítására színes képeket készítettünk HP ScanJet 4cT (Palo Alto, CA, USA) transzparencia scanner segítségével. Az autoradiográfiás és a transzparenciás kép szoftveres illesztésével az anatómiai és a funkcionális információk fúziója érhető el. „Phosphorimage”-analízist végeztünk, amely során a vizsgálati tervben rögzített anatómiai területekre ROI-kat (Region of Interest) helyezve számítottunk ki 16 szelet átlagából a relatív intenzitás értékeket az Image Quant<sup>TM</sup> TL 1.5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) szoftver segítségével (Mankoff és mtsai., 2001).

### **3.9.4. Szerv-eloszlásos vizsgálatok**

Azokban a kísérletekben, amelyekben az i.v. adott  $^{18}\text{F}$ FDG szervi eloszlását vizsgáltuk, az 1 órás inkubációs idő után az aortából vért vettünk (a plazma aktivitásának meghatározására) és egy-egy darabot távolítottunk el a májból, a veséből, a hasfal izomzatából és a tumorból, illetve kipreparáltuk a teljes tímuszt és a parathymicalis nyirokcsomókat. A minták tömegét és radioaktivitását – ez utóbbit gamma-számlálóval

(Canberra Packard) – lemértük, és az értékeket DAR-ban (**D**ifferential **A**bsorption **R**atio) fejeztük ki.

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

### 3.10. Immuncitokémia

A glükóz transzporter molekulák (GLUT-1 és GLUT-3), illetve a TGF  $\beta$ 1 kimutatására a vizsgálni kívánt hepatocelluláris carcinoma és mesoblastos nephroma sejteket 20 x 20 mm-es, négyzet alakú, steril fedőlemezen (Spektrum 3D) tenyésztettük. A sejteket 15 percig 4% paraformaldehidben fixáltuk, majd mostuk PBS-ben. A nem specifikus kötőhelyeket 1% BSA tartalmú PBS-el blokkoltuk 30 percig 37 °C-on. Újabb PBS-es mosás után a sejteket anti-GLUT1, anti-GLUT3 és anti TGF  $\beta$ 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 nyúl ellenes antitestet használtunk 1:1000 hígításban, illetve a citoskeleton aktin filamentumainak vizualizálására FITC-Phalloidin-t 1:500 hígításban. A sejtmagok megjelenítéséhez Vectashield Hard Set DAPI-t használtunk. A fényképek készítése egy Nikon Eclipse E800 (Nikon Corporation, Tokyo) típusú fluoreszcens mikroszkóppal történt.

### 3.11. Immunhisztokémia

A glükóz transzporter molekulák (GLUT-1 és GLUT-3), illetve a TGF  $\beta$ 1 kimutatására a vizsgálni kívánt hepatocelluláris carcinomát és mesoblastos nephromát tartalmazó patkány veséket, illetve a metastasist tartalmazó parathymicalis nyirokcsomókat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, paraffinba ágyaztuk, majd 3-5  $\mu$ m vastag metszeteket készítettünk. A tárgylemezeket deparaffináltuk 2 fokozat xilolban (5-5 perc), rehidráltuk leszálló alkoholsorban (abs., 96-80-70-50%), végül desztillált vízzel mostuk 3 percig.

A nem specifikus kötőhelyeket 1% BSA tartalmú PBS-el blokkoltuk 30 percig 37 °C-on. Újabb PBS-es mosás után a mintákat anti-GLUT-1, anti-GLUT-3 és anti TGF  $\beta$ 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, 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 µl ötszörös koncentrációjú elektroforézis puffert adtunk és 10 percig forraltuk. 60 µg fehérjét választottunk el 7.5 %-os SDS-PAGE gélen a GLUT-1, GLUT-3 és TGF β1 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 tartamú PBST-vel. Blokkolás után a membránokat mostuk, majd a primer antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on egy éjszakán át. A poliklonális anti-GLUT-1 antitestet (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) 1:250, a szintén poliklonális anti-GLUT-3 antitestet és a monoklonális TGF β1 antitestet (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) 1:400 arányban hígítottuk. A membránokat 30 percig mostuk PBST-ben, majd a másodlagos antitestekkel (anti-rabbit IgG (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)) 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A másodlagos antitesteket 1000-szeresére hígítottuk 1 % nem zsíros, száraz tej(por) tartalmú PBS-ben. A jeleket kemilumineszcens kimutatási módszerrel (Pierce, Rockford, IL., USA) jelenítettük meg a gyártó utasításai alapján.

### **3.13. Áramlási citometriás mérések**

A sejteket 70%-os hideg etanolban fixáltuk és -20 °C-on tartottuk felhasználásig. Az áramlási citométeres mérések előtt a sejteket PBS-ben szuszpendáltuk, kezeltük 100 µg/ml koncentrációjú RN-ázt tartalmazó PBS oldattal 30 percig 37°C-on, majd 50 µg/ml koncentrációjú propidium jodid oldatával festettük meg. Becton Dickinson FACScan áramlási citométert (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) használtunk a fluoreszcencia intenzitások mérésére. Az áramlási citométeres adatokat WinMDI 2.9, illetve FloWin programokkal értékeltük ki. Mintánként 10 000 sejtről gyűjtött fényszórás és fluoreszcencia intenzitás adatokat dolgoztuk fel.

### **3.14. Kromatinszerkezetek izolálása**

#### ***3.14.1. Reverzibilis permeabilizálás***

A módszert eredetileg Bánfalvi és mtsi (1984) alkalmazták egér thymusból izolált lymphocyták vizsgálatánál. Mi ezt a módszert adaptáltuk az általunk vizsgálni kívánt sejtekre. 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.

#### ***3.14.2. Sejtek regenerálása***

A permeabilizált sejtekhez 9 ml 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumot adtunk. A sejteket centrifugálással (500g, 5 perc) üleptítettük és friss, 10 % FBS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumban tartottuk 37 °C-on, 5% széndioxid és 95% relatív nedvesség tartalmú inkubátorban. A sejt regenerálódást bizonyította, hogy a sejtek 3 órán belül képesek voltak a tripánkéket kizárni. A permeabilizálatlan kontroll sejtek 5 %-a pusztult el a műveletek során.

#### ***3.14.3. 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-el 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 jégecet: 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. A lemezeket levegőn szárítottuk, majd szobahőmérsékleten éjjel állni hagytuk. PBS-sel történő lemosást követően felszálló alkoholsorban (70%, 90%, 95%, 100%) dehidratáltuk a tárgylemezeket.

#### ***3.14.4. Kromatin struktúrák fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata***

A dehidratált, majd levegőn szárított tárgylemezeket 35 µl antifade médium felvitele után 24 x 50 mm-es fedőlemezekkel takartuk le. A DAPI-val ilyen módon festett lemezeket ezután Opton fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### **3.14.5. Kromatin „image” analízis**

A kromatinállományról készült vörös (R), zöld (G), kék (B) színárnyalatos képeket szürkeárnyalatos (fekete-fehér) képekké konvertáltuk úgy, hogy a kék és zöld csatornák információtartalmának 50-50%-át összeadtuk. Ennek magyarázata, hogy a vörös tartományban található információ a zaj. A képek összevethetősége érdekében a képek információ tartományát 256 fokú szürkeárnyalatos skálán ábrázoltuk a háttérre normalizálva, hiszen a mikroszkóp HBO lámpája a vizsgálatok során nem egyforma intenzitással sugároz. A következő lépésben a rögzített felvételek elemzése az e célra kifejlesztett „Chromatin Image Analyzer” (CIA 2.5, Nagy és mtsai., 2001) nevű célszoftverrel történt. A szoftver segítségével meghatároztuk a képek intenzitás hisztogramját. A képek entrópiáját egy automatikus algoritmus által meghatározott szint felett vizsgáltuk, ez azt jelenti, hogy nem használtuk a háttérrel, mivel az számunkra fontos információt nem tartalmazott. Ezután kerület-terület meghatározás történt a képek kromatin tartalmú területein. A kerületet elosztottuk a területtel minden egyes sejtmagnál. A kapott értékből megállapítható, hogy egységnyi mennyiségű DNS mennyire fragmentáltan helyezkedik el a magban.

### **3.15. Adatok feldolgozása**

A kísérleti adatok 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.

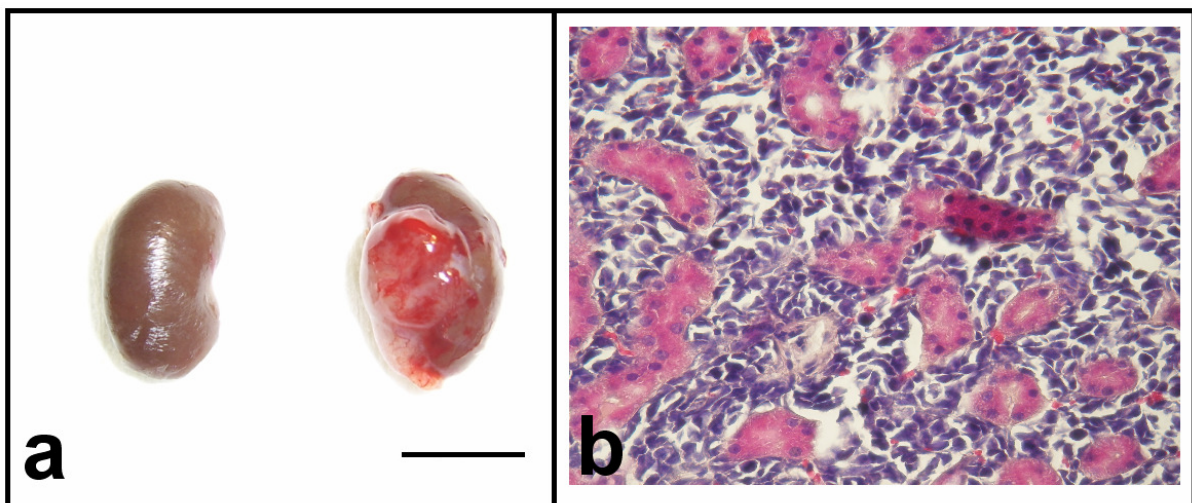
## 4. Eredmények

### 4.1. Hepatocelluláris carcinoma (He/De)

#### 4.1.1. A He/De jelzésű májcarcinoma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve szolid tumor formájában növekedésnek indulnak

Első kísérleteinkben a folyékony nitrogénből, illetve a sejttenyészetekből származó daganatos sejteket F344 hím patkányok vesetokja alá ültettük, majd 7 nap elteltével az állatokat elaltattuk és felboncoltuk. Makroszkóposan (6. ábra / a) megfigyelve az eltávolított vesét, jól látható a világos színű, erősen vaszkularizált tumor. A daganat növekedése lassabb, azonban infiltratív és az angiogenezis hamar elkezdődik (már hamar kis erek láthatók a világos színű tumor felületén). A tumor a vese méretének többszörösére is megnőhet, a vese nagy része azonban még ebben az állapotban is jól felismerhető. 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 (10-15  $\mu\text{m}$  átmérőjű), erősen bazofil sejtek. Köztük a kapcsolat laza, minimális mennyiségű kötőszöveti elem látható (6. ábra / b).

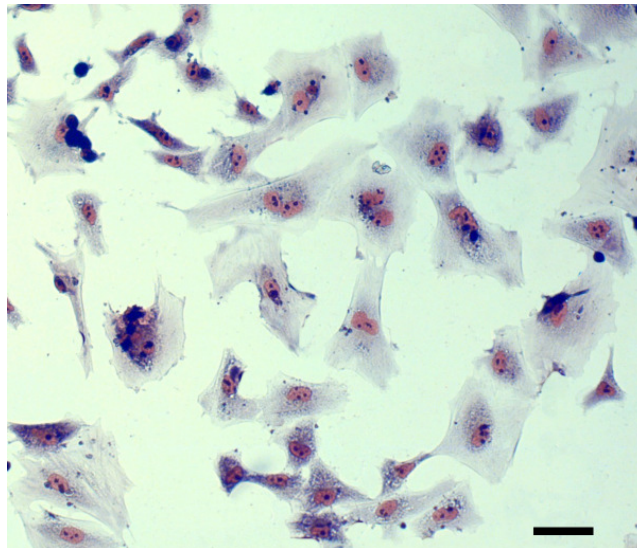


6. ábra. A kontroll és 7. napon eltávolított daganatos vesék makroszkópos (a) és mikroszkópos (b) képe.

**4.1.2. A He/De jelzésű májcarcinoma szolid tumorok sejtjeiből sejtvonal alakítható ki, amely tenyésztésből közvetlenül, vagy Kelvinátorban történő tárolás után ismét visszaiültethető a vesetok alá**

A szolid tumorból enzimes emésztéssel kinyert sejtek  $3 \times 10^6$  sejtszámban kerültek a sejttenyésztő edénybe. A sejtszám 24 óra elteltével több, mint kétszeresére nőtt. Az adherens sejtek morfológiája (7. ábra), daganat – és metastasis képző jellemzői a 100. passzáls után sem változtak. Ugyanezeket az eredményeket kaptam a Kelvinátorban történő 3. illetve 9 hónapos tárolás után is.

A módszerek fejezetben ismertetett módon létrehozott primer sejtkultúrák, majd a későbbiekben sejtvonalak ilyen módon lehetővé tették kísérleteinkben az állatok számának redukálását, hiszen mostantól nincs szükség a daganatok fenntartása érdekében a tumorok sorozatos állatból – állatba történő transzplantációjára. A sejtek – meghatározott számban (amire eddig nem volt lehetőség, hiszen a daganatok csak szolid formában léteztek) vesetok alá ültethetők Gelaspon korongon. A másik eredmény és előny, hogy az eddig szolid tumort alkotó sejtek egyedileg is vizsgálhatók *in vitro*.



**7. ábra.** He/De sejttenyésztet mikroszkópos képe.

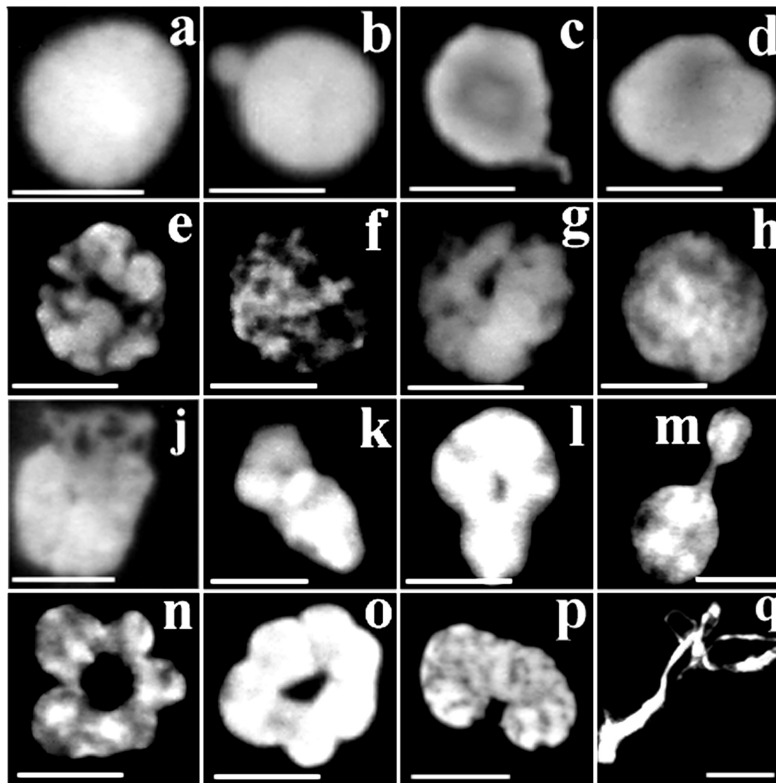
Jelzés: 5  $\mu\text{m}$ .

### ***4.1.3. A He/De sejtek kromatin kondenzációs folyamatai jelentősen különböznek mind a nyugvó (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) májsejtek, mind a regenerálódó máj nagyrészt a sejtciklus S fázisában levő sejteinek kondenzációs folyamataitól***

Kísérleteinkben nyugvó (a sejtciklus G<sub>0</sub> fázisában levő), regenerálódó és tumoros F344 patkány májsejteket (He/De) használtunk. Azt vizsgáltuk, hogy van-e eltérés a nyugvó (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) májsejtek, a regenerálódó máj nagyrészt a sejtciklus S fázisában levő sejteiei, illetve az agresszíven növekvő tumor sejtek kromatin kondenzációs folyamatai között. A kérdésre válaszolva, kromatin formákat izoláltunk az előbb említett sejtípusokból.

#### ***4.1.3.1. Kromatinformák a nyugvó hepatocytákban***

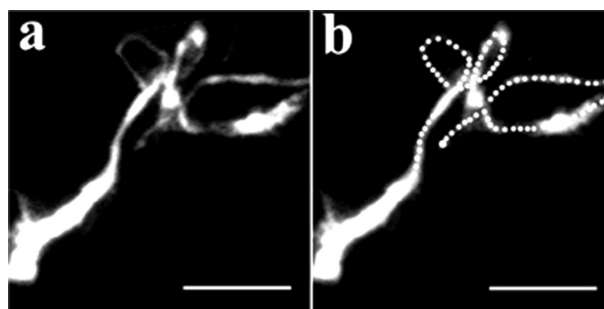
A fluoreszcens mikroszkóppal végzett kromatinstruktúrák vizsgálata feltárta, a nyugvó, G<sub>0</sub> fázisban levő sejtek magjaiban található kromatinstruktúrák szerkezetét. Bár a reverzibilis permeabilizálás megengedi a nukleáris struktúrák felnyílását a sejtciklus bármely fázisában, a fibrózus (rostos) 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 dekondenzált állapotban van jelen a sejtben (8. ábra). A fixált magok kromatinja homályos, „fátyolszerű” szerkezetként jelenik meg (8. ábra. a – d). A kromatin „fátyol” széteső, laza foszlányokká alakul (8. ábra. e – h). A maganyag szintén megőrizte a gömbölyű, lekerekített formáját. (8. ábra. a - h) vagy megnyúlt, szupertekercselt szerkezetűvé alakult (8. ábra. k, l, m, p, q).



**8. ábra.** Dekondenzált kromatinszerkezetek nyugvó hepatocyták magjaiban.

Jelzés: 5  $\mu$ m.

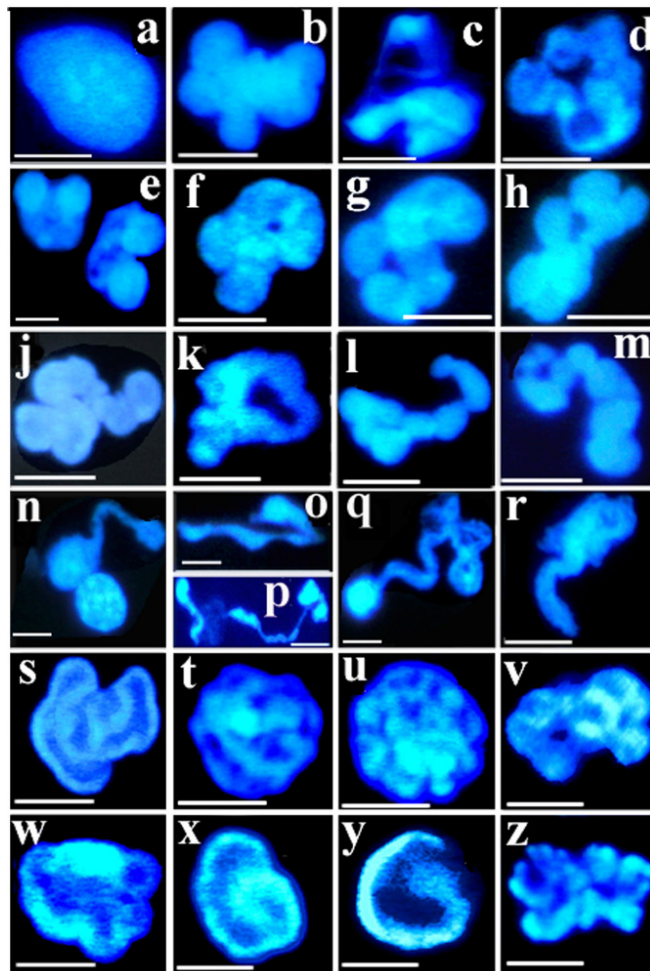
A tipikus szupertekercselt struktúra hat kromatin csoportból, „fürtből” tevődik össze (8. ábra. n, o). A szupertekercselt hurkok kromatinfonatból állnak (8. ábra. q), amely nagyítva, részletesen látható a 9. ábrán, ahol a kromatin folyamatos szupertekercselt szerkezetüként látható megkülönböztethető kromoszómák nélkül. A kromatin gerincét (9. ábra. a) pontozott fehér vonallal átrajzoltuk, hogy megjelenítsük a folyamatos interfázisos kromatin struktúra két végét (9. ábra. b).



**9. ábra.** Felcsavarodott kromatin nyugvó hepatocytákban. Jelzés: 5  $\mu$ m.

#### 4.1.3.2. 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. A 10. ábra a kromatinkondenzáció intermedierjeinek teljes spektrumát mutatja be. Megtalálható a dekondezált „fátyolszerű” kromatin (10. ábra. a, b), a polarizált kondenzáció a kromatin fátyolban (10. ábra. c, d, e), ami szupertekercselt kromatin szalaggá alakul (10. ábra. f – m). A szupertekercselés kromatin testek kialakulásához vezet (10. ábra. h, j, k, l, m).



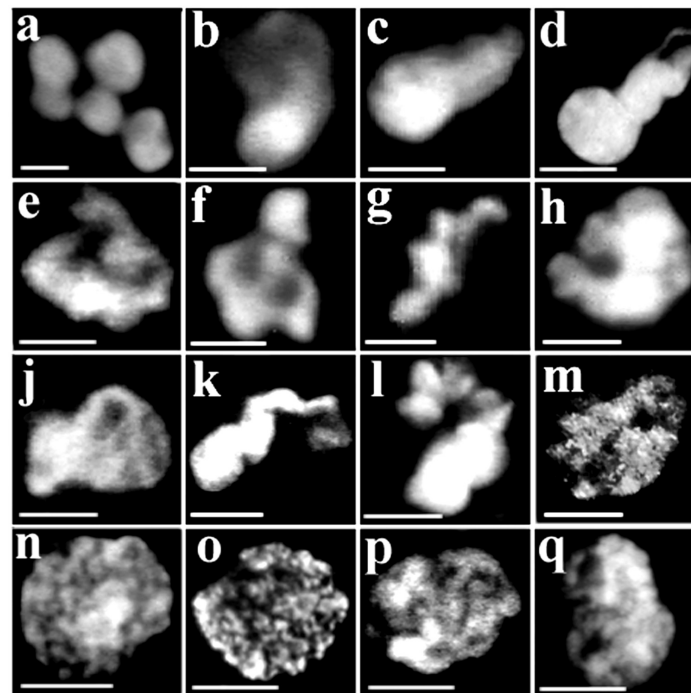
**10. ábra.** Átmeneti kromatin formák a zárt „fátyol”szerű szerkezettől a nyitott „szalagszerű” szerkezetig regenerálódó májsejtekben két héttel hepatectómia után.

Jelzés: 5  $\mu$ m.

A további szupertekercselés során a fibrózus, „rostos” kromatin struktúrák (10. ábra. n, o, p, q) vastag szalagos, gyöngysorszerű szerkezetté alakulnak (10. ábra. r - y). Néhány esetben a kromoszómák korai formái is megkülönböztethetőek (10. ábra. u, v, z).

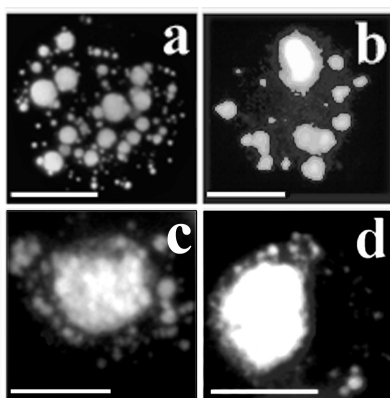
#### 4.1.3.3. Kromatinformák a hepatocelluláris carcinoma sejtekben

A legjellemzőbb kromatin szerkezetek, amelyek a hepatocelluláris carcinoma sejtek magjában fellelhetőek voltak a szupertekercselt szalagok és a fibrózus struktúrák (11. ábra.). Ezen sejtek magjaiban is megtalálhatóak voltak a dekondezálalt formák, így az elmosódott kromatin „fátyol” (11. ábra. a – h). Egy másik jellemző forma az erősen szupertekercselt szerkezet különböző formája, ami megfigyelhető a kromatin kondenzáció teljes folyamatán ezekben a sejtekben (11. ábra. b – q)



**11. ábra.** Szupertekercselt kromatin formák hepatocelluláris tumor sejtekben. Jelzés: 5  $\mu$ m.

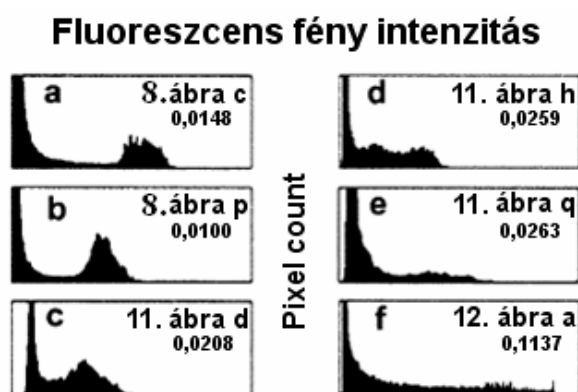
A harmadik és talán legfontosabb különbség a nyugvó és regenerálódó májsejtek kromatin állományához képest az apoptotikus testek megjelenése (12. ábra).



**12. ábra.** Apoptotikus változások hepatocelluláris tumor sejtekben. Jelzés: 5  $\mu$ m.

#### 4.1.3.4. Kromatin képek fluoreszcens intenzitás-hisztogram elemzése

Az intenzitás hisztogramok elemzése során kiderült, hogy a maximális fluoreszcens intenzitási értékek a hepatocelluláris tumor sejtek magjaiban voltak a legmagasabbak. Ezt követték a regenerálódó és nyugvó hepatocyták (13. ábra.). A kromatin formák kerület/terület aránya egyfajta indikátorként használható, ami tükrözi a magi struktúrák entrópiájának sokféleségét. Ez az arány, a tumoros sejtekhez képest alacsonyabb volt és közel azonos a regenerálódó és nyugvó hepatocytákban (13. ábra. a, b). A kerület/terület arány közel kétszer magasabb volt a tumoros (13. ábra. c, d, e) és majd ötször magasabb az apoptotikus sejtekben (13. ábra. f).

