

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Király Gábor

**Funkcionalizált hibrid aerogél mikrorészecskék
tumorelleses hatásának vizsgálata nyirokutakon
terjedő tumor sejteken**

DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Funkcionalizált hibrid aerogél mikrorészecskék
tumorelleses hatásának vizsgálata nyirokutakon
terjedő tumor sejteken**

Király Gábor

Témavezetők:

Prof. Dr. Juhász István

Dr. Szemán-Nagy Gábor



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Peritoneális tumorok, áttétek és léziók.....	8
2.2. Peritoneális metasztázisok őrszem nyirokcsomói	9
2.3. Állatmodellek a hasüregi nyirokelfolyás és áttétképzés vizsgálatára.....	11
2.4. Paratimikális nyirokcsomó karakterizálása	12
2.5. Az őrszem nyirokcsomó disszekció hátrányai	13
2.6. Metasztázis állatmodellek	14
2.7. Citosztatikumok célbajuttatására alkalmazható gyógyszerleadó rendszerek	14
2.8. Aerogél alapú gyógyszerhordozó rendszerek.....	16
2.8.1. Aerogélek, hibrid és funkcionális aerogélek jellemzése	16
2.8.2. Szervetlen aerogélek.....	16
2.8.3. Szerves aerogélek	17
2.9. Aerogélek biokompatibilitása, <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> alkalmazásuk	18
2.9.1. Aerogélek kardiovaszkuláris implantátumokként való felhasználása	18
2.9.2. Aerogél alapú rendszerek háromdimenziós szövettenyésztéshez.....	19
2.9.3. Aerogélek sebgyógyulásban való alkalmazási lehetőségei	20
2.9.4. Hibrid aerogélek gyógyszerhordozó/leadó rendszerként való alkalmazása	20
3. CÉLKITŰZÉSEK	23
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
4.1. Sejtenyésztés	24
4.2. Egér kísérletek.....	24
4.3. Szövettani vizsgálatok, immunhisztokémiai jelölés	25
4.4. Kromatin struktúrák izolálása, fluoreszcens mikroszkópia.....	25
4.5. Mikronukleusz vizsgálat Giemsa-festéssel.....	27
4.6. H-AG és MFH-AG mikrorészecskék előállítása.....	27
4.6.1. Anyagok és vegyszerek	27
4.6.2. Zselatin-metotrexát konjugátum előállítása	28
4.6.3. Metotrexáttal funkcionalizált hibrid aerogél előállítása	28
4.7. MFH-AG részecskék elektronmikroszkópos és porozitás vizsgálata.....	29
4.8. MFH-AG részecskék sterilizálása és kondicionálása	30
4.9. Time-lapse videómikroszkópia	30
4.10. Digitális képanalízis	31

4.11.	MFH-AG részecskeméret eloszlás vizsgálat.....	32
4.12.	A MFH-AG részecskékből történő MTX felszabadulásának vizsgálata.....	32
4.13.	Sejtek életképességének meghatározása MFH-AG mikrorészecskékkel történt kezelés után	33
4.14.	Statisztika	34
5.	EREDMÉNYEK	35
5.1.	A tus szemcsék i.p. oltása után a kolloid részecskék megjelentek a paratimikális nyirokcsomókban	35
5.2.	Az SCC VII sejteket C3H egerek hasüregébe oltva áttétet adnak a paratimikális nyirokcsomókba	36
5.3.	Immunhisztokémiai jelölés.....	37
5.4.	Kromatin kondenzálódási intermedierek vizsgálata metotrexáttal történő kezelés után.....	38
5.4.1.	Metotrexát indukálta genotoxicitás a SCC VII sejtek magjaiban reverzibilis permeabilizálást követően	38
5.4.2.	Mikronukleusz kialakulásának igazolása Giemsa-festéssel	40
5.4.3.	MTX által indukált mikronukleusz képződés nem permeabilizált sejtekben.....	41
5.5.	A vizsgált aerogélek karakterizálása	43
5.5.1.	A H-AG karakterizálása	43
5.5.2.	Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok	43
5.5.3.	N ₂ adszorpciós-deszorpciós porozimetriás vizsgálatok.....	44
5.5.4.	A MFH-AG mikrorészecskék és a SCC VII sejtek méreteloszlása.....	44
5.6.	A H-AG mikrorészecskék biokompatibilitásának vizsgálata time-lapse videómikroszkópiával.....	45
5.7.	Az MFH-AG részecskékből történő MTX felszabadulásának vizsgálata	49
5.8.	A MFH-AG mikrorészecskék hatása a HaCaT, SCC VII és HL-60 sejtek viabilitására.....	50
6.	MEGBESZÉLÉS.....	53
6.1.	Hasüregi metasztázisok esetén a paratimikális nyirokcsomók az őrszem nyirokcsomók ...	53
6.2.	A metotrexát genotoxikus és mikronukleusz képző hatása volt megfigyelhető daganatos sejteken.....	55
6.3.	A funkcionizált hibrid aerogél mikrorészecskék (MFHA-AG) különböző citotoxicitást mutattak eltérő kollagenáz aktivitású sejtvonalak esetén	57
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	60
8.	SUMMARY	61
9.	A KÍSÉRLETI MUNKÁBAN RÉSZTVEVŐ TÁRSSZERZŐK MUNKÁJÁNAK ISMERTETÉSE	62
	IRODALOMJEGYZÉK.....	64
	TÁRGYSZAVAK-KEYWORDS	80
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	81
	FÜGGELÉK.....	82

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATCC: American Type Culture Collection

BET: Fajlagos felület meghatározására használatos számítási módszer

DAPI: 2,6-diamino-2-fenilindol

DMEM HAM'S F12: DMEM és F12 sejtenyésző folyadékok 1:1 arányú elegye

DOX: Doxorubicin

Eudragit_L: Orális felhasználású gyógyszerekhez használatos bevonat

FBS: magzati borjú szérum

H-AG: Szilika-zselatin hibrid aerogél

HaCaT: Humán keratinocita sejtvonal

HeLa: Humán eredetű méhnyakrák karcinóma sejtvonal

HL-60: Humán leukémia sejtvonal

i.p.: Intraperitoneális/hasüregbe történő beadás

MCF-7: Humán emlőrák sejtvonal

MFH-AG: Metotrexáttal funkcionizált szilika-zselatin hibrid aerogél

MMP: Mátrix metalloproteáz

MTX: Metotrexát

MTT-teszt: Tetrazolium bromid/formazán átalakuláson alapuló életképesség vizsgálat

PEG: Polietilén-glikol

PBS: Foszfát-puffer sóoldat (pH 7.45)

SCC VII: Egér eredetű laphám karcinóma sejtvonal

SEM: Pásztázó elektronmikroszkópia

TMOS: tetrametil-ortoszilikát

WHO: Egészségügyi Világszervezet

1. BEVEZETÉS

A WHO 2016-os adatai alapján a nagy populációkat érintő betegségek közül az ischaemiás szívbetegség és a sztrók után a rákos/rosszindulatú elváltozások állnak a harmadik helyen. A közzétett adatok alapján 6-ból 1 halálesetet daganatos elváltozás okoz (www.who.int adatai alapján). A klasszikus és jelenlegi megközelítés szerint a tumor fejlődést számos onkogén mutáció felhalmozódása okozza, melyek a sejtciklusban, apoptózisban, illetve a telomeráz aktivitásban részt vevő géneket érintik [1]. A National Cancer Institute 2018-as rákos megbetegedésekkel kapcsolatos statisztikái közül kiemelendő, hogy több, mint 1,7 millió új esetet diagnosztizáltak az USA-ban, melyek közül az első és második leggyakoribb az emlő- és tüdődaganatos elváltozások. Ezeket gyakoriságuk alapján a peritoneális (prostatata, vastagbél, hasnyálmirigy, máj), illetve a retroperitoneális szervek (vesét és vesemedencét érintő rákos megbetegedések) daganatai követik. A daganatok okozta halálesetek közel 90%-áért az áttétek kialakulása a felelős [2]. A fentebb leírt adatok alapján elmondható, hogy a metasztázisok háttérben álló mechanizmusok jobb megértése és új terápiás stratégiák, valamint gyógyszer célpontok azonosítása segíthet a rosszindulatú daganatok kezelésében. Az utóbbi években bevezetett fejlett terápiás eljárások ellenére a metasztázisok, vagyis a tumor sejtek migrációs folyamata a primer tumorból a test távoli részeibe, okozzák a rákkal kapcsolatos halálesetek jelentős részét [3]. A metasztázis szekvenciális és egymással összefüggő lépések sorozata, mely során a metasztatikus kaszkád befejezéséhez a daganatos sejteknek le kell válni az elsődleges tumorról, és be kell lépniük a vér-, vagy nyirokkeringésbe (intravazáció). A tumor sejt az immunrendszer ellenőrző pontjait kikerülve a távoli kapillárisokon keresztül az adott szervbe behatol, és ott osztódni kezd [4, 5, 6]. Ez a folyamat lehetővé teszi a tumor sejteknek az elsődleges tumorból történő migrációját, valamint a környező szövetekbe történő bejutását (infiltráció) [7, 8]. A metasztatikus sejtek speciális mikrokörnyezetet hoznak létre, ami elősegíti az új erek képződését (angiogenezis) és a sejtosztódást, mely másodlagos rosszindulatú tumort eredményez [9].

Napjainkban jelenleg a daganatkezelési lehetőségek közé tartoznak a sebészeti beavatkozások, a kemoterápia, a sugárterápia, illetve ezek kombinációi. A hagyományos kemoterápia elsősorban a DNS szintézist és a mitózist zavarja, ami a gyorsan növekvő és osztódó tumoros sejtek halálához vezet. A módszer legnagyobb hátránya, hogy nem szelektív, ezáltal károsíthatja az egészséges szöveteket, súlyos, nemkívánatos mellékhatásokat okozva (étvágycsökkenés, hányinger, extrém fáradtság stb.). További tény, hogy a kemoterápiás

szereknek az egészséges szövetekre és szervekre kiváltott súlyos mellékhatásai okozzák a daganatos betegek magas halálozási rátáját. Ezen kívül, mivel ezeknek a gyógyszereknek a biohasznosulása a daganatos szövetekben viszonylag gyenge, magasabb dózisokra van szükség, ami a normál sejtekben megnövekedett toxicitást és multidrog rezisztencia fokozódást eredményezhet.

Az előbb felsorolt okok miatt szükséges olyan kemoterapeutikumok kifejlesztése, amelyek aktív vagy passzív módon célozzák a daganatos sejteket, illetve szöveteket, ezáltal csökkentve a káros mellékhatásokat, miközben növelik a terápiás hatékonyságot. Az elmúlt néhány évben a tumorbiológia jobb megértése, és különböző anyagok – polimerek, lipidek, szervetlen hordozók, hidro- és aerogélek, valamint makromolekuláris scaffoldok – alkalmazása lehetővé tették a kemoterápiás szerek fokozottabb terápiás hatékonysággal történő szállítását a daganat helyére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Peritoneális tumorok, áttétek és léziók

A jelenlegi korszerű képalkotó rendszerek alapján a metasztatikus szóródás mintázatát, mely figyelembe veszi az adott daganattípusra specifikus vonásokat is, két egymást kiegészítő folyamat határozza meg. Stephen Paget angol sebész volt az első, aki szerint a malignus sejteknek a távoli szövetekbe történő inváziója nem véletlenszerű esemény, hanem magát a folyamatot az áttétet képző tumor sejt (mag) és az adott specifikus szerv mikrokörnyezetének (talaj) a kölcsönhatása irányítja. Paget mag-talaj hipotézisével összhangban a daganat sejt főként passzív módon a nyirok és/vagy a vénás rendszeren keresztül jut a cél szövetbe, melyet egy aktív kolonizáció követ [10]. Számos anatómiai régió szolgálhat inváziós (úgynevezett „homing”) helyként az áttétek kialakulásához: az emlő- és prosztata rák például elsősorban csontokba metasztatizál, kisebb mértékben pedig tüdő, vastagbél, pajzsmirigy és húgyhólyag áttétet okozhat. Az agyban viszont melanoma, emlő, tüdő és vastagbél daganatok metasztázis képzése a jellemző. Melanoma és emlő rák esetén gyakori a tüdő metasztázis, a vastagbél- és hasnyálmirigyrákban szenvedő betegeknél pedig a májba történő tumor szóródás fordul elő [11]. Végül a hasüregben lévő metasztázisokért többnyire a petefészekrák, illetve gasztrointesztinális eredetű tumorok a felelősek [12].

Paget hipotéziséből az is következik, hogy a tumor sejt sikeres beültetése távoli szervbe akkor lehetséges, ha bizonyos szervek általi molekuláris szignálok által előre meghatározottan terjed a szervezeten keresztül [10]. Ennek ellenére, habár számít a tumor sejtek kolonizációjában bizonyos anatómiai helyekhez való fogékonyság, a metasztázis szerv specifikus mintázata elsősorban a belépő tumor sejttől és a tumor befogadó hely molekuláris kompatibilitásától függ [13]. Erre az egyik legjobb példa az emlő tumor, mely elsősorban nyirokcsomóba, tüdőbe és májba képez áttétet. Az áttétképzést a malignus sejt által expresszálo CCR7 és CXCR4 kemokin receptorok közötti kemotaktikus kölcsönhatás, valamint ezekhez a receptorokhoz tartozó ligandumok (például: CCL21 és CXCL12) az adott szövetben megjelenő nagy mennyisége határozza meg [14]. CXCL12 kemokin termelődés számos daganatban (például petefészek-és hasnyálmirigyrák), valamint hasüregi *mesothelialis* sztróma sejtekben, ér endothél és fibroblaszt sejtekben is megfigyelhető [15, 16]. Gyomordaganat esetén a VEGF, CXCR4 és CXCL12 közötti kölcsönhatás jelentős a hasüregi metasztázis kialakulásában [17, 18].

Napjainkban már általánosan elfogadott tény, hogy a szisztémás metasztázis kialakulását a vér- illetve nyirokutakon terjedő tumor sejtek okozzák. A tumor sejteknek a nyirokcsomókba jutása nem véletlen folyamat, ugyanis a metasztázis különféle mintázatai a daganat típusától függően változnak. Az áttételnél gyakori jelenség, különösképp karcinómák esetén, hogy a tumorsejtek nyirokcsomókba terjednek, mely a metasztázis alapját képezi [19]. A peritoneumban a metasztázisok 4 fő irányban terjedhetnek: 1) közvetlenül a hasüregi ligamentumok, bélfodrok és cseplesz mentén a nem összefüggő struktúrákhoz 2) hasüregi terjedés az ascitikus folyadék áramlásán keresztül 3) nyirokutakon 4) embolus szerű hematogén terjedés [20]. A tumornövekedés korai fázisában a regionális nyirokcsomók szerepét metasztázis során a T-sejtek regionális nyirokcsomókban történő indukciója jelzi. Kiszámú tumor sejt nyirokcsomóba jutása esetén a nyirokcsomó átmeneti gátként funkcionál a tumor növekedés ellen. A regionális nyirokcsomókban lévő daganatos sejtek által indukált szupresszor aktivitás elősegíti a tumorok kialakulását és nyirokcsomó áttétet eredményez. A tumor sejteknek a nyirokutak közvetítésével nyirokcsomókba történő jutása az őrszem nyirokcsomó elméletet hozta létre. Az őrszem nyirokcsomó elmélet szerint a tumor helyéről kiinduló nyirokelfolyás irányába eső első nyirokcsomó őrszemként először kerül a nyirok terjedése útjába. Így az eltávolított tumor sejteket tartalmazó nyirokcsomó diagnosztikai célra hasznosítható [21].

2.2. Peritoneális metasztázisok őrszem nyirokcsomói

A képalkotó diagnosztika széleskörű alkalmazása ma már elengedhetetlen a daganatos betegségek stádiumának meghatározásához és a megfelelő ellátás megtervezéséhez. A CT (computer tomográfia) a leggyakrabban használt képalkotó módszer a daganatos betegekkel történő munkában. Hasi CT vizsgálat kiértékelése során a radiológusok gyakran találkoznak megnagyobbodott nyirokcsomókkal, melyek helyes lokalizálása kritikusan fontos a tumor stádiumának megállapításában [22]. A nyirok csomópontok nomenklatúrája elsősorban a véredény (artéria vagy véna) és a kísérő nyirokelfolyás kapcsolatán, vagy az adott szervhez való közvetlen elhelyezkedésén alapszik. A nyirokcsomóknak a tumor terjedés anatómiai útvonalaihoz való közeli elhelyezkedése, és a képalkotó funkciók (például: PET/CT vagy MRI-ben nanorészecskékként) hasznosak annak meghatározásában, hogy a nyirokcsomó inkább rosszindulatú, vagy reaktív [23, 24, 25]. A következőkben a főbb hasüregi szervek daganatos megbetegedései esetén érintett nyirokcsomókat írom le:

A hepatocelluláris karcinóma (HCC) a leggyakoribb elsődleges zsigeri tumoros elváltozás [26]. A HCC a hepatocitákból alakul ki, melynek vannak zsíros és fibrózus elemei is. Az átlagos túlélés 10 hónap, habár korlátozott stádiumú betegség esetén, valamint fokozott kezeléssel 5 éves túlélés is elérhető. HCC-ben érintett főbb nyirokcsomók elhelyezkedése: a májat és a patkóbelet összekötő szalagnál lévő csomók, *vena cava inferior*hoz asszociált nyirokcsomók.

A hasnyálmirigy rák a második leggyakoribb hasüregi daganat, és az ötödik vezető ok a daganatos megbetegedések miatti elhalálozások közül. Ennél a daganattípusnál az esetek többsége (95%) *ductalis* adenokarcinóma. A hasnyálmirigy daganat általában korai fájdalom nélkül alakul ki, kivéve, ha a tumoros szövet közel helyezkedik el az epevezetékhez és ezáltal epeúti elzáródást okoz. Jelenleg elmondható, hogy a malignus szövet csak az esetek közel 10 %-ában távolítható el műtéti úton. A lokális daganat reszekálhatósága a nagyobb vaszkuláris struktúrák helyzetétől, elsősorban artériás struktúráktól (superior mezenteriális artéria), valamint az érintett főbb vénás struktúrák hosszától és esetleges elzáródásától függ (superior mesenterialis véna) [26]. A nyirokcsomók érintettségének azonosítása nehéz, mind a CT, mind pedig az MRI pontossága korlátozott [27, 28]. A medián túlélés kezelés nélkül 5 hónap, kezeléssel (sebészeti beavatkozás, illetve neoadjuváns kemoterápia általában rossz eredményű) pedig 8-14 hónap [29]. Hasnyálmirigy daganat esetén érintett főbb nyirokcsomók: hasnyálmirigyhez kapcsolt, hasnyálmirigy és bél közötti, lépnél lévő, illetve pilorikus nyirokcsomók.

A gyomorrák a harmadik leggyakrabban előforduló gasztrointesztinális daganat és hatodik a daganatos megbetegedések által kiváltott halálokok között. A leginkább előforduló szövettani elváltozás ebben a daganattípusban az adenokarcinóma (95%-ban). A műtéti eltávolítás az egyetlen hatékony beavatkozás a tumor kezeléséhez és a hosszú távú túléléshez. Szolid tumor esetén lehetséges a gasztrektómia és őrszem nyirokcsomó eltávolítás, azonban távoli áttét esetén (például para-aortikus nyirokcsomó metasztázis) a műtéti eljárás nem biztosít jelentős túlélési előnyt [30]. Gyomorrák esetén a gyomor nagy görbülete melletti nyirokcsomók, a nagy omentumhoz tartozó nyirokcsomók, gasztroduodenális, pilorikus, valamint a nagy csepleszhez és hasnyálmirigyhez asszociált nyirokcsomók lehetnek érintettek a tumor sejtet tartalmazó nyirokelfolyás miatt.

A kolorektális karcinóma (CRC) a legtöbb esetben polipból származik, fontos rizikófaktorok lehetnek az esetleges korábbi családi kolorektális daganatok, polipok vagy gyulladásos bélbetegségek megjelenése. Rektális malignus tumor kezelése elsősorban sebészi

beavatkozással történik, melyet általában sugárterápia, és ritkábban kemoterápia követ. A prognózist alapvetően a tumor stádium alapján határozzák meg, I-es stádiumú CRC esetén az 5 éves túlélés több, mint 90%-os, IV-es stádiumú CRC esetén pedig megközelíti a 0%-ot [26, 29]. CRC esetén a regionális nyirokcsomó metasztázisok eloszlása követi a *mesocolon*-ban lévő érhálózatot. Ez az érhálózat magába foglalja a *mesocolon* felszálló ágához tartozó *ileocolica* és a vastagbélnél lévő jobb oldali véredényeket, a középső *mesocolon* véredényeit, illetve a szigma és leszálló vastagbél alsó mezenterikus vénáit [31, 32].

A vesesejtes karcinóma (RCC) viszonylag ritka neoplazma, az összes rosszindulatú tumor 3%-át teszi ki [26]. Általában 50-70 éves kor között jellemző, leggyakoribb típusa az adenokarcinóma (90%). Az RCC-ben szenvedő betegek több, mint 50%-a gyógyul meg korai stádiumban, azonban IV-es stádiumú betegség esetén a túlélés alacsony. A vesesejtes karcinóma kezelése radikális nephrectomiával vagy kemoterápiával történik. Érintett nyirokcsomók: paracavalis, para-aorticus és periaorticus nyirokcsomók.

Őrszem nyirokcsomók azonban nemcsak a hasüregi daganatok közelében regionálisan, hanem távolabb is kialakulhatnak. Főként gyomordaganat esetén figyelték meg, hogy a peritoneális térből a tumor sejtek a *mediastinalis* régióban lévő nyirokcsomókba jutnak, és ott áttétet képezhetnek [33]. A peritoneális tér nyirokelvezető mintáinak a feltárása elősegítheti az intraabdominális rosszindulatú daganatok prognosztizálását, kezelését és a tumor stádium beosztás felállítását (staging). A hasüregi nyirokutakon történő tumor terjedés vizsgálatára számos állatmodell létezik, melyekben a metasztázisok különböző útvonalait írták már le.