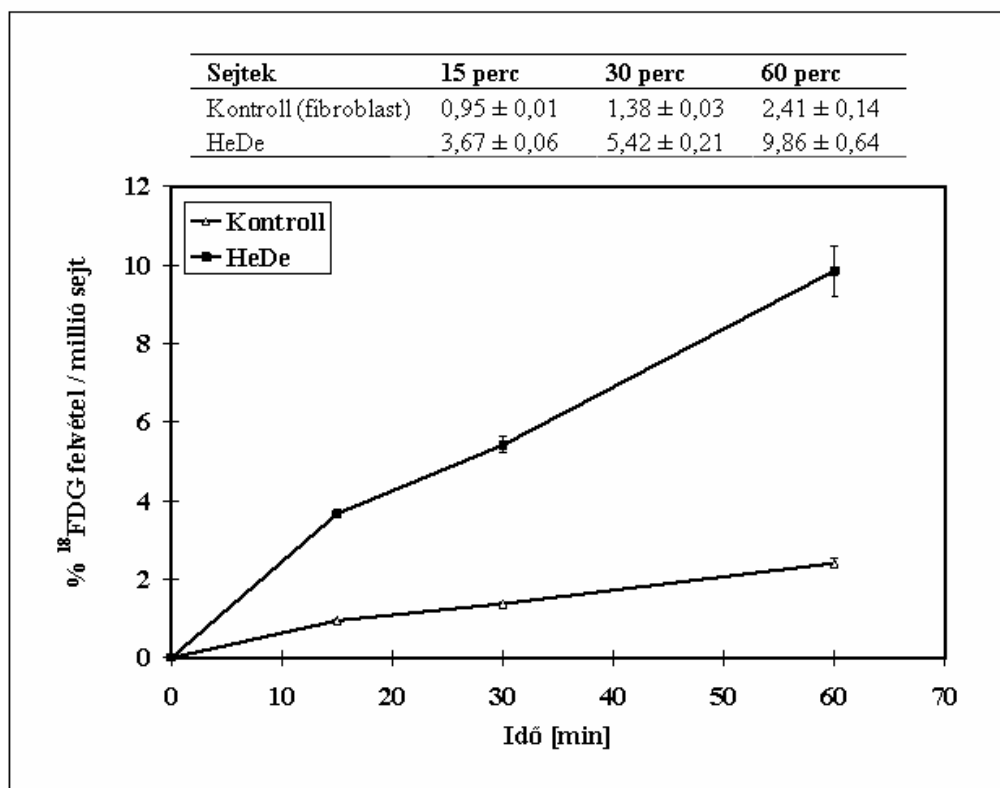


**13. ábra.** Kromatin szerkezetekről készült fluoreszcens fotók számítógépes analízise. A számok a megfelelő ábrák kromatin struktúráinak kerület/terület arányait mutatja. a és b panel: nyugvó hepatocyták (8 ábra c, p képei); c, d és e panel: tumoros sejtek (11. ábra d, h, q képei); f panel: apoptotikus sejtek (12. ábra a képe).

#### 4.1.4. A He/De jelzésű sejtek 15, 30 és 60 perc múlva jelentősen több <sup>18</sup>FDG-t vesznek fel, mint a kontrollnak használt fibroblast sejtek

##### 4.1.4.1. In vitro <sup>18</sup>FDG akkumulációs mérések

In vitro kísérleteink során a kontrollként használt, frissen izolált F344 patkány fibroblast sejtek <sup>18</sup>FDG felvételét hasonlítottuk össze a szintén F344 patkányból származó, 100 passzálon átesett hepatocelluláris carcinoma (He/De) sejt vonal glükóz-analóg felvételével. A vizsgálatok során 15, 30 és 60 perces felvételeket néztünk (14. ábra).



14. ábra. Kontroll (fibroblast) és He/De sejtek <sup>18</sup>FDG felvételének kinetikája.

Az 14. ábra azt mutatja be, hogy az inkubáló oldatban lévő <sup>18</sup>FDG aktivitás hány százalékát veszi fel 1 millió sejt. Az eredmények alapján a malignus He/De sejtek minden mért időpontban körülbelül háromszor annyi <sup>18</sup>FDG-t vesznek fel, mint a kontroll sejtek. A különbség minden időpontban szignifikáns ( $p < 0.01$ ).

5  $\mu$ M cytochalasin B - specifikus glükóz transzporter (GLUT) blokkoló - jelenlétében 60 perces felvételeket néztünk mindkét sejt típuson. Az eredmények alapján mind a fibroblast,

mind pedig a He/De sejtek közel 11-szer kevesebb  $^{18}\text{FDG}$ -t vettek fel cytochalasin B jelenlétében (I. táblázat).

<b>Sejtek</b>	<b><math>^{18}\text{FDG}</math> felvétel (%)</b>
Fibroblast	2.01 ± 0.16
Fibroblast + 5μM cytochalasin B	0.17 ± 0.01
He/De	6.96 ± 0.34
He/De + 5μM cytochalasin B	0.66 ± 0.05

**I. táblázat.** Kontroll (fibroblast) és He/De sejtek  $^{18}\text{FDG}$  felvétele (ID [%]) cytochalasin B jelenlétében, 60 perces inkubálást követően.

#### 4.1.4.2. He/De sejtek megoszlása a sejtciklus fázisaiban

Annak megállapítására, hogy a vizsgált sejtek (fibroblast, He/De) a sejtciklus melyik fázisában vannak, áromlási citometriás méréseket végeztünk etanolban fixált, propidium-jodiddal jelölt mintákkal. Ennek azért van jelentősége, mert ismert, hogy a sejtek glükóz analóg ( $^{18}\text{FDG}$ ) felvétele jelentősen eltér attól függően, hogy a sejt a sejtciklus melyik fázisában tart. A II. táblázat mutatja, hogy az exponenciálisan növekvő (log fázisú) sejtenyészetek (fibroblast, He/De) sejtjeinek igen nagy százaléka (~ 60-64 %) az S fázisban, körülbelül 20-22% a G1 fázisban és 16-19% a G2 fázisban volt. Megállapítható, hogy a vizsgálatainkhoz (immunocitokémia,  $^{18}\text{FDG}$  felvétel) használt sejtek proliferációs aktivitása közel azonos volt, tehát a kapott eredmények összevethetőek.

<b>Sejtciklus</b>	<b>Fibroblast %</b>	<b>He/De %</b>
S	63,7 ± 2	60,3 ± 2
G1	20,1 ± 2	21,2 ± 3
G2	16,2 ± 1	18,5 ± 1

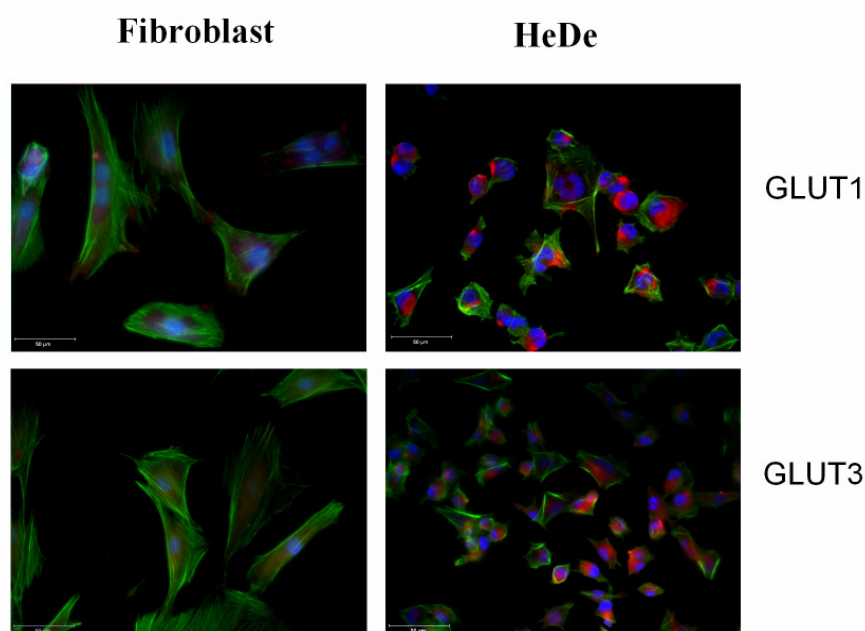
**II. táblázat.** Fibroblast és He/De sejtek százalékos megoszlása a sejtciklus különböző fázisaiban relatív DNS tartalom alapján.

**4.1.5. Immunfluoreszcens és Western blot analízissel egyaránt kimutatható, hogy a He/De jelzésű sejtekben a GLUT-1 és GLUT-3 glükóz transzporter fehérjék mennyisége és eloszlása jelentősen különbözik a kontrollnak használt fibroblast sejtektől**

**4.1.5.1. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és He/De sejtekben immunfluoreszcens technikával**

A transzporterek megjelenítésére immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk mind a sejttenyészetek, mind pedig a tumorok esetén.

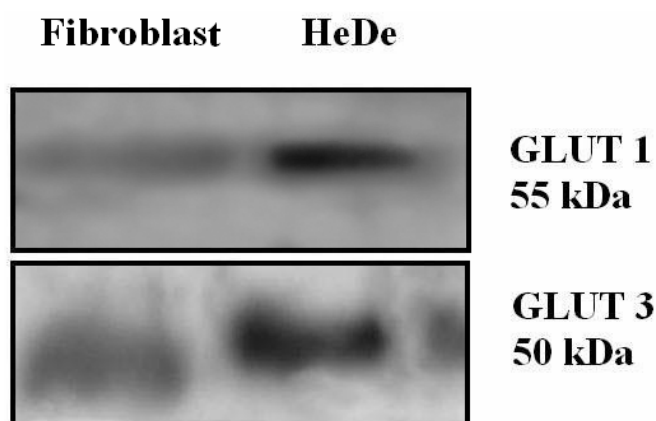
A sejteken végzett mérések eredményeit elemezve, azonnal szembe tűnt a fibroblastokban a magas F-actin mennyisége (FITC jelölés, zöld). A fibroblastokban a GLUT-1 transzporterek expressziója alacsonyabb volt, mint a tumoros (He/De) sejtekben. A GLUT-3 transzporterek mennyiségét tekintve szintén a kontroll (fibroblast) sejtekben alacsonyabb a jelintenzitás (15. ábra). A malignus He/De sejtek igen nagy mennyiségben expresszálták mindkét glükóz transzportert. A GLUT-1 és GLUT-3 transzporterek nem csak a membránban lokalizáltak, hanem ennél a sejtvonalnál is diffúzan fellelhetőek a citoplazmában (15. ábra). Ezek az eredmények is jól korrelálnak a tumorsejtek magas <sup>18</sup>FDG felvételével és a Western blot analízissel.



**15. ábra.** GLUT-1 és GLUT-3 glükóz transzporterek lokalizációja fibroblast és He/De sejtekben. Sejtmagok: kék (DAPI), citoszkeleton: zöld (phalloidin-FITC), GLUT transzporterek: piros (Texas red). Jelzés: 50  $\mu$ m.

#### 4.1.5.2. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és He/De sejtekben Western blot analízissel

A  $^{18}\text{F}$ FDG felvétel során kapott eredmények korreláltak a Western blot eredményekkel (16. ábra), amely módszerrel a vizsgált sejtek (teljes sejtlizátumok) GLUT-1 és GLUT-3 transzportereinek mennyiségét határoztuk meg. A Western blot eredményekből kitűnik, hogy mind a GLUT-1, mind pedig a GLUT-3 mennyisége a kontrollnak használt fibroblastokban a legalacsonyabb. A várakozásnak megfelelően a tumorsejtek magas GLUT szintet mutatnak, legalábbis a kontrollhoz képest. Ezek az eredmények jól illeszkednek a sejtek  $^{18}\text{F}$ -FDG felvételéhez.



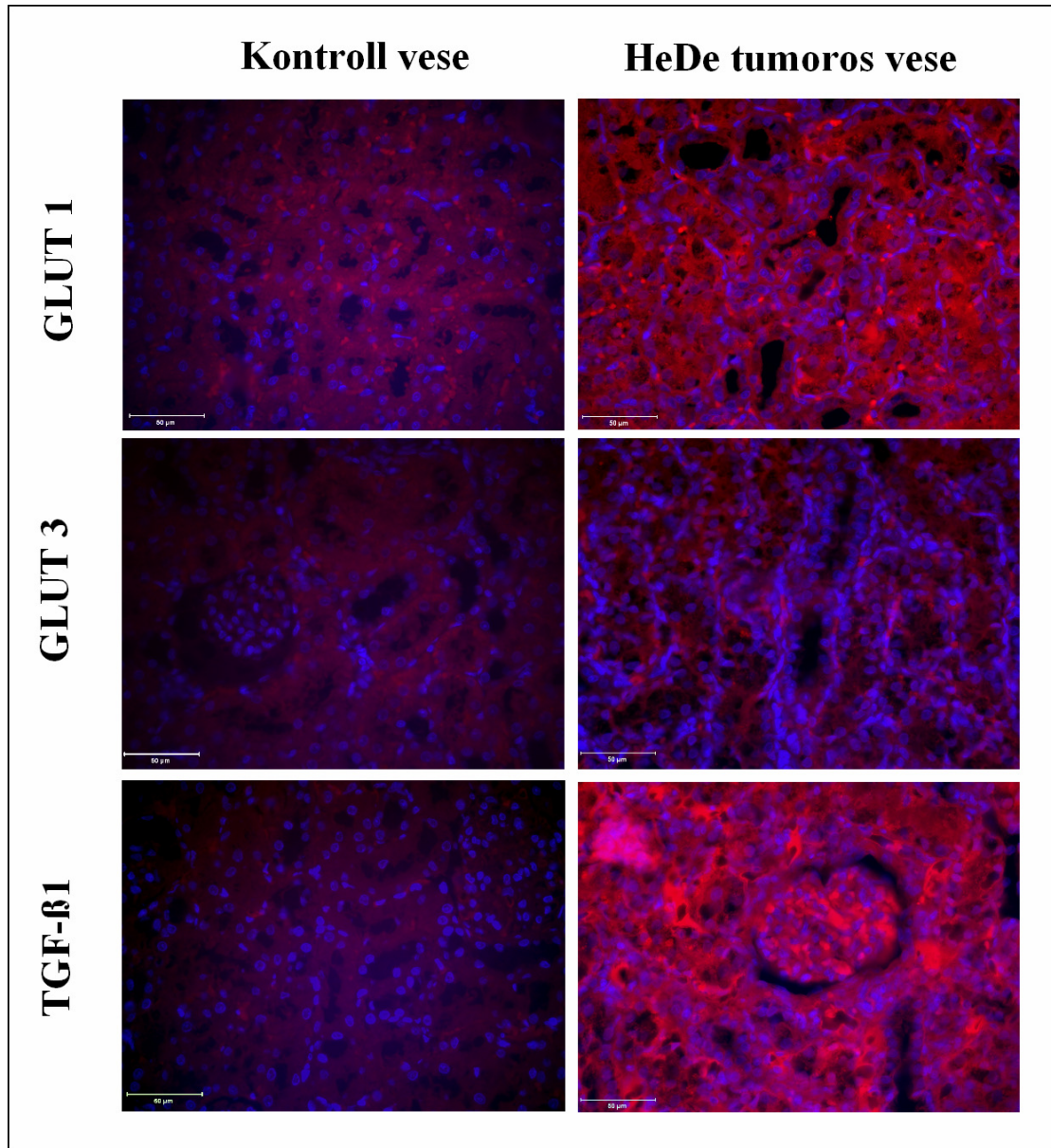
**16. ábra.** GLUT transzporterek mennyisége kontroll (fibroblast) és He/De sejtekben.

#### 4.1.5.3. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban immunfluoreszcens technikával

A glükóz transzportereket érintő vizsgálatokat elvégeztük F344 patkányból származó hepatocelluláris carcinoma tumorokon is. A kísérleti állatok vesetokja alá  $10^6$  He/De sejtet ültettünk, majd 14 nap múlva végeztük a kísérleteket a keletkezett tumorból készült szövettani metszeteken.

A 17. ábrán megfigyelhető, hogy mind a glükóz transzporter fehérjék, mind pedig a hepatocelluláris carcinomákra jellemző TGF- $\beta$ 1 fehérje szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen a tumorból készült metszeteken, mint a kontrollokon. A kapott eredmények hasonlóak a He/De sejt *in vitro* eredményekhez, hiszen a GLUT-1 transzporter mennyisége a tumorban is

magasabb, mint a GLUT-3. Ezt a Western blot adatok is alátámasztják. Megfigyelhető a daganatos vesében a distalis és proximális tubulusok szerkezetének szétesése, illetve a tumor okozta bevérzések. Ez utóbbit jelzik a GLUT-1 pozitív vörösvértetek megjelenése.



**17. ábra.** GLUT-1, GLUT-3 és TGF- $\beta$ 1 fehérjék jelenléte kontroll és He/De tumoros patkány vesén. Sejtmagok: kék (DAPI), GLUT transzporterek, illetve TGF- $\beta$ 1: piros (Texas red).

Jelzés: 50  $\mu$ m.

#### 4.1.5.4. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban Western blot analízissel

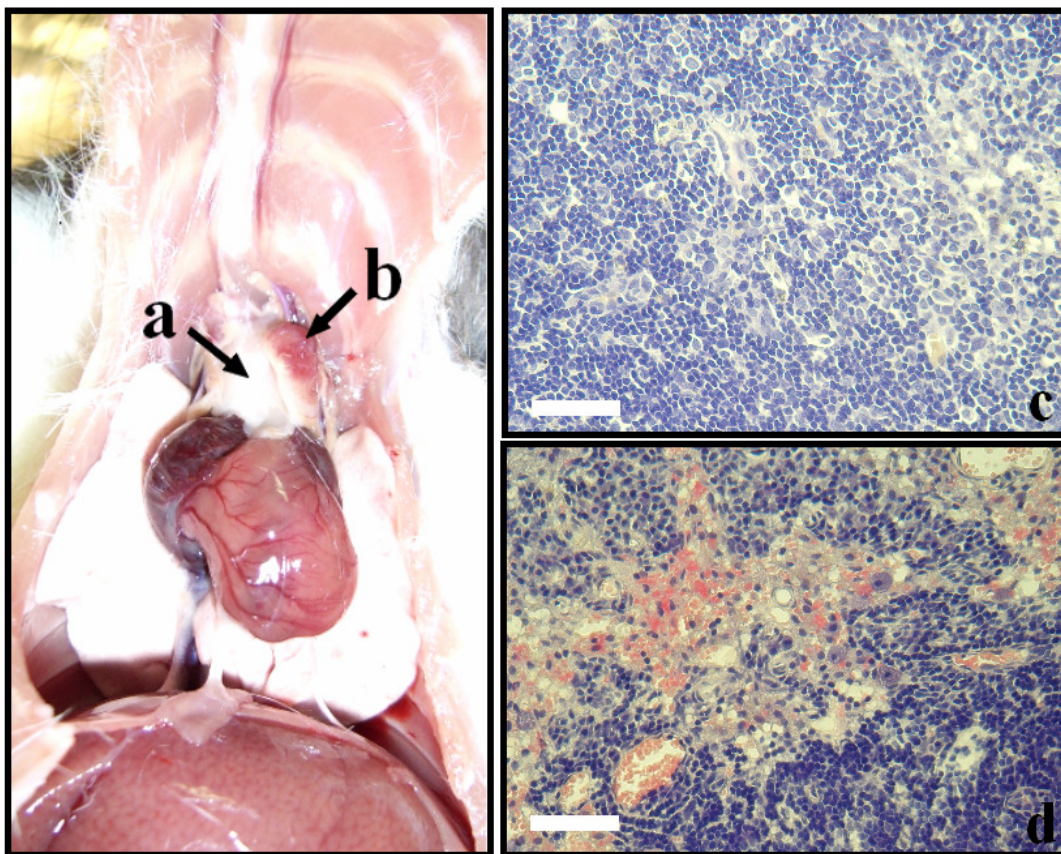
A kísérleti állatok vesetokja alá  $10^6$  He/De sejtet ültettünk, majd 14 nap múlva a keletkezett tumort kioperáltuk, tumorlizátumot készítettünk és Western blot analízissel vizsgáltuk a glükóz transzporter fehérjék mennyiségét. A patkány hepatocelluláris carcinomán végzett analízis eredménye a GLUT 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 sejtvonal sejtjeihez hasonlóan - alacsony. A tumorból nagy mennyiségben mutattuk ki a TGF- $\beta$ 1 fehérjét, ami a hepatocelluláris carcinoma egyik jellemző markere (18. ábra).



**18. ábra.** GLUT transzporterek mennyisége He/De tumorban.

#### 4.1.6. A He/De jelzésű májcarcinoma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba

Kísérleteink során véletlenül ismertük fel, hogy a patkányok mellüregében található parathymicalis nyirokcsomóban áttét képződik (19. ábra. b). 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 bevérzésszerűen összetömörülve vörösvértestek jelennek meg, illetve itt is előfordul a zsírsejtek megjelenése.

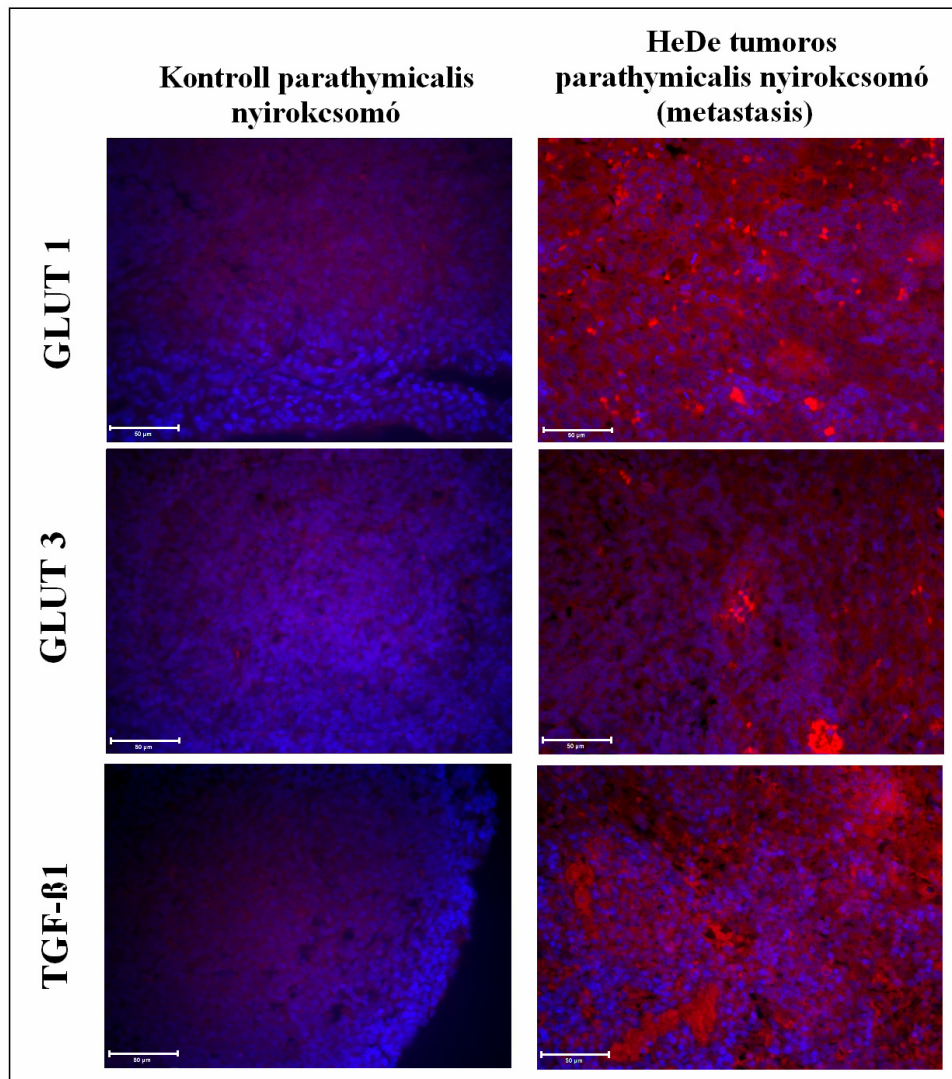


**19. ábra.** Parathymicalis nyirokcsomó.

*a – thymus, b – metastatikus parathymicalis nyirokcsomó, c – kontroll parathymicalis nyirokcsomó, d – He/De sejteket tartalmazó parathymicalis nyirokcsomó*

*Jelzés: 350  $\mu$ m, H&E.*

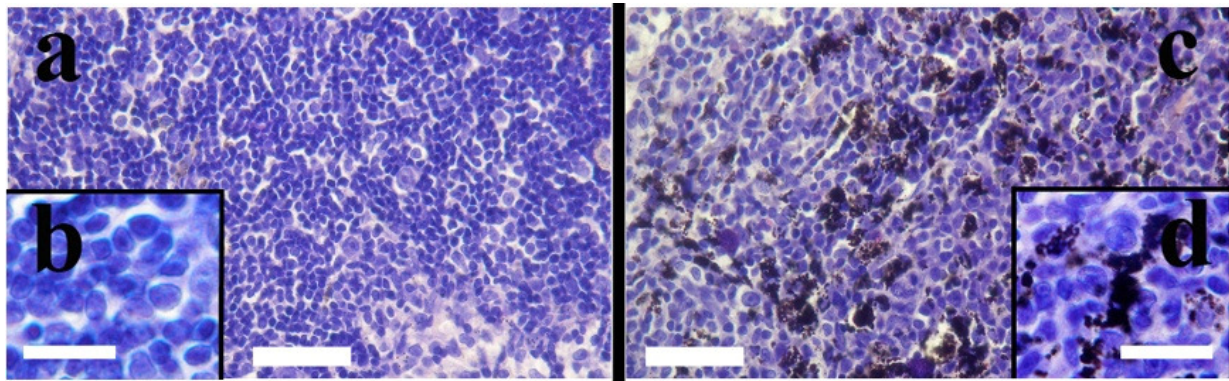
A parathymicalis nyirokcsomó daganatos érintettségét immunhisztokémiai (GLUT-1, GLUT-3, TGF- $\beta$ 1) vizsgálatokkal is bizonyítottuk. A metastasis vizsgálata során is azt tapasztaltuk, hogy a kontrollhoz képest, akárcsak a primer tumorban, mindhárom fehérje expressziója kifejezettebb. Megfigyelhetőek itt is a bevezések, illetve a glükóz transzporterek – különösen a GLUT-1 – nagy mennyisége (20. ábra).



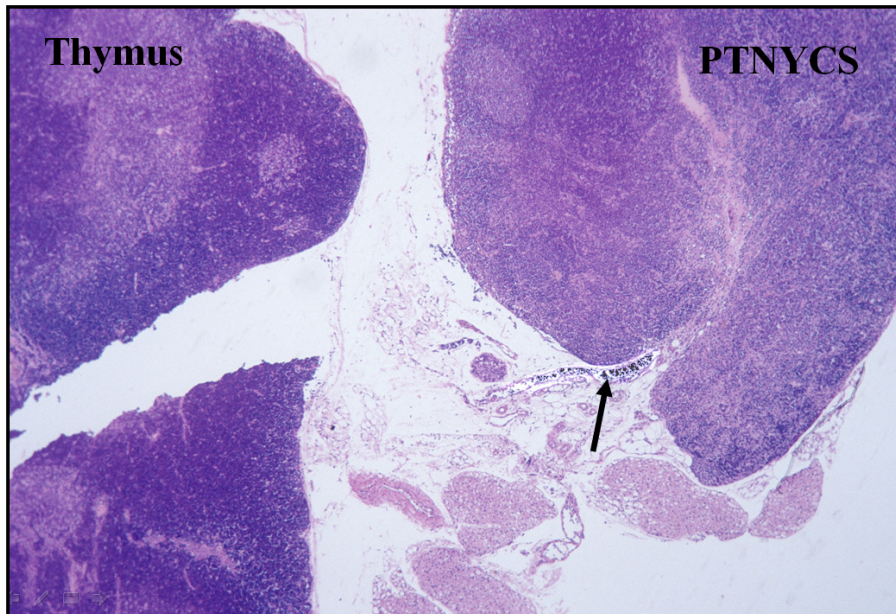
**20. ábra.** GLUT-1, GLUT-3 és TGF- $\beta$ 1 fehérjék jelenléte kontroll és He/De tumoros patkány parathymicalis nyirokcsomón. Sejtmagok: kék (DAPI), GLUT transzporterek, illetve TGF- $\beta$ 1: piros (Texas red). Jelzés: 50  $\mu$ m.