2.3. Állatmodellek a hasüregi nyirokelfolyás és áttétképzés vizsgálatára

Parungo és munkatársai újszerű, közeli infravörös nyirok nyomjelzővel azonosították a felső *mediastinalis* nyirokcsomókat, mint mellkasi őrszem nyirokcsomókat [34], és követték a mellkasba, hónaljba és hasüregbe történő nyirokelfolyási mintázatot [35]. Ennek ellenére továbbra is vita tárgyát képezi, hogy a hasüregnek van-e előre meghatározható nyirok elfolyási mintázata. Korábbi tanulmányokban leírták a rekeszizom [36], nyirokcsomó [37] és pneumoenterális fistula [38] csatornáin keresztüli nyirokáramlást. A gyomor-, vastagbél- és petefészekrák, valamint bármely olyan malignitás, mely potenciálisan a peritoneális térbe szóródhat, az őrszem nyirokcsomóhoz tartozó nyirokér drenálja, és a távoli nyirokkeringésbe jut.

Fritz és munkatársai hörcsögök hasüregébe Evans blue festéket, illetve radioaktívan jelölt albumint injektálva azt tapasztalták, hogy a részecskék a *mediastinalis* és hasüregi nyirokcsomókban jelentek meg [39]. Specifikus peritoneális nyirokelvezetést patkány modellen is megfigyeltek, mely során közeli infravörös képalkotás segítségével és különböző méretű nyirok nyomkövetők (tracer-ek) alkalmazásával a regionális őrszem nyirokcsomókon kívül a felső *mediastinalis* nyirokcsomókban is látható volt az áttét jele [40]. A hasüreg nyirokelfolyásának bárány modellben történő vizsgálata során 3 fő nyirokutat írtak le, melyek átfúrják a diafragmát és sajátos útvonalakon haladnak tovább. Evans kék festéket hasüregbe adva a festékszemcsék egyrészt a *caudalis sternalis* nyirokcsomókba jutottak, a *cranialis sternalis* nyirokerek közvetlenül vagy közvetve juttatják az anyagot a *trachealis* nyiroktörzsön keresztül a jobb nyirokcsatornába. A második útvonal esetén a festék a hasüregből a rekeszizom nyirokkeringésén keresztül a *mediastinum caudalis* nyirokcsomóba jutott. Ennek a csomónak az efferens nyirokcsatornája a mellkasi csatornához szállítja a szemcséket. A harmadik útvonal révén a hasi zsigerek mesothel vonalán keresztül szállítódott festéket az *interstitiumból* az *afferens visceralis* nyirokrendszer távolítja el [37]. Ezeket a hasüregből kilépő *mediastinalis* nyirokkeringési utakat már korábban szintén leírták emberben és további emlős állatmodellekben is [41, 42]. A fenti irodalmi adatok alapján látható, hogy a hasüregből a különböző kolloid, illetve festék részecskékhez hasonlóan a tumor sejtek is a diafragmán keresztül *mediastinalis* irányba jutottak tovább, és *parasternalis* nyirokereken keresztül a paratimikális nyirokcsomókba jutottak el.

2.4. Paratimikális nyirokcsomó karakterizálása

A paratimikális nyirokcsomók *mediastinumban* a tímuszhoz közel helyezkednek el és hozzá kapcsolódnak. A patkányok mellkasi üregében megfigyelt nyirokcsomók a paratimikális és *posterior mediastinalis* nyirokcsomók. Az egér paratimikális nyirokcsomókat a tímusz egyes lebenyén dorzolaterálisan, 2-3-as csomókban írták le [43]. Egerekben a paratimikális nyirokcsomók a tímuszon belül, míg patkányok esetén a tímusz felszínén találhatóak meg [43]. Tilney részletesen feltérképezte a patkányok nyirokrendszerét, és leírta, hogy a hasüregből, májból, pericardiumból és a tímuszból származó nyirok a paratimikális nyirokcsomókba jut, majd a *mediastinalis* nyiroktörzsbe folyik, ami a *subclavia* vénájába ömlik be [44]. A tímusz nyirokkeringését és tímusz specifikus nyirokcsomók jelenlétét más állatmodellben, mint bárányban [45] és tengerimalacban [46] is leírták. A humán paratimikális nyirokcsomókat csak

két tanulmányban [47, 48] publikálták, valószínűleg azért, mert a tímusz kapszula alatt helyezkednek el és a tímusztól nehezen különböztethetők meg.

2.5. Az őrszem nyirokcsomó disszekció hátrányai

A hasüregi őrszem nyirokcsomók eltávolítása elterjedt gyakorlat a klinikumban, azonban ennek a módszernek is vannak velejáró limitációi és hátrányai [49]. A metasztatikus nyirokcsomók eltávolításáról úgy gondolták, hogy bármilyen lehetséges áttét újramegjelenését megszünteti, azonban agresszívebb esetekben az eljárás után akár kevés számú tumoros sejt hátrahagyása miatt újabb rosszindulatú sejtszaporulat alakulhat ki. A reszekcióval kapcsolatos strukturális zavarok pedig további kockázati tényezőket (például: szeróma, zsibbadás, nyiroködéma vagy fertőzések) okozhatnak [49, 50]. A regionális nyirokcsomók eltávolítása, melyek valószínűsíthetően tumoros sejteket tartalmaznak, valóban javulást eredményez, azonban reziduális mikrotumorok kialakulása és a kiújulás lehetősége nem zárható ki. További probléma, hogy peritoneális nyirokcsomó eltávolítás a nyirokcsatornákat megnyitja és életképes tumor sejtek hasüregbe jutását okozhatja. Ribeiro és munkatársai tanulmányukban leírták, hogy serosa-invazív gyomordaganatos betegeknél a daganat kiújulása és emiatt az első két évben a betegek halála volt megfigyelhető még kuratív kezelés után is [51, 52]. A peritoneális metasztázist a serosa-invazív tumorokból leszakadt szabad tumor sejtek okozták, mindazonáltal nem invazív tumorok esetén is megfigyeltek áttét kialakulását. A nonserosus-invazív karcinóma peritoneális terjedésének okai a nyirokcsomó disszekció által megnyitott nyirokcsatornák, és az életképes daganatos sejtek jelenléte [53], illetve így a metasztatikus nyirokcsomókban lévő tumoros sejtek voltak [54]. Gyomor karcinómás betegeknél a hasüregi metasztázis az egyik leggyakoribb kiújulási mintázat, melyet a serosa-invazív tumorokból kijutó szabad daganatos sejtek okoznak. Habár a non-serosa invazív gyomorrákos betegeknél kuratív sebészeti beavatkozást végeztek, néhány beteg peritoneális daganat kiújulásban halt meg. A tanulmány egyértelműen bebizonyította, hogy RT-PCR vizsgálat után szabad tumorsejtek voltak láthatók nyirokcsomó disszekciót követően a hasüregben.

2.6. Metasztázis állatmodellek

A daganatos megbetegedések alapjául szolgáló molekuláris patogenezis megértéséhez, a daganat kezelés sorrendjének megállapításához és új célzott rákellenes terápiák kifejlesztéséhez reprezentatív metastázis állatmodellekre van szükség [55, 56]. A metastázisra vonatkozó vizsgálatok során gyakran olyan koncepcionális és gyakorlati nehézségekkel szembesülhetünk, amelyeket a klinikai és kísérleti vizsgálatok elvégzéséhez le kell küzdeni. A metastatikus vizsgálatok koncepciók nehézségei az élő szervezetben előforduló folyamatok dinamikus jellegével függnek össze, így az áttétek kialakulását *in vivo* kell vizsgálni, *in vitro* nem lehet őket megfelelően modellezni. Általánosan elmondható, hogy a metastatikus tumorképződés komplex folyamatának vizsgálata megköveteli az optimális modellek kifejlesztését. Khanna és Hunter a metastázis kísérletes megfigyelését legegyszerűbben a tumor sejtek közvetlenül a szisztémás keringésbe történő juttatásával érték el, mellyel az áttét kialakulásának a helyét határozták meg [57]. A mag-talaj hipotézis transzplantációs modellekhez való igazítása a tumor sejtek ortotóp transzplantációját eredményezte egerekben [58, 59, 60, 61]. Ortotopikus transzplantáció során a tumor sejteket ugyanazon anatómiai helyre vagy szövetbe juttatjuk, ahonnan a tumor eredetileg származik [61, 62].

2.7. Citosztatikumok célbajuttatására alkalmazható gyógyszerleadó rendszerek

A daganatos megbetegedések kezelésében nagyrészt olyan mellékhatásokkal és korlátozott hatékonysággal rendelkező toxikus gyógyszereket alkalmaznak, melyek legnagyobb hátránya a célspecifikusság hiánya [63]. Ezen kívül mind a kóros folyamatok a szervezetben, mind pedig a szervezet különböző gyógyszerekre adott válaszai megváltoztathatják a várható terápiás hatást még akkor is, ha ismert az előírt dózisa az alkalmazott gyógyszernek. Ennek következtében viszont a szükséges gyógyszer mennyiség eltérhet a beadandó mennyiségtől. A szabályozott hatóanyag-leadású rendszereket úgy fejlesztették ki, hogy biztosítsák a szükséges gyógyszer mennyiséget, így növeljék a gyógyszer hatását a szervezetben, megvédjék az élettani lebomlástól, javítsák a beteg kényelmét és a gyógyszer tényleges leadásának helye ellenőrizhető legyen [64]. A nyirokutakon alkalmazott gyógyszerleadó rendszereket a kemoterápiás gyógyszerek kuratív terápiás hatásának

javításához használják, valamint alkalmazzák makromolekuláris gyógyszerek szájjüregen keresztüli felszívódásának és a nyálkahártya immunitásának fokozására. A nyirokrendszer egyedülálló anatómiai tulajdonságai megnehezítik a gyógyszermolekuláknak a nyirokszövetben lévő célterület elérését, beleértve a nyirokcsomó metasztázisokat [65]. Ezért van szükség hatékony, nyirokutakon alkalmazható és fokozott terápiás hatással a gyógyszermolekulákat a léziók helyére szállító gyógyszerleadó rendszerekre [66].

A konvencionális daganatterápiában a metotrexát (MTX) egy hatékony daganatellenes szer [67, 68, 69], de alkalmazásának számos hátránya van: mivel az MTX felszívódása a gyomor-bél traktusban telítődési kinetikát követ a növekvő koncentrációval, biológiai hozzáférhetősége a tumorhoz dózis függő [70]. Nagy MTX dózisok alkalmazása esetén a beadott MTX nagy részét a vesék rövid időn belül kiszűrik. Ennek az eredménye pedig rövid plazma felezési idő (5-8 óra) és alacsony hatóanyag koncentráció jellemzi a célszövetekben [71, 72, 73]. Az előbb leírt okok miatt a megemelt MTX dózis pedig a mellékhatások (például: hányás, hányinger, hasmenés stb.) magasabb kockázatát eredményezi [74]. Számos hatóanyag leadási módszert fejlesztettek már ki a hagyományos MTX terápia hiányosságainak leküzdésére. Ezek közé tartozik például a gyógyszer lipidekbe történő csomagolása, amely jelentősen megnövelte a plazma felezési idejét és így ritkábban történő beadást tett lehetővé [75, 76]. A biológiailag lebontható, MTX-al funkcionális hidrofíli zselatin mikrogömbök hosszan tartó felszabadulást és megnövekedett tumorellenes hatást biztosítottak [77, 78]. A nyirokutakon történő áttétképzésre kifejlesztett kilomikronokra hasonlító emulzió hasznosnak bizonyult a first pass effect hatás kivédésére [79]. A „prodrug” megközelítések és a kovalens konjugáció esetén kimutatták, hogy mindkét stratégia alkalmas a sejtekbe, vagy szövetekbe történő szelektív hatóanyag leadásra. A két módszerben azonos az extra funkció csoportok kihasználása a MTX-nak különböző biomolekulákhoz (például: peptidek, antitestek, enzimek, fehérjék stb.) történő kovalens kötéséhez. A módszer alapja, hogy ezeknek a kovalens kötéseknek a hasítása célzott helyeken történik enzimekkel, biztosítva ezzel a specifikus gyógyszer felszabadulást [80, 81, 82, 83, 84]. A biológiailag lebomló zselatin-MTX konjugátumokat Narayani és Rao szintetizálta és vizsgálta [85]. Vizsgálataikban 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) karbodiimid-et (EDAC) használtak a MTX-nak a zselatin peptid oldalláncjaihoz történő kovalens kötéséhez. Ofner és munkatársai módosították a zselatin-MTX kapcsolási stratégiát és olyan konjugátumokat készítettek, melyek a bekötött MTX csak 3-8 tömeg %-át szabadították fel *in vitro*. Végül arra a következtetésre jutottak, hogy a MTX felszabadulását és a citotoxicitását

nem csak a cathepsin-B aktivitás szabályozza, hanem a komplex enzimatikus válasza is szükséges a hatékony leadáshoz [86, 87, 88].

2.8. Aerogél alapú gyógyszerhordozó rendszerek

2.8.1. Aerogélek, hibrid és funkcionális aerogélek jellemzése

A gyógyszerleadó rendszereknek fontos részei a porózus rendszerek a nagy belső felületük és felület/térfogat arányuk, a nagy pórus térfogatuk és egységes pórusméretük miatt. A hatóanyag megkötést, illetve felszabadulást befolyásoló pórus és felszíni tulajdonságok hatását, valamint a mátrix-hatóanyag kölcsönhatásokat már mikro- és mezopórusos rendszerek széles skáláján vizsgálták [89, 90, 91, 92]. Az aerogélek, mint a legkisebb sűrűségű szilárd anyagok, a nagy porozitásuknak és bizonyított biokompatibilitásuk miatt egyre nagyobb figyelmet kaptak hatóanyag leadó rendszerekként [93, 94, 95]. Az aerogéleket először Samuel Kistler szintetizálta 1931-ben, aki úgy definiálta az aerogéleket, mint az anyagot, ami megtartja a pórusait és az intakt szerkeszetét, miután a pórusokban lévő folyadékot gázra cserélte ki [96]. Körülbelül 60 évvel Kistler felfedezését követően a szerves aerogéleket diagnosztikai szerekként, mesterséges szövetként és főként gyógyszerleadó rendszerként javasolták orvosi alkalmazásokra [97]. Ennek is köszönhetően az aerogélekkel kapcsolatos közlemények száma 2005 óta közel megdízszereződtek (Sciencedirect.com-ról nyert adatok).

2.8.2. Szervetlen aerogélek

Az aerogélekkel, mint gyógyszerhordozó rendszerekkel kapcsolatos kutatások kezdetben a szilika alapú aerogélek alkalmazására összpontosítottak [98, 99, 100]. Smirnova és munkatársai [98] a szilika aerogélek orális gyógyszer leadó rendszerként való használhatóságát vizsgálták, és megállapították, hogy a hidrofil szilika aerogéleken adszorbeálódott gyógyszerek gyorsabban oldódtak fel, mint a megfelelő gyógyszerek kristályos formában. Ezt a gyors felszabadulást a szilika aerogélen a megnövekedett felület okozta, amelyen a gyógyszer adszorbeálódott. Smirnova és munkatársai a hidrofil szilika aerogélbe kétféle modell gyógyszert töltöttek, griseofulvint és ketoprofent, szuperkritikus CO₂-ből adszorpcióval. A gyógyszerek felszabadulási sebessége ötszöröse és négyszerese volt a ketoprofen és griseofulvin kristályos formáinak [101]. Schwertfeger és munkatársai [102] a gyógyszerleadó rendszerekhez használható hordozó mátrixok ígéretes anyagaként szabadalmaztatták a hidrofób és hidrofil aerogéleket. Az előkészített gyógyszer tartalmú aerogél mintákat szűrték és

szárították, melyekben ezt követően a pórusméret csökkenését figyelték meg, ami a sikeres gyógyszer bekötődésre utalt [103, 104]. Schwertfeger és munkatársai [102] szintén bemutatták hidrofób gyógyszerek hidrofil aerogélekbe történő bevitelét, és kivitelét. Guenther és munkatársai a gyógyszer tartalmú hidrofil szilika aerogélek lehetséges bőrgyógyászati alkalmazását írták le. Bizonyították, hogy a modellként használt gyógyszer, a dithranol felszabadulási és penetrációs tulajdonságai javíthatók, ha a gyógyszer nem kristályos formában szabadul fel az aerogélből [105].

2.8.3. Szerves aerogélek

A szilika aerogélek egyik legnagyobb hátránya a biológiai lebonthatóságuk hiánya, emiatt a kutatások jelentős része fordult a különféle szerves aerogélek előállítására felé. Berg és munkatársai [97] sikeresen kötöttek a resorcinol-formaldehid aerogélekbe tesztoszteron-adipátot és 5-fluorouracilt. Lee és Gould [106] különféle modell gyógyszereket, mint például methadone-t, naltrexone-t és inzulint kötöttek szerves aerogélekbe úgy, hogy a szuperkritikus szárítás előtt a gyógyszerek oldataival beoltották az alkogéleket. A következő ígéretes szerves aerogél mátrixnak, mint gyógyszer leadó rendszerek, a poliszacharidok számítottak. Stabilitásuk, elérhetőségük, megújíthatóságuk, alacsony költségük és alacsony toxicitásuk csak néhány a kiváló tulajdonságaik közül, amelyek miatt ígéretesnek tűntek orvosbiológiai alkalmazáshoz. Mehling és munkatársai [107] különböző poliszacharid prekursorokat (burgonyakeményítő, módosított keményítő, alginát) használtak aerogélek előállításához, és ezekbe ibuprofent és paracetamolt kötöttek. Bemutatták, hogy a gyógyszer aerogélbe történő kötése és kioldódási kinetikája elsősorban a mátrix tulajdonságaitól és szerkezetétől függ [107]. Betz és munkatársai egy aktív hatóanyag, a ketoprofen szállítására alkalmas tejsavó-fehérje alapú aerogélt készítettek. A vízben oldhatatlan tejsavó-fehérje alapú hidrogélek alkalmasak gyógyszerek kapszulázására és használhatók a beágyazott gyógyszerek széles termikus és pH tartományban történő stabilizására [108]. Modell gyógyszerként a ketoprofent alkalmazták, mert a gasztrointesztinális traktusban nem kívánatos helyi mellékhatásai lehetnek, így ideális jelölt volt a szabályozott hatóanyag leadáshoz. Garcia-González és munkatársai [108] biológiailag lebontható poliszacharid alapú aerogél mikrogömböket készítettek, amelyek kiindulási anyagai természetes poliszacharidok (alginát, pektin és keményítő alapúak) voltak, és kiértékeltek az adott aerogélek gyógyszer hordozóként történő használhatóságát [108]. Az aerogél mikrogömbökbe ketoprofent és benzoetsavat kötöttek szuperkritikus CO₂-ban történő adszorpcióval. A bekötött gyógyszerek amorf állapotban voltak, a hatóanyag megkötésének

kapacitása az aerogélek fajlagos felületétől és felszíni kémiai tulajdonságaitól függött [108]. Megállapították, hogy az alginát és pektin aerogélekből történő ketoprofen felszabadulása érzékeny volt a vizes közeg pH-jára, ami összhangban volt mások eredményeivel [108, 109, 110].

2.9. Aerogélek biokompatibilitása, *in vitro* és *in vivo* alkalmazásuk

2.9.1. Aerogélek kardiovaszkuláris implantátumokként való felhasználása

Az elmúlt 100 évben a biológia folyamatok jobb megértése, és az egyre komplexebb anyagok gyártásának a lehetősége a bioanyagok (biomaterials) elterjedéséhez vezetett. A mechanikai szilárdság jelentős javulásával párhuzamosan a modern aerogélek bizonyították az orvosbiológiai alkalmazásukhoz szükséges tulajdonságaikat, ezért számos vizsgálatot végeztek az aerogélek biokompatibilitására vonatkozóan. Napjainkban elterjedten használnak polimereket különböző implantálható orvosi eszközök részeként, az alkalmazási területeiket tekintve a szívritmus szabályozók, sztentek, mesterséges szívbillentyűk és a gyógyszerleadó anyagok a leggyakoribbak [111, 112, 113, 114]. Számos közlemény jelent meg, melyekben sebgyógyulási céllal biotechnológiai előállítású szöveti mérnökséghez (tissue engineering) vázként (scaffoldként) használták ezeket az anyagokat [115, 116, 117, 118]. Ezért érdekes, hogy a kiváló tulajdonságú polimer alapú aerogéleket csak a közelmúltban fedezték fel a hasonló biológiai alkalmazásokhoz [119, 120]. A mesterséges szívbillentyűket a beteg vagy sérült szívbillentyűk pótlására használják, és az egyik legáltalánosabban ismert vérkeringésbe ültethető eszközök [112, 113]. Általában poliuretánból készülnek, és messze nem tökéletesek [121, 122], mivel hajlamosak a lebomlásra és mechanikai szilárdságuk gyenge [123]. Az aerogélek jó alternatívát kínálnak a mesterséges szívbillentyűk anyagaként a kiváló mechanikai szilárdságuk, jobb biokompatibilitásuk és előnyös előállítási költségük miatt [123]. Yin és munkatársai különböző aerogél formulák és a szív- és érrendszer összeférhetőségét (kompatibilitását) tesztelték, mely során felületaktív anyaggal bevont polikarbamid-nanokapszulázott makropórusos szilika aerogélt vizsgáltak. Az aerogél részecskék biokompatibilitását a sejtaktiváció és a gyulladásos válasz szempontjából értékelték [123]. Azt látták, hogy egyes sajátos aerogél formulák kompatibilisek voltak a vérlemezkékkel és a vaszkuláris endotél sejtekkel, normál vérlemezke funkciók megváltozása, illetve akut immunválasz a vérplazmában nem volt jelen. Továbbá, a plazmával történő inkubációt követően anyagszerkezeti változások, valamint fehérje lerakódás nem volt megfigyelhető az anyag felszínén. A kitozán-szilika hibrid aerogél a vörösvértestekkel nem volt biokompatibilis,

és ennek az anyagnak való kitettségük a sejtek hemolíziséhez vezetett [124]. Ez a példa azért is érdekes, mivel egyes szilika-aerogél formulák biokompatibilisek a kardiovaszkuláris rendszerrel, és a másképpen formulált kitozán elterjedten használt anyaga a kardiovaszkuláris eszközöknek [119, 120, 124].

2.9.2. Aerogél alapú rendszerek háromdimenziós szövettényésztéshez

A sikeres szövetszere nem lehetséges a hibrid aerogélnek a célzott szövetrel, és az azokat alkotó sejtekkel történő biológiai összeférhetősége nélkül [125, 126, 127]. Az aerogélek olyan különböző fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek ideális jelölté teszik őket, hogy a szövetépítéshez alkalmas vázként szerepeljenek („tissue engineering scaffold”) [128]. Ezek közül az egyik legfontosabb tulajdonságuk a jelentős és testre szabható porozitásuk, ami szükséges a megfelelő szövetnövekedéshez [126]. Ez utóbbi miatt az aerogélt a natív extracelluláris mátrix szimulálására is használták, amely szintén nagyon porózus (80%-os porozitás), valamint nehéz volt másfajta anyagokkal modellezni a mátrixot [129, 126, 130]. Egy másik érdekes tulajdonsága az aerogéleknek a fokozott mechanikai szilárdságuk, összehasonlítva a hasonlóan nagy porozitású anyagokkal [120, 131, 132]. A többi bioanyaghoz képest jelentős paraméter az aerogélek változtatható kémiai összetétele [124], mivel a biokompatibilitást leginkább a kémiai összetétel és a bomlástermékek határozzák meg [119, 126]. Quraishi és munkatársai [129] a hibrid alginát-lignin aerogélek előállítására új megközelítést mutattak be, mely CO₂ indukált gélesítés volt oldószercserével, amit szuperkritikus szárítás követett. Quraishi és munkatársai a citotoxicitási vizsgálatok eredményei alapján jó adhéziós tulajdonságokat figyeltek meg, citotoxicitás nélkül, ami nagy potenciált jelentett a további *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokhoz [129, 133, 134]. Ge és munkatársai [130] szilika aerogél és poli-ε-kaprolakton (PCL) kompozitot, mint potenciális csontpótló anyagot vizsgáltak csontszövet növekedéséhez. A PCL poliészter polimerként ismert nagyfokú orvosi biológiai felhasználáshoz, bizonyított biokompatibilitással [135, 136], alacsony költséggel és biológiai lebonthatósággal [137]. Ge és munkatársai megfigyelték továbbá azt is, hogy a kompozit scaffoldba alkalikus aerogél hozzáadása a savas környezetet semlegesítette, ezáltal elősegítette a sejtek túlélését és növekedését [130]. Lu és munkatársai a nanocellulóz dialdehyd változatát kollagénnel kötötték keresztbe, mely során a dialdehyd cellulóz rostok mátrixként szolgáltak, míg a kollagén a dialdehyd cellulóz rostok mentén nőtt.

2.9.3. Aerogélek sebgyógyulásban való alkalmazási lehetőségei

A sebgyógyulás dinamikus folyamatként ismert, amely rendszerint magába foglalja a gyulladásos, vaszkuláris, kötőszöveti és epitel sejtek szisztémás, szabályozott és egyensúlyi aktivitását. Ezért az ideális sebgyógyulási alkalmazásnak nedves környezetet kell fenntartania a sebfelületen, lehetővé kell tennie a gázcserét, a mikroorganizmusokkal szemben barrierként kell viselkednie és eltávolítani a felesleges váladékot [138]. A sebgyógyulásra alkalmazni kívánt anyag továbbá nem lehet toxikus vagy allergén, jó mechanikai tulajdonságúnak, biokompatibilisnek, biodegradábilisnek és könnyen eltávolíthatónak kell lennie használat után [139]. A poliszacharidok az előbb említett előnyös tulajdonságok széles skáláját mutatják a sebgyógyulás szempontjából, mivel biokompatibilisek, többnyire biodegradábilisek és gyakran nagy vízfelvevő képességgel rendelkeznek [140]. A kitin és a kitozán az adhezív sajátságuk miatt, együtt pedig az antifungális és baktericid tulajdonságuk, valamint az O₂-re való nagy permeabilitásuk miatt potenciálisan használható anyagok a sebek és égések kezelésére [141]. A bakteriális nanocellulóz (*Komagataeibacter xylinus* által termelt cellulóz) jó stabilitást, alacsony toxicitást mutatott, biztonságosan sterilizálható, illetve biokompatibilis, ezért orvosbiológiai alkalmazásokra, égések utáni sebfelület kezelésre (dressing) vagy sebgyógyulásra általánosan használhatók [142, 143]. Lu és munkatársai által közölt dialdehyd nanocellulóz és kollagén tartalmú kompozit aerogélek [144] a porozitásuk, vízadszorpciójuk, sűrűségük és a sejtekkel való biokompatibilitásuk miatt ígéretes anyagok a lehetséges sebkezelési alkalmazásokhoz.

2.9.4. Hibrid aerogélek gyógyszerhordozó/leadó rendszerként való alkalmazása

Hibrid aerogélek esetében a nagy feülettel rendelkező szervetlen alkotó, és a szerves rész biodegradabilitásának a kombinációja olyan új anyagot eredményezett, mely számos előnyös tulajdonsággal rendelkező hordozó anyagként történő alkalmazáshoz [145]. A hibrid aerogélek orális gyógyszerhordozóként való alkalmazhatóságát Alnaeif és munkatársai vizsgálták, akik szilika aerogél mikrogömbökbe ibuprofent kötöttek, magához a mikrogömbökhöz pedig újszerű bevonatot készítettek, melyhez különböző polimereket (polietilén-glikol, Eudragit_L polimer) alkalmaztak [146]. Follmann és munkatársai [147] mezopórusos szilika nanorészecskéket kombináltak poli-akril sav és poli-vinil alkohol tartalmú, sok elágazást tartalmazó polimerekkel. Kísérleteikben egy hidrofób gyógyszert, dexametazont kötöttek aerogélbe, mely hosszantartó, elnyújtott felszabadulási profilt mutatott. Kiderült, hogy

az aerogélt alkotó mindkét összetevő (mezopórusos szilika részecskék és a polimerek) alapvetően meghatározta az aerogél tulajdonságait: a mezopórusos szilika lehetővé tette nagy mennyiségű dexametazon felvételét, a polimerek pedig a fizikai stabilitásért, és a dexametazon molekulák lassú és elnyújtott felszabadulásáért voltak felelősek. A szerkezeti felépítés és a gyógyszerfelszabadulási profil alapján például sebgyógyulásnál a seb lefedésére és hatóanyag leadásra alkalmas, valamint különböző funkcionális csoportok hozzáadásával (például: antitestek a cél szövethez) potenciális gyógyszerhordozó/leadó rendszerről beszélhetünk. Veres és munkatársai [148, 149] szuperkritikus CO₂ segítségével szilika-zselatin hibrid aerogélt hoztak létre, melyekbe különböző hidrofób, alacsony vízzoldékonyságú gyógyszermolekulákat impregnáltak (Triflusal, Ibuprofen, Ketoprofen). A kiindulási és a funkcionizált mátrixok is nagy mennyiségű gyógyszermolekulát adszorbeáltak (Triflusal 29 m/m%, Ibuprofen 27m/m%, Ketoprofen 18m/m %). A hibrid aerogél a szilika aerogélhez képest nagyobb, és specifikusabb gyógyszer megkötést mutatott, illetve a hibrid aerogélből történő gyógyszer felszabadulás 10-szer gyorsabb volt. A hatóanyag felszabadulást elsősorban a mátrix hidratációja, és ennek következtében történő szétesése, valamint a mátrix zselatin tartalma határozta meg.

Számos közleményben a gyógyszermolekulák aerogélekből történő felszabadulását a célzott szövetnek a normálistól való eltérő tulajdonságaira alapozták. Ilyen lehet a cél szövet megváltozott pH-ja [150, 151, 152], a megnövekedett enzimműködés [153, 154, 155], redox változások [156, 157, 158], vagy a kompetitív gátlás [159]. Szemészeti alkalmazás szempontjából Liao és munkatársai zselatin tartalmú szilika nanorészecskéket állítottak elő, melyekbe pilokarpint kötöttek zöldhályog kezelésére. A hibrid aerogél rendszert *in vitro* és *in vivo* nyúl állatmodellben használták intrakamerális injektlás után. Az *in vitro* kísérletek esetén a kezelés harmadik hetének a végére 50%-os gyógyszerfelszabadulást tapasztaltak, mely a megemelkedett MMP-2 (mátrix metalloproteáz) aktivitásnak és a kialakuló savas környezetnek volt köszönhető. Az állatok szemének elülső kamrájába történő pilokarpin tartalmú aerogél injektlása után az intraokuláris nyomás nem változott, a kontroll állatokban viszont a nyomás drasztikusan emelkedett [160].

Daganatkezeléssel kapcsolatos vizsgálatok esetén különböző, a normális sejtektől eltérő, megnövekedett intracelluláris enzimaktivitásokat használtak fel a hibrid aerogélekből való gyógyszer felszabadításhoz. Agostini és munkatársai a mezopórusos hibrid aerogélek felszínéhez oligo (etilén-glikol) láncokat kötöttek, capping anyagként pedig egyszerűen hidrolizálható anyagokat alkalmaztak, és a nanorészecskék internalizációját különböző tumoros sejtekben (HeLa, MCF-7) vizsgálták. A mezopórusos szilika nanorészecskék endocitózissal történő felvétele és a lizoszómális észteráz aktivitás lehetővé tette a hibrid aerogélbe kötött

hatóanyag kontrollált felszabadulását [154]. Tumoros szövetekben a mátrix metalloproteázok (MMP) alapvető szerepet játszanak a tumorgenezisben, a létrejövő tumoros szövet gyakorlatilag a dagantos sejtek és a tumor sztróma sejtek (fibroblasztok, myeloid sejtek) komplexe. A tumoros mikrokörnyezetről elmondható, hogy elősegíti új erek képződését (angiogenesis), az extracelluláris mátrix turnover-ét és a tumor sejtek mozgását [161]. Yun és munkatársai doxorubicinnel (DOX), mint modell farmakonnal funkcionális mezopórusos szilika nanorészecskéket vizsgáltak hepatocelluláris és colon karcinóma sejteken, melyek fokozott MMP-9 aktivitással rendelkeznek [162]. A nanorészecskéket *in vivo* farokvénába fecskendezték, a DOX tartalmú hibrid szilika nanorészecskékhez BSA cappinget és polipeptid linkert alkalmaztak. A részecskék a májdaganatban akkumulálódtak, míg a BSA csökkentette az immuntoxicitást. Xu és munkatársai *in vitro* és *in vivo* vizsgálták a DOX funkcionális szilika-zselatin részecskék tumor ellenes hatását vastagbél karcinóma és normál hepatocita sejteken. A karcinóma sejtek emelkedett proteáz aktivitása révén szignifikáns különbséget tapasztaltak a MMP-9 negatív sejtekhez képest a sejtek viabilitásában *in vitro*. Az *in vivo* kísérletekben a tumor helyén megfigyelhető, MMP általi kontrollált gyógyszerfelszabadulás eredménye szignifikáns (közel 84%-os) tumor méret csökkenés, terápiás hatás növekedés, és szisztémás toxicitás csökkenés volt [163].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink első részében egér állatmodellben az intraperitoneálisan (i.p.) beadott kolloid tusszemcsék, és az SCC VII egér karcinóma sejtek paratimikális nyirokcsomókban történő megjelenésének, és az áttét képzés vizsgálatát tűztük ki célul. A további kísérletekben az egér állatmodellben használt SCC VII sejtenyészeten a szilika-zselatin hibrid aerogél (H-AG) részecskék biokompatibilitását, valamint a metotrexáttal (MTX) funkcionalizált szilika-zselatin hibrid aerogél mikrorészecskék (MFH-AG) tumor növekedést gátló hatását *in vitro* kísérletekben kívántuk megvizsgálni. Ezeknek a vizsgálatoknak az elvégzéséhez a következő célokat tűztük ki:

- a) Az egér állatmodellben történő hasüregi tumor terjedési útvonalat makroszkóposan (i.p. beadott kolloid tusszemcsék terjedési útvonalának vizsgálatával), valamint mikroszkóposan (szövetteni festéssel és immunhisztokémiai jelöléssel) kívántuk megvizsgálni.
- b) *In vitro* vizsgálatokban igazolni kívántuk a MTX genotoxikus, mikronukleusz képző hatását a tumor sejteken citotoxikológiai assay segítségével, és a sejtek kromatin kondenzációs intermediereinek, illetve a kialakult kromatinstruktúrák vizsgálatával.
- c) A Debreceni Egyetem TTK Szervetlen-és Analitikai Tanszék munkatársai által szintetizált MFH-AG karakterizálását N₂ porozimetriás módszerrel, a SCC VII sejtek és a MFH-AG részecskék méreteloszlását diffrakciós méretmeghatározással, valamint a H-AG mikrorészecskék biokompatibilitását a hosszú távú megfigyelésre alkalmas videómikroszkópos rendszer segítségével kívántuk megvizsgálni.
- d) A MFH-AG mikrorészecskékből történő gyógyszer felszabadulást különböző, sejtmentes és sejteket tartalmazó médiumban kívántuk megfigyelni. Végül a MFH-AG részecskék tumor sejt növekedés gátlását vizsgáltuk SCC VII, illetve humán eredetű HL-60 és HaCaT sejtvonalakon, melyekhez MTT viabilitás vizsgálatot alkalmaztuk.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Sejtenyésztés

A kísérleteket egér eredetű karcinóma (SCC VII), illetve humán eredetű (HaCaT, HL-60) sejtenyészetekkel végeztük el. A jelentős metasztatizáló képességekkel rendelkező egér eredetű karcinóma sejtet C3H egértörzsből izolálták, a Boston-i Massachusetts Kórházban [164]. A sejteket DMEM-HAM'S F12 médiumban tenyésztettük 2mM L-glutamin, 23 mM nátrium-bikarbonát, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 1% nem esszenciális aminosav keverék és 10% hőinaktivált főtális borjú szérum hozzáadása mellett. A HaCaT sejtenyészetet 2 mM L-glutamint, 23 mM NaHCO₃-ot, 100 U/mL penicillint, 100 U/mL streptomycint, 1%-os nem esszenciális aminosav keveréket és 10% borjú szérum albumint tartalmazó DMEM tápfolyadékban, a HL-60 sejtenyészetet pedig az előzőhöz hasonló összetételű RPMI 1640-es tápfolyadékban tenyésztettük.

4.2. Egér kísérletek

A kísérleteket hím és nőstény (5-5) C3H/HeJ egereken végeztük a Debreceni Egyetem Botanikus Kertben található Kísérleti Állatházban. Az állatokat konvencionális laboratóriumi körülmények között tartottuk, szemi-szintetikus diétát (Charles River Mo Kft, Gödöllő, Magyarország) és *ad libitum* csapvizet kaptak. Az egereket az UK Állatkísérletes bizottságának előírása szerint kezeltük, melyet a DEMÁB (Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság) engedéllyel hagyott jóvá (eng. sz: 16-1/2012/DE MÁB). A kísérletek során a metasztázis útvonal vizsgálatához a 8-10 hetes állatok először tustintát kaptak i.p. 0,2 ml-ben, majd 48 óra elteltével az állatokat felboncoltuk. A SCC VII egér karcinóma sejteket ($1,5 \times 10^5$) szintén 0,2 ml térfogatban oltottuk i.p. az állatokba, majd 30 nap elteltével az egereket nyaki diszlokációval áldoztuk fel. A boncolás során megnyitottuk a hasüreget az elsődleges tumor, illetve a *mediastinum*ot a timusz eltávolításához. Az egér boncolás során a felvételeket LED megvilágítású, 5 megapixeles felbontású kamerával készítettük.

4.3. Szövettani vizsgálatok, immunhisztokémiai jelölés

Az egerek boncolása után a paratimikális nyirokcsomókat tartalmazó tímuszt 4%-os formaldehidben fixáltuk. A mintákat paraffinba ágyasztuk, metszettük, majd hematoxylin-eozin festést alkalmaztunk rajtuk. A hasüregben kialakult primer tumor, valamint a tímuszon belüli, áttéteket tartalmazó nyirokcsomók szövettani vizsgálatát Dr. Hargitai Zoltán segítségével a Kenézy Gyula Kórház Pathológiai Osztályán végeztük el.

A formalin fixált, paraffinba ágyazott egér mintákban az áttétet tartalmazó nyirokcsomókban lévő karcinóma sejtek jelöléséhez citokeratin 14 (LL002, Biocare Medical, Pcheco, CA, USA) pozitív sejtek immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. A paraffin blokkokból 4 µm vastagságú metszeteket készítettünk, majd a hőindukált antigén visszakeresést EnVision FLEX Target oldattal (DAKO, Glostrup, Dánia) végeztük el. Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os hidrogén-peroxiddal blokkoltuk. Az elsődleges antitestek megjelenítésére immundetekciós kitként a speciális a Vector M.O.M.-ot (mouse-on-mouse) használtuk, mint egér monoklonális anti-CK14 antitestet. Az immunreakciót M.O.M. biotinilált anti-egér IgG (szobahőmérsékleten 10 perc) és 30 perces streptavidin-HRP (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) (1:300) kezelés segítségével végeztük el. A megjelenítést 3,3'-diaminobenzidine-nel végeztük, illetve a sejtmagokat hematoxylin-eozin festéssel ellenfestettük. A metszetekről a felvételek készítését LEICA DM 2000 mikroszkóppal végeztük el.

4.4. Kromatin struktúrák izolálása, fluoreszcens mikroszkópia

A DE Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken található munkacsoport már évek óta alkalmazza a különböző toxikológiai kísérletekben a kromatin kondenzálódási intermedierek analizését, mint genotoxicitás vizsgálatot. Bizonyítottuk, hogy a kromatin szerkezetek kialakulása a sejtciklus adott fázisára jellemzően zajlik le, amit már számos sejttypuson a jellegzetes kromatin formák bemutatásával leírtunk [165]. Kromatin kondenzálódás folyamata a következők szerint zajlik le: a G0/G1 fázisban a maganyag homogén, dekondezált állapotban figyelhető meg. G1/S fázisban a maganyag a replikáció helyén fellazul, emiatt heterogén megjelenést mutat. A korai S fázisban a fátyolos kromatin szerkezet jellemző, a szalagszerű kondenzálódás ezt követően az egész sejtmagra kiterjed. A késői S fázisban a szalagok kondenzálódása révén tömörebb, fonalas szerkezetek a jellemzőek. Ezt követően a szalagok további szupertekercselődésével a maganyag gyűrűszerű struktúrává

alakul, a G2 fázisban már kromoszóma előtelepeket figyelhetünk meg különböző kondenzáltsági fokkal. M fázisban (mitózis) már teljesen kondenzáldódott kromoszómák láthatóak. A sejtosztódás ana-és telofázisában a magállomány megkettőződését és különválását követően a maganyag újra szerveződik, majd újra tömörebb, homogén, dekondezálts szerkezetű lesz.

A SCC VII kromatin struktúrák izolálásnak lépései a következők:

A módszert eredetileg Bánfalvi és munkatársai dolgozták ki, mely során egér tímuszból izolált limfocita sejtek kromatin struktúráját vizsgálták [166]. A kísérleteinkben szereplő kontroll és metotrexáttal (MTX) kezelt sejtek sejtmag vizsgálatához is ezt a metodikát alkalmaztuk, mely során a sejteket T-25-ös sejtenyésző edényben tenyésztettük.

- 1) A reverzibilis permeabilizálás segítségével a sejtmembránok átjárhatóvá tehetők rövid ideig hipotóniás puffer alkalmazásával, mellyel lehetőség van például oligonukleotidok sejtekbe történő bevitelére, vagy mikroszkópos vizsgálatok esetén az interfázisos kromoszómák láthatóvá tehetők [167].

A sejteket centrifugálás segítségével ülepítettük, majd ezt követően reszuszpendáltuk. 10^6 számú SCC VII sejtet 1 ml permeabilizáló (hipotóniás) pufferben 0°C -on 2 percig inkubáltunk. A permeabilizáló pufferben található T-150 dextrán megakadályozta a sejtek szétesését a permeabilizálás során. A permeabilizáció megfordítására a sejtekhez 9 ml 10% FBS-t tartalmazó sejtenyésző tápfolyadékot adtunk. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk (500g, 5 perc), és friss 10% FBS-t tartalmazó médiumot adtunk a sejtekhez.

- 2) A sejtenyésző edényben a sejtszám (5×10^5) meghatározást követően a sejteket colcemiddel kezeltük. A sejtszám függvényében a médiumhoz 0,2 ng/ml koncentrációjú colcemidet adtunk, ezt 2 órás inkubáció követte. A sejteket ezt követően PBS-el mostuk át 2 alkalommal. Ez a lépés gyakorlatilag egy metafázisos blokknak felel meg, mivel a colcemid hatására a sejtek nem lépnek a következő sejtciklusba.
- 3) Ezután a sejtek ozmotikus duzzasztásához swelling (duzzasztó) puffert használtunk, 10 percig 37°C -on történt az inkubáció. Swelling puffer összetétele: 50 mM KCl, 3 mM ditiotritol, 5 mM NaPO_4 és 10 mM MgSO_4 , pH 8.0). A duzzasztó puffert centrifugálással (500g, 5 perc) távolítottuk el.

- 4) A magizolálás során a pellet sejtjeihez lassan 1 ml jégcet:metanol (1:3) elegyet adtunk, a sejtmagokat ezzel a fixálószerrel mostuk kétszer, majd 2 ml fixáló elegyben vettük fel őket.
- 5) A fixáló oldatban felvett sejtmagokat kb. 30 cm magasról mikroszkóp fedőlemezre cseppentettük Pasteur-pipetta segítségével, ezt követően a lemezeket szobahőmérsékleten hagytuk száradni éjjelre. PBS-sel történő átmosást követően a lemezeket felszálló alkoholsorban (70%, 90%, 95%, 100%) dehidráltuk.
- 6) A tárgylemezeken lévő dehidrált mintákat 20 µl DAPI-Antifade keverékkel festettük meg, majd fedőlemezrel lefedtük őket. Az antifade médium összetevői: 1,4-diazobiciklo-(2,2,2)-oktán; 20 mM Tris-Cl; pH 8.0; 0,02% nátrium-azid és 25 ng/ml DAPI. A minták befotózása fluoreszcens mikroszkóppal, DAPI (em.: 417-477 nm, ex.: 352-402 nm) szűrő alkalmazásával (Nikon Eclipse E800 Nikon Corporation, Tokyo) történt.