#### ***4.1.7. Tus alkalmazásával bizonyítható, hogy a vesetok nyirokereit és a parathymicalis nyirokcsomók között összeköttetés van***

Kísérleteinkben 8 db F344 patkány b.o. vesetokja alá olyan Gelaspon<sup>R</sup> korongot ültettünk, amelyet előzőleg 10 µl 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 (21. ábra). Egy másik felvételen egy efferens nyirokér látható, amely tusszemcséket tartalmaz (22. ábra). A kísérletek azt bizonyítják, hogy a vesetok és a parathymicalis mirigy nyirokereit között összeköttetés van.

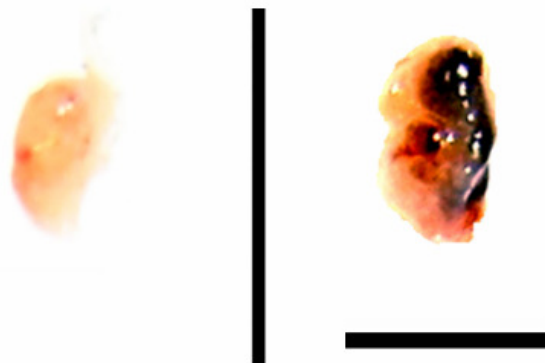


**21. ábra.** *a) kontroll parathymicalis nyirokcsomó (a jelzés hossza 350µm); b) kontroll parathymicalis nyirokcsomó nagyobb nagyításon (a jelzés hossza 50µm); c) tussal kezelt patkány parathymicalis nyirokcsomója (a jelzés hossza 350µm); d) tussal kezelt patkány parathymicalis nyirokcsomója nagyobb nagyításban (Jelzés: 50 µm).*



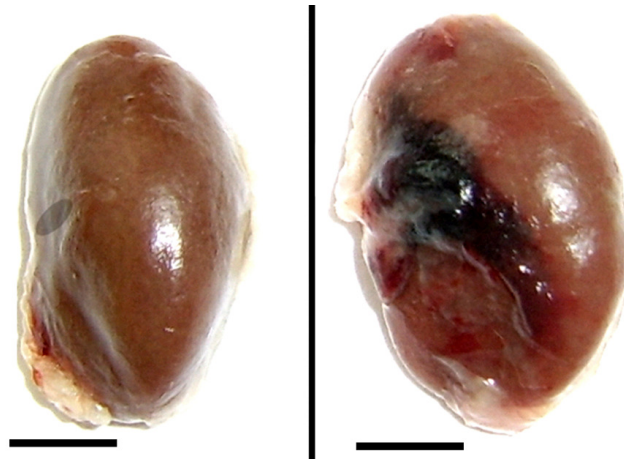
*22. ábra. Parathymicalis nyirokcsomó (PTNYCS) efferens nyirokere (nyíllal jelölve) tusszemcséket tartalmaz.*

A makroszkópos képen szabad szemmel is jól látszik a vesetokból a parathymicalis nyirokcsomóba érkezett tus (23. ábra).



*23. ábra: A bal oldali képen a kontroll parathymicalis nyirokcsomó, a jobb oldali képen pedig a tussal kezelt patkány parathymicalis nyirokcsomója a beültetés után 24 órával (Jelzés: 0.5 cm).*

A szeparált veséken is jól látszik a beültetett tust tartalmazó korong (24. ábra). Mindkét vesét a beültetéstől számított 24 órával távolítottuk el.

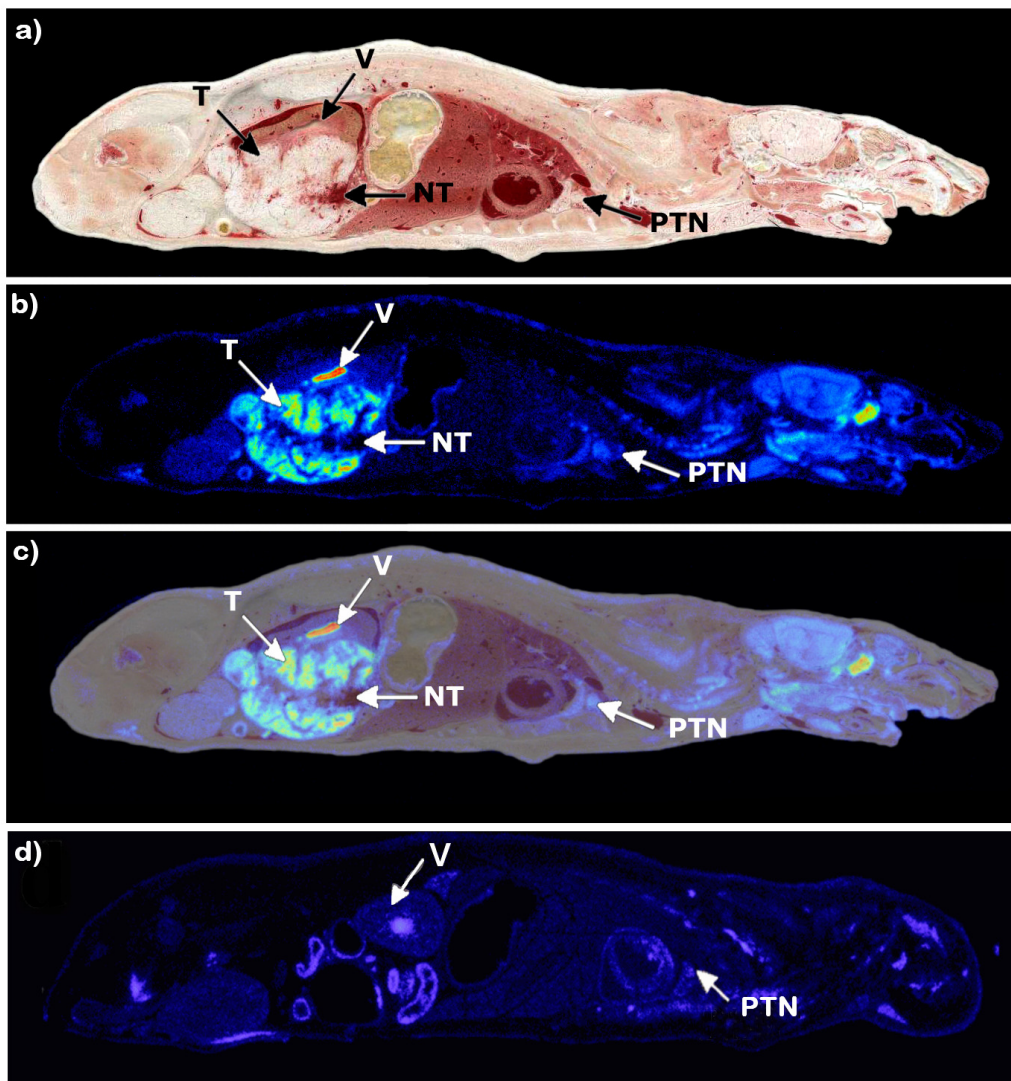


**24. ábra:** A bal oldali képen a kontroll vesét láthatjuk, a bal oldalin pedig azt amelyik vesetokja alá tussal átítatott Gelaspon<sup>R</sup> korongot helyeztünk. (Jelzés: 0,5 cm).

#### **4.1.8. Autoradiográfiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok egyaránt azt erősítették meg, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő He/De jelzésű tumorok „sentinel” nyirokcsomói**

##### **4.1.8.1. Teljes test autoradiográfiás vizsgálatok**

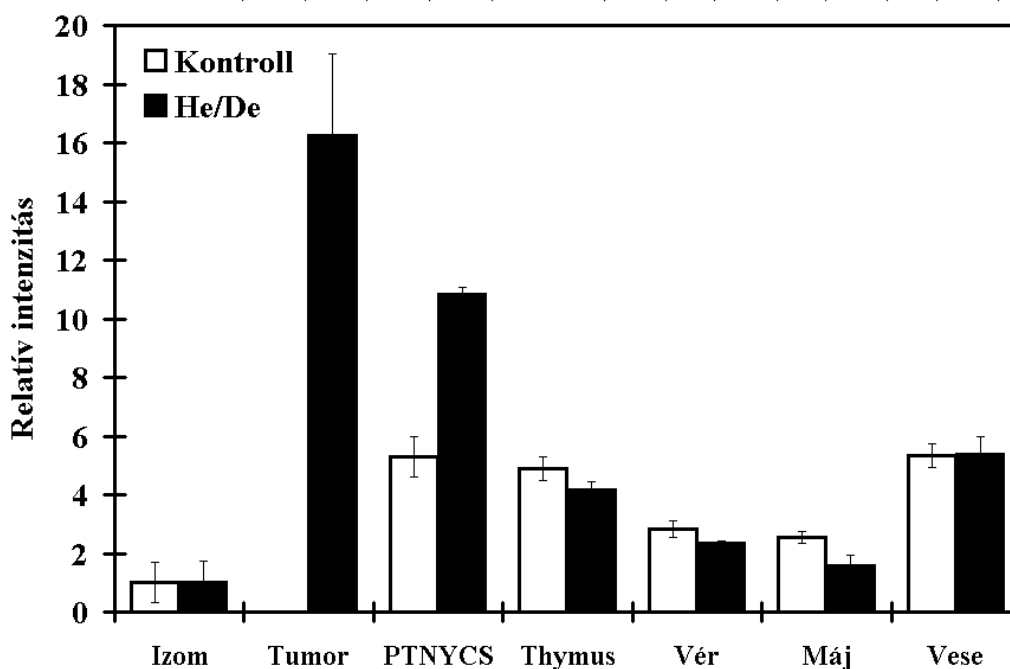
He/De sejtek metasztatikus potenciálját vizsgáltuk teljes test autoradiográfia és „phosphorimage” analízis segítségével. Következő kísérletsorozatunkban 6 db F344 hím patkány vesetokja alá  $10^6$  He/De sejtet transzplantáltunk, majd 14 nap múlva Nembutal altatás közben a bal oldali *vena femoralis*ba 15.0 MBq aktivitású  $^{18}\text{F}$ FDG tartalmú fiziológiás konyhasó-oldatot fecskendeztünk. Egy óra múlva az állatokat túlaltattuk, majd a módszertani részben ismertetett módon teljes-test autoradiográfiát és „phosphorimage” analízist végeztünk. A szervek közül kitűnt a tumor, illetve a parathymicalis nyirokcsomók aktivitása (25. ábra).



**25. ábra:** 14 napos He/De tumoros F344 patkány metszete és szerveinek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele teljes test autoradiográfiás képen. a, átvilágító szkennelvel készült anatómiai kép, b) autoradiográfiás kép az előző metszetről, c) anatómiai és autoradiográfiás képek összevetésként egymásra helyezve, d) kontroll (T- He/De tumor, V-vese, NT-necrotizált tumor, PTN- parathymicalis nyirokcsomó).

Még inkább kitűntek a különbségek a „phosphorimage” analízis elvégzése után: a harántcsíkolt izomzatra vonatkoztatott relatív intenzitás ugyanis tumorokban  $14.23 \pm 2.6$ , a parathymicalis mirigyben  $10.82 \pm 2$ , míg a vérben  $2.35 \pm 0.2$ , a májban  $1.57 \pm 0.4$  volt az egységet jelentő izommal szemben (26. ábra).

	Izom	Tumor	PTNYCS	Thymus	Vér	Máj	Vese
Kontroll	1,00±0,5	n/a	5,29±0,7	4,88±0,4	2,83±0,3	2,56±0,2	5,33±0,4
He/De	1,00±0,7	16,23±2,6	10,82±2	4,16±0,8	2,35±0,2	1,57±0,4	5,36±0,7



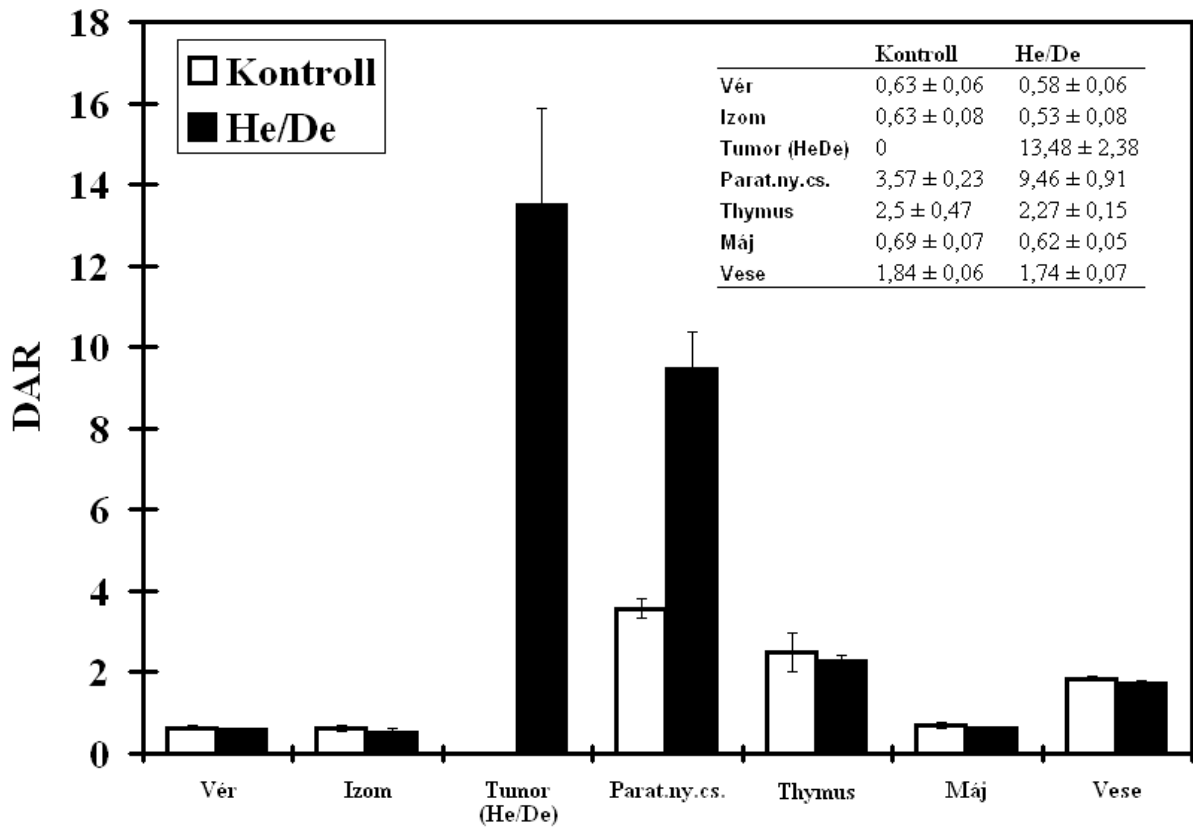
**26. ábra:** Relatív intenzitás megoszlása <sup>18</sup>F-FDG intravénás adása után He/De tumoros F344 patkányok autoradiográfiás képén. Az értékeket az egységet jelentő izomra normalizáltuk.

A kísérlet-sorozatból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vesetok alatt növekvő daganatok jelentős mértékű metastasist adnak a parathymicalis nyirokcsomókba.

#### 4.1.8.2. Szerv-eloszlás vizsgálatok

Ezt a megállapítást erősítik meg azok a kísérleteink is, amelyeket 6 hím F344 patkányon végeztünk. 10<sup>6</sup> He/De sejt *subcapsularis* transzplantációja után 14 nappal az állatokat Nembutallal elaltattuk, majd – az előző kísérletsorozatokkal megegyezően – 15.0 MBq aktivitású <sup>18</sup>F-FDG tartalmú fiziológiás konyhasóoldatot fecskendeztünk be i.v.. Egy óra múlva az aortából vért vettünk, majd eltávolítottuk a daganat, a máj, a vese, a thymusz, a *m. rectus abdominalis* 3-3 darabkáját, illetve a parathymicalis mirigyét, aktivitásukat gammaszámlálóval lemértük, és a DAR értékeket kiszámítottuk. Mint az a 27. ábrából kitűnik, He/De esetében a tumor, illetve a parathymicalis mirigy DAR értéke kiemelkedő, ez utóbbi közel háromszorosa a megfelelő kontrollnak. A vesék magasabb aktivitása nem

meglepő, hiszen a  $^{18}\text{F}$ FDG ezen keresztül választódik ki. A parathymicalis mirigy kivételével nincs szignifikáns eltérés a kontroll és He/De tumoros szervek DAR értékei között. Ez a kísérlet is alátámasztja eddigi eredményeinket, a parathymicalis mirigyeknek a metastasis-képződésben játszott szerepéről.

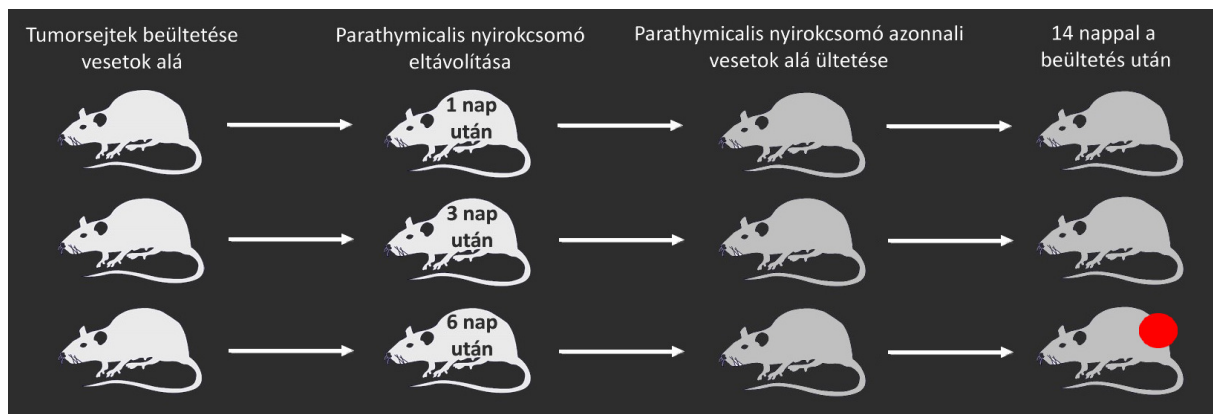


*27. ábra. Radioaktivitás DAR-ban kifejezett szervi megoszlása  $^{18}\text{F}$ FDG intravénás beadása után He/De tumoros F344 patkányokban.*

**4.1.9. A nyirokcsomók transzplantációjával, illetve sorozatos veseírtásokkal kimutatható, hogy a He/De metastasisok  $10^6$  primaer daganatsejt beültetése esetén a 6. naptól jelennek meg**

**4.1.9.1. Nyirokcsomó transzplantációk**

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 a beültetést követő 1., 3. és 6. napon 2-2 patkányt elaltattunk, parathymialis mirigyeiket eltávolítottuk, és azokat újabb 2-2 (összesen 6 db) érintetlen hím patkány vesetokja alá ültettük (28/a. ábra). 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. Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy  $10^6$  sejtet tartalmazó primaer tumorokból a 3. és a 6. nap között indul meg a metastatis képződés (III. táblázat).



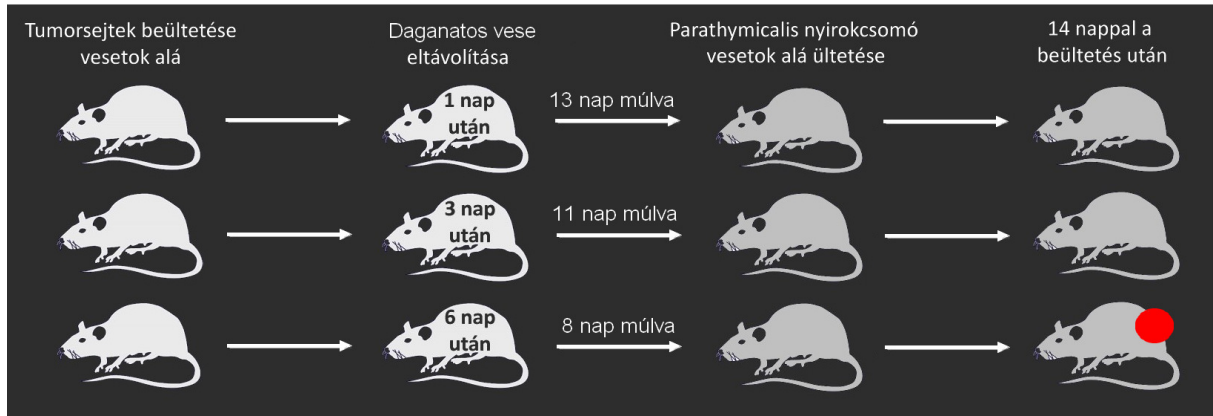
**28/a. ábra.** Metastasis megjelenését célzó vizsgálatok sémája He/De tumoros patkányokban  
Pirossal jelölve a daganatot hordozó állat

A tumor beültetése és a nyirokcsomók kivétele között eltelt napok száma	He/De tumor tömege (g)
1	-
1	-
3	-
3	-
6	1.5
6	2.0

**III. táblázat.** A vesetok alá ültetett parathymicalis mirigyek tömege a beültetést követő 14. napon.

#### 4.1.9.2. Nephrectomiás vizsgálatok

Következő kísérletsorozatunkban előző kísérleteinket úgy módosítottuk, hogy az 1., 3. és 6. napon nem a parathymicalis mirigyeket, hanem az implantált tumorsejteket hordozó b.o. vesét távolítottuk el (28/b. ábra). 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. Mint az előző kísérletben, itt is feltételeztük, hogy amennyiben a nyirokcsomókban áttét van, két hét alatt a vesetok alatt daganat nő. 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 még a He/De sejtek nem képeztek áttétet. Ezzel szemben azok a nyirokcsomók, amelyeket a nephrectomia után 8 nappal távolítottunk el, jelentős mértékben tartalmaztak daganatsejteket. Ezekből a kísérletekből ugyancsak 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 (IV. táblázat).



*28/b. ábra. Metastasis megjelenését célzó vizsgálatok sémája He/De tumoros patkányokban  
Pirossal jelölve a daganatot hordozó állat.*

A nephrectomia és a nyirokcsomó átültetése között eltelt napok száma	He/De tumor tömege (g)
13	-
13	-
11	-
11	-
8	6.1
8	7.5

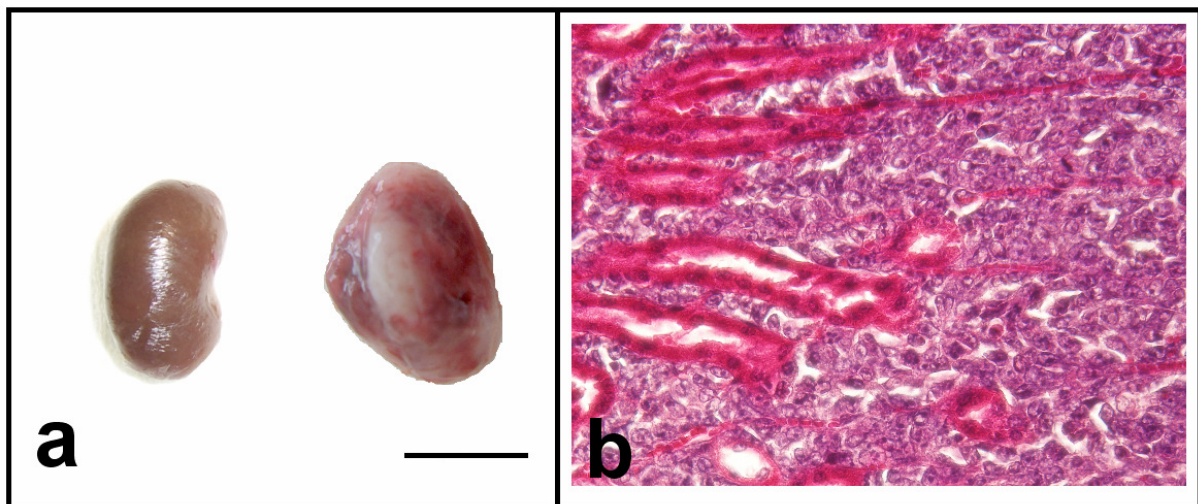
*IV. táblázat. A vesetok alá ültetett parathymicalis mirigyek tömege a beültetést követő 14. napon.*

## 4.2. Mesoblastos nephroma (Ne/De)

### 4.2.1. Ne/De jelzésű mesoblastos nephroma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve szolid tumor formájában növekedésnek indulnak

További kísérleteinkben a folyékony N<sub>2</sub> - ből, illetve a sejttenyészetekből származó daganatos sejteket F344 nőtény patkányok vesetokja alá ültettük, majd 7 nap elteltével az állatokat túlaltattuk és felboncoltuk. Makroszkóposan (29. ábra. a) megfigyelve a kivett és zsírszövetből megtisztított vesét, illetve a metszlapot a következőket láthattuk: a tumor gyorsan nő, infiltratív, az angiogenezis hamar elkezdődik (már hamar kis erek láthatók a világos színű tumor felületén). A tumor a vese méretének többszörösére is megnőhet, a vese nagy része azonban még ebben az állapotban is jól felismerhető, a vesének körülbelül csak a felét szűri be a tumor. A daganatot hordozó ép veserész megnagyobbodott, a kiesett funkció pótlására.

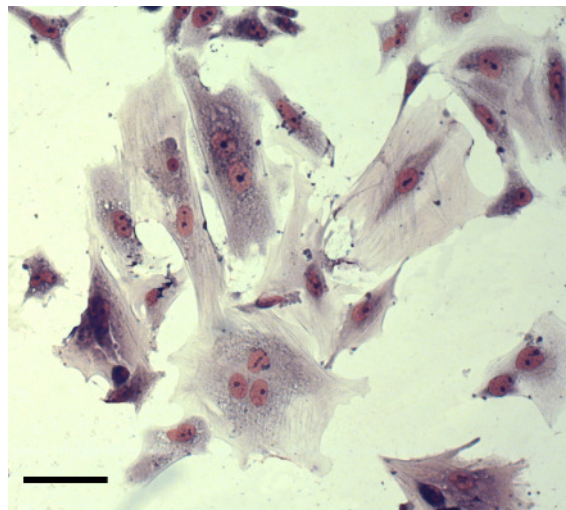
Fénymikroszkóppal vizsgálva megállapítható (H&E festés alapján), hogy a tumorsejtek kicsik (8-12 $\mu$ m), alakjuk és méretük változatos (pleomorfia) (29. ábra. b), jellemző a citoplazmához képest nagy mag, a bazofília. A tumor állománya alapvetően laza, kevés kötőszövetet tartalmaz. A tumor először a vesetok alatt, a vese felszínén nő (a kisebb nyomás irányába), a növekedés előrehaladtával azonban helyenként (általában a vese-tumor határvonal közepénél) elkezdődik a veseszövet infiltrációja.



29. ábra. A kontroll és 7. napon eltávolított daganatos vesék makroszkópos (a) és mikroszkópos (b) képe.

**4.2.2. A Ne/De jelzésű szolid tumorok sejtjeiből sejtvonal alakítható ki, amely tenyésztéssel közvetlenül, vagy Kelvinátorban történő tárolás után ismét visszaiültethető a vesetok alá**

A szolid tumorból a módszerek fejezetben ismertetett enzimes emésztéssel kinyert sejtek  $3 \times 10^6$  sejtszámban kerültek a sejtenyésztő 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 (30. ábra), daganat – és metastasis képző jellemzők a 100. passzálás után sem változtak.



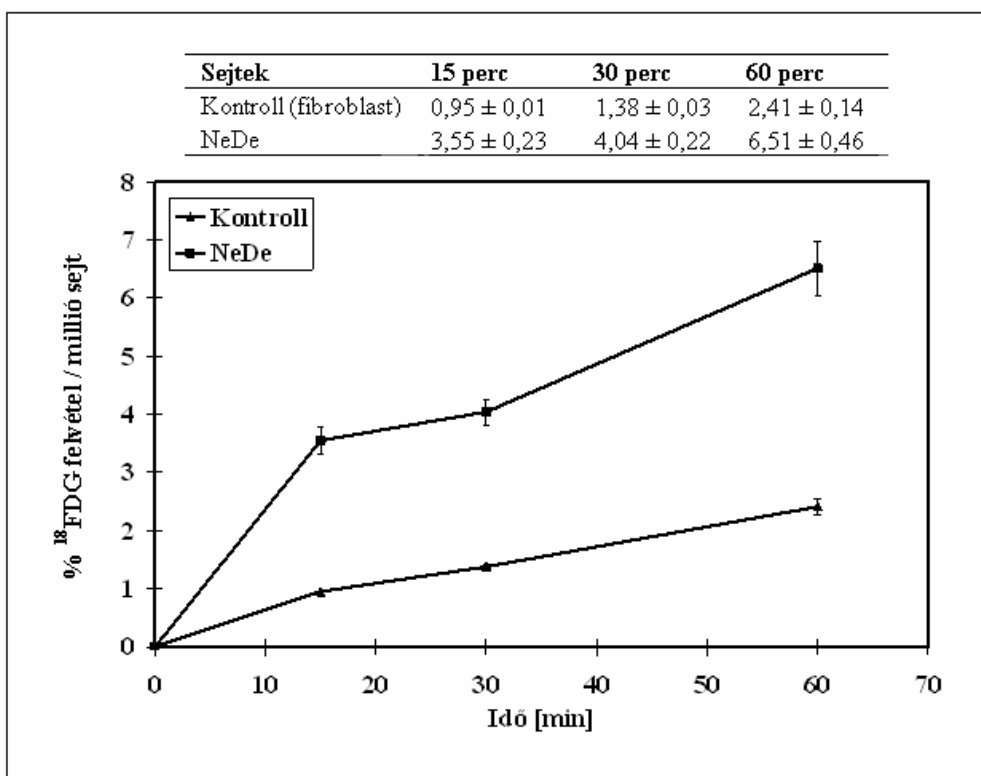
**30. ábra.** Ne/De sejtenyésztet mikroszkópos képe.

Jelzés: 5  $\mu$ m.

**4.2.3. A Ne/De jelzésű sejtek 15, 30 és 60 perc múlva jelentősen több  $^{18}\text{FDG}$ -t vesznek fel, mint a kontrollnak használt fibroblast sejtek**

**4.2.3.1. In vitro  $^{18}\text{FDG}$  akkumulációs mérések**

*In vitro* kísérleteink során, ahogyan a hepatocelluláris carcinoma esetén is, frissen izolált F344 patkány fibroblast sejteket használtunk kontrollként. A kontroll sejtek  $^{18}\text{FDG}$  felvételét hasonlítottuk össze a szintén F344 patkányból származó, 100 passzáláson átesett mesoblastos nephroma (Ne/De) sejtvonal glükóz-analóg felvételével. A vizsgálatok során 15, 30 és 60 perces felvételeket néztünk (31. ábra).



31. ábra. Kontroll (fibroblast) és Ne/De sejtek  $^{18}\text{F}$ FDG felvételének kinetikája.

Az ábra azt mutatja be, hogy az inkubáló oldatban lévő  $^{18}\text{F}$ FDG aktivitás hány százalékát veszi fel  $10^6$  sejt. Az eredmények alapján a Ne/De sejtek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele minden mért időpontban több mint kétszerese volt a kontroll sejtekhez viszonyítva. A különbség minden időpontban szignifikáns ( $p < 0.01$ ).

5  $\mu\text{M}$  cytochalasin B jelenlétében 60 perces felvételeket néztünk mindkét sejtípuson. Az eredmények alapján mind a fibroblast, mind pedig a Ne/De sejtek közel 11-szer kevesebb  $^{18}\text{F}$ FDG-t vettek fel cytochalasin B jelenlétében (V. táblázat).

Sejtek	$^{18}\text{F}$ FDG felvétel (%)
Fibroblast	2.01 ± 0.16
Fibroblast + 5 $\mu\text{M}$ cytochalasin B	0.17 ± 0.01
Ne/De	5.96 ± 0.30
Ne/De + 5 $\mu\text{M}$ cytochalasin B	0.51 ± 0.05

V. táblázat. Kontroll (fibroblast) és Ne/De sejtek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele (ID [%]) cytochalasin B jelenlétében, 60 perces inkubálást követően.

#### 4.2.3.2. Ne/De sejtek megoszlása a sejtciklus fázisaiban

Áromlási citometriás méréseinkhez etanolban fixált, propidium-jodiddal jelölt Ne/De és fibroblast sejteket használtunk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált sejtek (fibroblast, Ne/De) a sejtciklus melyik fázisában vannak, hiszen a sejtek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele nagyban függ a sejtciklusban elfoglalt helyüktől. Eredményeink alapján (VI. táblázat) a vizsgált sejtenyészetek (fibroblast, Ne/De) sejtjeinek igen nagy százaléka (~ 62-64 %) az S fázisban, körülbelül 20-22% a G1 fázisban és 16-18% a G2 fázisban volt. A sejtek proliferációs aktivitása hasonló volt, tehát a kapott eredmények összevethetőek.

Sejtciklus	Fibroblast %	Ne/De %
S	63,7 ± 2	62,1 ± 1
G1	20,1 ± 2	22,0 ± 2
G2	16,2 ± 1	17,5 ± 2

**VI. táblázat.** Fibroblast és Ne/De sejtek százalékos megoszlása a sejtciklus különböző fázisaiban relatív DNS tartalom alapján.

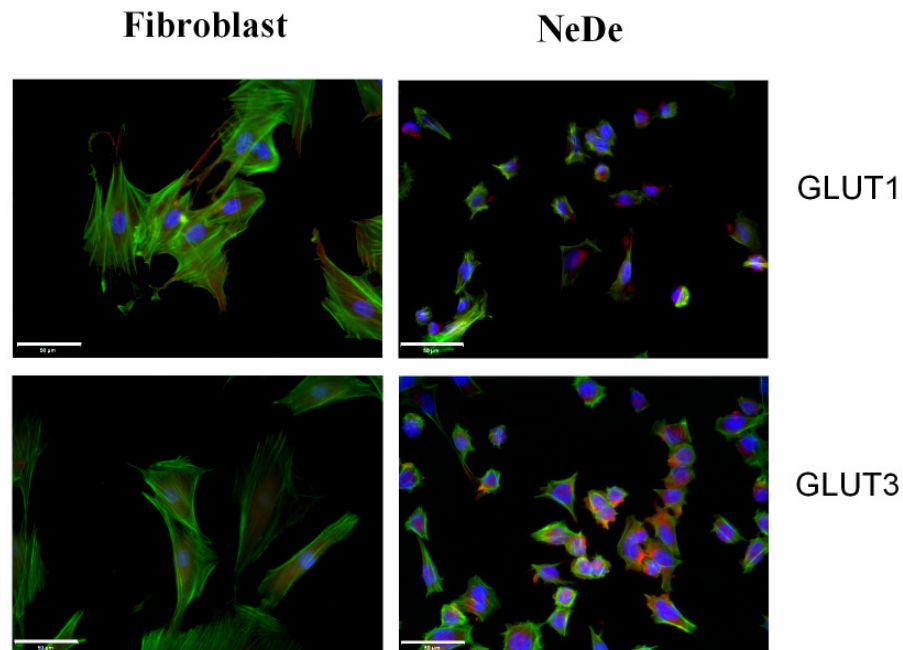
#### 4.2.4. Immunfluoreszcens és Western blot analízissel egyaránt kimutatható, hogy a Ne/De jelzésű sejtekben a GLUT-1 és GLUT-3 glükóz transzporter fehérjék mennyisége és eloszlása jelentősen különbözik a kontrollnak használt fibroblast sejtektől

##### 4.2.4.1. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és Ne/De sejtekben immunfluoreszcens technikával

A mesoblastos nephroma (Ne/De) sejtek glükóz-transzportereinek megjelenítésére immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk.

A fibroblastok és a tumoros (Ne/De) sejtek GLUT-1 expressziója között nem tapasztaltunk jelentős eltérést. A fibroblastok esetén 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

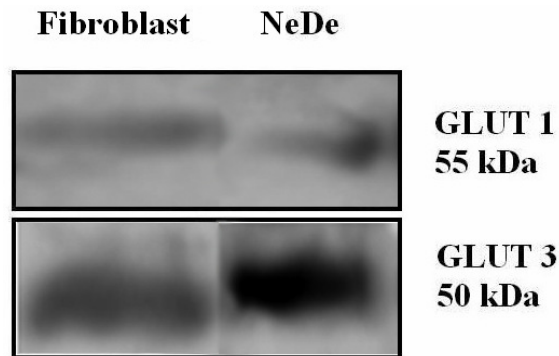
diffúzan fellelhetőek a citoplazmában (32. ábra). Ezek az eredmények is jól korrelálnak a tumorsejtek magas  $^{18}\text{F}$ FDG felvételével és a Western blot analízissel.



**32. ábra.** GLUT-1 és GLUT-3 glükóz transzporterek lokalizációja fibroblast és Ne/De sejtekben. Sejtmagok: kék (DAPI), citoszkeleton: zöld (phalloidin-FITC), GLUT transzporterek: piros (Texas red). Jelzés: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4.2. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása fibroblast és Ne/De sejtekben Western blot analízissel

A  $^{18}\text{F}$ FDG felvétel során kapott eredmények korreláltak a Western blot eredményekkel (33. ábra), amely módszerrel a vizsgált sejtek (teljes sejtlizátumok) GLUT-1 és GLUT-3 transzportereinek mennyiségét határoztuk meg. A Western blot eredményekből kitűnik, hogy a GLUT-1 transzporterek mennyiségét illetően nincs szignifikáns különbség a kontroll és daganatos sejtek között. A GLUT-3 transzporterek mennyisége ezzel szemben jóval magasabb mind a kontrollhoz, mind pedig a GLUT-1 szinthez képest a daganatos Ne/De sejtekben.



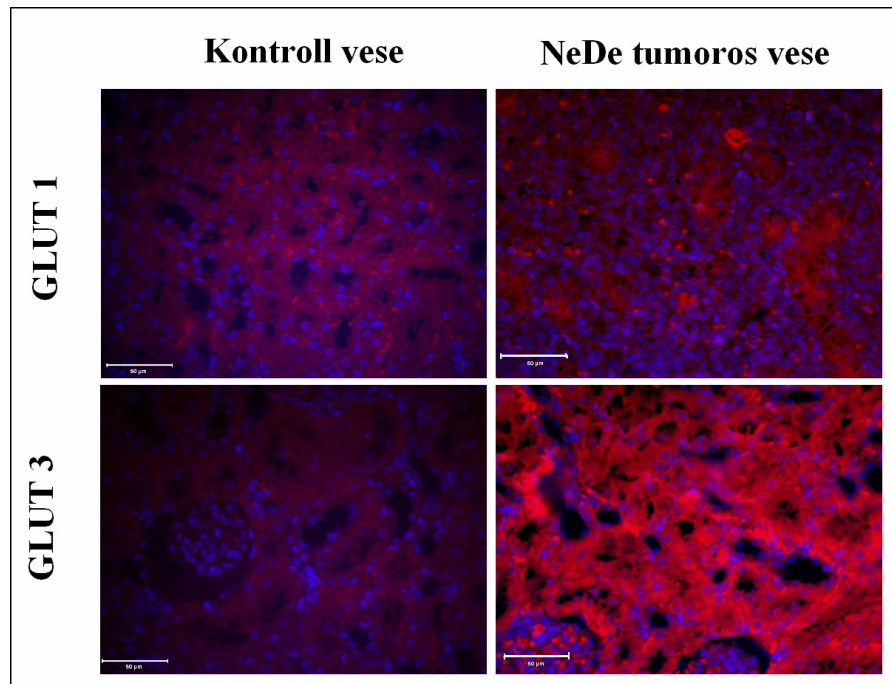
**33. ábra.** GLUT transzporterek mennyisége kontroll (fibroblast) és Ne/De sejtekben

#### 4.2.4.3. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban immunfluoreszcens technikával

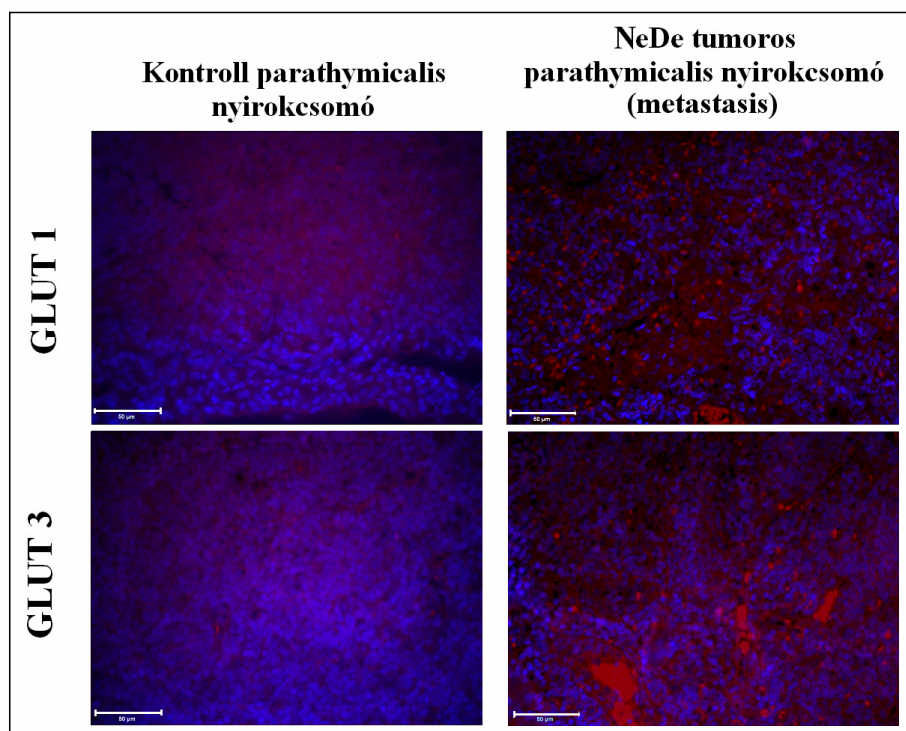
A glükóz-transzportereket érintő vizsgálatokat elvégeztük F344 patkányból származó mesoblastos nephroma tumoron is.  $10^6$  Ne/De sejt vesetok alá ültetése után 14 nappal keletkezett tumorból készült szövettani metszeteken végeztük a kísérleteket.

A 34. ábrán megfigyelhető, hogy mindkét transzporter fehérje nagyobb mennyiségben van jelen a tumorból készült metszeteken, mint a kontrollon. A kapott eredmények hasonlóak a Ne/De sejtek Western blot analíziséhez, hiszen a GLUT-3 transzporter mennyisége a tumorban is magasabb, mint a GLUT-1. Megfigyelhetőek a daganat miatt széteső tubulusok, illetve a GLUT-1 pozitív vörösvértestek által jelzett bevérzések.

A vesén keletkező primer tumor a mellkasi parathymicalis nyirokcsomóba ad áttétet. A metastasis vizsgálata során is azt tapasztaltuk, hogy a kontrollhoz képest mindkét transzporter fehérje expressziója kifejezettebb, különösen az 3-as típusú transzporteré (35. ábra). Megfigyelhetőek itt is a bevérzések, illetve a normál szöveti állomány fellazulása.



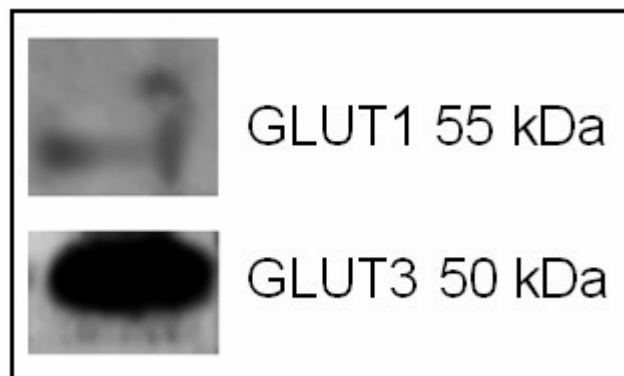
**34. ábra.** GLUT-1 és GLUT-3 fehérjék jelenléte kontroll és Ne/De tumoros patkány vesén. Sejtmagok: kék (DAPI), GLUT transzporterek: piros (Texas red). Jelzés: 50  $\mu$ m.



**35. ábra.** GLUT-1 és GLUT-3 fehérjék jelenléte kontroll és Ne/De tumoros patkány parathymicalis nyirokcsomón. Sejtmagok: kék (DAPI), GLUT transzporterek: piros (Texas red). Jelzés: 50  $\mu$ m.

#### 4.2.4.4. GLUT-1 és GLUT-3 transzporter fehérjék jelenlétének kimutatása tumorokban Western blot analízissel

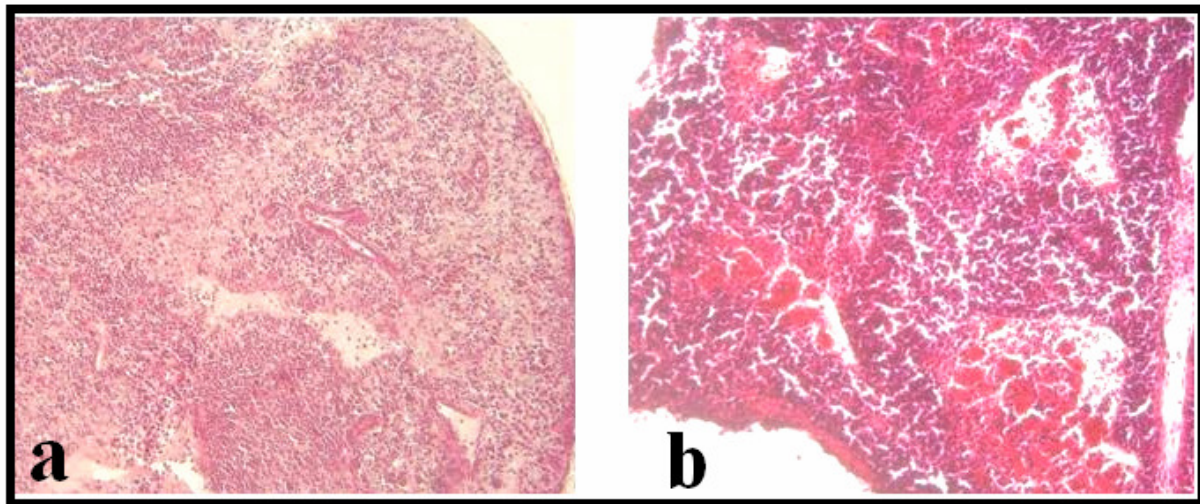
A kísérleti állatok vesetokja alá  $10^6$  Ne/De sejtet ültettünk, majd 14 nap múlva a keletkezett tumort kioperáltuk, tumorlizátumot készítettünk és Western blot analízissel vizsgáltuk a glükóz transzporter fehérjék mennyiségét. A Ne/De tumorlizátumon végzett vizsgálatok eredménye alátámasztotta az immunfluoreszcens kísérleteket, miszerint a glükóz-transzporterek közül a GLUT-3 expressziója magasabb (36. ábra).



36. ábra. GLUT transzporterek mennyisége Ne/De tumorban.

#### 4.2.5. A Ne/De jelzésű mesoblastos nephroma sejtek F344 patkányok vesetokja alá ültetve áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba

A Ne/De esetében is a patkányok mellüregében található parathymicalis nyirokcsomóban képződik áttét (37. ábra). 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 találhatók (37. ábra. b).



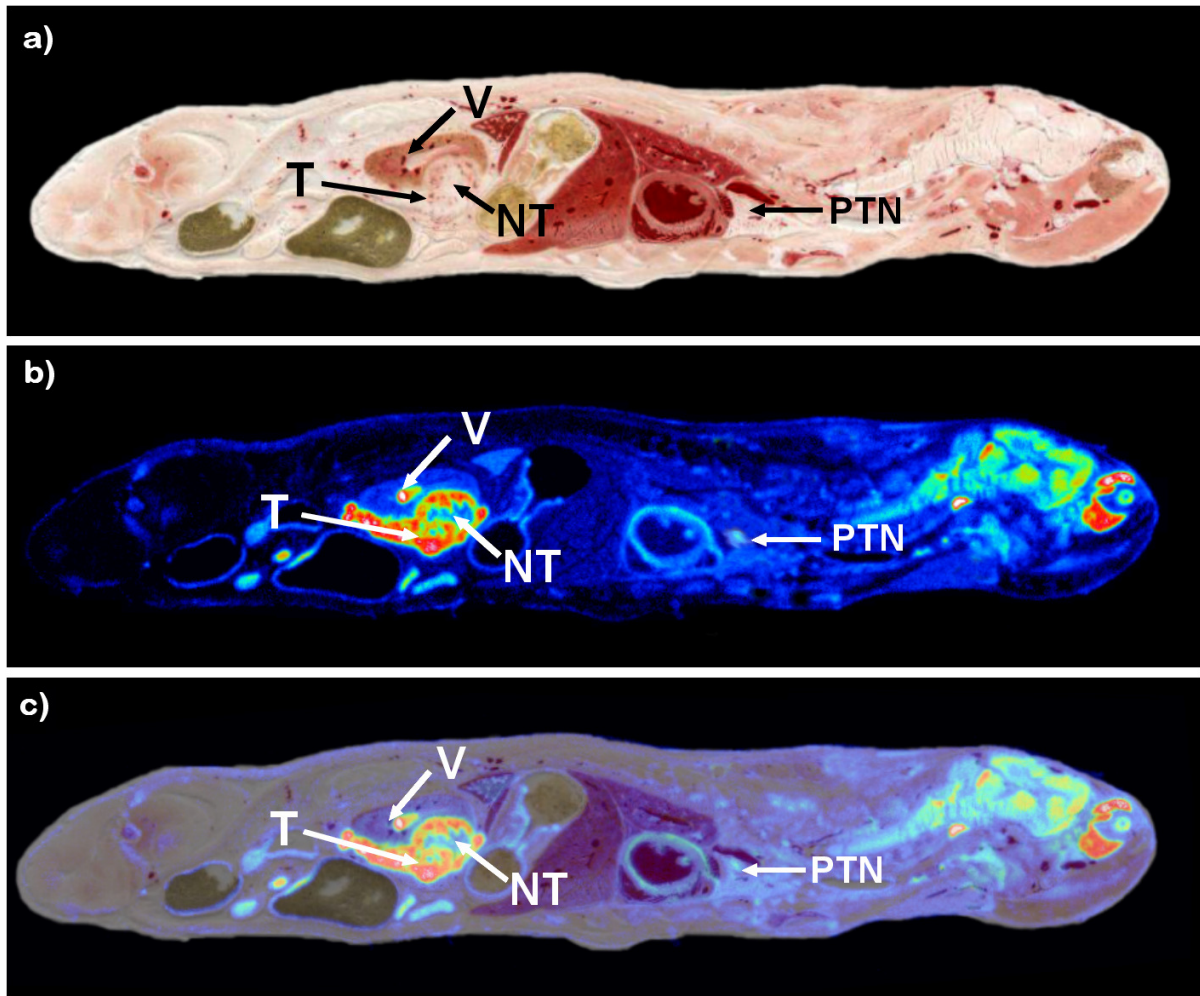
**37. ábra.** *Parathymicalis nyirokcsomó.*

*a – Ne/De sejtekkel infiltrált nyirokcsomó, b – haemorrhagiás, metasztatikus nyirokcsomó. H&E festés.*

**4.2.6. Autoradiográfiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok egyaránt azt erősítették meg, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő Ne/De jelzésű tumorok „sentinel” nyirokcsomói**

#### *4.2.6.1. Teljes test autoradiográfiás vizsgálatok*

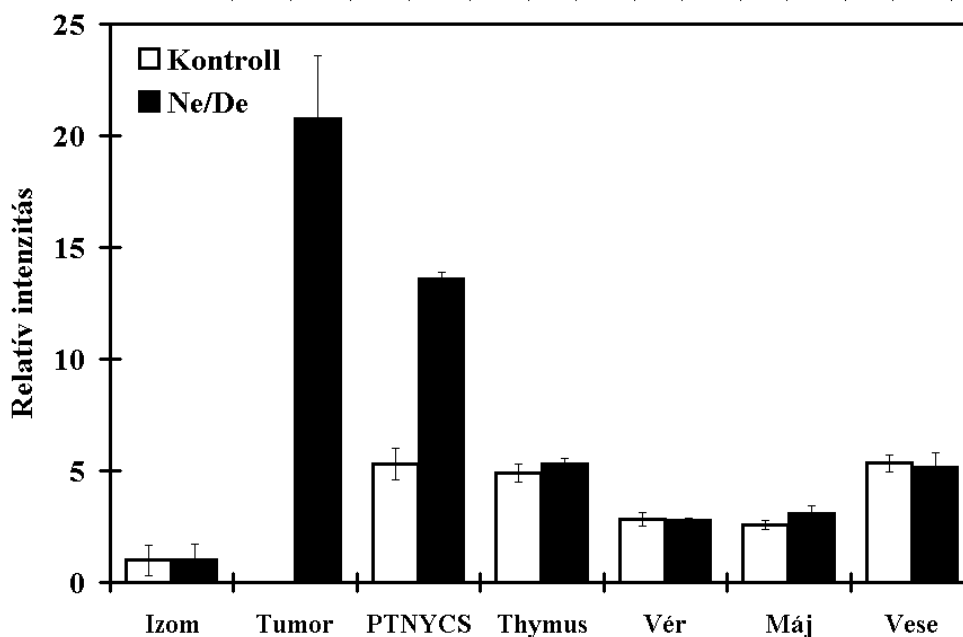
A hepatocelluláris carcinomához hasonlóan a Ne/De sejtek metasztatikus potenciálját is teljes test autoradiográfia és „phosphorimage” analízis segítségével vizsgáltuk. Kísérletünkben 6 db F344 nőtény patkány vesetokja alá  $10^6$  Ne/De sejtet transzplantáltunk, majd 14 nap múlva Nembutal altatás közben a bal oldali *vena femoralis*ba 15.0 MBq aktivitású  $^{18}\text{F}$ FDG tartalmú fiziológiás konyhasó-oldatot fecskendeztünk. 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 (38. ábra).