A mikronukleuszok számát az összes maghoz viszonyítva adtuk meg mikronukleusz indexként. Az alkalmazott MTX koncentrációk: 0 (kontroll); 0,1; 1; 10 és 100 µM-os MTX. A sejtmagokat (kísérletenként 100) minden koncentrációnál három alkalommal meghatároztuk, és az átlagot vettük mikronukleusz indexnek.

4.5. Mikronukleusz vizsgálat Giemsa-festéssel

A SCC VII sejtek sejtmagjában MTX által indukált mikronukleusz képződés bizonyítására Giemsa festést is alkalmaztunk. A mikroszkópos megfigyeléshez az előző pontban leírt sejtmag izolálási protokoll végén a sejtmagokat óvatosan a tiszta tárgylemezre pipettáztuk, levegőn szárítottuk és 3%-os Giemsa-oldattal festettük, majd a tárgylemezre fedőlemezt helyeztünk. A metszeteket fénymikroszkóp (63x nagyítású objektív) és a mikroszkóphoz kapcsolható digitális kamera segítségével fotóztuk be.

4.6. H-AG és MFH-AG mikrorészecskék előállítása

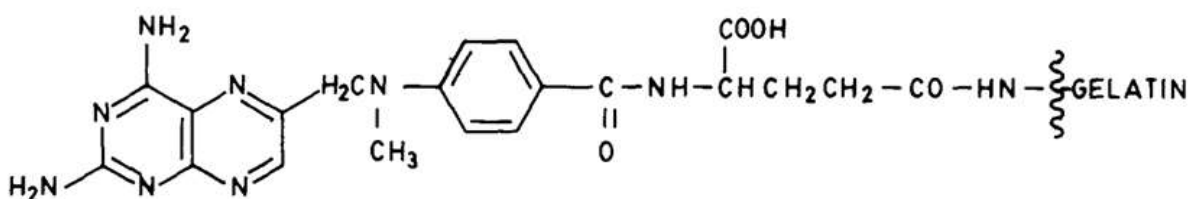
4.6.1. Anyagok és vegyszerek

A hibrid aerogélek szintéziséhez használt tetrametil-ortoszilikátot (TMOS) a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) Kft., a zselatin (A típusú, 150 kDa, étkezési tisztaságú) pedig a Martin Braun Kft. terméke volt. Az 1-etil-3-(3-diamino-propil) karbidoimid-hidroklorid

(EDC), a metotrexát és a borjú lépből izolált cathepsin-B (liofilezett por, ≥ 10 unit/mg fehérje) enzimet, illetve egyéb szervesetlen vegyszereket (NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , HCl , NaOH) szintén a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk. A metanolt, acetont és ammonium-karbonátot a Fluka-tól szereztük be. A szuperkritikus CO_2 -t 99,95%-os tisztaságú gázból állítottuk elő. Minden vizes oldatot Milli-Q víz hozzáadásával készítettünk el.

4.6.2. Zselatin-metotrexát konjugátum előállítása

A zselatin-MTX konjugátumot Kosasih és munkatársai által leírt szintézis protokoll alapján készítettük el [86]. A zselatint (0,5 g) feloldottuk 30 ml 0,05 M-os NaHCO_3 -ban, majd hozzáadtuk a 150 mg MTX-ot tartalmazó, 15 ml 0,05 M-os NaHCO_3 oldatot. Az oldat pH-ját HCl oldat segítségével pH 6-ra állítottuk be, majd szobahőmérsékleten 2 órán át 300 rpm-en kevertettük. Ezt követően 1-etil-3-(3-diaminopropil)-karbodiimid hidrokloridot (750 mg) adtunk a keverékhez és tovább hagytuk kevertetni éjjelre. A konjugátum tisztításához foszfát puffert tartalmazó (0,05 M, pH 7.4) 7000 MWCO SnakeSkin dialíziscsővet használtunk. A puffert 24 óra után lecseréltük, és további 5 dializáló ciklust alkalmaztunk. Végül a száraz zselatin-MTX konjugátumot (1. ábra) liofilezéssel kaptuk meg.



Zselatin-metotrexát konjugátum

1. ábra. Metotrexát kapcsolása zselatin oldallánchoz amid kötésen keresztül [85].

4.6.3. Metotrexáttal funkcionizált hibrid aerogél előállítása

A MTX tartalmú szilika-zselatin hibrid aerogél elkészítéséhez egy korábban publikált metodikát használtunk fel [148]. A zselatin-MTX konjugátumot (0,55 g) és 70 mg $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -ot 20 ml desztillált vízben oldottuk be, a folyadék szobahőmérsékletre történő lehűtése után 7 ml metanolban 3 ml tetrametil-ortoszilikátot oldottunk fel, és hozzáadtuk a diszperziós közeghez. A reakcióelegyet erőteljesen kevertettük, és henger alakú műanyag formába öntöttük az alkogél képződéséhez. 24 óra elteltével az alkogélt eltávolítottuk az öntőformából, majd egy

perforált alumínium tartályba helyeztük a többlépcsős oldószercseréhez. Először az alkogélt 24 órára tiszta metanolba helyeztük dehidratálás céljából, ezt követően pedig a metanolt tiszta acetonnal cseréltük 4 lépésben 24 órán keresztül. Az acetont további 3 alkalommal cseréltük friss oldószerezre, majd egy folyamatosan működő oldószer regeneráló és extrahálóegységet alkalmaztunk annak érdekében, hogy a porózus rendszerből az összes vizet eltávolítsuk. Az extraháláshoz használt oldószerekben nem észleltünk MTX kioldódást. Az acetont folyékony állapotú CO_2 -vel vontuk ki a rendszerből egy autoklávban 5,4 MPa nyomáson, szobahőmérsékleten. Végül a gélt szuperkritikus CO_2 (14 MPa, 80 °C) segítségével szárítottuk ki [168]. Korábban publikált eredmények alapján a fenti szintetikus eljárás biztosítja, hogy molekuláris szinten a zselatin teljes mennyisége beépül az aerogélbe, szilika-zselatin hibrid aerogélt eredményezve [148, 149]. A hibrid aerogél összetételét termikus analízis segítségével 65 m/m% szilikára és 35 m/m% zselatin-MTX-re becsültük. A hibrid aerogél készítése során nem detektáltunk MTX kioldódást, így megállapíthatjuk, hogy a hibrid aerogél teljes szárazanyag tartalmának 6 m/m%-a volt MTX. Használat előtt az aerogélt először szárazon, mechanikusan porítottuk achát dörzsmozsárban, majd nedvesen Potter-Elvehjem szövet grinderrel (Mediker, Budapest, Magyarország) 10 percig. Ezzel a módszerrel a szilika-zselatin részecskék könnyen, reprodukálható módon 10-20 μm -es átmérővel rendelkeztek.

4.7. MFH-AG részecskék elektronmikroszkópos és porozitás vizsgálata

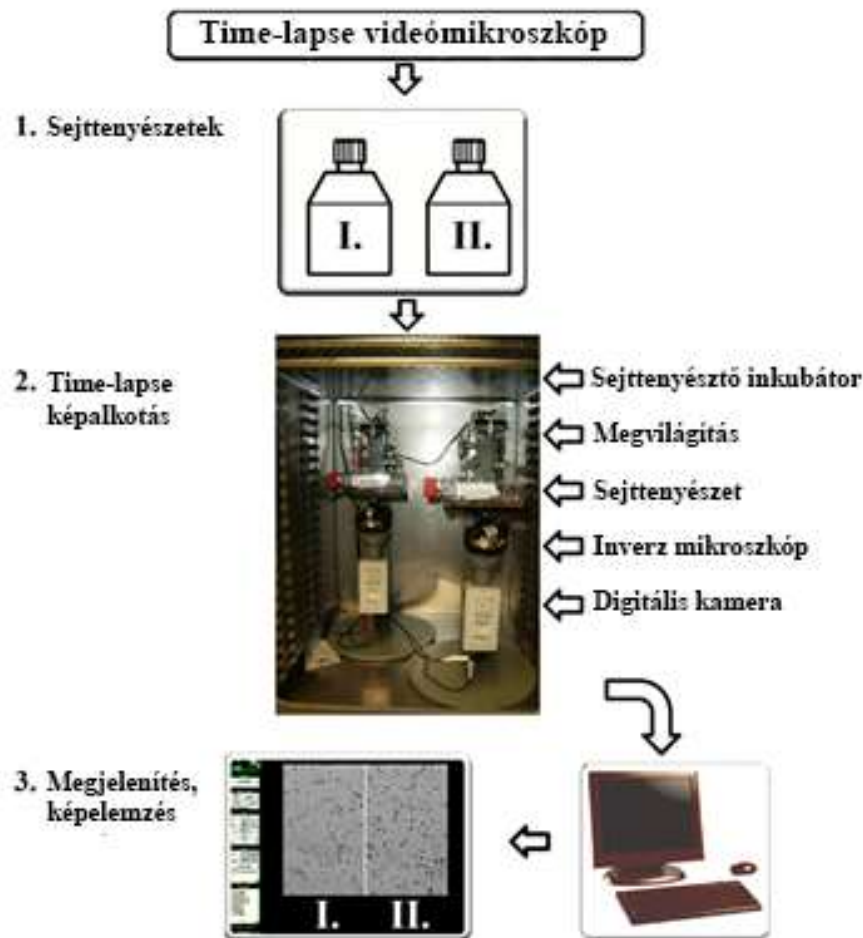
A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) és porozitás vizsgálatokat Dr. Veres Péterrel végeztük el. A SEM képeket Hitachi S-4300 (Hitachi, Tokyo, Japán) mikroszkóp segítségével készítettük el. A monolitból frissen levágott aerogél darabokat szén szalagokra rögzítettük, és 5-6 atomréteg vastag, aranyozott vezetőréteggel borítottuk, illetve 10-30 kV-os gyorsítófeszültséget alkalmaztunk. Az aerogél minták fajlagos felületét, pórus méret eloszlását és fajlagos pórus térfogatát N_2 adszorpció/deszorpció porozimetria (Quantachrome Nova 2200e) alkalmazásával mértük meg 80 °C-on 24 órás gáztalanítást követően. A fajlagos felületet a többpontos BET módszer alkalmazásával számítottuk ki. A pórusméret eloszlását BJH módszerrel számoltuk ki a deszorpció görbéből.

4.8. MFH-AG részecskék sterilizálása és kondicionálása

A szilika-zselatin aerogél részecskéket 48 óráig sterilizáltuk UV-sugárzással az *in vitro* kísérletek előtt. A kitapadási, adhézios kísérletekhez 1-2 mm vastag részecskéket használtunk, míg a migrációs vizsgálatokhoz rostált, kerek ($d < 125 \mu\text{m}$) részecskéket használtunk. Az aerogél mintákat UV áteresztő műanyag mintatartóba helyeztük, a megvilágítás végig 360° -ban történt. A sterilizálást követően az aerogél részecskéket 3 órán át sejtmertes médiumba helyeztük, majd a részecskéket átpipettáztuk a sejteket tartalmazó sejtenyésztő edénybe.

4.9. Time-lapse videómikroszkópia

A biokompatibilitási vizsgálatokhoz a hosszú távú megfigyelésre alkalmas time-lapse videómikroszkópot (2. ábra) használtuk: az inkubátor típusa SANYO MCO18-AC CO_2 sejtenyésztő inkubátor (Wood Dale, IL, US), melyben 4 videó mikroszkóp található, melyekkel akár ugyanabból a sejtenyészetből származó, kontroll és kezelt sejtpopulációk párhuzamosan futó megfigyelése is elvégezhető. Az inverz állású, Olympus típusú (Toyo, Japán) mikroszkópokban az alábbi módosításokat végeztük el: a fényforrást a revolvertoronyba, a CCD kamerát pedig az okulár helyére telepítettük. Az objektívek (x10:0,25, achromat Carl Zeiss, Jena, nagy látóterű objektívek) a CCD kamera előtt helyezkednek el. A 2 megapixel felbontású CCD kamerán további módosításokat hajtottunk végre: a kameraházat, objektíveket, és infraszűrőt is eltávolítottuk. Fényforrásként 960 nm hullámhosszúságú, közeli infravörös fényt emittáló LED-et alkalmaztunk a fototoxicitás minimálisra csökkentéséhez [169]. A rendszer előnyei közé tartozik, hogy a sejtpopulációkban bekövetkező változások valós időben követhetők, illetve szükség esetén vissza nézhetők és ellenőrizhetők. A bemutatott rendszer lehetővé teszi a sejtek nem csak populációs, hanem egyedi szinten történő megfigyelését több sejtcikluson keresztül. A rendszer segítségével elkészített képsorozatot videófelvétellé konvertálhatjuk, majd a felvétel statisztikai képelemző módszerekkel történő feldolgozása nagy időbeli felbontású adatokat biztosít a toxikus folyamatok dinamikai vizsgálatához.



2. ábra. Time-lapse videómikroszkóp felépítése.

4.10. Digitális képanalízis

A time-lapse rendszerrel készített képszekvenciák elemzését az ImageJ programmal végeztük el, ami egy nyílt forráskódú Java-alapú képfeldolgozó rendszer. A program ingyenesen letölthető a hivatalos honlapról (<https://imagej.nih.gov/ij/>), futtatása asztali alkalmazásként vagy online applet-ként is lehetséges. Az ImageJ az egyik leggyorsabb, tisztán Java nyelven írt képfeldolgozó keretrendszer. Az ImageJ-ben megtalálható több képjavító, illetve helyreállító művelet, többek között tudunk simítani, élt detektálni, medián szűrést, illetve küszöbölést (thresholding) végrehajtani 8-bites szürkeárnyaltos, és színes képeken is egyaránt. A program szabadon bővíthető különböző macro-val, script-el vagy plugin-okkal. Ezekkel a bővítésekkel lehetőségünk van extra opciókat importálni a programba, az adott mérési igényeknek megfelelően.

A sejt motilitási vizsgálatokhoz az ImageJ programhoz ingyenesen letölthető MtrackJ plugint használtuk. A programba különböző adatok megadásával (hemocitóméterről készült kép alapján méret, és a képek között eltelt idő) elvégeztük a képek kalibrációját, mely segítségével a pixel értékeket μm -es értékekre tudtuk átváltani. Ezt követően a képszekvenciákon belül az egyes képeken a sejteket manuálisan jelöltük ki, mellyel a program minden egyes sejthez adatpontokat rendelt a sejtek helyzetéről. Ezeket az adatpontokat koordináta-rendszerbe helyeztük, mellyel együtt a program megadta az egyes sejtek által megtett utat, a sejtek sebességét. A kapott koordináta-rendszerben a fekete nyilak a pozitív, míg a piros nyilak a negatív irányú elmozdulást jelölték.

4.11. MFH-AG részecskeméret eloszlás vizsgálat

A MFH-AG monolit tömbből nyert 2-3 mm-es darabokat pufferbe (pH 7.4 PBS) helyezve szöveti homogenizátorral 10 percen keresztül mechanikailag kezeltük, illetve szonikáltuk 10 percig. A SCC VII sejtek és a MFH-AG mikrorészecskék méreteloszlását hemocitóméter és digitális képanalízis segítségével mértük meg. A képeket 1,3 megapixeles USB mikroszkóp kamerával (MicroQ-W Pro) készítettük, és az ImageJ programot használtuk a sejtek és a mikrorészecskék méreteloszlásának a meghatározásához. Az eredmények kiértékeléséhez Excel programot (Microsoft Office) használtunk. Ezen kívül a MFH-AG mikrorészecskék méreteit lézerdiffrakciós méreteloszlási (Mastersizer 2000, MALVERN Instruments) módszerrel is megmértük. A MFH-AG részecskék méretében bekövetkező változások követéséhez 2 órán keresztül, 10 percenként végeztük a méréseket.

4.12. A MFH-AG részecskékből történő MTX felszabadulásának vizsgálata

A MFH-AG részecskékből történő MTX felszabadulást úgy vizsgáltuk, hogy a mikronizált MFH-AG részecskéket 72 órán át különböző vizes közegben áztattuk. A részecskék koncentrációja mindig 1 mg/ml volt. Először a sejtmentes vizsgálatokhoz 3 pufferoldatot használtunk: 0,01 M-os HCl oldatot, acetát puffert (pH 5.0) és PBS-t (pH 7.4). A széles pH tartományban történő MTX felszabadulás megmérésének a célja volt annak meghatározása, hogy a konjugátum hidrolitikusan stabil-e sejtmentes környezetben, vagy nem. A három különböző pH érték segítségével a szervezeten belüli adszorpciós körülményeket modelleztük. A kioldódást szérum mentes DMEM-HAM'S F12 tápfolyadékban is vizsgáltuk, mely 2 mM L-

glutaminnal, 23 mM NaHCO₃-mal, 100 U/ml penicillinnel, 100 U/ml streptomocinnel, 1% nem esszenciális aminosav keverékkel volt kiegészítve. Az előzőekben leírt tápfolyadékot 10% magzati borjú szérummal (FBS) kiegészítve is vizsgáltuk a MTX kioldódást a MFH-AG részecskék jelenlétében.

Az MFH-AG részecskék SCC VII sejtekkel történő inkubálása (T-25-ös sejttenyésztő edényben, 5×10^5 sejtszám mellett) során 5 vizsgálati csoporttal végeztük el a kísérleteket: 1) a sejttenyészetek felülúszóinak szabad MTX tartalmát a tenyészetek MFH-AG részecskéikkel történő inkubálása után mértük meg. 2) A SCC VII sejteket DMEM-HAM'S F12 tápfolyadékban történő tenyésztést követően a SCC VII sejtek felülúszóját is felhasználtuk a MFH-AG részecskékből történő MTX felszabadulás tesztelésére. Kiegészítésként, a sejttenyésztő edény alját 1 %-os zselatinnal vontuk be, majd a SCC VII sejteket ezen a felszínen tenyésztettük 72 órán keresztül. A sejteket ezt követően összegyűjtöttük, majd szonikáltuk őket. 3) Az intakt sejttenyészet felülúszóját, illetve 4) a szonikálás után kapott lizátumot külön-külön inkubáltuk a MFH-AG részecskéikkel a MTX felszabadulás tesztelésére. 5) A mikrorészecskéket 24 órán keresztül cathepsin-B (PBS-ben, 1 U) enzimmel inkubáltuk a MFH-AG enzimatis emésztésének teszteléséhez. A felszabadult MTX mennyiségét az összes kísérletben UV spektroszkópiával határoztuk meg, az egyes minták standard adagolásának módszerével. Az UV spektroszkópiás vizsgálatokhoz a mintákat tartalmazó puffert és tápfolyadékot ötszörösre hígítottuk, a mérésekhez alkalmazott hullámhosszak pedig 302, 312 és 372 nm voltak. Az UV-Vis vizsgálatokhoz használt fotométer típusa Agilent Cary 60 volt.

4.13. Sejtek életképességének meghatározása MFH-AG mikrorészecskéikkel történt kezelés után

A sejtek életképesség vizsgálatát 96-lyukú lemezekon végeztük el. SCC VII és HaCaT sejtekből $2,5 \times 10^3$, HL-60 sejtek esetén pedig 5×10^3 számú sejtet helyeztünk a 96-os mikroplate-en található lyukakba. A kísérletek során az inkubációs idők (24, 48 és 72 óra) letelte után a sejteket 2 alkalommal PBS-sel mostuk (100 µl), majd hozzáadtunk 100 µl MTT reagenst (MTT reagens koncentrációja: 0,5 mg/ml), ezután a lemezeket 3 órára visszahelyeztük a sejttenyésztő inkubátorba. Ezt követően az MTT oldatot eltávolítottuk, a létrejött formazán kristályokat 200 µl DMSO-ban (dimetil-szulfoxid) oldottuk fel, majd fél órás inkubálás után a lemezeket 570 nm-en fotometráltuk. A mikrolemezekon háttér abszorbanciát is mértünk, szintén 570 nm-en.

A kezelt sejtek életképességét a kontroll sejtek életképességéhez viszonyítva százalékos (%) értékben fejeztük ki.