**38. ábra.** 14 napos Ne/De tumoros F344 patkány metszete és szerveinek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele teljes test autoradiográfiás képen. a) szkennelvel készült anatómiai kép, b) autoradiográfiás kép az előző metszetről, c) anatómiai és autoradiográfiás képek összevetésként egymásra helyezve. (T-élő Ne/De tumor, V-vese, NT-nekrotizált tumor, PTN- parathymicalis nyirokcsomó).

A mesoblastos nephroma esetén is elvégeztük a „phosphorimage” analízist. A harántcsíktolt izomzatra vonatkoztatott relatív intenzitás értékek rendkívül hasonlóak voltak a hepatocelluláris carcinoma esetén mért értékekhez. A képek pixeleinek információit számszerűsítve a tumor és a parathymicalis nyirokcsomók aktivitása kiemelkedő a többi szervhez viszonyítva (39. ábra). A kísérlet-sorozatból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vesetok alatt növekvő daganatok jelentős mértékű metastasist adnak a parathymicalis nyirokcsomókba.

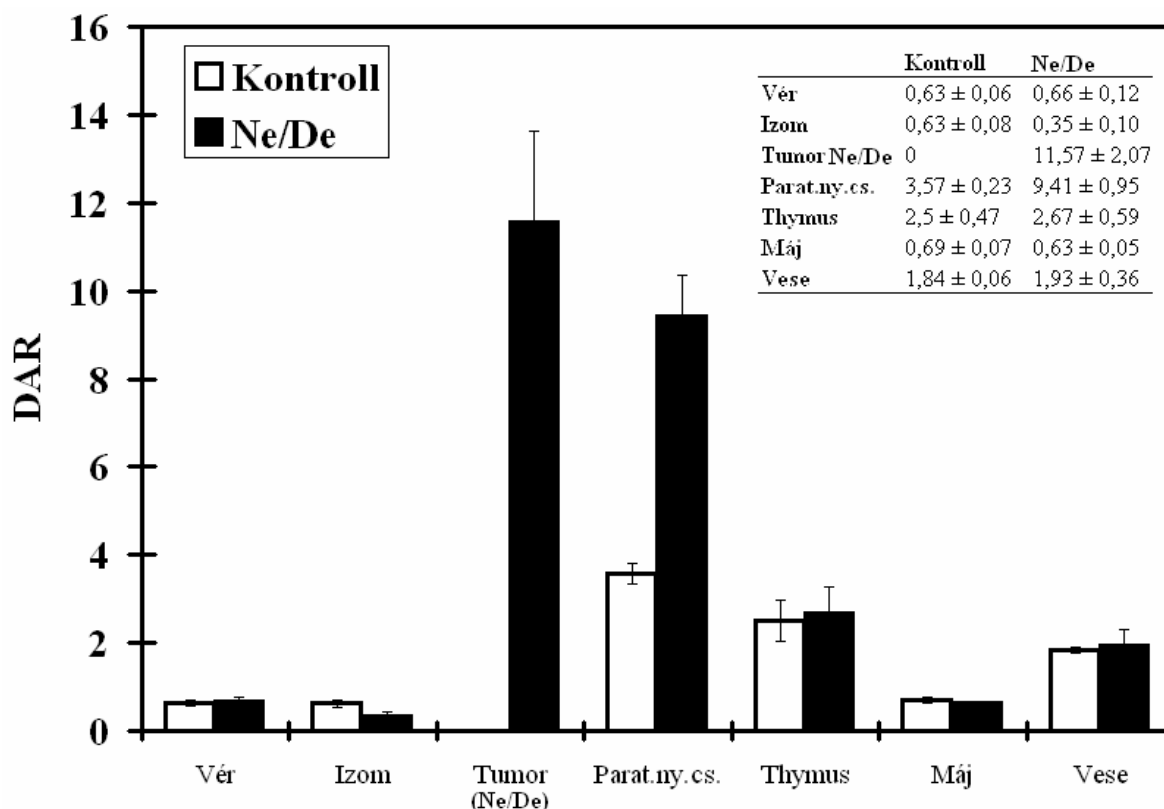
	Izom	Tumor	PTNYCS	Thymus	Vér	Máj	Vese
Kontroll	1,00±0,5	n/a	5,29±0,7	4,88±0,4	2,83±0,3	2,56±0,2	5,33±0,4
Ne/De	1,00±0,7	20,78±2,8	13,61±0,3	5,29±0,3	2,79±0,1	3,06±0,4	5,15±0,6



**39. ábra.** Relatív intenzitás megoszlása <sup>18</sup>F-FDG intravénás adása után Ne/De tumoros F344 patkányok autoradiográfiás képén. Az értékeket az egységet jelentő izomra normalizáltuk.

#### 4.2.6.2. Szerv-eloszlásos vizsgálatok

Metastasis modellünket erősítik meg a nőstény F344 patkányokon végzett kísérleteink is. 10<sup>6</sup> Ne/De sejt subcapsularis transzplantációja után 14 nappal az állatokba 15.0 MBq aktivitású <sup>18</sup>F-FDG tartalmú fiziológiás konyhasó-oldatot fecskendeztünk be i.v.. Beadás után egy óra múlva az aortából vért vettünk, majd eltávolítottuk a daganat, a máj, a vese, a thymusz, a *m. rectus abdominalis* 3-3 darabkáját, illetve a parathymicalis mirigyét. Az eltávolított szervek aktivitását gammaszámlálóval mértük, és a DAR értékeket kiszámítottuk. Mint az a 40. ábrából kitűnik, a 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.



40. ábra. Radioaktivitás DAR-ban kifejezett szervi megoszlása  $^{18}\text{F}$ FDG intravénás adása után Ne/De tumoros F344 patkányokban.

4.2.7. A nyirokcsomók transzplantációjával, illetve sorozatos veseírtásokkal kimutatható, hogy a Ne/De metastasisok  $10^6$  primer daganatsejt beültetése esetén a 6. naptól jelennek meg

#### 4.2.7.1. Nyirokcsomó transzplantációk

Annak kiderítésére, hogy mennyi idő múlva jelennek meg az áttétek, a He/De tumornál már ismertetett kísérletet 6 db F344 nőtény patkányban is megismételtük, azzal a különbséggel, hogy a vese tokja alá  $10^6$  Ne/De sejtet ültettünk. Azt találtuk, 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. Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy  $10^6$  sejtet tartalmazó primaer tumorokból a 3. és a 6. nap között indul meg a metastatis képződés, és úgy tűnik, a lassabban növekvő He/De-nek nagyobb a metastaticus potenciálja, mint a gyorsabban növekvő Ne/De-nek (VII. táblázat).

A tumor beültetése és a nyirokcsomók kivétele között eltelt napok száma	Ne/De tumor tömege (g)
1	-
1	-
3	-
3	-
6	0.5
6	0.9

**VII. táblázat.** A vesetok alá ültetett parathymicalis mirigyek tömege a beültetést követő 14. napon.

#### 4.2.7.2. Nephrectomiás vizsgálatok

Következő kísérletsorozatunkban – a hepatocelluláris carcinománál már leírt módon - 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 növekvő Ne/De-nek. (VIII. táblázat).

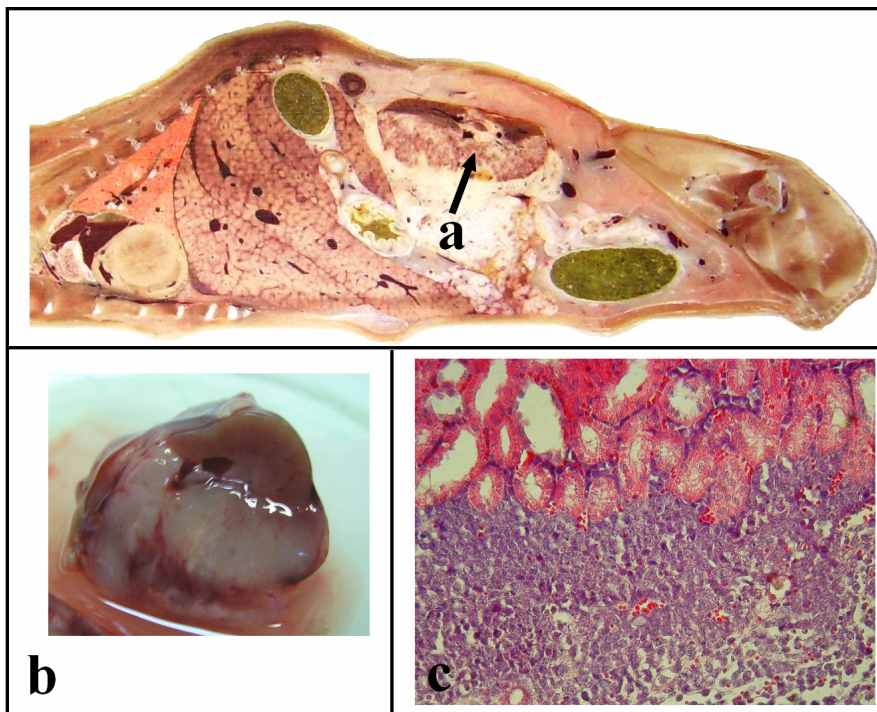
A nephrectomia és a nyirokcsomó átültetése között eltelt napok száma	Ne/De tumor tömege (g)
13	-
13	-
11	-
11	-
8	2.3
8	3.7

**VIII. táblázat.** A vesetok alá ültetett parathymicalis mirigyek tömege a beültetést követő 14. napon.

### 4.3. Myelomonoblastos leukaemia (My1/De)

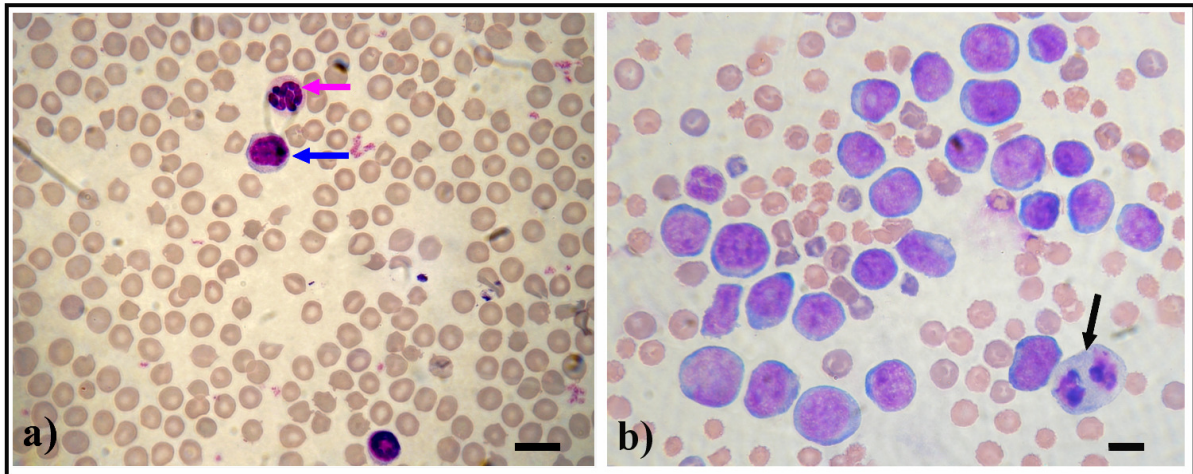
#### 4.3.1. A My1/De jelzésű myeloblastos sejtek LE patkányok vesetokja alá ültetve szolid tumor (myelomonoblastos sarcoma) formájában növekedésnek indulnak, amely végül leukaemiához vezet

A vesetok alá ültetett myelomonoblastos sejtek (My1/De) 2 hét elteltével a vese jelentős részét infiltrálják (41. ábra. a,b). A hypercelluláris myelosarcoma basophil festődésű blast sejteket tartalmaz (41. ábra. c). A diffúz infiltrációs mintázatot adó blast sejtek nagy méretűek, sejmagjuk kerek vagy enyhén behúzott, citoplazmájuk keskeny.



**41. ábra.** 14. napon eltávolított daganatos (myelomonoblastos sarcoma) vesék makroszkópos (a, b) és mikroszkópos (c) képe.

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 (42. ábra). A nagyszámú blast sejtek jól láthatóak a 42. ábra b részén, valamint megfigyelhető a polikromázia jelensége éretlen vörösvértestekkel együtt.

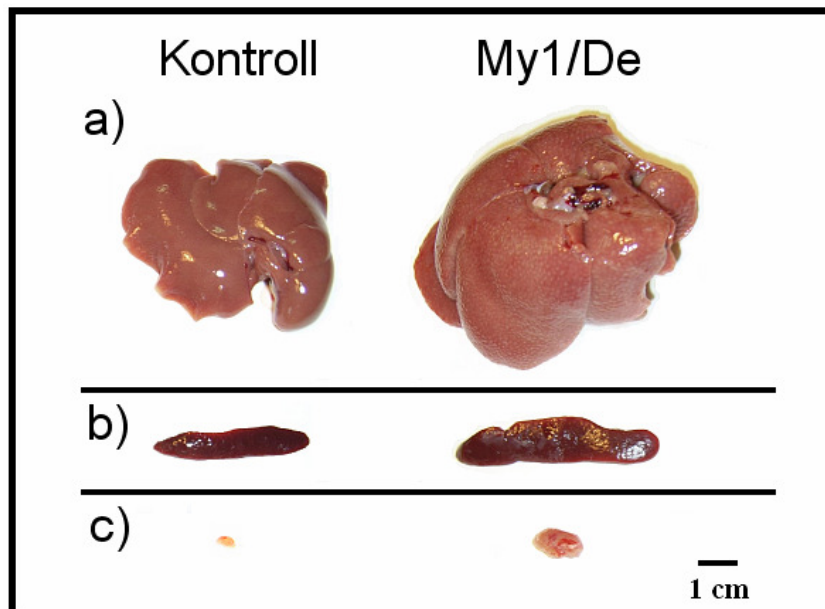


**42. ábra.** Kontroll (a) és leukaemiás (b) Long-Evans patkányok perifériás vérkenete.

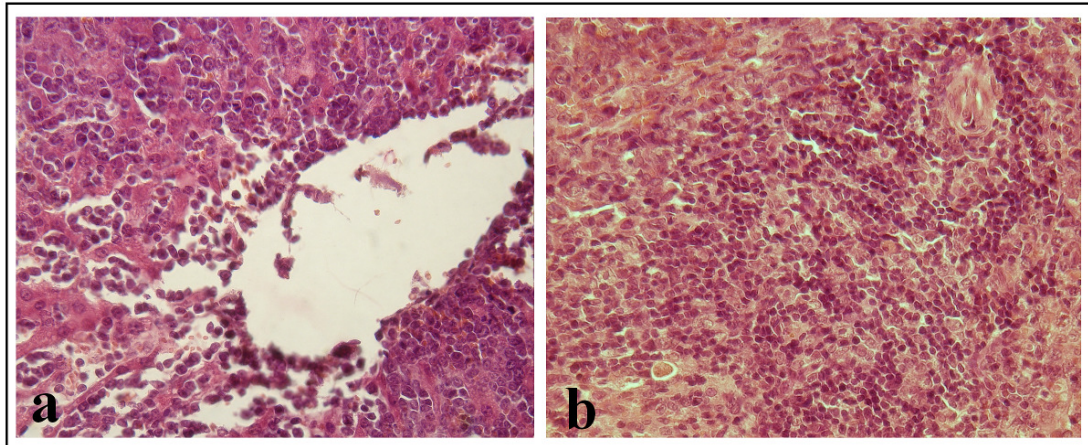
Rózsaszínű nyíl: granulocyta, kék nyíl: lymphocita, fekete nyíl: osztódó blast sejt.

Giemsa festés. Jelzés: 10  $\mu$ m.

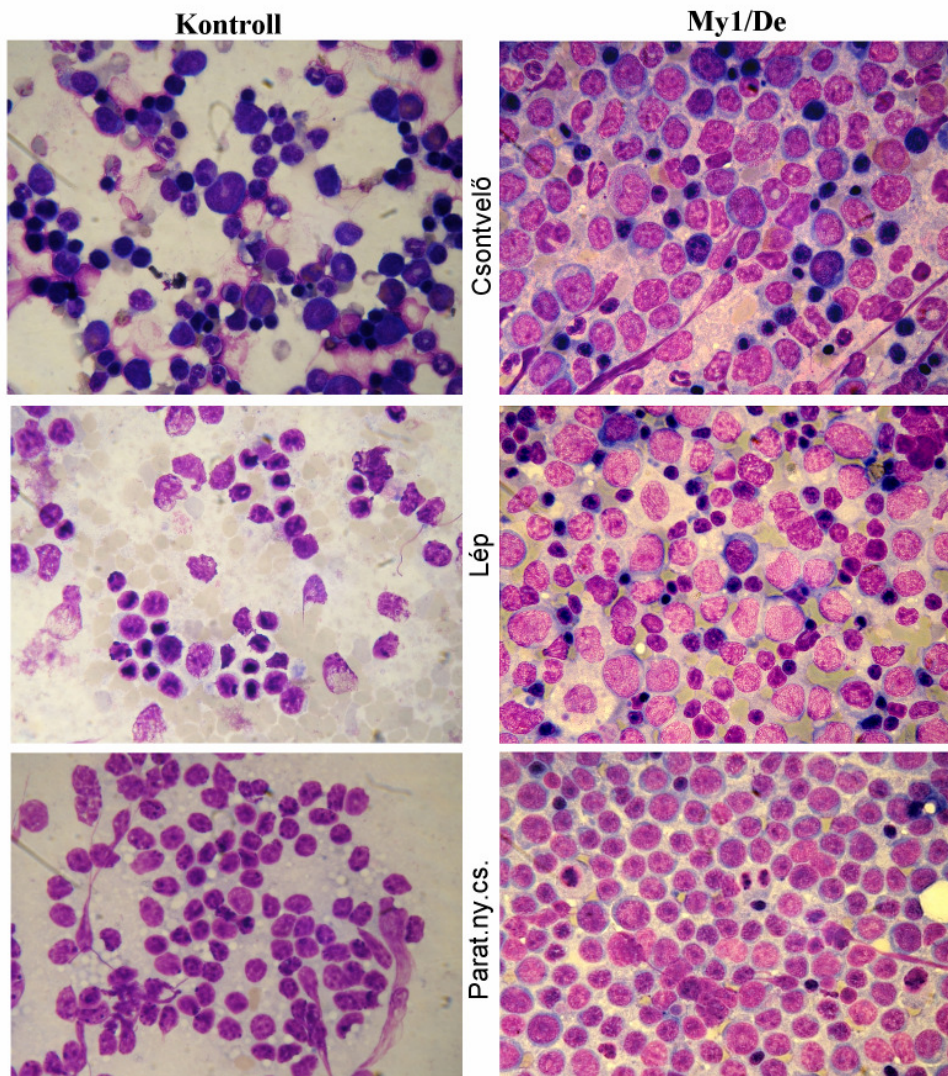
Makroszkóposan megfigyelhető volt a kontrollhoz képest megnagyobbodott, világosabb színű máj (43. ábra a), ugyancsak megnagyobbodott lép (43. ábra. b) és parathymicalis nyirokcsomó (43. ábra. c). Mind a májból és lépből készített szövettani metszetek (44. ábra), mind pedig a csontvelő, lép és parathymicalis nyirokcsomó kenetek mikroszkópos vizsgálatai megerősítették e szervek leukaemiás érintettségét (45. ábra).



**43. ábra.** My1/De sejtek subcapsularis transzplantációja után 14 nappal eltávolított kontroll és myelomonoblastos leukaemiás szervek LE patkányból. a – máj, b – lép, c – parathymicalis nyirokcsomó.



44. ábra. My1/De sejtekkel infiltrált máj (a) és lép (b) mikroszkópos képe. H&E festés.

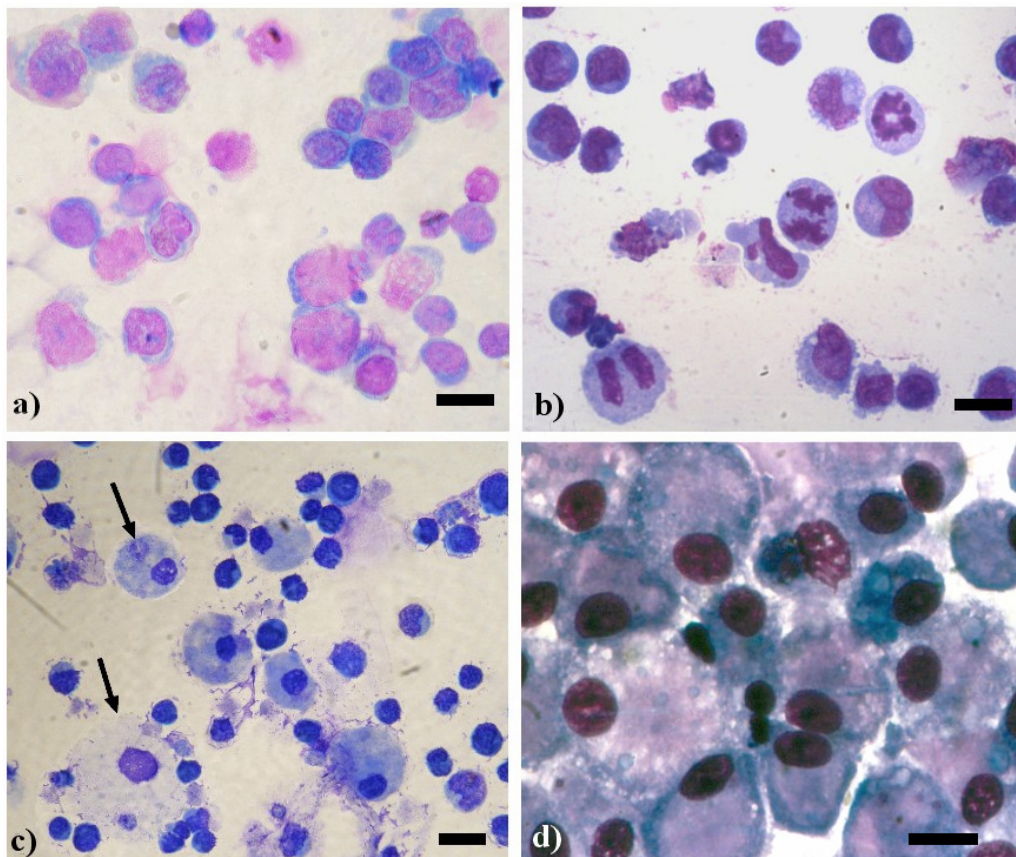


45. ábra. My1/De sejtek subcapsularis transzplantációja után 14 nappal LE patkányból eltávolított kontroll és myelomonoblastos leukaemiás szervek kenetei. (Giemsa festés).

(Parat.ny.cs.: Parathymicalis nyirokcsomó)

#### 4.3.2. A leukaemiás patkányok csontvelő sejtjei tenyésztethetők, tenyészetből közvetlenül, vagy Kelvinátorban történő tárolás után ismét visszaültethetők a vesetok alá

A leukaemiás Long-Evans patkányok csontvelő szuszpenziójából (46. ábra. a) 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 (humán plasma-sejtekre emlékeztető) macrophagokká differenciálódnak (46. ábra. c), majd a sejttenyészet elpusztul. Mielőtt megkezdődne a sejtek makrofágokká történő átalakulása, a myelomonoblastos sejtek igen intenzíven osztódnak (46. ábra. b). Megfigyeléseink szerint a sejtszám 1,5 – 2 naponta a duplájára emelkedik. A sejttenyészetekből, transzplantációs kísérletekre körülbelül a 45. napig használhatók fel.

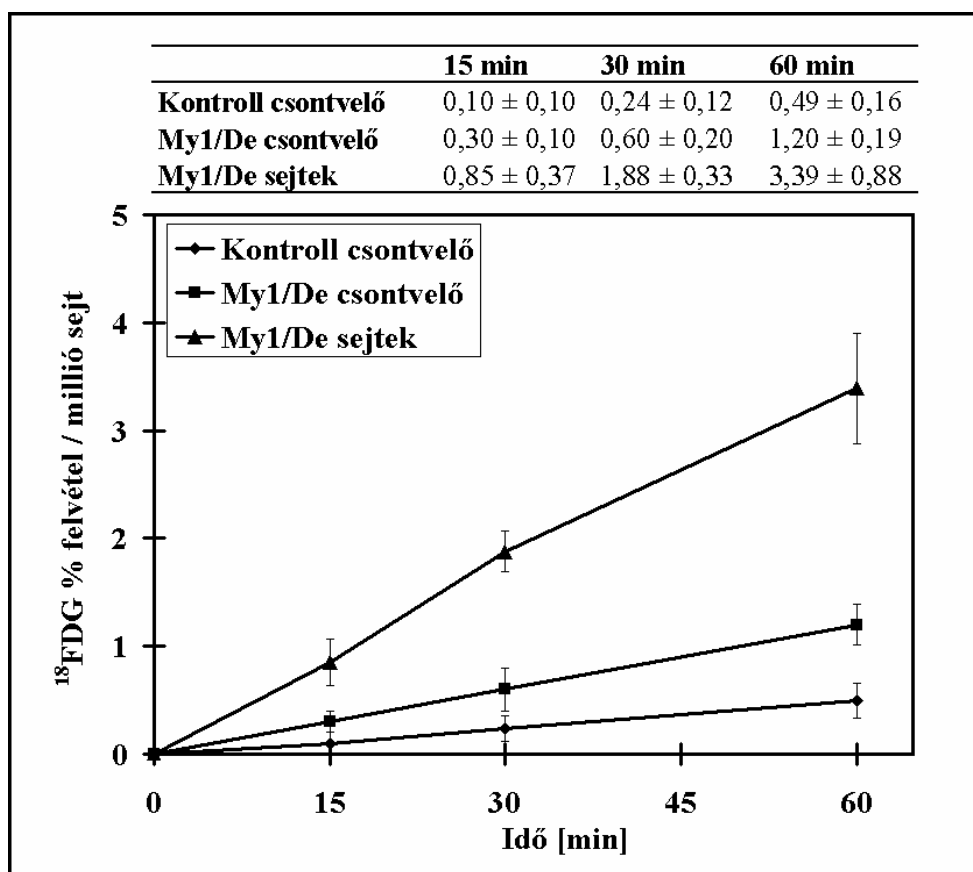


46. ábra. Felnőtt (My1/De) Long-Evans patkány csontvelőből induló myelomonoblastos leukaemia sejttenyészetek. a): My1/De 1. nap, b): My1/De blast sejtek mitotikus alakokkal, 14. nap, c): My1/De 50. nap. Nyilak: macrophagok. d) My1/De 60. nap. Macrophagok. Giemsa festés. Jelzés: 15 µm.

**4.3.3. A My1/De jelzésű myelomonoblastos sejtek 15, 30 és 60 perc múlva jelentősen több <sup>18</sup>FDG-t vesznek fel, mint a kontroll, illetve a leukaemiás patkányok csontvelő sejtjei**

**4.3.3.1. In vitro <sup>18</sup>FDG akkumulációs mérések**

*In vitro* <sup>18</sup>FDG akkumulációs méréseinknél kontroll és leukemiás Long-Evans patkányok frissen izolált csontvelő szuszpenzióját hasonlítottuk össze 20 passzálon átesett My1/De leukemiás (myelomonoblast) sejtenyészettel. Vizsgálatainkhoz felhasznált leukaemiás patkányok perifériás vérkenetében a fehérvérsejtek száma 60-80 G/L volt, amely 50-70%-át blast sejtek tették ki. A vizsgálatok során 15, 30 és 60 perces felvételeket néztünk (47. ábra).



**47. ábra.** Kontroll és leukaemiás csontvelő szuszpenzió, illetve My1/De sejtek <sup>18</sup>FDG felvételének kinetikája.

A 47. ábra azt mutatja be, hogy az inkubáló oldatban lévő <sup>18</sup>FDG aktivitás hány százalékát veszi fel 1 millió sejt. 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  $\mu\text{M}$  glükóz transzporter blokkoló cytochalasin B jelenlétében 60 perces felvételeket néztünk a My1/De leukaemiás sejttenyészetben. Eredményeink alapján a leukemiás sejtek 10-szer kevesebb  $^{18}\text{F}$ FDG-t vettek fel cytochalasin B jelenlétében (IX. táblázat).

Sejtek	$^{18}\text{F}$ FDG felvétel (%)
My1/De	$3.39 \pm 0.51$
My1/De + 5 $\mu\text{M}$ cytochalasin B	$0.35 \pm 0.12$

**IX. táblázat.** My1/De sejtek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele (ID [%]) cytochalasin B jelenlétében, 60 perces inkubálást követően.

#### 4.3.3.2. My1/De és csontvelő sejtek megoszlása a sejtciklus fázisaiban

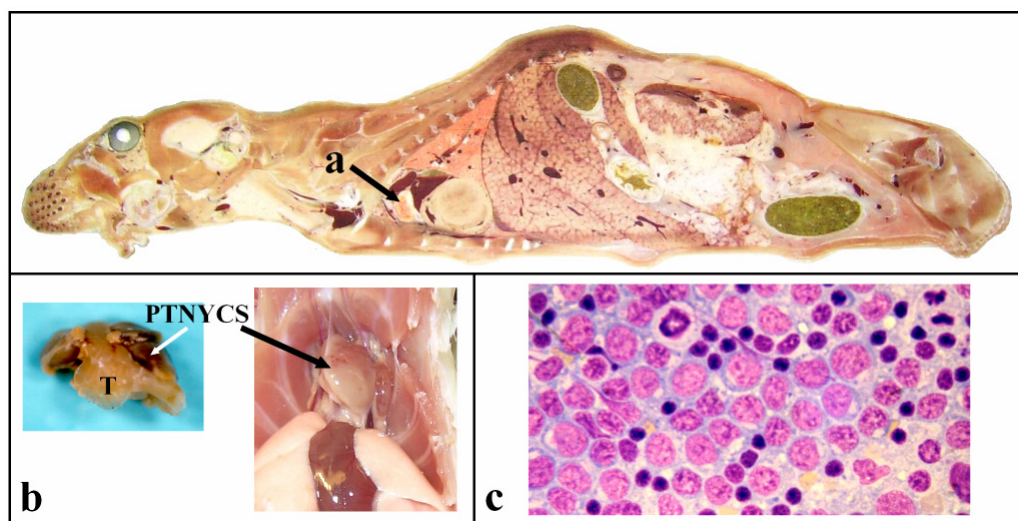
Áramlási citometriás méréseink során megállapítottuk, hogy a vizsgált sejtek (kontroll és leukaemiás csontvelő szuszpenziók, My1/De sejtek) a sejtciklus melyik fázisában vannak. Eredményeink alapján (X. táblázat) a vizsgált sejtpopulációk nagy százalékban (~ 59-61 %) az S fázisban, körülbelül 20-24% a G1 fázisban és 17-19% a G2 fázisban volt. A sejtek proliferációs aktivitása közel azonos volt a mérések idején, tehát a kapott eredmények összevethetőek.

Sejtciklus	Kontroll csontvelő %	Leukemiás Csontvelő %	My1/De %
S	$60,7 \pm 2$	$61,3 \pm 2$	$59,8 \pm 1$
G2	$23,1 \pm 1$	$20,1 \pm 1$	$24,0 \pm 1$
G2	$17,2 \pm 2$	$19,2 \pm 1$	$18,2 \pm 2$

**X. táblázat.** Kontroll és leukaemiás csontvelő szuszpenziók és My1/De sejtek százalékos megoszlása a sejtciklus különböző fázisaiban relatív DNS tartalom alapján.

#### **4.3.4. A My1/De jelzésű myeloblastos sejtek LE patkányok vesetokja alá ültetve áttéteket adnak a parathymicalis nyirokcsomókba**

A vesetok alá ültetett myelomonoblastos sejtek e modell esetében is a patkányok mellüregében található parathymicalis nyirokcsomóba adnak áttétet (48. ábra. a). A blast sejtek a szervet teljesen infiltrálják, a szerv - makroszkóposan vizsgálva – vöröses színezetű (48. ábra. b). A tumorsejtek (blastok) megegyeznek a vesében látottakkal. Jellemző rájuk a nagy méret (kb. 10-12  $\mu\text{m}$ ), keskeny citoplazma kerek vagy enyhén behúzott sejttaggal. A magkromatin laza szerkezetű, benne 1-2 nukleólusz azonosítható (48. ábra. c).



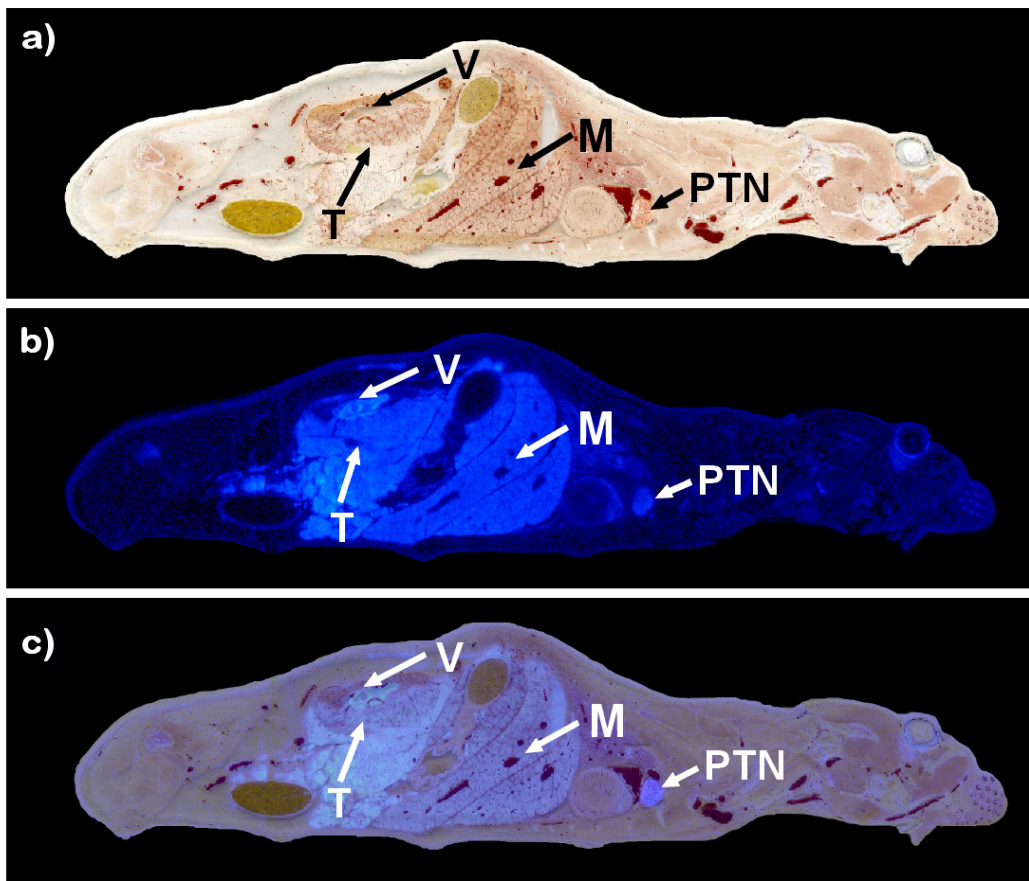
**48. ábra.** Vesetok alá ültetett My1/De sejtek megjelenése a parathymicalis nyirokcsomóban. *a* – mellkas üregében elhelyezkedő metastatikus parathymicalis nyirokcsomó, *b* – metastatikus parathymicalis nyirokcsomó (PTNYCS) (T – thymus), *c* – blast sejtekkel (fekete nyilak) infiltrált parathymicalis nyirokcsomó (Giemsa festés).

#### **4.3.5. Autoradiográfias és szerv-eloszlásos vizsgálatok egyaránt azt erősítették meg, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő My1/De jelzésű tumorok „sentinel” nyirokcsomói**

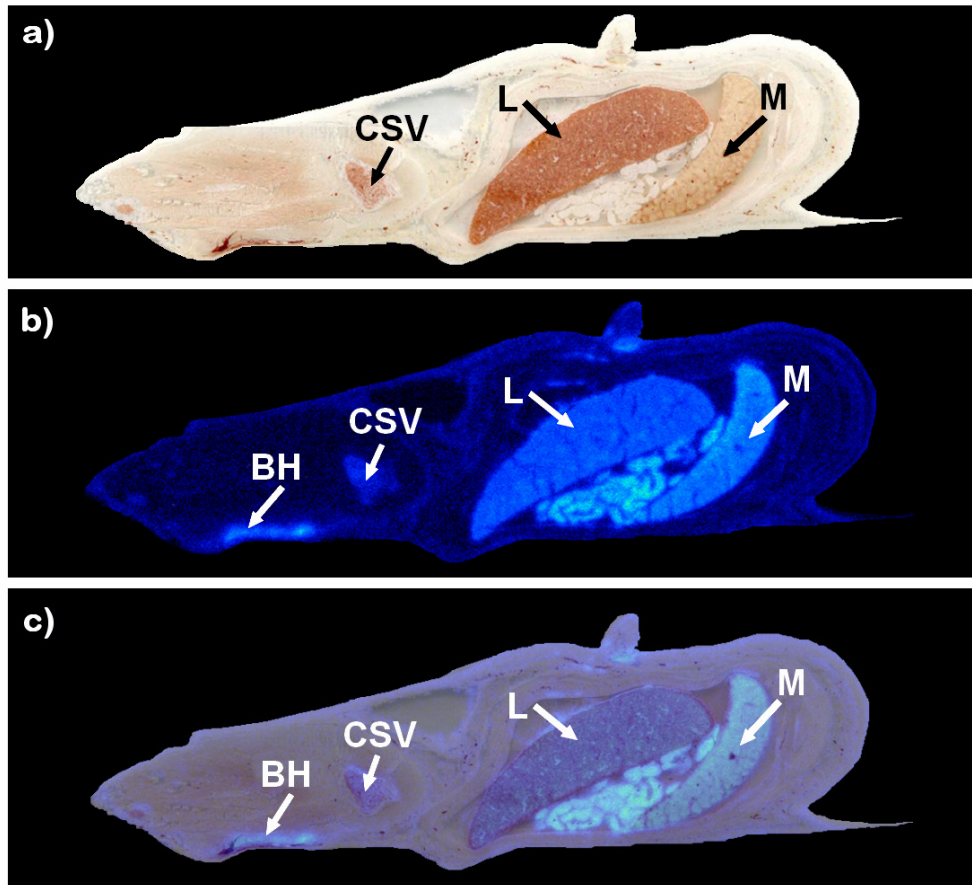
##### **4.3.5.1. Teljes test autoradiográfias vizsgálatok**

Az epitheliális eredetű májcarcinomához (He/De) és a mesenchymális eredetű mesoblastos nephromához (Ne/De) hasonlóan a My1/De sejtek metastatikus 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  $^{18}\text{F}$ FDG tartalmú fizioológias konyhasó-oldatot fecskendeztünk. Egy óra múlva az állatokat túllattattuk, majd teljes-test autoradiográfiát és „phosphorimage” analízist végeztünk. Az autoradiográfiás kísérletek szerint a legnagyobb aktivitást a vesetok alatt kialakult myeloid sarcoma mutatta, illetve a kontrollhoz képest a metastasist tartalmazó parathymicalis nyirokcsomók (49. ábra), illetve a máj, a lép és a mesenterialis nyirokcsomók aktivitása volt kiemelkedő (50. ábra).

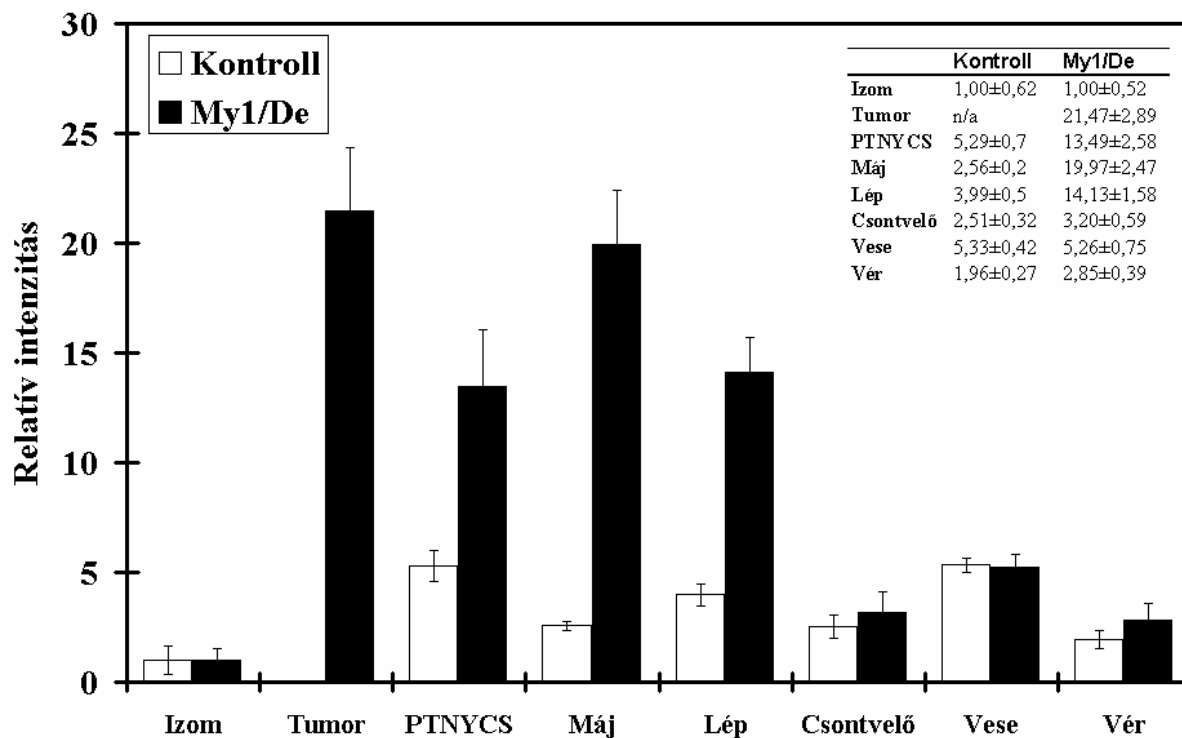


**49. ábra.** 14 napos My1/De tumoros Long-Evans patkány metszete és szerveinek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele teljes test autoradiográfiás képen. a) szkennelrel készült anatómiai kép, b) autoradiográfiás kép az előző metszetről, c) anatómiai és autoradiográfiás képek összevetésként egymásra helyezve. (T-My1/De tumor /myeloid sarcoma/, V-vese, M-máj, PTN-parathymicalis nyirokcsomó).



**50. ábra.** 14 napos My1/De tumoros Long-Evans patkány metszete és szerveinek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele teljes test autoradiográfiás képen. a) szkennelvel készült anatómiai kép, b) autoradiográfiás kép az előző metszetről, c) anatómiai és autoradiográfiás képek összevetésként egymásra helyezve. (CsV-csontvelő, L-lép, M-máj, BH- $^{18}\text{F}$ FDG beadás helye- v. femoralis).

Elvégezve a „phosphorimage” analízist, a képek pixeleinek információit számszerűsítve, meghatároztuk a szervek harántesíktól izomzatra vonatkoztatott relatív intenzitás értékeit. Magas volt a leukémiás érintettségű szervek (máj, lép) aktivitása. A csontvelő aktivitása a vártnál alacsonyabb értéket mutat. A legnagyobb aktivitást a myeloid sarcománál (tumor) tapasztaltuk. A nyirokcsomók közül egyedül a parathymicalis nyirokcsomók aktivitása kiemelkedő (51. ábra).



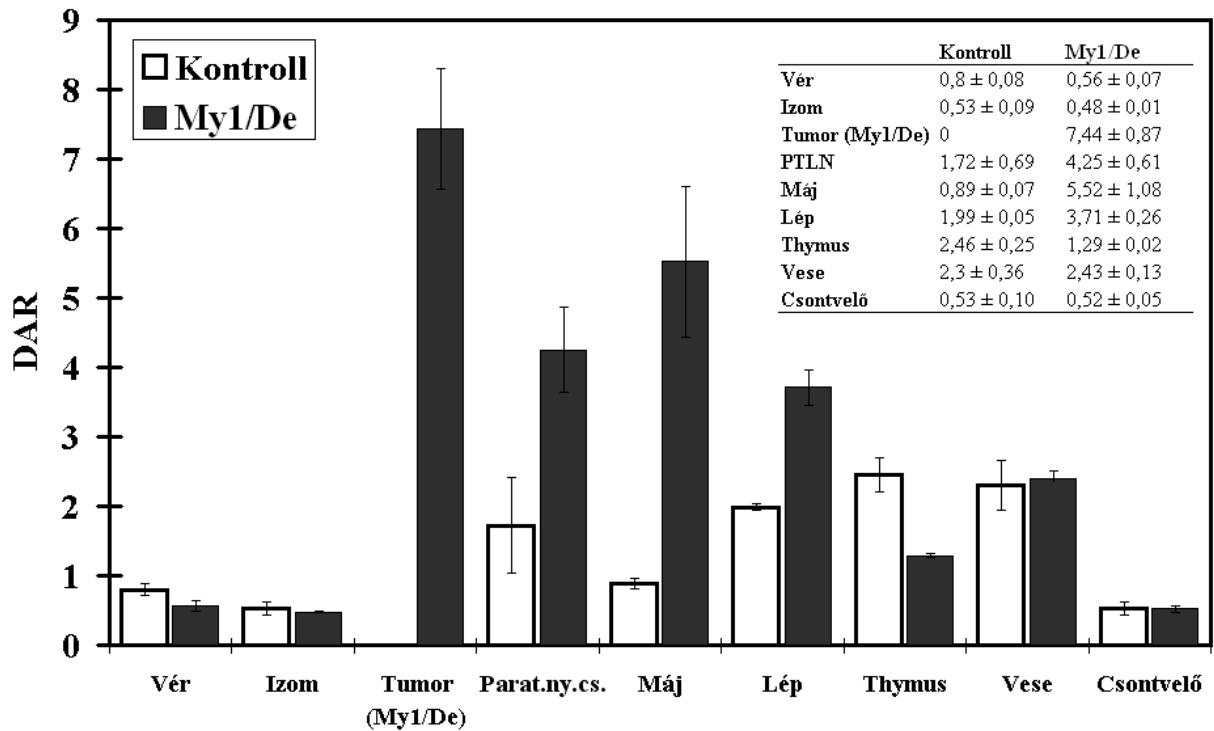
**51. ábra.** Relatív intenzitás megoszlása  $^{18}\text{F}$ FDG intravénás adása után My1/De tumoros Long-Evans patkányok autoradiográfiai képén. Az értékeket az egységet jelentő izomra normalizáltuk.

A kísérlet-sorozatból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vesetok alatt növekvő daganatok elsőként a parathymicalis nyirokcsomókba adnak (jelentős) mértékű metastasist.

#### 4.3.5.2. Szerv-eloszlásos vizsgálatok

Ezt a megállapítást erősítik további kísérleteink is, amelyekben  $10^6$  My1/De sejt subcapsularis transzplantációja után két héttel az állatokba 15.0 MBq aktivitású  $^{18}\text{F}$ FDG tartalmú fiziológiai konyhasó-oldatot fecskendeztünk be i.v.. Beadás után egy óra múlva az aortából vért vettünk, majd eltávolítottuk a daganat, a máj, a vese, a lép, a csontvelő, a thymusz, a m. rectus abdominalis 3-3 darabkáját, illetve a parathymicalis mirigyét. Az eltávolított szervek aktivitását gammaszámlálóval lemértük, és a DAR értékeket kiszámítottuk (52. ábra). 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. Feltűnő a leukemiás patkány thymusának kontrollhoz képest

alacsonyabb aktivitása. Ennek oka, hogy a My1/De tumoros állatban a thymus atrophizál a daganat okozta stressz miatt. Ez a kísérlet is alátámasztja eddigi eredményeinket, a parathymicalis mirigyeknek a metastasis-képződésben játszott szerepéről.



52. ábra. Radioaktivitás DAR-ban kifejezett szervi megoszlása <sup>18</sup>FDG intravénás beadása után My1/De tumoros Long-Evans patkányokban.

## 5. Megbeszélés

Kísérleteink során az alábbi új eredményekhez jutottunk:

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* tenyésztethetők, 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-ik *in vitro* passzázs után macrophágokká differenciálódnak.
3. Az első két pontban ismertetett eredmények jól használhatók a preklinikai kemoprevenációs vizsgálatok során. A kísérleteket megrövidítő, gyorsan növekvő tumortörzsek adottak, 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 <sup>18</sup>FDG radiofarmakon módszerek kémiai úton létrehozott daganatokat hordozó patkányban is alkalmazhatók, és segítségükkel a kemoprevenációs próbálkozások hatása rövid idő alatt ellenőrizhető.
5. Új megfigyelés, hogy a vesetok alá ültetett 10<sup>6</sup> 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 kromatinjára a nagyfokú szupertekercseltség jellemző.

A továbbiakban a fenti eredményekhez - a felsorolás sorrendjében - további megjegyzéseket szeretnék fűzni.

A dimetilnitrozaminnal 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 sejtenyészetek használata a világon mindenütt elterjedt. Azok a technikák, amelyek segítségével képesek vagyunk sejteket fenntartani a testen kívül, látványos fejlődésen mentek keresztül a 20. században. Az első daganatos sejtvonal, a HeLa (Gey és mtsai., 1952) publikálása óta eltelt közel 60 évben több száz tumoros sejtvonal jelent meg. Ezek a sejtvonalak kiváló eszközként szolgálnak a különböző biokémiai és molekuláris biológiai kutatásokhoz, amelyek hozzájárulnak a normál és daganatos sejtek fiziológiájának megértéséhez.

A kutatások során gyakran felmerült a kérdés, hogy a kísérletek során már létező, jól karakterizált sejtvonalakat használjunk, vagy hozzunk létre új sejtvonalat? Amennyiben vizsgálatainkat jól leírt, ismert sejtvonalon akarjuk elvégezni, akkor számos sejtbank (ATCC, DSMZ) áll rendelkezésünkre. A már létező sejtvonalak használatának egyik nagy előnye, hogy szinte azonnal elérhetőek, jól karakterizáltak, illetve a folyamatosan megjelenő publikációk révén újabb és újabb információkat kapunk az adott modellről. Azonban számos helyzetben a sejtvonalak nem hozzáférhetőek, és szükség van új modellek létrehozására. Ez különösen a kísérleti állatok különböző daganataira érvényes. Új modellek létrehozása sok időbe és nagy erőfeszítésbe kerül, hiszen az új sejtvonalakat karakterizálni kell, azonban számos szituációban - mindezek ellenére - szükséges. Előfordulhat, hogy nincs, vagy csak nagyon kevés olyan, már létező sejtvonal van, amely az általunk vizsgált tumor típusnak megfelel. Különleges tulajdonságokkal (például egy újfajta szerrel szemben kialakuló rezisztencia), rendelkező sejtvonalak nem mindig hozzáférhetőek. Végezetül lehetnek eddig ismeretlen, új tulajdonságai egy újonnan alapított sejtvonalnak, ami ellensúlyozza a karakterizálás nehézségeit.

A szolid tumorokból történő primer kultúrák létrehozásának számos módja ismeretes. A legegyszerűbb módszer az úgynevezett szövet-szelet technika, melynek során a szervezetből származó tumor „fragmentumból” (explant), *in vitro* körülmények között képesek a sejtek migrálni, majd növekedni. Célravezetőbb eljárás a tumor (fragmentum) mechanikai darabolása vagy enzimátikus (tripszin, kollagenáz, hialuronidáz, stb.) emésztése, amely során különálló sejtekből álló, úgynevezett „single cell” kultúrát, vagy kisebb sejtcsoportokat kapunk. Egyszerűbb a helyzet, ha primer kultúrát nem szolid tumorból, hanem példának okáért peritoneális ascites-ből, csontvelőből, vagy pleurális folyékból indítunk, hiszen a sejtek eleve szuszpenzióban vannak, illetve minimális mechanikai behatással

kinyerhető. Bármilyen izolálási technikát is alkalmazunk, az annak eredményeként létrejövő, induló sejtpopuláció ugyanolyan heterogén, mint az a tumor, amiből származik. Az induló sejtpopuláció egyes sejttípusai nehezen vagy egyáltalán nem tapadnak a felülethez, illetve lassabban osztódnak, mint más típusok, ezért az idő előrehaladtával a primer kultúra összetétele megváltozik, hiszen a gyorsan növekvő sejtek „túlnövik” a nem, vagy lassan proliferálódó sejteket. A heterogenitás csökkenésének vannak előnyei és hátrányai is. Előny, ha a szelekcióval létrehozott homogén sejtpopuláció tisztán a vizsgálni kívánt sejteket tartalmazza. Ez egyben hátrány is, hiszen hiányzik az *in vivo*-ra jellemző heterogenitás, diverzitás, így a különböző sejtfeleségek közötti interakció sem modellezhető.