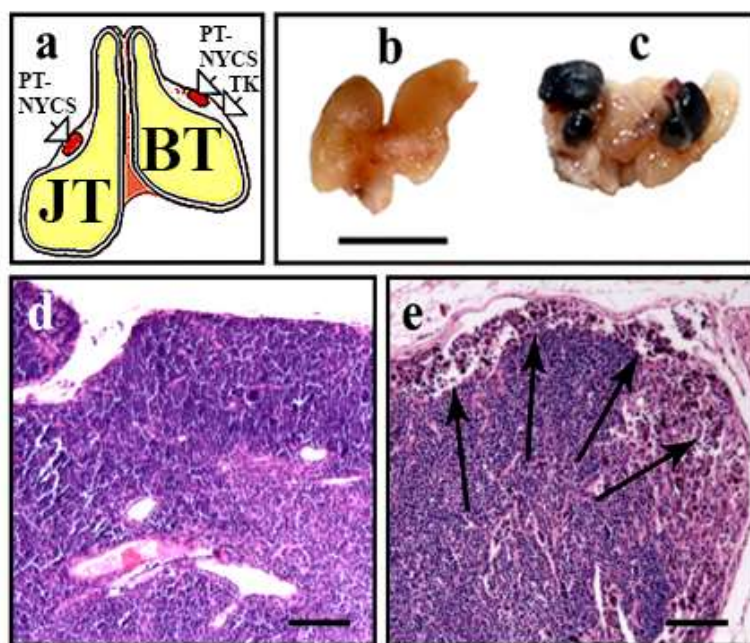
4.14. Statisztika

Az eredményeket átlagérték $\pm$ szórás (standard deviáció) formában adtuk meg. Az eredmények statisztikai analízisét t-próbával, vagy többszörös összehasonlítás esetén ANOVA módszerrel végeztük el. A statisztikai analízist GraphPadPrism 6 Windows szoftverrel (Graphpad szoftver, San Diego California, USA) végeztük. A $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ eredményeket tekintettük szignifikáns módon eltérőnek.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A tus szemcsék i.p. oltása után a kolloid részecskék megjelentek a paratimikális nyirokcsomókban

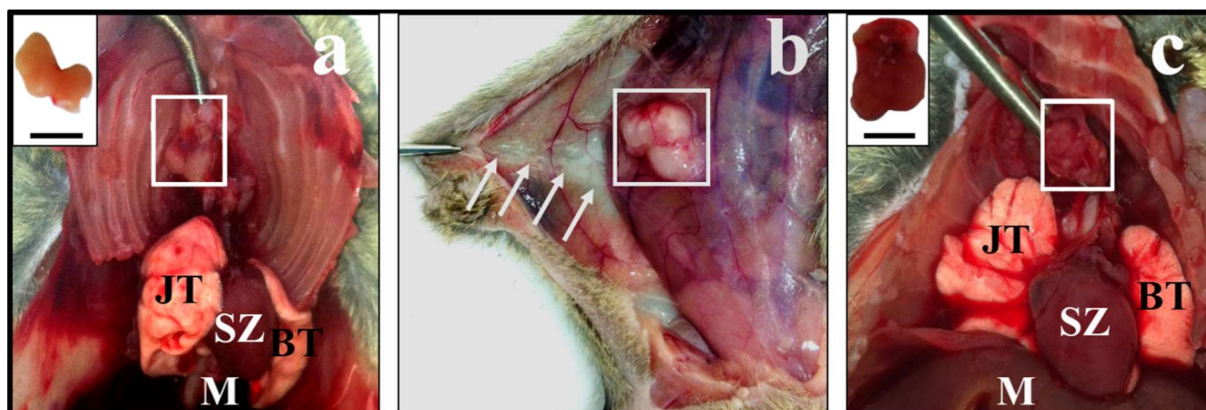
Az intra-, és retroperitoneális térből a *mediastinum*ba nyíló nyirokerek drenálják a hasüregi folyadékot, melyet a *mediastinum*ban lévő nyirokcsomók szűrnék át. Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban, patkány állatmodellben bizonyította ezt az anatómiai összeköttetést, mely érintett a peritoneális, illetve retroperitoneális térből történő metasztázisok során [170]. Első kísérleteinkben ezt az anatómiai útvonalat kívántuk vizsgálni egér állatmodellben. A kontroll C3H/HeJ egerek hasüregébe (2 hím és 2 nőstény) 200 µl fiziológiás sóoldatot adtunk, majd az ép tímuszokat 48 órával az oltást követően eltávolítottuk. A tus szemcséket tartalmazó szuszpenziót szintén i.p. adtuk be az egereknek, majd a tust tartalmazó tímuszokat 48 óra múlva távolítottuk el az állatokból. A részecskék a tímusz 2 felső részén található, egymással szimmetrikusan elhelyezkedő nagyobb, illetve az ezek alatt található 2 kisebb paratimikális nyirokcsomókban dúsultak fel (3-c ábra). Szövettani képen látható volt, hogy a tus részecskék a nyirokcsomók kéreg (cortex) régiójában voltak megtalálhatók (3-e ábra fekete nyilak). (Anyagok és módszerek 4.2.).



3. ábra. A tímusz felépítésének sematikus ábrája a) ábra: (PTNYCS: paratimikális nyirokcsomók, TK: tímusz kapszula, JT és BT: tímusz jobb és bal oldali lebenye). A kontroll és a tus szemcséket tartalmazó tímusz makroszkópos (b, c), és mikroszkópos (d, e) képe. Jelzések: b, c: 0,5 cm; d, e: 50 µm.

5.2. Az SCC VII sejteket C3H egerek hasüregébe oltva áttétet adtak a paratimikális nyirokcsomókba

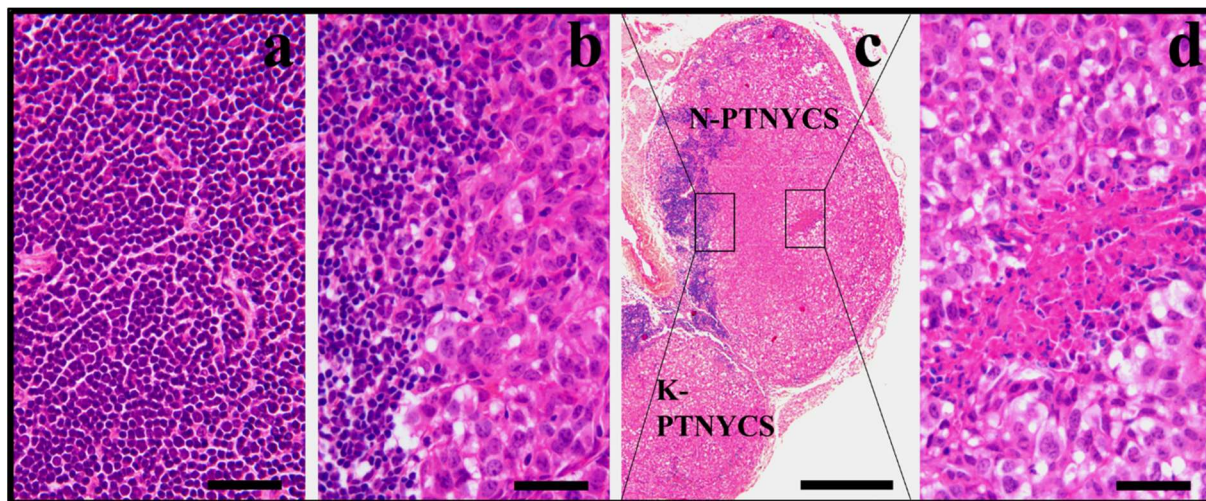
A kontroll C3H egereket (5 db) 200 µl fiziológiás sóoldattal, a kezelt állatokat (5 db) pedig SCC VII sejteket ($1,5 \times 10^5$) tartalmazó 200 µl szuszpenzióval oltottuk be intraperitoneálisan, majd az egereket 30 nap elteltével feláldoztuk. A boncolás során a hashártyán kialakult primer tumort, illetve az áttétet tartalmazó tímuszt távolítottuk el. A *mediastinum*ban elhelyezkedő tímusz a 4-a ábrán látható. A hashártya felszínén figyeltük meg a primer tumor jelentős részét, valamint a hasfal hashártya felőli részén is megfigyelhető volt (4-b ábra) az áttétek kialakulása. A hasüregbe történt tumor sejtek oltása után a tímusznak a megnagyobbodását, valamint gyulladt, vöröses színű elváltozását tapasztaltuk. A szerveket további felhasználásig, illetve szövettani vizsgálatokig 4%-os formaldehidbe helyeztük.



4. ábra. Elsődleges daganat kialakulása a hasfalon, illetve metasztázis az egér tímuszban. a) ábra: kontroll állatok tímusza az i.p. oltást követő 30. napon, a bal felső képen az izolált tímusz látható. Jelzés: 0,25 cm. b) ábra: Primer tumor (négyzettel jelölve) kialakulása a hashártyán a daganatos sejtekekkel történő oltást követő 30. napon. A hasfal belső részén található áttéteket fehér nyilak jelölik. c) ábra: Áttétet tartalmazó tímusz fehér kerettel jelölve, a bal felső ábrán a megnagyobbodott tímusz látható. Rövidítések: JT-BT: jobb és bal tüdő lebeny, SZ: szív, M: máj. Jelölés: 0,25 cm.

A kontroll és az áttéteket tartalmazó paratimikális nyirokcsomó metszeteken hematoxylin-eozin festést (H-E) alkalmaztunk. Az egészséges nyirok szövet túlnyomóan bazofil színű sejtjei (5-a ábra) jelentősen eltértek mind morfológiában, mind színben az eozinofil festődésű daganatos szövet sejtjeitől (5-b ábra). A tumoros szövetet atípiás magok, magas sejtdenzitás és az osztódó sejtmagok nagy száma jellemezte. A daganatos sejteket tartalmazó, megnagyobbodott bal és a kisebb jobb tímusz lebenyek az előző 4-c ábrán láthatóak. A paratimikális nyirokcsomó túlnyomó részét tumoros szövet jellemezte, melynek belső

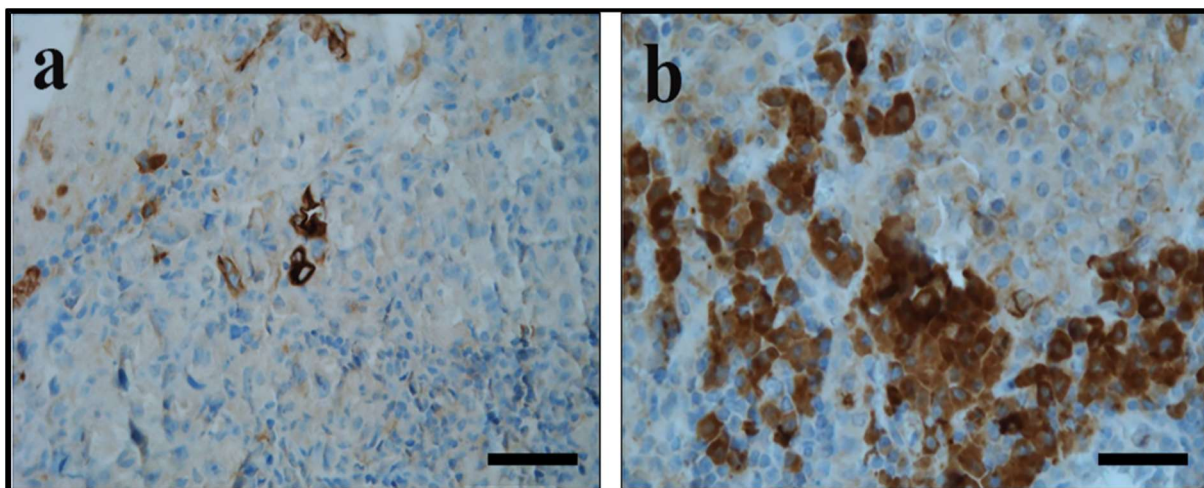
résében nekrotizált régió volt látható (5-d ábra). A nyirokcsomó metasztázist tartalmazó belső része nekrotizál, a külső része felszakad, így a vér és a tumor sejtek a környező szövetekbe szűrődnek. Az így kiáramló vér-és daganatos sejtek további nyirokcsomókba szűrődnek, a korábbi patkány modellhez hasonlóan a paratimikális nyirokcsomók az őrszem nyirokcsomók (Anyagok és módszerek 4.3.).



5. ábra. A paratimikális nyirokcsomók H-E festése. a) ábra: a kontroll nyirokcsomó szövettani képe. b) ábra: az ép és az áttétet tartalmazó nyirok szövet határa. c) ábra: a nagyobb (N-PTNYCS) és a kisebb (K-PTNYCS) paratimikális nyirokcsomók szövettani képe. d) ábra: a daganatos szövetben található nekrotizált régió. Jelzések: a, b, d: 50 μ m (40x nagyítás) c: 500 μ m (5x nagyítás).

5.3. Immunhisztokémiai jelölés

A diagnózist segíthetik egyes, a daganatban is kimutatható antigének, úgynevezett tumormarkerek, melyek utalhatnak a daganat eredetére, a differenciáltságára és a prognózisra is. Vizsgálatainkban az immunhisztokémiai jelölést megbízható módszerként alkalmaztuk a laphámsejtes karcinóma áttét paratimikális nyirokcsomón belüli megjelenítésének a bizonyítására. A kontroll nyirokcsomók is adtak kis mértékben pozitív jelet, ezek a kontroll szövetben megtalálható Hassal-testek voltak, melyek keratinizált régiók a nyirokszövetben (6-a ábra). Az áttétet tartalmazó paratimikális nyirokcsomókban a daganatos sejtek jelölésére használt citokeratin-14 (CK14) festés igazolta a SCC VII sejtek jelenlétét a rosszul differenciált szövetben (6-b ábra) (Anyagok és módszerek 4.3.).



6. ábra. Citokeratin 14 (CK14) pozitív sejtek immunhisztokémiai detektálása a kontroll (a) és áttétet tartalmazó (b) paratimikális nyirokcsomókban. A pozitív sejtek sötétbarnára festődtek. Jelzések: 50 μ m (40x nagyítás).

5.4. Kromatin kondenzálódási intermedierek vizsgálata metotrexáttal történő kezelés után

5.4.1. Metotrexát indukálta genotoxicitás a SCC VII sejtek magjaiban reverzibilis permeabilizálást követően

A metotrexát (MTX), mely a dihidrofolát reduktáz enzim inhibitora, mikronukleusz képződést indukál és további kezeléssel ez fokozható [171, 172]. Többszöri kezelés hatására egér csontvelői sejtekben több mikronukleusz és kromoszóma aberráció volt megfigyelhető, mint egyszeri kezeléskor. Mások viszont azt tapasztalták, hogy az MTX plazma szintje nem, vagy csak kis különbséget mutatott egyszeres és a négyszeres kezelés között [173]. A mikronukleuszokat a Yamamoto és Kikuchi által meghatározott morfológiai kritériumok szerint listázhatjuk, azaz normál, dupla, többszörös, gyűrű alakú és nagyméretű. A nagyméretű mikronukleuszok viszonylag akkor voltak gyakoriak, amikor a sejteket aneugén, az osztódási orsókat gátló vincristin-nel kezeltük, ami aneuploidiát okozott. Trietil-amin hatására kromoszóma törések és kisebb mikronukleuszok képződtek [174].

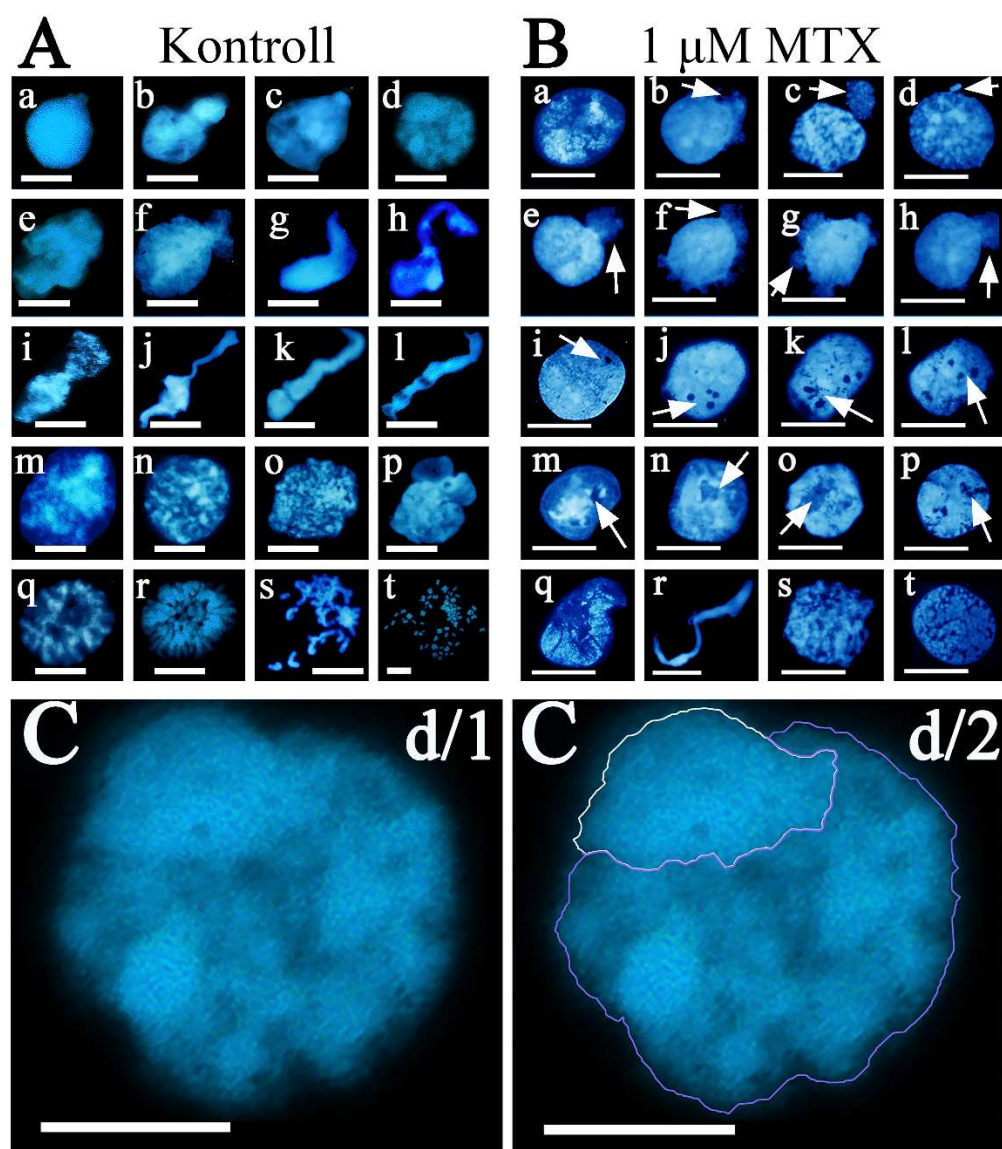
A MTX-ot, mint folsav antagonistá antimetabolitot, széles körben használják daganatellenes szerként szignifikáns klasztogén hatása miatt [175]. A kromatin toxicitási hatást dózis függő módon, reverzibilisen permeabilizált patkány myeloid leukémia sejteken korábban vizsgálták [176]. Amikor a patkány myeloid leukémia sejteken a MTX kezelés 0,1 μ M alatt volt, nem volt megfigyelhető változás az interfázisos kromatin struktúrákban. A 0,1 és 10 μ M-os

koncentrációkon az apoptotikus kromatin zsugorodás korrelált az alkalmazott MTX dózissal, apoptózis elsősorban a korai S fázisban mutatkozott meg. Magasabb MTX koncentrációknál (~ 20 μM) nekrotikus zavar volt látható, valamint fontos megjegyezni, hogy a legalacsonyabb nekrotikus koncentráció megegyezett a legmagasabb MTX koncentrációval, ami már apoptózist okozott (10 μM) [176].

A reverzibilisen permeabilizált SCC VII sejtek kromatin kondenzálódási mintázatát a 7-A ábra mutatja. Az 1 μM -os MTX kezelést követően a SCC VII sejtek magjában a következő négy fő kromatin változást láttuk (a 7-es ábrán fehér nyilakkal jelöltük a kromatin változásokat):

- 1) mikronukleusz szerű formák (7-B ábra a-d)
- 2) a fibrilláris kromatin kijutása a sejtmag egy- vagy több pontján, mely a membrán károsodására utal, itt nem egyetlen mikronukleusz képződéséről van szó (7-B ábra e-h)
- 3) egy vagy több kis lyuk megjelenése a magmembránban a MTX által okozott membrán károsodást mutatja (7-B ábra i-l)
- 4) kiterjedt membrán károsodás nagyméretű lyukakkal a membránon (7-B ábra m-p)

MTX kezelést követően a kromatin kondenzálódás nem érte el a metafázist és a szalagformák kialakulása után gátlódott, valószínűleg az elégtelen szupertekercselődés miatt (7-B ábra q-t). A 7-A ábra d paneljét választottuk a mikronukleusz képződés szorosabb vizsgálatához (7-C ábra d/1), ami azt mutatta, hogy a mikronukleusz a maganyag jól definiált része, valamint jól megkülönböztethető a több kromoszómát tartalmazó makronuklesztól (7-C ábra d/2) (Anyagok és módszerek 4.4.).

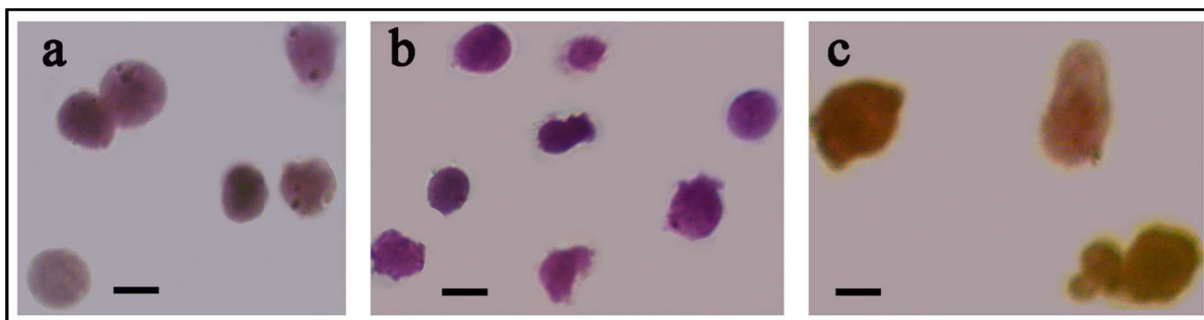


7. ábra. Kontroll (A) és 1 μM -os MTX (B) kezelt SCC VII sejtmagokban lejátszódó kromatin kondenzálódás. Az (A) ábra d panelje lett kiválasztva a közelebbi vizsgálathoz, a mikronukleuszt (d/2 ábra felső része) fehér, és a makronukleuszt (d/2 ábra alsó része) kék színű jelölés mutatja. Jelzések az ábrákon: 5 μm .

5.4.2. Mikronukleusz kialakulásának igazolása nem permeabilizált SCC VII sejtekben Giemsa-festéssel

A Giemsa-festést annak a bizonyítására használtuk, hogy az MTX kezelés mikronukleuszokat generál. A 8. ábrán látható a mikronukleuszok képződésének előzetes vizsgálata SCC VII sejtek sejtmagjában MTX kezelést követően. A sejtmagokat intakt sejtekből izoláltuk és Giemsa-festéssel festettük (8. ábra): a kontroll (8-a ábra), a 10 μM -os (8-b ábra) és

a 100 μM -os (8-c ábra) MTX kezelést követően a sejtmagokat izoláltuk és festettük (Anyagok és módszerek 4.5.).



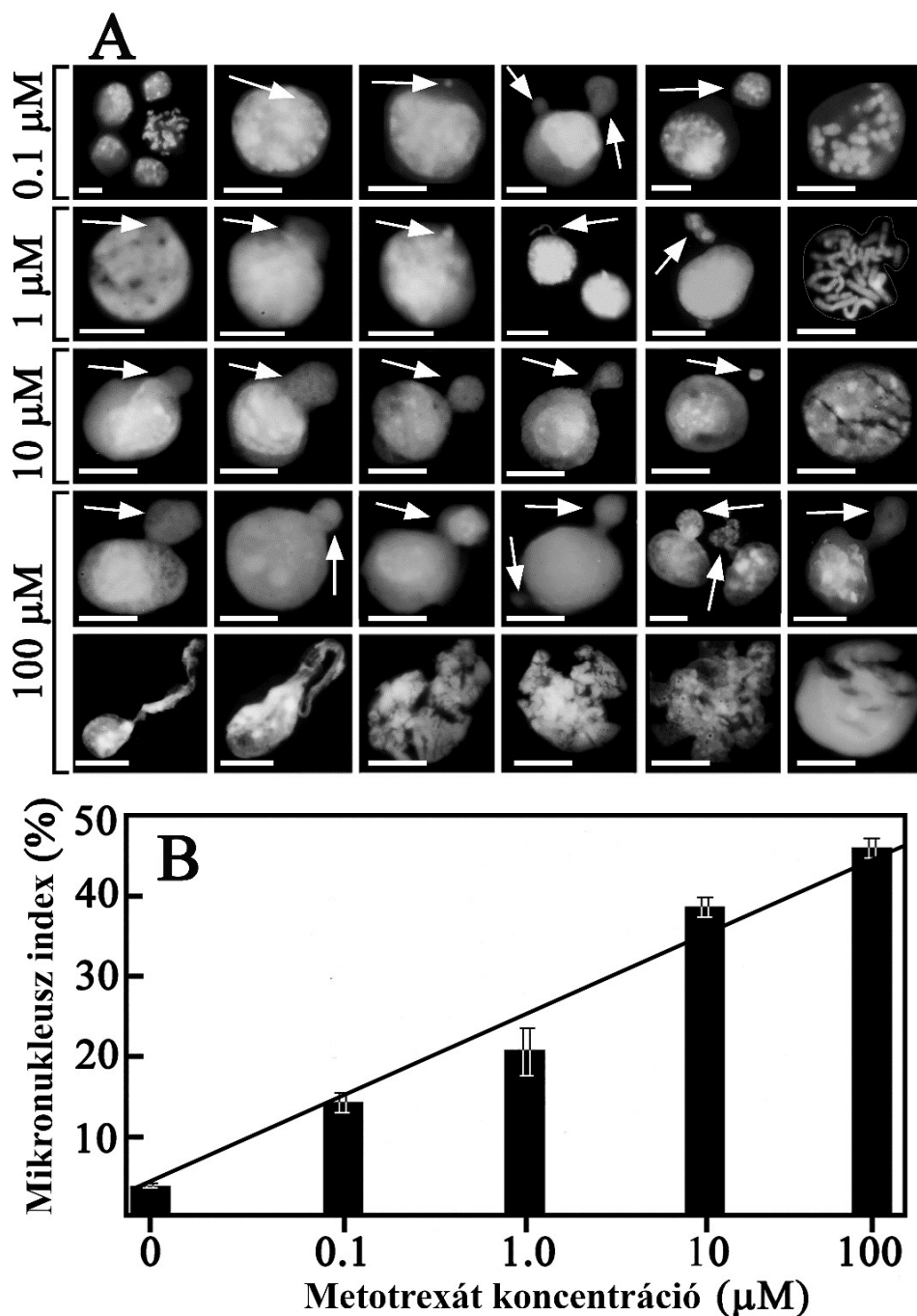
8. ábra. A MTX kezelést követően kialakult mikronukleuszok Giemsa-festése. Az exponenciálisan növekvő SCC VII sejteket 9 óráig kezeltük MTX-al (10 és 100 μM), majd sejtenyésző inkubátorba 37 °C-ba helyeztük őket, ezt követően pedig izoláltuk a sejtmagokat és megfestettük őket. a) kontroll sejtmagok b) 10 μM -os MTX-al kezelt sejtek apoptotikus sejtmagjai c) 100 μM -os MTX kezelést követő sejtmagok nagyméretű mikronukleuszokkal. Jelzések az ábrákon: 5 μm .

5.4.3. MTX által indukált mikronukleusz képződés nem permeabilizált sejtekben

MTX jelenlétében a permeabilizálás elhagyása növelte a mikronukleuszok kialakulását dózis függő módon. A MTX kezelés a hasonló és jellegzetes mikroméretű magstruktúrák gyakoriságát növelte, de a magmembránt nem nyitotta fel az alatta lévő kromatin struktúrák kijutásához (9. ábra). Ez a megfigyelés azt mutatta, hogy a korai S fázisban a mikronukleusz kialakulás nemcsak a kromatin foldingban kritikus, hanem a megjelenésük a gentoxikus ágens által okozott membrán sérülésnek is érzékeny indikátora.

Az SCC VII sejtmagokban permeabilizálás nélkül az interfázisos kromoszómák nem voltak láthatóak, azonban MTX kezelés 0,1 és 100 μM közötti koncentrációk esetén mikronukleuszokat generált (9-A ábra). Kontroll, kerek alakú MTX kezelés nélküli sejtmagokat a 9. ábra nem tartalmazott, de a Giemsa festést prezentáló ábrán láthatóak (8-a ábra). A klasztogén eredeténél fogva az MTX viszonylag kis mikronukleuszokat generált alacsony (0,1-1 μM) koncentrációk esetén, az apoptotikus koncentrációk (1-10 μM) esetén a makronukleusz mérete csökkent, a nekrotikus koncentráció (100 μM) pedig megnövelte a makronukleusz méretét és a sejtmag töredezését okozta (9-A ábra). A várakozásoknak megfelelően a mikronukleuszok megjelenésének gyakorisága dózis-hatás függést mutatott, a MTX koncentrációk növelésével a mikronukleuszok száma is növekedett (9-B ábra). A kontroll

sejtmagok esetén a sejtekkel történt munka során az esetleges behatásokkal (mechanikai) magyarázható a megjelent mikronukleuszok kis aránya (4%) (Anyagok és módszerek 4.4.).



9. ábra. Mikronukleusz képződés a SCC VII sejtmagokban különböző koncentrációjú MTX kezelés hatására. A) Az exponenciálisan növekvő SCC VII sejteket 0,1; 1; 10 és 100 μM-os koncentrációjú MTX-al kezeltük 9 órán keresztül CO₂ inkubátorban (Anyagok és módszerek). A sejtmagokat metanol:jégcet (3:1) keverék segítségével izoláltuk, tárgylemezre cseppentettük és DAPI-val festettük őket. A mikronukleuszokat fehér nyilakkal jelöltük. Jelzések: 5 μm. B) A mikronukleuszok számát az összes maghoz viszonyítva adtuk meg mikronukleusz indexként 0 (kontroll); 0,1; 1; 10 és 100 μM-os MTX koncentrációk mellett.

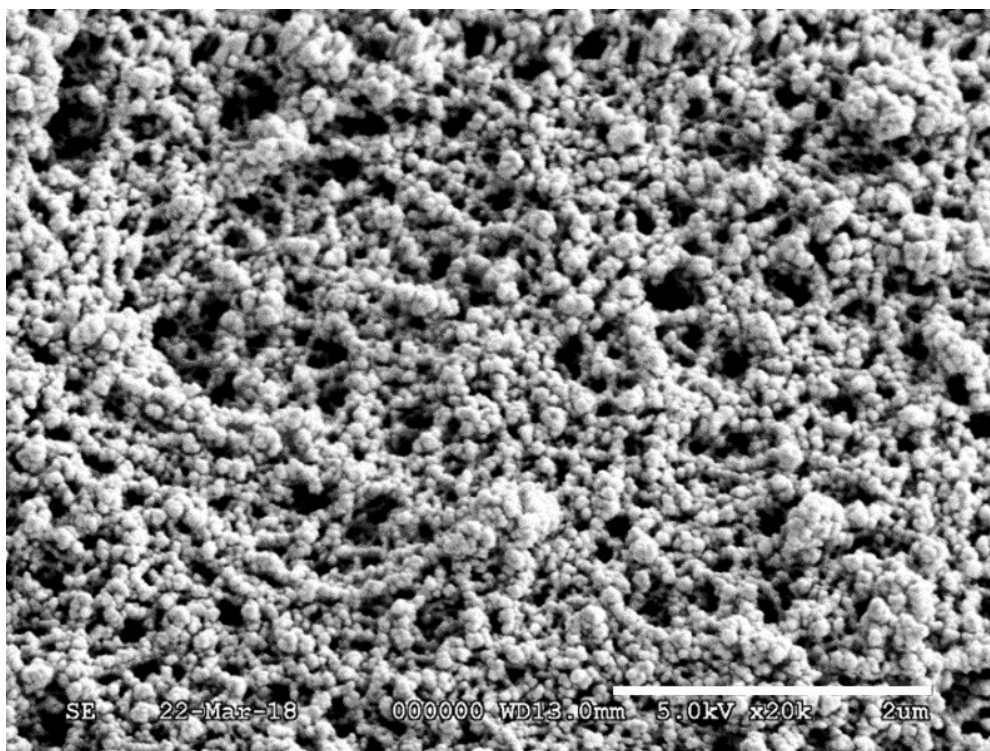
5.5. A vizsgált aerogélek karakterizálása

5.5.1. A H-AG karakterizálása

A közel 30% zselatin tartalommal rendelkező H-AG jellemzése korábbi publikációban megtalálható [148], a jelen értekezésben vizsgált vegyület az eredeti H-AG-nek megfelel, ezeket új eredményként nem mutatom be. Munkámban az újonnan szintetizált, MFH-AG-t írom le és hasonlítom össze a megfelelő referencia vegyülettel (Anyagok és módszerek 4.6.).

5.5.2. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

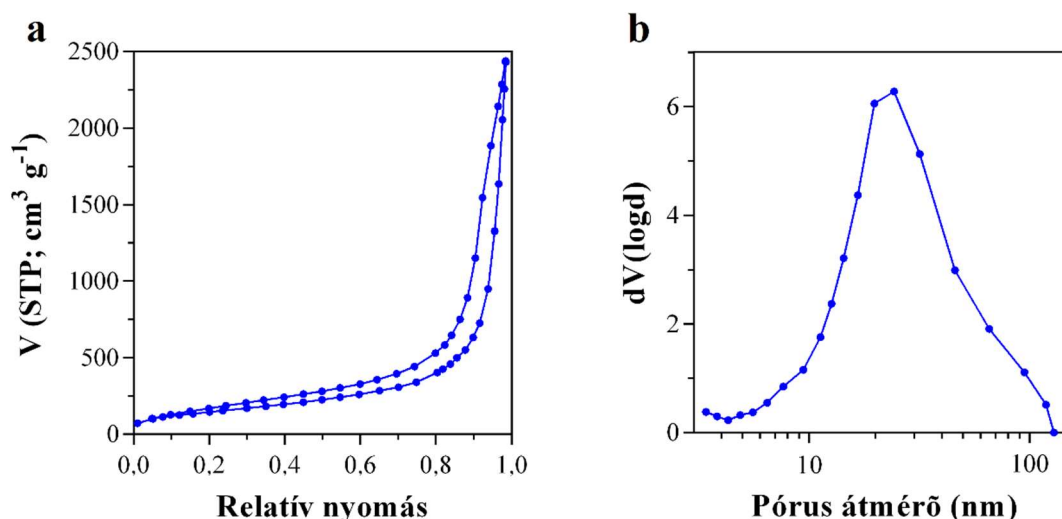
A MFH-AG pásztázó elektronmikroszkópos képe a 10. ábrán látható, mely 20000-szeres nagyítással készült. A felvételeken nem volt megfigyelhető szignifikáns szerkezetbeli eltérés az azonos módon szintetizált szilika-zselatin hibrid aerogélekhez képest [148, 149]. A szilika-zselatin aerogél alapváza gömb alakú blokkokból állt, melyeknek az átlagos átmérője kb. 100 nm volt (Anyagok és módszerek 4.7.).



10. ábra. MFH-AG minta pásztázó elektronmikroszkópos képe. Jelölés: 2 µm.

5.5.3. N₂ adszorpciós-deszorpciós porozimetriás vizsgálatok

A N₂ adszorpciós-deszorpciós izotermák és a hozzájuk tartozó szilika-zselatin-metotrexát (MFH-AG) aerogél pórus-méret eloszlás látható a 11. ábrán. Az izoterm görbék olyan IV-es típusú hiszterezést adnak, ami a makropórusokat tartalmazó mezopórusos anyagra jellemzők. A MFH-AG specifikus felszíne ($544 \pm 20 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) hasonló az eredeti hibrid aerogél felszínéhez. A pórusméretek maximuma $d_{\text{pórus}} = 25\text{--}30 \text{ nm}$, a pórusok méreteloszlásának kiszámításához a BJH módszert alkalmaztuk. A Barrett, Joyner és Halenda (BJH) módszer során a pórusméret eloszlásokat a deszorpciós izotermából számítottuk ki. Ez a szélesebb eloszlás jellemző a nagyobb (>20 tömeg %) zselatin tartalmú szilika-zselatin aerogélekre. A porozimetriás mérések alapján megállapítható, hogy a MTX beépülése a hibrid aerogélekbe nem okozott struktúrális változásokat [87, 88] (Anyagok és módszerek 4.7.).

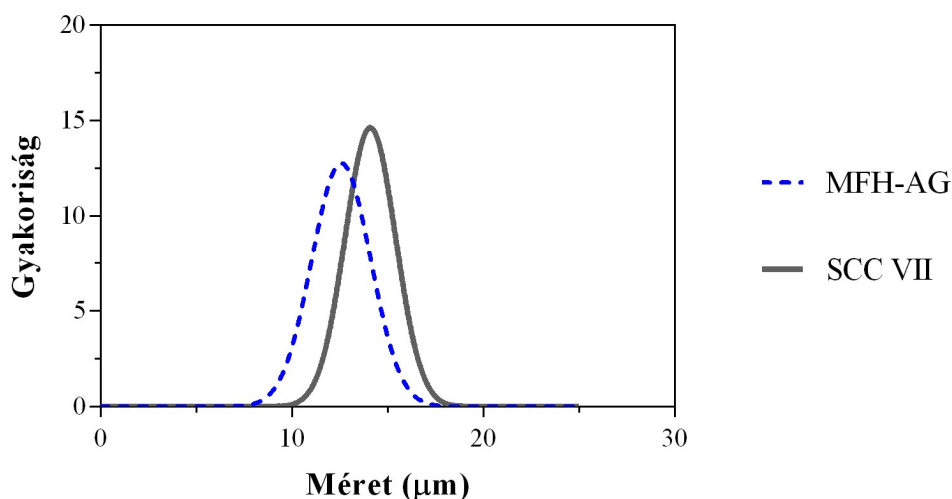


11. ábra. Nitrogén adszorpciós-deszorpciós izotermák standard hőmérsékletre és nyomásra viszonyítva (a) és a szilika-zselatin aerogél pórus méret eloszlása (b). Rövidítések: STP, standard hőmérséklet és nyomás (IUPAC 0 °C, 10^5 pascals = 1 bar).

5.5.4. A MFH-AG mikrorészecskék és a SCC VII sejtek méreteloszlása

A mikrorészecskék és a sejtek méreteloszlásának meghatározásához a felvételeket hemocitóméter és mikroszkóphoz kapcsolt videokamera segítségével készítettük el, majd a részecske-és sejtméreteket a képeken digitális képanalízissel határoztuk meg (12. ábra). A mikrorészecskék méreteit lézerdiffrakciós méreteloszlás meghatározásával is megmértük. A szöveti homogenizátorral történt kezelés és szonikálást követően a részecskék ($12,13 \pm 1,5 \mu\text{m}$)

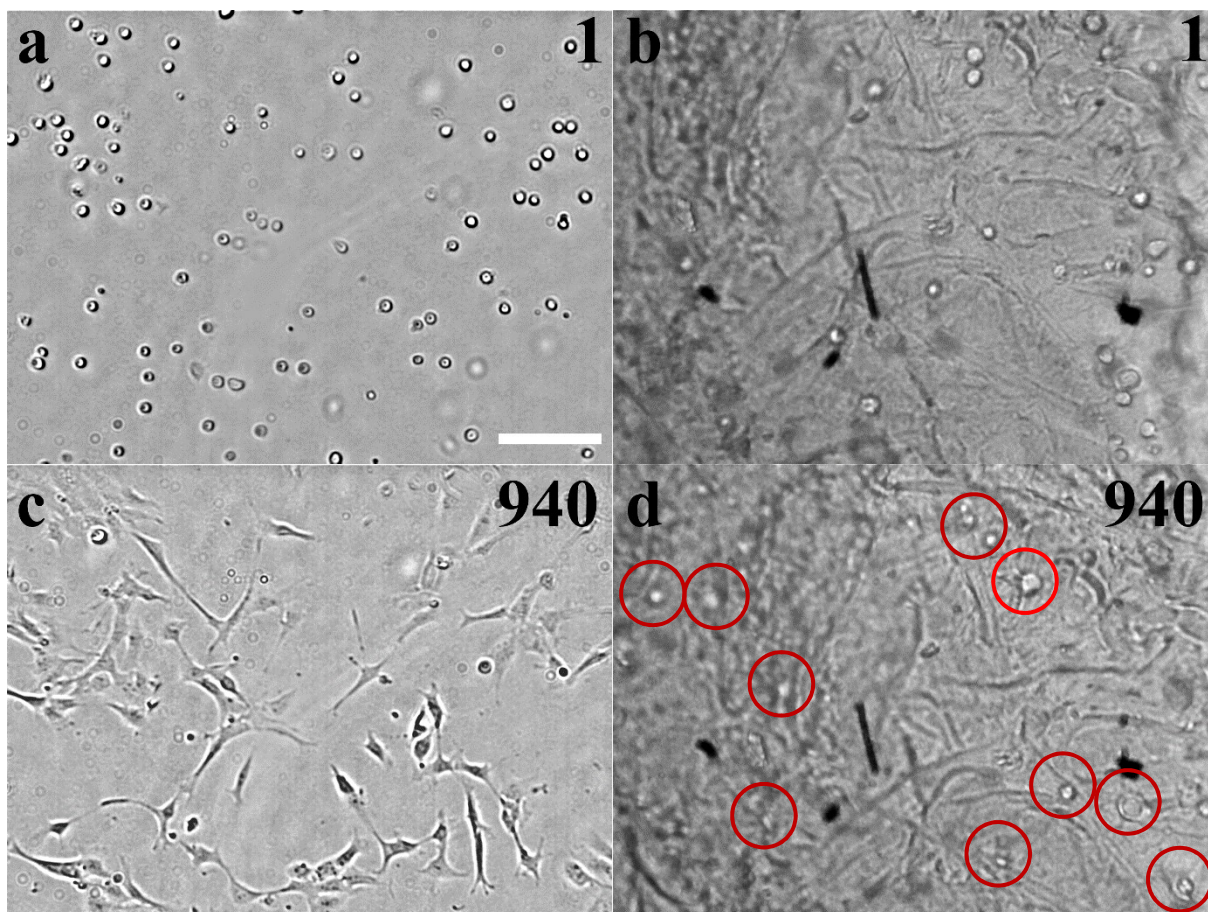
közel sejtméretűre estek szét ($14,5 \pm 1,6 \mu\text{m}$) (átlagos méretek). Az aerogél részecskék méreteloszlása 2 órával a mechanikai őrlést követően stabilizálódott, ezért az aerogél kevertetését tovább folytattuk, mielőtt a részecskéket az *in vitro* kísérletekben alkalmaztuk volna (Anyagok és módszerek (4.11.)).



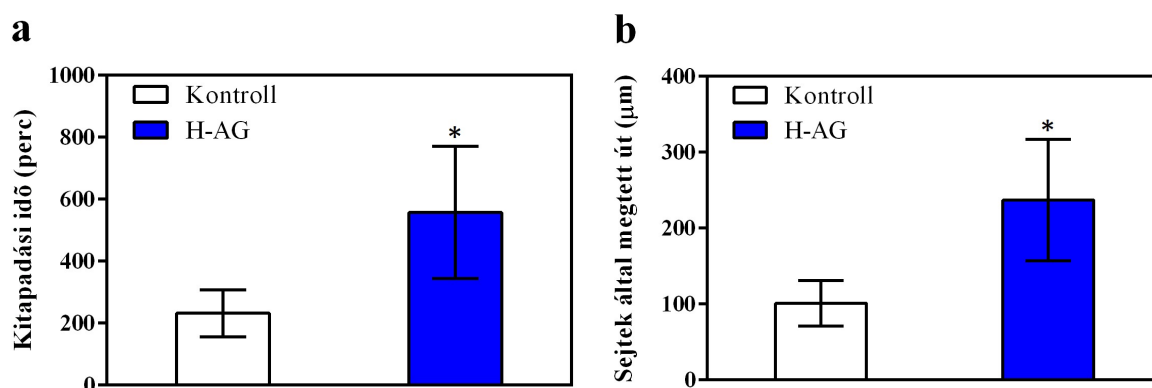
12. ábra. A fénymikroszkóppal és digitális képanalízissel meghatározott SCC VII sejtekre, és a MFH-AG mikrorészecskékre vonatkozó méreteloszlási diagramok ($n=50$). A görbék a mikroszkópban számolt darab szerinti átlagot mutatják.