A primer kultúrából létrejövő sejtvonal fontos tulajdonsága, hogy képes az ismétlődő vizsgálatokhoz egy folyamatosan megújuló populációt biztosítani. A sejtvonal 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 (Masters, 2000). Ezért fontosnak tartottuk, hogy a daganatból nyert sejtek és a daganatból létrehozott sejtvonalak tumorképző és metastatikus potenciálját mindhárom általunk vizsgált tumor féleségnél (He/De, Ne/De, My1/De) ellenőrizzük. Ennek veszélyére Hayflick és Moorhead hívták fel a figyelmet, akik az 1960-as évek elejéről származó tanulmányikban leírták, hogy a diploid humán fibroblastok nem tarthatóak fenn korlátlan ideig (Hayflick és mtsai., 1961). Ez a megállapítás – néhány, főleg embrionális eredetű kivételtől eltekintve (pl.: egér 3T3-L1 fibroblast) - a legtöbb nem daganatos állati és humán sejtvonalakra is igaz, hiszen ezek egyik fő jellemvonása az elöregedés (Mather és mtsai., 1998). Ismert, hogy a legtöbb daganatos sejtvonal immortalizált. Annak érdekében, hogy a sejtvonal folyamatos legyen, a kezdeti kultúrát alacsony sejt számmal kell indítani, vagy a sejteknek transzformáción (kémiai úton vagy vírus által) kell átesniük. Leggyakrabban génmutációk és/vagy deléciók eredményezik a sejtvonal immortalizációját, ilyenek például a p53-at érintő mutációk (Pereira-Smith és mtsai., 1988; Sasaki és mtsai., 1994). A már létrehozott sejtvonalat karakterizálni kell és meggyőződni arról, hogy kontaminációtól mentes. Ahogy a létrejött sejtvonal egyre több passzálon megy keresztül, bizonyos tulajdonságait elveszítheti, mindazonáltal a gyorsan növekvő szubklónok megjelenése által nagyobb homogenitást mutathat. Modell rendszerként a sejtvonalaknak számos előnyük van a primer kultúrákhoz képest. A sejtvonalak legnagyobb előnye, hogy a kísérletek egy jól karakterizált rendszerrel bármikor megismételhetők. A folyamatos fenntartással egy viszonylag homogén sejtpopuláció jelenik meg, ellentétben a primer kultúrával, amely sokféle

stroma és tumor infiltráló sejtet (pl. lymphocyta) tartalmazhat, amelyek megnehezíthetik az adatok értelmezését.

A létrejött, immortalizált sejtvonalak fenntartására, tenyésztési körülményeire utaló irodalmak, könyvek száma szinte végtelen. Az esetek többségében a daganatos sejtvonalak standard sejttenyésztési körülmények között (5–10% CO<sub>2</sub>, 37 °C, klasszikus tápfolyadék és szérum) minden gond nélkül fenntarthatók. Kivételt képeznek többek között a leukaemiás sejtvonalak (pl.: B – és – T sejtvonalak), amelyek hypoxiás körülmények között (5% O<sub>2</sub>) jobban szaporodnak (Smith és mtsai., 1989), illetve tápfolyadékukat gyakran más anyagokkal (interleukinok, inzulin, L-leucin-metil-észter, stb.) is ki kell egészíteni. Ilyen körülmények között is a megkettőződési idejük 2-4 hét. Annak ellenére, hogy a malignus hematopoetikus sejtek proliferációja *in vivo* független a normál szabályozási mechanizmusoktól, *in vitro*, önmagukban csak rövid ideig tarthatók fenn, hiszen hiányoznak a proliferációjukhoz szükséges hematopoetikus növekedési faktorok.

A laboratóriumunkban létrehozott sejtvonalakat 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 sejtvonalból 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 (Tarin és mtsai., 1984). 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 (Liotta, 1986). 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.

A daganatos sejtek *in vivo* tumor formáló képességét, illetve metastatikus potenciálját azonban számos *in vitro* tényező befolyásolja. Ilyen a viabilitás, hiszen az *in vivo* vizsgálatokra szánt sejtek legalább 90%-a élő kell, hogy legyen a befecskendezés pillanatában. Megfigyelték (Welch, 1997), hogy egyes daganatos sejtek, amelyek sejtkultúrában adherensek, kísérleti állatba juttatva eltérő metastatikus potenciállal bírnak

attól függően, hogy beadás előtt milyen módszerrel (tripszin, tripszin-EDTA, EDTA, illetve 4 °C, 25 °C és ezek kombinációi) szüntették meg a tapadásukat a sejtenyésző edényhez.

A másik fontos *in vitro* tényező a sejtenyészetek konfluenciája. Welch és mtsai. (1994) leírták, hogy a 13762NF patkány adenocarcinoma sejtek eltérő számú metastasist hoznak létre a tüdőkből intravénás beadás után attól függően, hogy a felhasznált sejtek milyen konfluenciájú tenyészetből származtak. Azt tapasztalták, hogy minél konfluensebb a tenyészet, a belőle származó sejtek annál több metastasist hoznak létre a kísérleti állatban. A szerzők a B16 melanoma sejtek vizsgálatakor is ugyanilyen eredményt kaptak.

Annak érdekében, hogy növeljük a daganatos sejtek tumorformáló képességét és metastatikus potenciálját, a rákos sejteket nem önmagukban, hanem más típusú sejtekkel (normál fibroblastokkal (Camps és mtsai., 1990; Picard és mtsai., 1986), szingenikus embrionális sejtekkel (Fidler, 1973)), illetve Matrigel-el (Fridman és mtsai., 1990; Mehta és mtsai., 1993) együtt juttatják a kísérleti állatba. A fenti módszerek eredményeként keletkező tumorok vaszkularizáltabbak, és kisebb területen nekrotizálódnak.

*In vitro* és *in vivo* vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy a daganatos sejtek szignifikánsan több <sup>18</sup>FDG-t vesznek fel, mint a kontroll sejtek, szövetek, aminek egyik oka a GLUT-1 és GLUT-3 transzporterek fokozott kifejeződése volt. A daganatos sejtek anyagcseréje – így a szénhidrát-metabolizmusa – jelentősen eltér a normál sejtek anyagcsere jellemzőitől. Ezen alapszik az általunk használt eloszlási vizsgálat is.

A 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-dezoxi-D-glükóz-t (<sup>18</sup>FDG) először Gallagher és mtsai (1978) használták rágcsejtek glükóz anyagcseréjének vizsgálatánál. Két évvel később, 1980-ban kezdték vizsgálni a malignus elváltozások emelkedett glükóz felvételét kísérleti állatokon ezzel a módszerrel. Majd 1982-ben jelentek meg az első humán vonatkozású vizsgálati eredmények, amelyekben agy és májtumorok emelkedett <sup>18</sup>FDG felvételét írták le (Patronas és mtsai., 1982).

A mai napig a leggyakrabban használt PET radiofarmakon mind az *in vivo*, mind az *in vitro* tumordiagnosztikában a [<sup>18</sup>F] izotóppal jelölt dezoxi-glükóz. Ennek oka, hogy a különböző tumor sejtek *in vivo* és *in vitro* egyaránt, magas szénhidrát metabolizmusuk miatt sok <sup>18</sup>F-FDG-t vesznek fel (Mueckler, 1994, Murakami és mtsai., 1992; Lengyel és mtsai., 2002), ugyanis az analógot a sejtek transzportrendszerei nem tudják megkülönböztetni a glükóztól. A tumor sejtekben a nagymértékű glükóz és <sup>18</sup>FDG felvétel kapcsolatban van a citoszolban lévő glükóz transzporter mRNS megnövekedett szintjével, így a transzporterek fokozott expressziójával is. A glükóz felvételének két fő mechanizmusa ismert a tumoros sejtekben. Az egyik csoport képviselői az úgynevezett nátrium/glükóz kotranszporterek

(SGLT1, SGLT2), amelyek a koncentráció gradiens ellen dolgoznak főként a vese szöveteiben, a másik csoportba a passzív transzporttal működő facilitatív transzporterek tartoznak. Számos facilitatív glükóz transzporter molekula ismert (GLUT-1-7), amelyek mindegyike különböző szövethez kapcsolódik (Mueckler, 1994).

Legkifejezettebb a GLUT-1 és GLUT-3 transzporterek megnövekedett aktivitása a tumoros szövetekben (pl. primer mellrák, a nyak és fej különböző daganatai, stb.) a normál szövetekhez viszonyítva, ezért feltehetően ezek tehetők felelőssé a fokozott glükóz és  $^{18}\text{F}$ FDG felvételért a malignus daganatokban (Murakami és mtsai., 1992; Mellanen és mtsai., 1994). A cytochalasin B-vel, mint glükóz transzporter blokkolóval végzett vizsgálatok azonban rámutattak arra, hogy nem minden tumor mutatja a GLUT transzporterek overexpresszióját. Immunhisztokémiai vizsgálatok kiderítették azt is, hogy ezen transzporterek közül a GLUT-1 (over)expressziója szignifikánsan magasabb a tumorokban, különösen a szegényesen vaszkularizált (hipoxiás) területeken (Brown és mtsai., 1995). Az  $^{18}\text{F}$ FDG felvétel és a GLUT-1 expressziójának mértéke összefügg a tumor méretének növekedésével (Clavo és mtsai., 1995). Leírták, hogy a tumorok  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele emelkedett a nekrotikus terület mellett lévő sejtekben, aminek oka, hogy a hipoxia serkenti a GLUT-1 transzporterek membránban történő megjelenését (Rastogi és mtsai., 2007; Wahl, 1996). Gu J. 2006-ban leírta a colorectalis tumoroknál, hogy szintén a hipoxia miatt a tumor közepe mutat erősebb GLUT-1 expressziót, ami miatt e területek  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele magasabb.

Kihasnálva a tumorsejtek membránjában található transzporterek emelkedett mennyiségét a közelmúltban indultak azok az *in vitro* kísérletek, amelyekben monoklonális antitest „terápiaként” a transzporter ellen termeltetett antitesttel működésképtelenné teszik azt, így a daganatos sejt apoptózissal elpusztul (Rastogi és mtsai., 2007)

Számos enzimátikus elváltozást leírtak már a humán tumorokban, sejtekben összehasonlítva a normál sejtekkel, szövetekkel. Így például ismert, hogy számos daganatban jelentősen emelkedettek a glükóz foszforilációs mechanizmusok, illetve csökkent mértékű a glükóz-6-foszfát defoszforilációja (Fukunaga és mtsai., 1993). A glikolízis első enzime a hexokináz, ami a glükózt glükóz-6-foszfáttá alakítja. Az  $^{18}\text{F}$ FDG a sejtben belép a glikolízisbe, de a glukokináznak nem, csak a kisebb  $K_M$  értékű hexokináznak szubsztrátja, ami  $^{18}\text{F}$ FDG-6-P-ot képez belőle (Renner és mtsai., 1972). Ezzel magyarázható az a klinikai megfigyelés, hogy hiperglikémia esetén a glukokináz bekapcsolódásakor csökken a tumorok  $^{18}\text{F}$ FDG felvétele. Az a tény, hogy a hexokináz aktivitás a humán daganatos szövetekben jelentősen magasabb, mint a homológ normál szövetekben, alátámasztja azt az általános elképzelést, hogy a malignus tumorok fokozott enzimaktivitást mutatnak a glikolítikus útvonalat

szabályozó enzimek esetében (Bustamante és mtsai., 1981; Wahl, 1996). Leírták, hogy a normál és benignus máj szövetek  $^{18}\text{F}$ FDG akkumulációja szignifikánsan alacsonyabb mértékű, mint a malignus daganatokban, aminek oka a magas glükóz-6-foszfát szint (Gallagher és mtsai., 1978). Weber és mtsai. (1955, 1963) kísérleteikkel bizonyították, hogy a májban lejátszódó glikoneogenezis alacsony mértékű a karcinogenezis során és majdnem teljesen hiányzik a hepatocelluláris carcinomákban. Ezek a tulajdonságok eredményezik a PET felvételeken az  $^{18}\text{F}$ FDG emelkedett akkumulációját a hepatocelluláris carcinomákban és a metastatikus májtumorokban (Okazumi és mtsai., 1992; Nagata és mtsai., 1990), illetve *in vitro* kísérletekben a HepG2 hepatocelluláris carcinoma sejtvonalon (Ong és mtsai., 2008).

A glükózból hexokináz által létrehozott glükóz-6-foszfátot a glikolízis további enzimek, elsőként a glükóz-6-foszfát izomeráz, tovább metabolizálják. A glükóz-6-foszfát izomeráz enzimnek, konzervatív struktúrája és geometriája miatt, a  $^{18}\text{F}$ FDG-6-foszfát nem szubsztrátja, ezért a glikolízis további lépéseiben már nem vesz részt, és a sejtekben felhalmozódik. Emellett a glükóz-6-foszfát, amely képes volna visszaalakítani a keletkezett  $^{18}\text{F}$ FDG-6-P-ot  $\alpha$ -D-glükózzá, a hepatocytáktól eltekintve, igen alacsony koncentrációban vannak jelen a sejtben (Gallagher és mtsai., 1978). A  $^{18}\text{F}$ FDG-6-P a sejtekben csapdába esik (trapping mechanizmus), ezáltal koncentrációja megnövekszik (Pauwels és mtsai., 1998). A  $^{18}\text{F}$ FDG szöveti eloszlásának ismeretében különböző fiziológiás folyamatok (pl. neuronális aktivitás, szívizomműködés) és patológiás elváltozások (pl. gyulladások, tumorok) karakterizálhatók a glükóz felhasználás mértékén keresztül. A [ $^{18}\text{F}$ ] izotóp 109 perces felezési ideje lehetővé teszi az  $^{18}\text{F}$ FDG alkalmazását hosszú, akár több órás vizsgálatokban is. A szokásosan alkalmazott dózis 0,15 mCi (5,55 MBq)/kg testtömeg. Ez a nyomjelző anyag a glükóztól eltérően a vizelettel ürül, így az urogenitális rendszer vizsgálatára csak korlátozottan, illetve megfelelő előkészítést (diuretikum, hólyagkatéter) követően alkalmas (Lengyel és mtsai., 2002). *In vitro* a technika a tumoros sejtek glükózfelvétel-intenzitásának mérésében, különböző sejtfajták glükóz metabolizmusának összehasonlításában alkalmazható (Ong és mtsai., 2008). *In vivo* a klinikai gyakorlatban elterjedten használt PET (Positron Emission Tomography) vizsgálatok mellett a teljes test autoradiográfia is kiemelkedő fontosságú eljárás. *In vitro* és *in vivo*  $^{18}\text{F}$ FDG szereloszlási kísérleteink bizonyították ennek a PET radiofarmakonnak a dúsulását a tumorban és a parathymicalis nyirokcsomókban.

Kísérleteinkben bebizonyítottuk azt is, hogy a patkányok vesetokja alá implantált epiteliális, 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  $^{18}\text{F}$ FDG mind a vesetok alatt növekedő tumorokban, mind a parathymicalis mirigyekben jelentősen feldúsul, 3. a primer daganatok, illetve a metastasist hordozó parathymicalis nyirokcsomók a  $^{18}\text{F}$ FDG transzportját végző GLUT-1 és GLUT-3 transzportereket túltermelik, 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 (Zwaga és mtsai., 2008), tüdő (Nakazawa és mtsai., 2008) és emésztőrendszeri (Lee és mtsai., 2009) daganatok esetében.

Tumorok vesetok alá történő implantációjával elsősorban Bogden és mtsai. foglalkoztak (1979), akik a módszert kemoterápiás készítmények gyors tesztelésére kívánták felhasználni. A módszert patkányokban fejlesztettük tovább isogén tumorok növekedési dinamikájának követésére (Uzvölgyi és mtsai., 1990). A kísérletek végzése közben vettük észre a parathymicalis mirigyek elváltozásait, majd szövettani vizsgálatokkal tumorsejtek jelenlétét (Paragh és mtsai., 2005).

Érdekes, hogy a rágcsálók parathymicalis nyirokcsomóira viszonylag kevés figyelmet fordítottak, annak ellenére, hogy jelenlétüket már az 1960-as években leírták (Bonney és mtsai., 1967; Miller, 1963). Blau és Gaugas 1968-ban tust fecskendeztek be intravénásan, és ennek segítségével megállapították, hogy ezek a nyirokcsomók egérben a tímusz tokján belül, míg patkányban a tímusz tokján kívül, annak felszínén helyezkednek el, külön kötőszövetes tokkal és zsírszövettel körülvéve. A fordulat akkor következett be, amikor Steer és Foot (1987) megfigyelték, hogy a patkányok heveny gastroenterisekor a hasüregi exsudatum sejtszelei a parathymicalis mirigyekben lelhetők fel. Ez ráirányította a figyelmet azokra a régebbi kísérletekre, amelyeket részben festékekkel, részben röntgen-kontraszt anyagokkal végeztek, és amelyek megállapították, hogy a hasüregből érkező nyirokutak átfúrják a diafragmát, és három úton haladnak tovább. Ezek közül az egyik retrosternalisan az a. mammariak mellett halad, és a felső mediastinalis nyirokcsomókat érinti (Manville és mtsai., 1932; Zhdanov, 1952; Olin és mtsai., 1964). Tilney részletesen feltérképezte a patkányok nyirokrendszerét, és megállapította, hogy a parathymicalis nyirokcsomókhöz a hasüregből, a májból, a pericardiumból és a tímusból érkezik nyirok, és a mediastinalis nyiroktörzs felé tart. (Tilney, 1971). A felsorolt adatok alapján valószínűsíthető, hogy a vesetok alatt növekedő tumorok

metastatizáló sejtjei előbb a diafragma nyirokereibe jutnak, majd főleg a parasternalis nyirokereken keresztül érintik a parathymicalis nyirokcsomókat. Feltételezzük, hogy a vesetok és a parathymicalis nyirokcsomók olyan komplexust alkotnak, amelyet a tuberculosus fertőzés esetén a góc és a mediastinális nyirokcsomók között Ranke feltételezett (Ranke-f. komplexus), és amely annak idején sokat segített a fertőzés pathomechanizmusának megértésében. Ennek analógiájára igyekeztünk kidolgozni egy viszonylag izolált rendszert a metastasis-képződés tanulmányozására, ezzel is bővítve a rendelkezésre álló módszerek körét. Az általunk létrehozott limfogén metastasis modell azért is jelentős, mert az elmúlt 100 évben főként a hematogén áttétképzés pato- és molekuláris mechanizmusát kutatták és csak újabban kezdett kialakulni a limfogén áttétképzés elmélete, amely molekuláris szinten még kevésbé ismert (Kopper, Tímár. 2007).

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 (erre utal Blau és Gaugas kísérlete, 1968), és vitatott, de nem kizárt, hogy a vesetok és a veseparenchyma nyirokcapillárisai közt anastomosis van, ami némiképp megváltoztatja a metastasisok lokalizációját (Rusznay és mtsai., 1980). 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 pedig lehetőséget ad az elsődleges, másodlagos és tovább; 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- $\beta$  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 (Kopper, Tímár., 2007), 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 (Kumar és mtsai., 2009).

A Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszékén Prof. Dr. Bánfalvi Gáspár és a vezetése alatt álló munkacsoport jelentős előrehaladást ért el a sejtek kromatinstruktúrájának és a kromatinkondenzációs folyamatainak kutatásában. A munkacsoport sok éves tapasztalatát, illetve az általuk kifejlesztett módszereket felhasználva vizsgáltuk a kémiai indukált hepatocelluláris carcinoma (He/De) sejtek kromatinkondenzációs folyamatait.

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 dekondezált fátýolszerű 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).

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 (Michalopoulos és mtsai., 1997). Különböző növekedési faktorok, citokinek (hepatocyta növekedési faktor, fibroblaszt növekedési faktor, tumor nekrosis faktor- $\alpha$ , IL-6, insulin,) befolyásolhatják a megmaradt máj regenerálódását, differenciálódását. Megfigyelték, hogy jelentős mennyiségű SCF (Stem Cell Factor) található az egészséges májszövetben. Sérülés vagy részleges hepatektómia során ez a mennyiség a sérülés mértékének növekedésével csökken. Regenerálódáskor a SCF mennyisége a proliferáló hepatocyták mennyiségének növekedésével arányosan emelkedik (Simpson és mtsai., 2003). Elmondhatjuk, hogy a nyugvó hepatocytákhoz viszonyítva mind a regenerálódó, mind a hepatocelluláris carcinoma sejtek metabolikus aktivitása megnő. A regenerálódó sejteknél inkább a makromolekulák bioszintézisének (megemelkedett DNS, RNS és fehérjeszintézis) folyamatai kerülnek előtérbe, míg a daganatos sejteknél a katabolizmus is jelentős szerepet kap. Regenerálódó sejtekben a DNS szintézis aktiválódásával emelkedett topoizomeráz I enzim aktivitást és szintet várnánk. Az eukaryota DNS szupertekercselődéséért a DNS topoizomeráz I enzim a

felelős. Ezzel szemben Tournier és társai nem tapasztaltak jelentős változást a topoizomeráz I aktivitásában és szintjében (Tournier és mtsai., 1992). A fluoreszcensen festett regenerálódó májsejteken mi sem láttunk erőteljes szupertekercselődést, ami a topoizomeráz megemelkedett működésére utalna. A kromatin kondenzálás jellegzetes struktúrái figyelhetők meg. A topoizomeráz I egyrészt megvédi a sejteket a DNS károsodástól, másrészt illegitim rekombinációhoz vezethet, növelve a genom instabilitását. Ezért a topoizomeráz I szintje sejten belül viszonylag alacsony és állandó. Ez a helyzet a legtöbb nem transzformált sejttel, ahol a topoizomeráz I enzim száma elérheti a sejtenkénti egymilliót. Ezzel szemben tumoros sejteknél a topoizomeráz I fehérje szintje és aktivitása akár két nagyságrenddel is magasabb lehet (Bronstein és mtsai., 1996). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a megemelkedett topoizomeráz szint miatt jelentős mértékű topológiai változások mehetnek végbe a kromatin szerkezetekben. Ezeket a változásokat tumoros sejtek kromatin szerkezetének erőteljes szupertekercselődésében figyeltük meg. Eredményeinket alátámasztja az is, hogy a tumorelleses terápiában 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) sejttenyészetből sejtvonalat indítottunk. A létrehozott sejtvonalak fagyasztva tárolhatók, illetve reimplantálhatóak kísérleti állatokba. A My1/De jelzésű myelomonoblastos sejtek, ha korlátozott ideig is, de sejttenyészetben 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. Szövettani, GLUT transzporterekkel végzett immuncitokémiai, immunhisztokémiai, <sup>18</sup>FDG-vel végzett autoradiographiás és szerv-eloszlásos vizsgálatok ugyancsak azt bizonyították, hogy a parathymicalis nyirokcsomók a vesetok alatt növekedő tumorok „sentinel” nyirokcsomói. A nyirokcsomók transzplantációjával kimutattuk, hogy a metastasisok 10<sup>6</sup> daganatsejt jelenléte esetén a 3-6.-ik 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 kémiailag indukált hepatocarcinoma sejtek 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 dekondezált fátyolszerű kromatin, a regenerálódó sejtek sejtmagjaiban változatos szerkezetű kromatin struktúrák figyelhetők meg. A daganatos sejtek kromatinjára a nagyfokú szupertekercseltség jellemző.

## 7. Summary

We have established new cell lines from N-nitrosodimethylamine induced hepatocellular carcinoma (He/De) and mesoblastic nephroma (Ne/De). The hepatocarcinoma (HeDe) and nephroblastoma (NeDe) cell lines and the tumors have been characterized with respect to their expression of GLUT-1 and GLUT-3 glucose transporters. We have examined the relationship between  $^{18}\text{F}$ FDG uptake and the expression of facilitative glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3). The higher  $^{18}\text{F}$ FDG uptake of tumor cells correlated with the GLUT-1 or GLUT-3 expression. Tumor cell lines expressed higher relative levels of GLUT transporters than the control cells. Significant differences were observed among the expressions of the tumors and the tumor cell lines.

Our experiments have shown that chemically induced hepatocellular carcinoma (He/De), mesoblastic nephroma (Ne/De) and myelomonocytic leukemia (My1/De) tumor cells implanted under the capsule of the kidney generate metastases in the parathymic lymph nodes. This was proved by the subcapsular implantation of clooidal ink particles, histopathology, immunohistochemistry, whole-body autoradiography and tissue distribution experiments of  $^{18}\text{F}$ FDG uptake. We regard the renal capsule–parathymic lymph node complex as an isolated system which provides an experimental approach to study angiogenesis and the potential role of parathymic lymph nodes in malignant transformation. Our system contributes to the understanding of: (a) the metastatic potential of rodent tumors; (b) the connection between the number of primary tumor cells and the temporal aspects of metastatic development. Finally our method is suitable for the experimental demonstration of chemical prevention of metastases formation.

We have found that the basic differences of potential diagnostic importance among chromatin structures of resting (Go), regenerating and hepatocellular tumor cells: 1. Nuclei of resting cells contain decondensed chromatin referred to as chromatin veil. Most of the open nuclei maintained their round shape or were only slightly elongated. 2. Nuclei of regenerating cells opened up easily and showed a wide variety of chromatin structures, typical to logarithmically growing cells with most of the cells being in S phase. 3. Supercoiling was evident from the early stage of chromatin condensation referred to as veil-like chromatin in nuclei of hepatoma cells. The tendency of intensive supercoiling in nuclei of tumor cells could be traced throughout the cell cycle.

## **8. Irodalomjegyzék**

### ***8.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke***

Alam BS, Saporoschet IB and Epstein SS. (1971a) Formation of N-nitroso-piperidine from piperidine and sodium nitrite in the stomach and the isolated intestinal loop of the rat. *Nature (Lond.)*, 232, 116.

Alam BS, Saporoschetz IB and Epstein SS. (1971b) Synthesis of nitroso-piperidine from nitrate and piperidine in the gastro-intestinal tract of the rat. *Nature (Lond.)*, 232, 199.

Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A and Muschel RJ. (2000) Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med*, 6, 100-102.

Anasimov VN. (1987) *Carcinogenesis and aging Volume I*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Andervont HB. (1934) U.S. Public Health Service. *Public Health Rept*, 49, 620.

Argus MF and Hoch-Ligeti C. (1961) Comparative study of the carcinogenic activity of nitrosamines. *J nat Cancer Inst*, 27, 695.

Asahina S, Friedman MA, Arnold E, Millar GN, Mishkin M, Bishop Y and Epstein SS. (1971) Acute synergistic toxicity and hepatic necrosis following oral administration of sodium nitrite and secondary amines to mice. *Cancer Res*, 31, 1201.

Babó I, Bocsi J, Jeney A. (1999) The site-dependent growth characteristics of a human xenotransplanted basaloid squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 125, 35-41.

Baló J. (1962) *Az általános kórbonctan tankönyve*. Medicina, Budapest, 237-238.

Banfalvi G, Sooki-Toth A, Sarkar N, Csuzi S, Antoni F. (1984) Nascent DNA synthesized reversibly permeable cells of mouse thymocytes. *Eur J Biochem*, 139, 553-559

Baumgart J and Zippel D. (1991) Age-dependent experimental tumor dissemination of murine melanoma B16. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 39, 489-494.

Berlin O, Samid D, Donthineni-Rao R, Akeson W, Amiel D and Woods VL (1993) Development of a novel spontaneous metastasis model of human osteosarcoma transplanted orthotopically into bone of athymic nude mice. *Cancer Res*, 53, 4890-4895.

Bibby MC. (2004) Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer*, 40, 852-857.

Blau JN, Gaugas JM. (1968) Parathymic lymph nodes in rats and mice. *Immunology*, 14, 763-765.

Bogden AE, Haskell PM, Le Page DL, Kelton DE, Cobb WR, Esber HJ. (1979) Growth of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice. *Exp Cell Biol*, 47, 281-293.

Bogenmann E. (1996) A metastatic neuroblastoma model in SCID mice. *Int J Cancer*, 67, 379-385.

Bonney WM, Battenberg JD. (1967) Transthoracic thymectomy in rats. *Transplantation*, 5, 544-546.

Borland R, Hard GC. (1974) Early appearance of "transformed" cells from the kidneys of rats treated with a "single" carcinogenic dose of dimethylnitrosamine (DMN) detected by culture in vitro. *Eur J Cancer*, 10, 177-184.