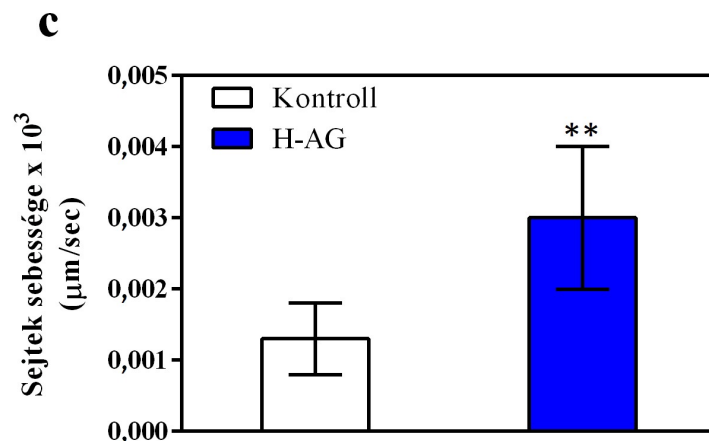
5.6. A H-AG mikrorészecskék biokompatibilitásának vizsgálata time-lapse videómikroszkópiával

A biokompatibilitási tesztek egyedi kialakítású, hosszú távú megfigyelésre alkalmas time-lapse videómikroszkópiával végeztük el. A kísérletekhez $25 - 45 \mu\text{m}$ átmérőjű és $1 - 2 \text{ mm}$ vastagságú, előzetesen UV fény segítségével sterilizett és sejttenyésztő médiumban kondicionált szilika-zselatin aerogél részecskéket (1 mg/ml) használtunk fel. A time-lapse kitapadási és migrációs kísérletek 940 percig (~ 16 óra) tartottak, valamint 10-10 sejtet figyeltünk meg a kontroll és a szilika-zselatin részecskét tartalmazó time-lapse képszekvenciákon. Az adhéziós kísérletek során általánosan elmondható volt, hogy a kontroll sejtekhez (13-c ábra) képest az aerogél részecske felszínén történő kitapadás során a sejtek kerekesebbek voltak, ami a 13-d ábrán látható. A kitapadás időtartama megközelítőleg kétszerese volt az aerogél részecske felszínén (átlag: 557 ± 213 perc) a kontroll sejtekhez képest, melyek a sejttenyésztő edény aljára tapadtak ki a vizsgálatban (átlag: 232 ± 76 perc) (13-b ábra) (Anyagok és módszerek 4.9. és 4.10.).



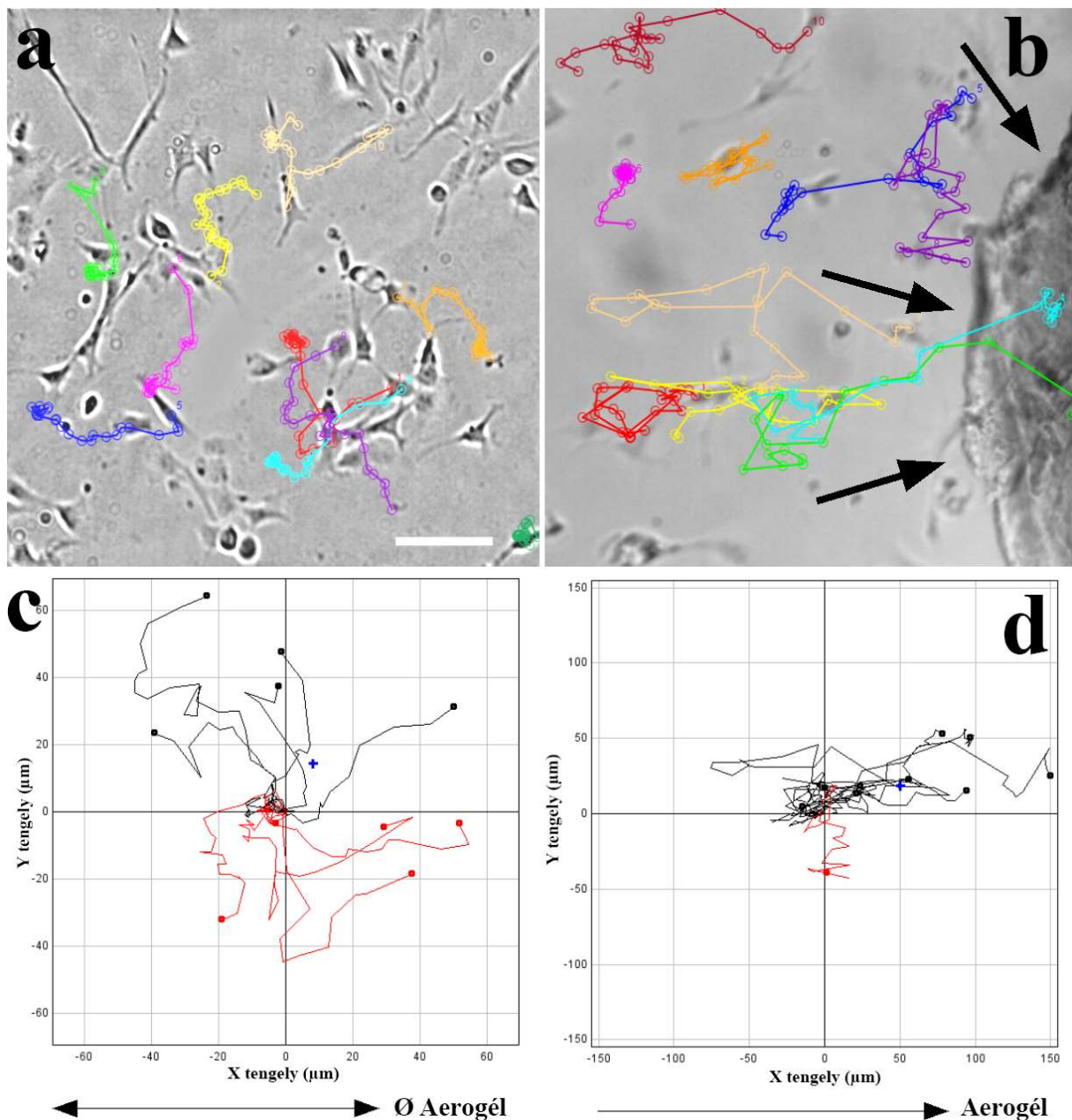
13. ábra. A SCC VII sejteknek a sejtenyésző edény aljára (a és c ábra), valamint a H-AG mikrorészecske darab felszínére történő kitapadása (b és d ábra). A H-AG felszínén kitapadt sejteket piros színű körökkel jelöltük. Az ábrák jobb felső részén található számok az időt jelölik percben. Jelzések: 50 μm.





14. ábra. Az ImageJ program segítségével elvégzett mérések alapján a hibrid aerogél mikrorészecskék jelenlétében a SCC VII sejtekre gyorsabb és irányítottabb mozgás volt jellemző, mint a kontroll sejtek esetén. a) a SCC VII sejtek kitapadásához szükséges idők, b) a kontroll és a H-AG jelenlétében a SCC VII sejtek által megtett út, c) a kontroll és a H-AG részecskékkel történő kezelés esetén a SCC VII sejtek átlagos mozgási sebessége. Mindhárom mérés során a * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

A szintén a time-lapse videómikroszkópia segítségével készített felvételeken a motilitási vizsgálatokat az ImageJ program, és a programhoz ingyenesen letölthető MtrackJ program kiegészítés (plugin) segítségével végeztük el a képszekvenciákon. A mérések során azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált sejtek által megtett út hosszabb volt (kontroll sejtek esetén: $101 \pm 30 \mu\text{m}$; a H-AG jelenlétében: $237 \pm 80 \mu\text{m}$), illetve a sejtek mozgásának a sebessége gyorsabb volt a hibrid aerogél jelenlétében (kontroll sejtek mozgási sebessége: $0,0013 \pm 0,0005 \mu\text{m/s}$; H-AG jelenlétében a sejtek mozgási sebessége: $0,003 \pm 0,0001 \mu\text{m/s}$) (14. ábra). Ezenkívül a sejtek mozgásának pontjait koordináta rendszerbe helyezve azt láttuk, hogy az aerogél részecskék jelenlétében a sejtek irányítottabban mozogtak (a H-AG részecskék felé), mint a kontroll sejtek. Az irányított migráció ebben az esetben csak azt jelenti, hogy a sejtek a felvételeken látható H-AG részecske (15-b ábra jobb szélén) irányába mozdultak el. Ez a jelenség feltételezhetően a részecskékben megtalálható zselatin tartalom kemoattraktáns hatásának tulajdonítható. Fontos még megjegyezni, hogy a H-AG részecskék jelenlétében a time-lapse vizsgálatok során nem tapasztaltunk sejthalálra utaló jeleket (apoptózis, nekrozis). Ezzel is bizonyítva, hogy a H-AG mikrorészecskék biokompatibilisak voltak a sejtekkel (Anyagok és módszerek 4.9. és 4.10.).



15. ábra. A kontroll (a, c) és a szilika-zselatin aerogélt (H-AG) tartalmazó (b, d) felvételeken a sejtek (10-10) mozgását reprezentáló montázs. Az a) és a b) ábrákon a színes vonalak a sejtek útvonalait mutatják a kontroll sejtek esetén (a) és az aerogél jelenlétében (b). A b) ábrán a fekete nyilak az aerogél részecskéket jelölik. Az ImageJ program segítségével a kontroll, szilika-zselatin aerogél hiányában (c) és jelenlétében (d) a sejtek mozgásait leíró pontokat koordináta-rendszerbe helyeztük. A c) és d) ábrákon a piros és fekete nyilak a sejteket jelölik, melyek az Y tengelyhez képest felfelé vagy lefelé mozognak, ami a sejtek irányát adta meg. Jelzés: 50 μm .

5.7. Az MFH-AG részecskékből történő MTX felszabadulásának vizsgálata

A felszabadult metotrexát mennyiségét csak akkor tudtuk megfelelő pontossággal meghatározni, ha a vizsgált immobilizált hatóanyag teljes mennyiségének legalább 3 %-a felszabadult. A MTX felszabadulási kísérletek eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze. A MFH-AG részecskékből történő MTX kioldódást először különböző pH-jú puffer oldatokban vizsgáltuk 72 órás inkubációt követően. A 0,01 M-os HCl oldatban, a pH 5 acetát pufferben, illetve a pH 7.4 PBS oldatban a MTX koncentráció az inkubálást követően a kimutatási határ alatt volt. Az előző megfigyelésekhez hasonlóan, a kiegészített DMEM-HAM'S F12-el elvégzett kísérletekben sem volt kimutatható MTX tartalom, függetlenül a médium szérum tartalmától. A MFH-AG részecskéknél a SCC VII sejtekkel történő együtt inkubálása a teljes MTX tartalomnak a $8,6 \pm 1,9$ %-a jutott a sejtek felülúszójába. Abban az esetben, mikor a SCC VII sejtek felülúszójával 72 órán át inkubáltuk együtt a hibrid aerogél részecskéket, a MTX tartalom $11,8 \pm 2,0$ %-a jutott a médiumba. Azoknál a kísérleteknél, ahol a SCC VII sejtek enzim termelését zselatin bevonattal indukáltuk, az aerogél részecskéket a sejtlizátummal történő együtt inkubálása $8,7 \pm 1,2$ %-os MTX felszabadulást, az indukálás után kapott sejttenyésztő médiummal történő inkubálás pedig $11,6 \pm 1,4$ %-os MTX kioldódást eredményezett. A MFH-AG részecskék cathepsin-B enzimmel történő inkubálása a teljes immobilizált MTX mennyiségének kevesebb, mint $4,6 \pm 0,9$ %-os felszabadulását okozta. Ez a megfigyelés összhangban van a korábban publikált eredményekkel [87] (Anyagok és módszerek 4.12.).

Az eredményeket a következő táblázat foglalja össze:

- 1. táblázat.** A MTX felszabadulása különböző körülmények között. Minden kísérletet háromszor végeztünk el, és az eredményeket átlagoltuk.

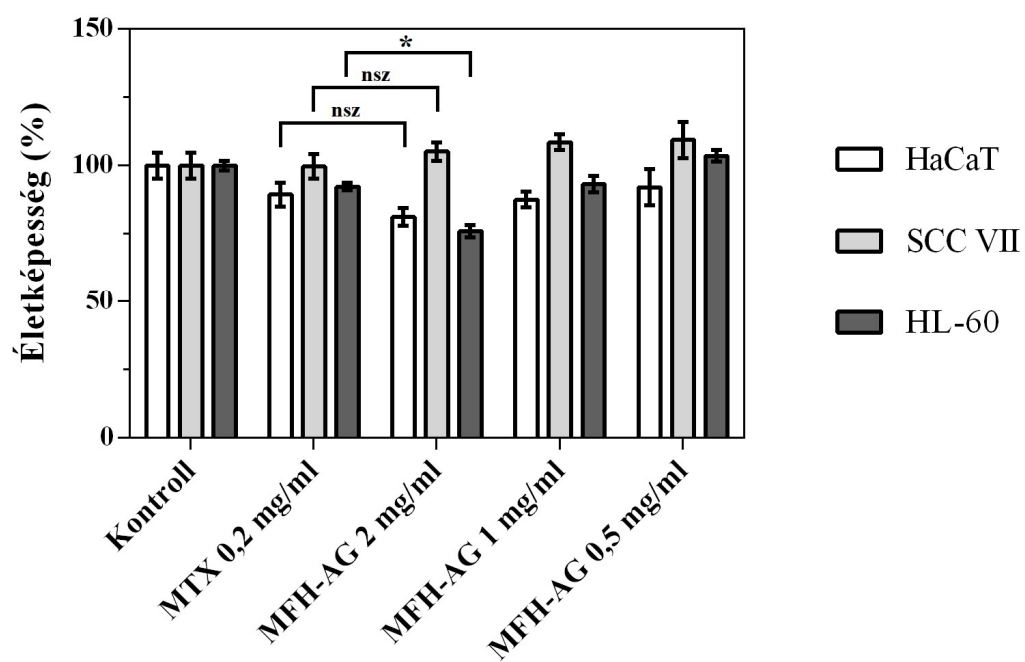
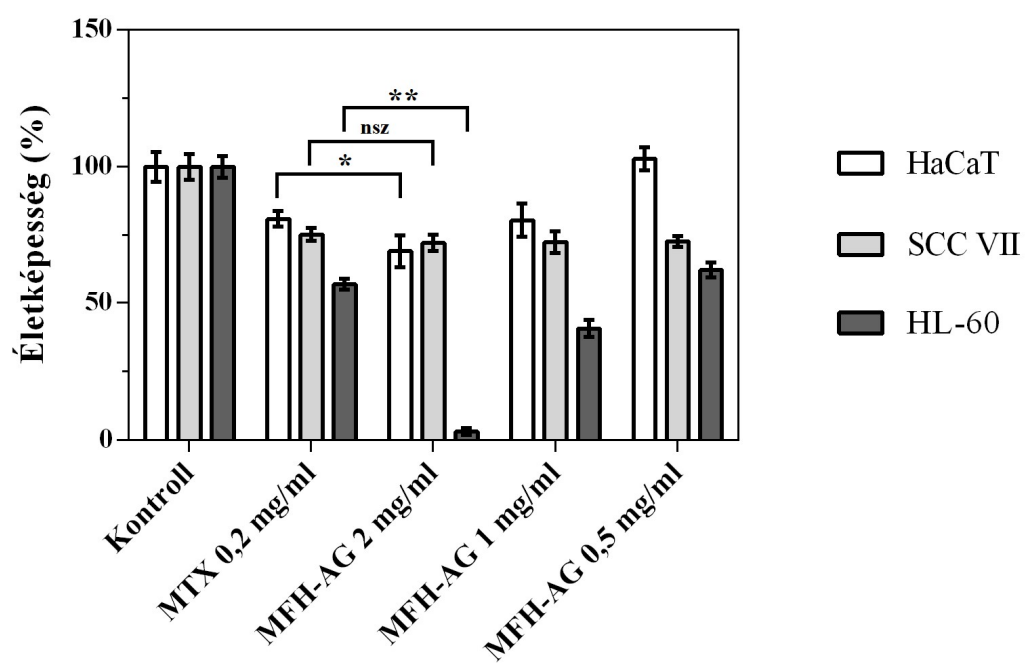
Alkalmazott médium és körülmények	Felszabadult MTX
Puffer (pH 2.0; 5.0; 7.4)	< 3 %
DMEM-HAM'S F12	< 3 %
SCC VII sejt kultúra	$8,6 \pm 1,9$ %
SCC VII sejt kultúra felülúszó	$11,8 \pm 2,0$ %
Indukált sejt kultúra lizátum	$8,7 \pm 1,2$ %
Indukált sejt kultúra felülúszó	$11,6 \pm 1,4$ %
Cathepsin B PBS pufferben	$4,6 \pm 0,9$ %

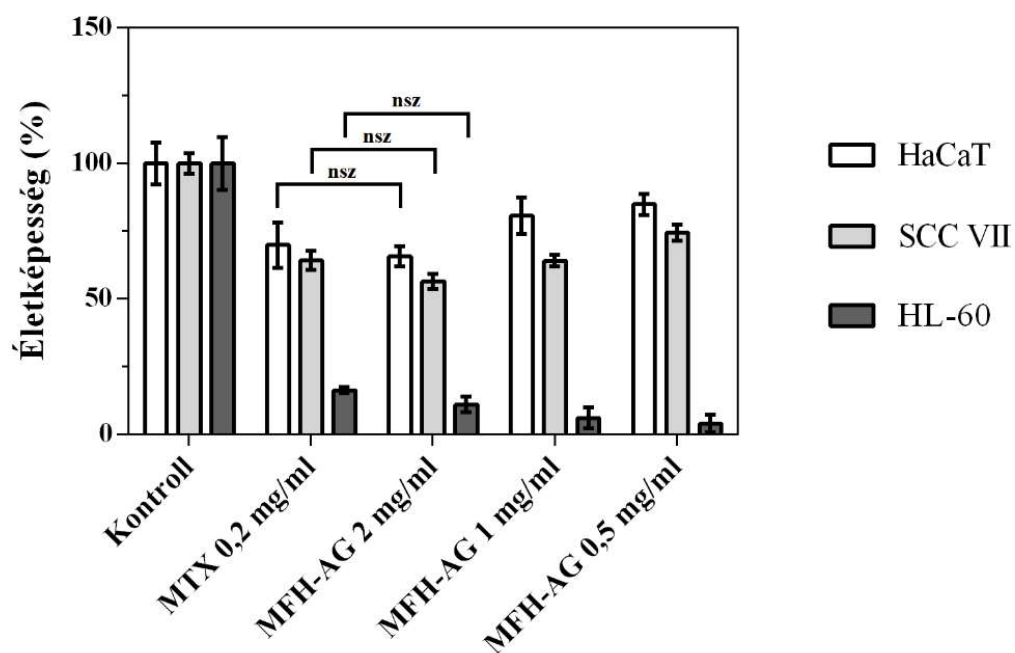
5.8. A MFH-AG mikrorészecskék hatása a HaCaT, SCC VII és HL-60 sejtek viabilitására

A MFH-AG részecskékből történő MTX kioldódási eredmények alapján a részecskéket MTT viabilitás módszerrel vizsgáltuk tovább. A MFH-AG mikrorészecskék sejtnövekedést gátló hatásának vizsgálatát két daganatos (SCC VII, HL-60), valamint epitel eredetű sejtvonalakon (HaCaT) végeztük el (16. ábra).

A MFH-AG részecskék mindhárom vizsgált sejtvonal esetén (SCC VII, HaCaT, HL-60) növekedés gátlást okoztak 24 órás inkubációt követően (16-a ábra). A funkcionális szilikazselatin mikrorészecskék dózisfüggő citotoxikus hatása a HL-60 sejtvonal esetén volt a legkiemelkedőbb. A 2 mg/ml-es MTX tartalmú aerogél koncentráció esetén szignifikáns sejtpusztulás volt tapasztalható a tömegequivivalens hatóanyagot tartalmazó 0,2 mg/ml-es szabad MTX-hez képest a 24 és 48 órás inkubációt követően. Az 1 mg/ml-es MFH-AG mikrorészecske koncentráció hatása megegyezett a 0,2 mg/ml-es szabad MTX koncentráció citotoxikus hatásával. A SCC VII sejtek növekedésének gátlását minden koncentrációban kimutattuk, de csak a 48 órás inkubáció után (16-b ábra). A HaCaT tenyészetek a 0,5 mg/ml-es koncentrációra toleránsak voltak, azonban az 1 és 2 mg/ml-es koncentrációk alkalmazása esetén a sejtek életképessége szignifikánsan csökkent. A HaCaT sejtek esetén a 2 mg/ml-es MFH-AG koncentrációnál az azonnali (24 és 48 órás inkubálás után) citotoxikus hatás szignifikánsan magasabb volt, mint a 0,2 mg/ml-es szabad MTX esetén, hasonlóan a HL-60 sejtekhez.