Bronstein IB, Vorobyev S, Timofeev A, Jolles CJ, Alder SL, Holden JA. (1996) Elevations of DNA topoisomerase I catalytic activity and immunoprotein in human malignancies. *Oncol Res* 8, 17-25.

Brown RS, Leung JY, Fisher S, Frey KA, Ethier SP, Wahl RL. (1995) Autoradiographic assessment of the intratumoral distribution of [<sup>3</sup>H]FDG in breast carcinoma. II. Role of glucose transporter-1 (Glut-1) in FDG uptake. *J Nuc A Med*, 36, 1854-1886.

Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL. (1981) Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem*, 256, 8699-8704.

Camps JL, Chang S-M, Hsu TC. (1990) Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 75-79.

Cardiff RD, Kenney N. (2007) Mouse mammary tumor biology: a short history. *Adv Cancer Res*, 98, 53-116.

Clavo AC, Brown RS and Wahl RL. (1995) Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increased by hypoxia. *J Nucl Med*, 36, 1625-1632.

Dezso B, Rady P, Mórocz I, Varga E, Gomba S, Poulsen K, Kertai P. (1990) Morphological and immunohistochemical characteristics of dimethylnitrosamine-induced malignant mesenchymal renal tumor in F344 rats. *J Cancer Res Clin Oncol*, 116, 372-378.

Drabkin DL. (1950) Cytochrome c metabolism and liver regeneration. influence of adrenalectomy. *J Biol Chem*, 182, 351-358.

Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S and Schmahl D. (1967) Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-ratten. *Z Krebsforsch*, 69, 103.

Du Plessis LS, Nunn JR. (1969) Carcinogen in a Transkeian Bantu Food Additive. *Nature*, Volume 222, Issue 5199, 1198-1199.

Elmenhorst H and Grimmer G. (1968) Polycyclische Kohlenwasserstoffe aus Zigarettenrauchenkondensat. Eine Methode zur Fraktionierung grosser Mengen für Tierversuche. *Z Krebsforsch*, 71, 66.

Ender F, Havre G, Helgebostad A, Koppang N, Madsen R, Ceh L. (1964) Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Die Naturwissenschaften*, Volume 51, Issue 24, 637-638.

Fazio T, White RH, Howard JW. (1971) Analysis of nitrite- and-or nitrate-processed meats for N-nitrosodimethylamine. *J Assoc Off Anal Chem*, 54, 1157-1159.

Fidler IJ and Kripke ML. (1977a) Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197, 893-895.

Fidler IJ and Nicolson GL. (1977b) Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. *J Natl Cancer Inst*, 58, 1867-1872.

Fidler IJ. (1973) The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability of experimental metastasis. *Eur J Cancer*, 9, 223-227.

Fidler IJ. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 453-458.

Freund HA. (1937) Clinical manifestation and studies in parenchymatous hepatitis. *Ann Intern Med*, 10, 1144.

Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar AF and Mulshine JL. (1990) Reconstituted basement membrane (Matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 87, 6698-6702.

Fukunaga T, Enomoto K, Okazumi S, Isono K. (1993) Analysis of glucose metabolism in patients with esophageal cancer by FDG-PET: estimation of hexokinase activity in the tumor and prediction of prognosis: clinical PET in oncology. *Proceedings of 2nd Intl Symposium on PET in Oncology*. Singapore: World Scientific, 87-90.

Gallagher BM, Fowler JS, Gutterson NI, MacGregor RR, Wan CN, Wolf AP. (1978) Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [<sup>18</sup>F]-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J Nucl Med*, 19, 1154-1161.

Garofalo A, Chirivi RG, Scanziani E, Mayo JG, Vecchi A and Giavazzi R. (1993) Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/scid and severe combined immunodeficient mice. *Invasion Metastasis*, 13, 82-91.

Gey GO, Coffman WD and Kubicek MT. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*, 12, 364-365.

Gonzalez FJ and Kimura S. (2001) Understanding the role of xenobiotic- metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutat Res*, 477, 79-87.

Gorden JR. and Quigley JP. (1986) Early spontaneous metastasis in the human epidermoid carcinoma Hep3/chick embryo model: contribution of incidental colonization. *Int J Cancer*, 38, 437-444.

Grimmer G and Hildebrandt A. (1965) Kohlenwasserstoffe in der Umgebung des Menschen. III. Der Gehalt polycyclischer Kohlenwasserstoffe in verschiedenen Gemüsesorten und Salaten. *Dtsch Lebensmitt-Rdsch*, 61, 272.

Grimmer G. (1968) Cancerogene Kohlenwasserstoffe in der Umgebung des Menschen. *Dtsch Apoth Ztg*, 108, 529.

Gu J, Yamamoto H, Fukunaga H, Danno K, Takemasa I, Ikeda M, Tatsumi M, Sekimoto M, Hatazawa J, Nishimura T, Monden M. (2006) Correlation of GLUT-1 Overexpression, Tumor Size, and Depth of Invasion with 18F-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose Uptake by Positron Emission Tomography in Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci*, 51, 2198-2205.

Hamacher K, Coenen HH, Stöcklin G. (1986) Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med*, 27, 235-238.

Hamm R and Toth L. (1970) Cancerogene Kohlenwasserstoffe in geraucherten Fleischerzeugnissen. *Med u Ehnahr*, 11, 25.

Hard GC, Borland R. (1975) In vitro culture of cells isolate from dimethylnitrosamine-induced renal mesenchymal tumors of the rat. I. Qualitative morphology. *J Natl Cancer Inst*, 54, 1085-1095.

Hard GC, Ogiu T. (1984) Null effects of vitamin A analogs on the dimethylnitrosamine kidney tumor model. *Carcinogenesis*, 5, 665-669.

Hard GC. (1984) High frequency, single-dose model of renal adenoma/carcinoma induction using dimethylnitrosamine in CrI:(W)BR rats. *Carcinogenesis*, 5, 1047-1050.

Hard GC. (1985) Differential renal tumor response to N-ethylnitrosourea and dimethylnitrosamine in the Nb rat: basis for a new rodent model of nephroblastoma. *Carcinogenesis*, 61, 551-1558.

Hawksworth GH and Hill MJ. (1971a) The formation of nitrosamines by human intestinal bacteria. *Biochem J*, 122, 28.

Hawksworth GH and Hill MJ. (1971b) Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines. *Brit J Cancer*, 25, 520.

Hayflick L and Moorhead PS. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.

Heath DF. (1962) The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamines in rats. *Biochem J*, 85, 72.

Hettche HO. (1971) Plant waxes as collectors of polycyclic aromatics in the air of residential areas. *Staub (Eng Transl)*, 3, 34.

Higgins GM, Anderson RM. (1931) Experimental pathology of liver: restoration of liver in white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 12, 186-202.

Hill RP. (1987) Metastasis. *In: The Basic Science of Oncology*, Tannock IF and Richard HP (ed.) New York, Pergamon Press.

Hoffmann D and Wynder EL. (1962a) A study of air pollution carcinogenesis. II. The isolation and identification of polynuclear aromatic hydrocarbons from gasoline engine exhaust condensate. *Cancer*, 15, 93.

Hoffmann D and Wynder EL. (1962b) Analytical and biological studies on gasoline engine exhaust. Nat Cancer Inst Monogr, 9, 91.

Hoffmann D and Wynder EL. (1963) Studies on gasoline engine exhaust. J air Pollut Control Ass, 13, 322.

Howard JW, Fazio T, Watts JO. (1970) Extraction and gas chromatographic determination of N-nitrosodimethylamine in smoked fish. J Ass of Anal Chem, 53, 269.

Huggins CB, Grand LG, Brillantes FP. (1961a) Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. Nature, 189, 204-207.

Huggins CB, Morii S, Grand LC. (1961b) Mammary cancer induced by a single dose of polynuclear hydrocarbons: routes of administration. Ann Surg Suppl, 154, 315-318.

Huggins CB, Sugiyama T. (1966) Induction of leukemia in rat by pulse doses of 7,12 dimethylbenz[a]anthracene. Proc Natl Acad Sci USA, 55, 74-81.

Huggins CB, Yang NC. (1962) Induction and extinction of mammary cancer. Science, 137, 257-262.

Huggins CB. (1979) Experimental leukemia and mammary cancer. Chicago: University of Chicago Press.

Ianysheva NIa, Balenko NV. (1966) On experimental lung cancer caused by the introduction of various doses of 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene. Gig Sanit, 31, 12-15.

Kangas L, Perila M. (1985) Clinical praxis and laboratory procedures in subrenal capsule assay (SRCA). Ann Chir Et Gyn, 74, 7-11.

Kertai P. (1973) Carcinogén anyagok a környezetben. Egészségtudomány 17, 297-309.

Kertai P. Kémiai rákkeltők. In: Az onkológia alapjai (szerk.: Ádány R, Kásler M, Ember I, Kopper L, Thurzó L) Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest, 1997. II. 12-23.

Khanna C, Prehn J, Yeung C, Caylor J, Tsokos M and Helman L. (2000) An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clin Exp Metastasis*, 18, 261-271.

Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, Yeung C, Gorlick R, Hewitt SM and Helman LJ. (2004) The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med*, 10, 182-186.

Khazaie K, Schirmacher V and Lichtner RB. (1993) EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 12, 255-274.

Klubes P and Jondorf WR. (1971) Diethylnitrosamine formation from sodium nitrite and dimethylamine by bacterial flora of rat intestine. *Res Commun Chem Path Pharmacol*, 2, 24.

Kolesnichenko TS and Golub NI. (1975) Effect of N-nitroso compounds and aminoazo compound on organ cultures of human embryonal kidney. *Voprosy Onkologii*, 21, 76-84.

Kopper László, Tímár József. (2007) *Molekuláris onkológia*. Semmelweis Kiadó, Budapest.

Kozhevnikova EP and Beliaeva NM. (1976) Carbohydrate metabolism in the kidneys of rats with dimethylnitrosamine-induced tumors. *Voprosy Oncologii*, 22, 56-60.

Kozlowski JM, Hart IR, Fidler IJ and Hanna N. (1984) A human melanoma line heterogeneous with respect to metastatic capacity in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 72, 913-917.

Kurita Y, Sugiyama T, Nishizuka Y. (1968) Cytogenetic studies on rat leukemia induced by pulse doses of 7,12- dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res*, 28, 1738-1752.

Lee SE, Lee JH, Ryu KW, Cho SJ, Lee JY, Kim CG, Choi IJ, Kook MC, Nam BH, Park SR, Lee JS, Kim YW. (2009) Sentinel node mapping and skip metastases in patients with early gastric cancer. *Ann Surg Oncol*, 3, 603-608.

Lengyel Zs, Fekésházy A, Kálvin B, Galuska L, Szakáll Sz, (2002) Standard PET-vizsgálati protokollok. 143/21, Suppl, 3, 1243-1248.

Lijinsky W and Epstein SS. (1970) Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature (Lond.)*, 225, 21.

Lijinsky W, Domsky I, Mason G, Ramahi HY and Safavi T. (1963) The chromatographic determination of trace amounts of polynuclear hydrocarbons in petrolatum, mineral oil and coal-tar. *Analyt Chem*, 35, 952.

Liotta LA. (1986) Tumor invasion and metastasis — role of the extracellular matrix. *Cancer Res*, 46, 1-7.

Little CC. (1941) The genetics of tumor transplantation In: *Biology of the laboratory mouse*. GD Snell, Ed, Blakiston, 279-309.

Liu XL, Li LJ, Chen Z. (2002) Isolation and primary culture of rat hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 1, 77-79.

Magee PN and Bames JM. (1956) The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Brit J Cancer*, 10, 114.

Magee PN and Bames JM. (1959) The experimental production of tumours in the rat by dimethylnitrosamine (N-nitroso-dimethylamine). *Acta Un int Cancr*, 15, 187.

Magee PN and Bames JM. (1962) Induction of kidney tumours in the rat with dimethylnitrosamine (N-nitroso-dimethylamine). *J Path Bact*, 84, 19.

Magee PN. (1968) Occurrence of alkylating substances. In: *Alkylierend wirkende Verbindungen*, Hamburg, 79.

Magee PN. and Bames JM. (1967) Carcinogenic nitroso compounds. *Advanc Cancer Res*, 10, 163.

Mankoff DA, Bellon JR. (2001) Positron-emission tomography imaging of cancer: glucose metabolism and beyond. *Semin Radiat Oncol*, 11, 16-27.

Manville LJ, Ané JN. (1932) A Roentgen-ray study in absorption of thorium dioxide from peritoneal cavity of albino rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 30, 28-30.

Masters JR. (2000) Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev*, 1, 233-236.

Mather JP, Barnes DW. (1998) American Society for Cell Biology. *Animal cell culture methods*. San Diego: Academic Press.

Mehta RR, Graves JM, Hart GD, Shilkaitis A and Das Gupta TK. (1993) Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice. *Breast Cancer Res Treat*, 25, 65–71.

Mellanen P, Minn H, Grenman R, Harkonen P. (1994) Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int J Cancer*, 56, 622-629.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. (1997) Liver regeneration. *Science*, 276, 60-66.

Mikecz P, Tóth G, Horváth G, Lehel S, Kovács Z, Pribóczki E, Boros I, Miklovicz T, Márián T. (2002) Synthesis of radiopharmaceuticals for PET investigations *Orv Hetil*, 143, 1240-1242. Review. Hungarian.

Miller JF. (1963) Role of the thymus in immunity, *Brit Med J*, 2, 459-464.

Mizrahi IJ and Emmelot P. (1962) The effect of cysteine on the metabolic changes produced by two carcinogenic N-nitrosodialkyl nitrosamines in rat liver. *Cancer Res*, 22, 339.

Montesano R and Magee PN. (1970) Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices in vitro. *Nature (Lond.)*, 228, 173.

Murakami T, Nishiyama T, Shirotani T. (1992) Type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *J Biol Chem*, 267, 9300-9306.

Muraoka RS, Dumont N, Ritter CA, Dugger TC, Brantley DM, Chen J, Easterly E, Roebuck LR, Ryan S, Gotwals PJ, Koteliansky V and Arteaga CL. (2002) Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *J Clin Invest*, 109, 1551-1559.

Murphy GP, Mirand EA, Johnston GS, Schmidt JD and Scott WW. (1966) Renal tumors induced by a single dose of dimethylnitrosamine: morphologic, functional, enzymatic and hormonal characterization. *Invest Urol*, 4, 39.

Nagamachi Y, Tani M, Shimizu K, Tsuda H, Niitsu Y and Yokota J. (1998) Orthotopic growth and metastasis of human non-small cell lung carcinoma cell injected into the pleural cavity of nude mice. *Cancer Lett*, 127, 203-209.

Nagata Y, Yamamoto K, Hiraoka M, et al. (1990) Monitoring liver therapy with (F18)FDG positron emission tomography. *J Comput Assist Tomogr*, 14, 370-374.

Nagy G, Pinter G, Szepessy E and Banfalvi G. (2001) Three dimensional visualization of chromatin structures. *Acta Biol Debrecina*, 23, 77-79.

Naito S, Von Eschenbach AC and Fidler IJ. (1987) Different growth pattern and biologic behavior of human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 78, 377-385.

Naito S, Von Eschenbach AC, Giavazzi R and Fidler IJ. (1986) Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *Cancer Res*, 46, 4109-4115.

Nakazawa K, Satoh H, Ohtsuka M, Sekizawa K. (2008) Skip metastasis to abdominal lymph nodes from lung adenocarcinoma. *Onkologie*, 12, 708.

Németh K. Környezeti kémiai karcinogenezis. In: *Környezet-egészségtan* (szerk.: Ember I, Dombi Zs, Prantner I) Dialóg Campus Kiadó, 2006 145-154.

Okazumi S, Isono K, Enomoto K, et al. (1992) Evaluation of liver tumors using fluorine-18-fluorodeoxy-glucose PET: characterization of tumor and assessment of effect of treatment. *J Nucl Med*, 33, 333-339.

Oldham JW, Casciano DA and Farr JA. (1979) The isolation and primary culture of viable, nonproliferating rat hepatocytes. *Methods in Cell Science* Volume 5, 2, 1047-1050.

Olin T, Saldeen T. (1964) The lymphatic pathways from the peritoneal cavity: A lymphangiographic study in the rat. *Cancer Res*, 24, 1700-1711.

Ong LC, Jin Y, Song IC, Yu S, Zhang K, Chow PK. (2008) 2-[<sup>18</sup>F]-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake in human tumor cells is related to the expression of GLUT-1 and hexokinase II. *Acta Radiol*, 49, 1145-1153.

Paragh G, Fóris G, Paragh G Jr, Seres I, Karányi Z, Fülöp P, Balogh Z, Kosztáczky B, Teichmann F, Kertai P. (2005) Different anticancer effects of fluvastatin on primary hepatocellular tumors and metastasis in rats. *Cancer Lett*, 222, 17-22.

Paragh G, Kertai P, Kovacs P, Paragh G Jr, Fulop P, Foris G. (2003) HMGCoA reductase inhibitor Fluvastatin arrests the development of implanted hepatocarcinoma in rats. *Anticancer Res*, 23, 3949-3854.

Patronas NJ, Di Chiro G, Brooks RA, et al. (1982) Work in progress: [<sup>18</sup>F] fluorodeoxyglucose and positron emission tomography in the evaluation of radiation necrosis of the brain. *Radiology*, 144, 885-889.

Pauwels EKJ, McCready VR, Stoot JHMB, van Deurzen DFP. (1998) The mechanism of accumulation of tumour-localising radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med*, 25, 277-305.

Pereira-Smith OM and Smith JR. (1988) Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 6042-6046.

Picard O, Rolland Y and Poupon MF. (1986) Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice: implications for implantation of metastasis. *Cancer Res*, 46, 3290-3294.

Price JE, Polyzos A, Zhang RD and Daniels LM. (1990) Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*, 50, 717-21.

Rastogi S, Banerjee S, Chellappan S, Simon GR. (2007) Glut-1 antibodies induce growth arrest and apoptosis in human cancer cell lines. *Cancer Lett*, 18, 257, 244-251.

Renner ED, Plagemann PGW and Bernlohr RW. (1972) Permeation of glucose by simple and facilitated diffusion by Novicoff rat hepatoma cells in suspension culture and its relationship to glucose metabolism. *J Biol Chem*, 265, 6481-6488.

Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. (2006) Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med*, 4, 145-149.

Rich MA. (1968) *Experimental Leukemia*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

Riopelle JL and Jasmin G. (1969) Nature, classification and nomenclature of kidney tumors induced in the rat by dimethylnitrosamine. *J nat Cancer Inst*, 42, 643.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. (2009) *ROBBINS- A patológia alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.*

Roussy G, Guerin M and Guerin P. (1942) Activite comparee des trois pr.incipaux hydrocarbures synthetiques canceri-genes. *Bull Cancer*, 30, 66.

Rusznayak I, Toldi M, Szabó G. (1980) *Lymphatics and lymph circulation, physiology and pathology*, London: Pergamon Press Ltd.

Rygaard J, Povisen CO. (1969) Heterotransplantation of a human malignant tumor to „nude mice”. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 77A, 758-760.

Sasaki M, Honda T, Yamada H, Wake N, Barrett JC, Oshimura M. (1994) Evidence for multiple pathways to cellular senescence. *Cancer Res*, 54, 6090-6093.

Schackert H and Fidler IJ. (1989) Development of an animal model to study the biology of recurrent colorectal cancer originating from mesenteric lymph system metastases. *Intl J Cancer*, 44, 177-181.

Schmidt-Hansen B, Klingelhofer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen S, Kruse C, Hansen T, Ambartsumian N, Lukanidin E and Grigorian M. (2004) Functional significance of metastasis-inducing S100A4 (Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem*, 279, 24498-24504.

Sharkey FE and Fogh J. (1984) Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev*, 3, 341-360.

Simoneit BR and Burlingame AL. (1971) Organic analyses of selected areas of surveyor III recovered on the Apollo 12 mission. *Nature* 234, 210.

Simpson K, Hogaboam CM, Kunkel SL, Harrison DJ, Bone-Larson C, Lukacs NW. (2003) Stem cell factor attenuates liver damage in a murine model of acetaminophen-induced hepatic injury. *Lab Invest*, 83, 199-206.

Smith SD, McFall P, Morgan R, Link M, Hecht F, Cleary M and Sklar J. (1989) Long-term growth of malignant thymocytes in vitro. *Blood*, 73, 2182-2187.

Steer HW, Foot RA. (1987) Changes in the medulla of the parathyroid lymph nodes of the rat during acute gastro-intestinal inflammation. *J Anat*, 152, 23-26.

Sugiyama T, Kurita Y, Nishizuka Y. (1967) Chromosome abnormality in rat leukemia induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Science*, 158, 1058-1059.

Sugiyama T, Osaka M, Koami K, Maeda S, Ueda N. (2002) 7,12-DMBA-induced rat leukemia: a review with insights into future research. *Leuk Res*, 26, 1053-1068. Review.

Sýkora I, Tretiník P, Vortel V. (1985) Postnatal carcinogenic study of dimethylnitrosamine in rats. *Neoplasma*, 32, 63-72.

Takizawa Y, Saida T, Tokuda Y, Dohi S, Wang YL, Urano K, Hioki K and Ueyama Y. (1997) New immunodeficient (nude-scid, beige-scid) mice as excellent recipients of human skin grafts containing intraepidermal neoplasms. *Arch Dermatol Res*, 289, 213-218.

Taniguchi N. (1992) Clinical significances of superoxide dismutases: changes in aging, diabetes, ischemia and cancer. *Adv Clin Chem*, 29, 1-59.

Tarin DT, Price JE, Kettlewell MGW, Souter RG, Vass ACR and Crossley B. (1984) Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res*, 44, 3584-3592.

Terracini B, and Magee PN. (1964) Renal tumours in rats following injection of dimethylnitrosamine at birth. *Nature (Lond.)*, 202, 502.

Terracini B, Palestro G, Rua S and Trevisio A. (1969) Studio sul ruolo dell'iperplasia compensatoria nella cancerogenesi renale da dimetilnitro-samina nel ratto. *Tumori*, 55, 357.

Tilney NL. (1971) Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat*, 109, 369-383.

Tournier MF, Sobczak J, de Nechaud B, Duguet M. (1992) Comparison of biochemical properties of DNA-topoisomerase I from normal and regenerating liver. *Eur J Biochem*, 210, 359-364.

Trencsenyi G, Kertai P, Somogyi C, Nagy G, Dombradi Z, Gacsi M, Banfalvi G. (2007) Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat hepatocarcinoma cells. *DNA Cell Biol*, 26, 649-655.

Tsutsui H. (1918) Ueber das künstlich erzeugte Cancroid bei der Maus. *Gann*, 12, 17-21.

Tueni EA, Dumont P, Jacobovitz D. (1987) Subrenal capsule assay for fresh human tumors in immunocompetent mice; an inappropriate technique for non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23, 1163-1167.

- Turusov VS, Raïkhlin NT, Timoshenko IV. (1980) Experimental models of embryonic nephroblastomas (Wilms' tumor). *Arkhir Patologii*, 42, 44-51.
- Uzvolgyi E, Katona A, Kertai P. (1990) Tumor cell implantation with the use of Gelaspon gelatin sponge disc. *Cancer Lett*, 51, 1-5.
- Wahl LR. (1996) Targeting glucose transporters for tumor imaging. "Sweet" idea, "Sour" result. *J Nucl Med*, 37, 1038-1041.
- Weber G, Cantero A. (1955) Glucose-6-phosphatase activity in normal, precancerous, and neoplastic tissues. *Cancer Res*, 15, 105-108.
- Weber G, Morris HP. (1963) Comparative biochemistry of hepatomas III. Carbohydrate enzymes in liver tumors of different growth rates. *Cancer Res*, 23, 987-994.
- Welch DR, Aeed PA, Earhart RH and McClure SA. (1994) Evidence for paracrine regulation of experimental metastasis in 13762NF rat mammary adenocarcinoma cell clones. *Anticancer Res*, 14, 1743-1752.
- Welch DR. (1997) Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis*, 15, 272-306.
- Workman P, Twentyman P, Balkwill F, Balmain A, Chaplin D, Double JA, Embleton J, Newell D, Raymond R, Stables J, Stephens T, Wallace J. (1988) UK Coordinated Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Br J Cancer*, 77, 1-10.
- Yamagiwa K, Ichikawa K. (1915) Experimentelle Studie über die Pathogenese der Epithelialgeschwülste. *Mitt Med Fac Kaiserl Univ Tokyo*, 15, 295-344.
- Yamamoto T, Sugano H. (1972) *Experimental leukomogenesis*. University Park Press, Tokyo.
- Yanysheva NY and Balenko NV. (1966) Experimental lung cancer caused by introduction of various doses of 1,2,5,6-dibenzanthracene. *Gig Sanit*, 31, 12.

Zak FG, Hoizner JH, Singer EJ and Popper H. (1960) Renal and pulmonary tumors in rats fed dimethylnitrosamine. *Cancer Res*, 20, 96.

Zhdanov DA. (1952) General anatomy and physiology of the lymphatic system. Leningrad Medgiz, (in russian).

Zwaga T, Bovée JV, Kroon HM. Osteosarcoma of the femur with skip, lymph node, and lung metastases. (2008) *Radiographics*, 1, 277-283.

## ***8.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke***

**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 Nov;24(11):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, (in press). **IF:** 2,194

## 9. Tárgyszavak

$^{18}\text{F}$ FDG felvétel

Glükóz transzporterek

Hepatocelluláris carcinoma

Kémiai karcinogenezis

Kromatinkondenzáció

Mesoblastos nephroma

Metasztázis modell

Myelomonoblastos leukaemia

Parathymicalis nyirokcsomó

Primer tumor

Sejtvonal

Teljes test autoradiográfia

$^{18}\text{F}$ FDG uptake

Glucose (GLUT) transporters

Hepatocellular carcinoma

Chemical carcinogenesis

Chromatin condensation

Mesoblastic nephroma

Metastasis model

Myelomonoblastic leukemia

Parathymic lymph node

Primary tumor

Cell line

Whole body autoradiography

## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok Prof. Dr. Bánfalvi Gáspárnak, aki a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszéken folyó munkát lehetővé tette, segítséget nyújtott az eredmények értelmezésében, valamint a publikációk és a Ph.D. értekezés megírásában.

Köszönet illeti Prof. Dr. Hunyadi Jánost az eredmények értelmezésében, és a disszertáció megírásában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kertai Pálnak, aki a kémiaileg indukált daganatokat elindította és fenntartotta, aki szakmailag és erkölcsileg is nagyon sokban hozzájárult az értekezés elkészítéséhez.

Köszönöm Dr. Márián Teréz tudományos főmunkatársnak, aki a Nukleáris Medicina Intézetben folyó munkát lehetővé tette és irányította.

Dr. Grigorszky Istvánnak köszönöm a hozzáférési lehetőséget a fényképezőgéppel felszerelt fénymikroszkóphoz, mely szintén nagy segítségemre volt a disszertáció elkészítéséhez.

Köszönet illeti a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék, a Bőrgyógyászati Klinika és a Nukleáris Medicina Intézet laboratóriumaiban dolgozó hallgatótársaimat, asszisztenseket.

## **11. Függelék (Közlemények másolatai)**