A 72 órás kezelés végére (16-c ábra) a HL-60 sejtek mortalitása az összes MFH-AG koncentrációnál több, mint 80% volt. A HaCaT és SCC VII sejtek életképessége közel 30%-al csökkent a 2 mg/ml-es koncentrációjú MFH-AG kezelés hatására a kontroll sejtekhez képest, valamint szignifikáns különbség volt a viabilitások között. Fontos megjegyezni, hogy a 72 órás kezelés után a vizsgált sejtvonalak egyike sem mutatott szignifikáns különbséget a 0,2 mg/ml szabad MTX és a 2 mg/ml MFH-AG kezelés hatása között (16-c ábra) (Anyagok és módszerek 4.13.). A vizsgálatokban alkalmazott 0,2 mg/ml-es koncentráció megegyezik a klinikumban alkalmazott MTX koncentrációval, mellyel megközelítőleg tömegequivivalens MTX-ot tartalmazott a 2 mg/ml-es MFH-AG koncentráció.

a**b**

c

16. ábra. A MTX és a MFH-AG mikrorészecskék növekedés gátlásának vizsgálata HaCaT, SCC VII és HL-60 sejteken 24 (a), 48 (b) és 72 (c) órás kezelést követően. Az oszlopok a viabilitásban bekövetkező változás %-os értékét mutatják a kontroll sejtekhez viszonyítva. Minden vizsgálatot 3 párhuzamos kísérletben végeztünk el. Szignifikancia szintek: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; nsz: nem szignifikáns.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A paratimikális nyirokcsomók a hasüregi tumorok őrszem nyirokcsomói

A kutatás első részeként a célkitűzésekben szereplő, kolloid részecskék és tumor sejteknek a peritoneumból a nyirokkeringésen keresztül történő eljutását vizsgáltuk a paratimikális nyirokcsomókba, egér modellben. A tumor progresszió vizsgálatára az állatmodellek 2 fő típusát használják: 1) a tumor sejtek ortotopikus injektálása során a sejteket ugyanazon anatómiai helyre vagy szövetbe juttatják, ahonnan a tumor eredetileg származik 2) az ektopikus modellben pedig a daganatsejteket szubkután implantálják [177]. Az ektopikus rágszáló modellt gyakran kritizálták, mert nem reprezentálja a valós tumor progressziót, mivel a mikrokörnyezet kulcsszerepet játszik a tumorfejlődésben [178]. Az ortotopikus beültetés metasztázis képződéssel járt egerekben, míg az ektopikus módszer áttét képződés nélkül, kizárólag lokális daganatképződéshez vezetett [179]. Rózsa és munkatársai korábban patkány állatmodellben vizsgálták a peritoneális, illetve retroperitoneális térből történő daganatos áttétképződést a felső mediastinalis nyirokcsomókban. Ezekben a vizsgálatokban kimutatták, hogy hepatokarcinóma vagy nephroblastoma tumorsejtek vesetok alá történő ortotopikus beültetésével valós metasztatikus modell hozható létre [170]. Baktériumok (*Listeria monocytogenes*) intra-, és retroperitoneális oltása után a tusszemcséket tartalmazó kolloid oldat (India Ink) alkalmazásakor hasonló nyirokfolyás volt tapasztalható, mely azt mutatta, hogy mindkét ágens az intraperitoneális makrofágok által a mellkasi nyirokközpontba (*Lymphocentrum thoracicum ventrale*) és a mediastinalis nyirokcentrum nyirokcsomóiba (*Lymphocentrum mediastinale*) szállítódott [180]. Egér állatmodellben a hasüregből, nyirokutakon történő daganat terjedést a paratimikális nyirokcsomókba nemcsak a tumor sejtekkel, hanem a tus kolloid részecskéknek a hasüregbe történő közvetlen beinjektálásával is modelleztük. A beültetést követően 24 óra elteltével a kolloid tus részecskék a paratimikális nyirokcsomókban jelentek meg, illetve akkumulálódtak (Eredmények 5.1.). A tumoros sejteknek a véráramon keresztüli terjedésének a megelőzéséhez egér daganatos sejteket injektáltunk a peritoneumba, lehetővé téve ezáltal hasüregi daganatok kialakulását, a tumoros sejtek diafragma nyílásain keresztüli átjutását és mellkasi útvonal követését. A pontos, ismert számú tumor sejtet tartalmazó szuszpenzió beadása lehetővé tette az egerekben a tumor fejlődés időbeni vonatkozásainak követését. Az intraperitoneális beadás eredményeként a tumor sejtek a peritoneális és retroperitoneális szervekre (például: máj, lép, vesék és a belek) tapadtak ki. A

hasüregből a tumor sejtek terjedése, és a kolloid tustintának i.p. injektálása után leírt anatómiai útvonal vizsgálata az alábbi következtetésekhez vezetett:

1) A daganatos sejtek a mellkasi nyirokcsomó láncon keresztül jutottak el a távoli paratimikális nyirokcsomóba. 2) Az egér modellben vizsgált paratimikális nyirokcsomók a tímuszon belül találhatóak, míg patkányokban ezek a nyirokcsomók a tímuszon helyezkednek el (Eredmények 5.2.). A nyirokcsomók az egerekben a tímusz kötőszöveti állományában találhatóak, a patkányokban pedig vékony kötőszöveti réteg található a tímusz és a nyirokcsomók között [181]. Itt érdemes megjegyezni, hogy korábban az egér eredetű paratimikális csomók számát nem határozták meg. Dunn publikációjában [182] 3-4 csomót írt le, melyek a csecsemőmirigy mögött helyezkednek el. Még ennél is fontosabb az a tapasztalatunk, hogy a paratimikális nyirokcsomók nem a tímusz belsejében voltak rejtve, hanem a tus szemcsék lerakódása után kilöködtek, és sebészeti úton eltávolíthatók voltak. Ezeknek a nyirokcsomóknak az eltávolítása, vagy eltávolíthatósága orvosi szempontból bír jelentőséggel, különösen akkor, mikor a tumoros őrszem (jelen esetben a paratimikális) nyirokcsomók reszekciójára kerül sor. A reszekció az őrszem nyirokcsomókból tovább haladó, például az emlői nyirokcsomókban kialakuló metasztázist megakadályozza, így megmentheti, vagy meghosszabbíthatja a betegek életét. 3) A hasüregi daganatos sejtek a peritoneális nyirokelfolyáson keresztüli terjedése megegyezik a hepatokarcinóma, nephroblastoma és myeloid leukémia sejtek patkány metasztázis modelljeiben kapott korábbi megfigyelésekkel. Kimutattuk, hogy a hasüregbe fecskendezett sejtek, vagy részecskék, közvetlenül a diafragma peritoneum felőli részén a *mesothelialis* sejtek által kialakított bazális fenestrált membránon keresztül jutnak tovább, belépnek a rekeszizom kötegek közötti nyirokerekekbe és a diafragmatikus plexusban ürülnek ki (Eredmények (5.2.) [42, 183]. Pitt és Anderson írták le, hogy az elsődleges daganatból leváló tumor sejtek mozgása a peritoneális makrofágoknak a mellkasi nyirokcsomókhoz történő transzdiafragmatikus forgalmához hasonló [184]. Ezek a csatornák a nagyobb intrathoracikus csatornába gyűlnek össze, amelyek a véráramba történő kiürülés előtt belépnek az elülső emlő és paratimikális nyirokcsomókba [44, 185]. A diafragmatikus nyirok plexus pedig a nagy belső mellkasi (emlő) nyirokcsomókba jut, ami belép a paratimikális nyirokcsomókba. 4) Ismert, hogy a paratimikális és *posterior mediastinalis* csomók *mediastinalis* csatornái belépnek a *subclavia* vénájába. A metasztázisos fejlődés visszatér és folytatódhat a véráramban, körfolyamatot generálva a vér útján, és a nyirokutakon történő terjedéssel erősíthetik egymást. 5) Az egér peritoneum-paratimikális nyirokcsomó útvonal hasonlít a humán hasüregi elfolyásból származó tumor progresszióhoz. A hasi daganatok növekedését követi a tumor sejtek kijutása a primer tumorból, ami a paratimikális nyirokcsomók mellkasi metasztázisaként folytatódhat és emlő metasztázis

kialakulását okozhatja. 6) Az egér állatkísérletekben kapott eredmények megerősítették a patkány modellel kapott eredmények érvényességét, ami arra utal, hogy a hasüregi daganatokból kiinduló metasztatikus terjedés általános emlősökben (Eredmények 5.1. és 5.2.).

A paratimikális nyirokcsomókról ismert, hogy az antitesttermelő sejtek egyik fő helyszíne, annyi immunsejtet tartalmaznak, mint az egész lép, és ezeket a szerveket antigén invázió esetén az utolsó védelmi vonalnak tekintik. Miután a paratimikális nyirokcsomók immunogén kapacitása kimerült, a metasztatikus tumor növekedés miatt a nyirokcsomó perifériás része hypoxiás angiogenezisnek és szöveti károsodásoknak van kitéve. Más kutatásokkal egyetértésben a nyirokcsomó metasztázisok jelenléte további metasztatikus terjedést és a betegek rossz túlélését okozza [186]. A paratimikális nyirokcsomókat elérő tumor sejtek a mellkas alsó üregeibe juthatnak, és áttérhetnek más szövetekbe, mivel a fő mellkasi csatorna (*ductus thoracicus*) a nyirkot a vérbe juttatja a *subclavia* vénába történő belépés után. Ennek a folyamatnak a várható eredménye lehet a tumor sejteknek más mellkasi nyirokcsomókba, és más testrészekbe való jutása. A hasüregből történő nyirokelfolyás vizsgálatoknak azonban nem csak daganatos áttétképzés (az előbbieken leírtak mellett például: daganatos megbetegedésekkel kapcsolatos intraperitoneális dialízis kemoterápiával történő kiegészítése) [187] miatt van jelentősége, hanem számos más betegség feltérképezése miatt is: vesebetegeknél peritoneális dialízis [188], a hasüregbe került patogének nyirokelfolyáson keresztüli követése [189], valamint a táplálékbevitel egyensúlyba hozása miatt [190].

6.2. A metotrexát genotoxikus és mikronukleusz képző hatása volt megfigyelhető daganatos sejteken

A következő kísérletekben a peritoneális tumorok kezelésére a klinikumban használt metotrexát (MTX) [191, 192, 193] genotoxikus hatását vizsgáltuk az előzőekben leírt, egér modellben alkalmazott SCC VII sejteken. Tanszékünk Sejtbiológiai munkacsoportja jelentős eredményeket ért el korábban a különböző kémiai ágenseknek a kromatin kondenzálódásra való hatásának a jellemzésével, valamint az így kialakult genotoxicitás leírásával. Az izolált kromatinstruktúrák elemzése előtt artefaktumok képződését az alábbi, korábban publikált eredmények miatt kizárhattuk [165, 194]: 1) különböző sejtvonalakból izolált kromatin struktúrákat hasonlítottunk össze 2) a különböző toxikus kezelések alkalmazása, mint például gamma-besugárzás, kadmiummal történő kezelés olyan kromatinváltozásokat idéztek elő, melyek szignifikánsan különböztek a normál sejtektől 3) a kromatin kondenzálódás folyamatát

bemutató sejtszinkronizáció 4) replikatív és DNS javító szintézis tesztelése normál és megváltozott biokémiai funkciókat mutatott. Ezek az előzetes vizsgálatok biztosították, hogy az izolált kromatinszerkezetek a kondenzációs folyamat valós köztermékeit tükrözik. Az általunk elvégzett genotoxicitási vizsgálatoknak a célja volt annak eldöntése, hogy a reverzibilis permeabilizálást követő, sejtmagból történő kromatin kilökődést mutató apoptotikus változások artefaktumok, vagy ezek a kis magok a kromatin kondenzálódáshoz kapcsolódnak. Számos publikációban leírták már, hogy a MTX, mint dihidrofolát-reduktáz inhibitor, által indukált mikronukleusz képződés fokozható többszörös gyógyszer kezeléssel [171, 172]. A MTX szerkezetét tekintve folsav-analóg, amely kompetitíven blokkolja a dihidrofolát-reduktáz enzimet és gátolja a timidin szintézist [195]. A permeabilizált, illetve nem permeabilizált sejtek esetén is megfigyelhető volt a MTX klasztogén tulajdonsága miatt a mikronukleuszok képződése, mely a különböző koncentrációknál dózis-hatás összefüggést mutatott (Eredmények 5.4.1-5.4.3.). Azonban a mikronukleuszok jelenléte nem feltétlenül jelent citotoxicitást, mivel a nukleáris membránon átjutó kromatin struktúrák tartalmazhatnak mikronukleuszt. A sejtek regenerációja a permeabilizáció után maga is ellentétes tendenciát tükrözött. Ezen túlmenően az apoptózis nem következhetett be a permeabilizációt követő néhány órán belül, mivel az apoptózis időigényes folyamat, több órát vesz igénybe, és a sejtek regenerációja a kromatin izolálása előtt csak 3 óráig tart. Eredményeink alapján elmondható, hogy a mikronukleuszok jelenléte a különböző emlős sejtvonalakban a kromatin kondenzálódás normál intermedierjei közé tartozik. A kromatin kondenzálódás a nagymértékben dekondezált kromatinszerkezet szupertekercselődésével kezdődik, amelyből a fátyolos kromatinszerkezeten keresztül a kromatin lemez jön létre, ami pedig ezt követően nagyobb szupertekercselt mikronukleuszként lökődik ki. A korai S fázisban a mikronukleusz a kondenzált kromatin szalag fejrészeként jelenik meg, amely a folytonos kromatin szerkezet két karján folytatódik. A megfordult fejrész az S fázis végén visszahajtódik lineáris szerkezetűvé, mikor az U, V és 8 alakú elongált kromoszómák hosszú lineáris prekromoszómává válnak. Miután a fejrész (mikronukleusz) visszahajtódott, és a lineáris szalagos kromatin kialakult az S fázisban, ezután a mikronukleusz már nem volt látható.

A többi citosztatikumtól eltérően a MTX-ot széles dózistartományban alkalmazzák, a 20 mg/m²-os koncentrációtól kezdve, amit a kezelés alatt a limfoblasztos leukémia fenntartó kemoterápiájában és nem tumoros betegségek (rheumatoid arthritis, psoriasis) esetén hetente alkalmaznak, egészen az 1000-33000 mg/m²-es dózisig, melyet leucovorinnal kombinálnak. Az intraperitoneális kemoterápia alacsony hatékonyságú, mert az i.p. beadott gyógyszerek

penetrációs távolsága a *submesothelialis* szövetbe 2-3 mm-re korlátozódik [196, 197], továbbá az i.p. bejuttatott citosztatikum a peritoneális üreg anatómiai komplexitása miatt általában nem egyenletesen oszlik el. A klinikumban alkalmazott nagy dózistartomány, az i.p. beadás hátrányai és a citosztatikum szisztémás mellékhatásai miatt a MTX célbajuttatásának optimalizálása és javítása szükséges a kívánt terápiás hatás javításához.

6.3. A funkcionális hibrid aerogél mikrorészecskék (MFHA-AG) különböző citotoxicitást mutattak eltérő kollagenáz aktivitású sejtvonalak esetén

A MTX hordozó rendszerhez történő konjugálásával a gyógyszer szisztémás toxicitása csökkenthető, valamint a lokális hatás növelhető. A szilika-zselatin hibrid aerogélek kiválóan alkalmasak a szabályozott hatóanyag leadásra, nyílt mezopórusos szerkezetük, nagy fajlagos felületük és a módosítható felületi jellemzőik miatt számos hatóanyaggal funkcionálizálhatók [148, 149]. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy az újonnan szintetizált, magas zselatin (~24%) tartalmú, hibrid szilika-zselatin részecskék (H-AG) alkalmazhatóak-e biológiai rendszerben *in vitro*. A citotoxikológiai vizsgálatok eredményei alapján látható volt, hogy a H-AG részecskék biokompatibilisek voltak a sejtekkel, illetve a részecskék jelenléte serkentette a sejtek osztódását. A time-lapse videómikroszkópos felvételek alapján kijelenthetjük, hogy a sejtek az aerogél szemcsék irányába migráltak, a szemcsék felszíne alkalmas közegnek bizonyult a sejtek kitapadásához és növekedéséhez (Eredmények 5.6.). A biokompatibilitási tesztek eredményei alapján a következő vizsgálatokban a H-AG mikrorészecskéket MTX-el funkcionálisztuk, és az újonnan szintetizált MFH-AG mikrorészecskék toxicitását különböző enzim aktivitással rendelkező tumoros (HL-60, SCC VII) és nem tumoros (HaCaT) sejtenyészeteken teszteltük.

A MFH-AG mikrorészecskéket sikeresen szintetizáltuk és alkalmaztuk *in vitro* citotoxicitási vizsgálatokban. A közelmúltban végzett kutatások kimutatták, hogy a klinikailag jóváhagyott, kemoterapeutikumot tartalmazó nanohordozók (10-100 nm-es átmérővel) hatékonyan képesek a különböző daganatellenes szereket a tumor helyén leadni, ezzel javítva a farmakokinetikai hatékonyságot és terápiás hatást [198, 199]. Mindezek ellenére, a hatóanyag leadásra képes nanorészecskéknek több hátránya is van: 1) a nanoméretű anyagok komplex fiziko-kémiai kölcsönhatást alakítanak ki az élő rendszerekkel, amelyben a részecske anyagi összetétele, mérete és geometriája egyaránt komplex szerepet játszik. Ennek következtében káros hatásúak lehetnek például az oxidatív stressz útvonalakon [199, 200, 201, 202, 203, 204] 2) A

nanomicellák nem rendelkeznek megfelelő stabilitással a véráramban. 3) Egynél több hatóanyag hordozóhoz való kötése variabilitást okozhat a részecskékben. 4) A terápiás nanorészecskék szintézise költséges folyamat, különösen ha módosított antitesteket vagy aptamereket tartalmaznak. Továbbá ki kell emelni, hogy a fiziológiás kapillárisok endotél sejtjei közötti rések mérete 5-8 nm között van, így a nanoméretű hordozókkal szemben a mikro mérettartományba eső rendszerek nem lépnek ki a keringésből, ezzel aspecifikus hatást okozva [205]. Vizsgálatainkban hangsúlyozni kell, hogy az általunk szintetizált MFH-AG mikrorészecskék méreteloszlása közel állt a vizsgált daganatos sejtek méreteloszlásához. Ennek a fontossága abban rejlik, hogy a daganatos sejtek metasztatikus útvonalain a mikronizált részecskéket alkalmazzuk, melyek antimetabolitot tartalmaznak. Így magas lokális koncentráció érhető el a nyirokutakon, illetve a sentinel nyirokcsomók fokális pontjain, ami a metasztázis megakadályozásában hasznos. Ezenkívül a MFH-AG részecskék a reszekciót követő terápiában történő használatra is alkalmas lehet a műtétet követő, szóródó tumor sejtek kezelésére (Irodalmi áttekintés 2.5.).

A különböző gyógyszer-kioldódási tesztek igazolták, hogy a kovalensen kötött MTX nem szabadult fel a hibrid mikrorészecskékből az élő sejtekkel történő kölcsönhatás nélkül. Az aerogél alapvázához amid kötéssel keresztül kapcsolt MTX nem hidrolizált sejtmentes pufferekben, és csak részlegesen volt hasítható Cathepsin-B kollagenáz enzimmel. A hibrid mikrorészecskék fokozott hidrolitikus stabilitása a porózus mátrixba történő bekötődés stabilizáló hatásának volt tulajdonítható. A sejtek komplex kollagenáz aktivitása azonban jelentős mértékben felszabadította a MTX-et a mikrorészecskékből. A MTX tartalmú mikrorészecskéknek SCC VII sejtekkel történő együtt inkubálása csak mérsékelt mennyiségű szabad MTX-et eredményezett, mivel ezek a sejtek részlegesen felvették a komponenst az oldatból. Az SCC VII tenyészet felülszója tartalmazta az exkretált kollagenáz enzimet, így ez a sejtmentes tápközeg is felszabadította a MTX-et a mikrorészecskékből. Ugyanez a hatás volt megfigyelhető, mikor a SCC VII sejtek enzimtermelését zselatin bevonattal indukáltuk, és a sejtlyúzátumot használtuk a mikrorészecskék emésztésére (Eredmények 5.7.). Ezekből az eredményekből látható volt, hogy sejtmentes környezetben a MTX felszabadulás kimutatási határ alatt volt, a vizsgált tumor sejtek (SCC VII) jelenlétében azonban egyértelműen mérhető volt MTX felszabadulás, mely a sejtek által *in situ* termelt kollagenáz enzim hatásának volt köszönhető.

A MFH-AG mikrorészecskék citotoxikus hatását SCC VII, HL-60, illetve HaCaT sejttenyészeteken vizsgáltuk. Az alkalmazott sejtvonalak eltérő kollagenáz aktivitása megfelel

a különböző biológiai funkcióiknak. A HaCaT sejtek számára a kollagenáz aktivitás szükséges a kollagén mátrixon történő mozgáshoz [206]. A tumor sejtek fokozott kollagenáz aktivitása felelős az extracelluláris mátrix degradációjáért, ami lényeges lépés a metasztázis kialakulásában [87]. Az a tény, hogy az általunk vizsgált legmagasabb, 2 mg/ml-es MFH-AG és a 0,2 mg/ml-es MTX koncentrációk citotoxicitása megegyezett, azt bizonyítja, hogy az MTX aktivitása intakt maradt az aerogéllal történt funkcionálizálást követően is. Ez a MFH-AG részecskék terápiás alkalmazhatóságának kulcsfontosságú követelménye. A MTX felszabadulási tesztek eredményei alapján indokolt feltételezni, hogy a MFH-AG mikrorészecskék citotoxicitásának különbségei a vizsgált sejtvonalakkal szemben a sejtek eltérő kollagenáz aktivitásával függött össze. A megnövekedett kollagenáz aktivitás, amely metasztatikus faktor a tumor sejtek terjedésében, fokozta a MTX felszabadulást a mikrorészecskékből (Eredmények 5.8.). Ez a tulajdonság, kombinálva a gyógyszer mentes H-AG mikrorészecskék biokompatibilitásával, szabályozott hatóanyag leadású rendszert biztosít a daganat terápiához.

Érdemes még megemlíteni, hogy a gyógyszer tartalmú szilika-zselatin részecskék növekedést gátló hatását okozó MTX mennyiség ekvivalens a szabad (vizes közegben lévő) MTX dózisához, ami azt jelenti, hogy a mikrorészecskékben lévő MTX teljes mennyisége (a teljes tömeg kb. 6 tömeg%-a) hozzájárult a funkcionálizált aerogél citotoxicitásához. Az élő sejtek jelenlétében végzett *in vitro* hatóanyag leadási kísérletek eredményei sohasem mutattak a funkcionálizált aerogélbe kötött teljes MTX mennyiség 10%-ánál nagyobb kioldódást, mivel figyelembe kellett venni azt, hogy a sejtek gyorsan felvették és metabolizálták a felszabadult gyógyszert, így a tápközegben mért koncentráció egyensúlyi állapotot tükrözött. A MFH-AG mikrorészecskék magas fokú, specifikus citotoxicitása a jövőbeli terápiás alkalmazások feltétele lehet.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk első részében egér állatmodellben vizsgáltuk a hasüregből, nyirokutakon keresztül történő metasztázis kialakulását a felső *mediastinalis* nyirokcsomókban. Kimutattuk, hogy az intraperitoneálisan oltott tus szemcsékhez hasonlóan az egér eredetű SCC VII daganatos sejtek is a diafragmán keresztül jutottak át, és megjelentek a paratimikális nyirokcsomókban. Az alkalmazott modellben a paratimikális nyirokcsomók az őrszem nyirokcsomók, melyeknek orvosi diagnosztikai szempontból van jelentős szerepük. Hematoxylin-eozin és immunhisztokémiai festési módszerekkel bizonyítottuk, hogy a paratimikális nyirokcsomók a hasüregi daganatok áttétes sejtjeit tartalmazzák, a hasüregi tumorok őrszem nyirokcsomói. A leírt egér metasztázis modell alkalmas lehet a nyirokmetasztázisok terápiájára potenciálisan alkalmas különböző antitumor ágensek és/vagy gyógyszerhordozó anyagok tesztelésére.

A kutatás második részében metotrexát (MTX), mint modell citosztatikum hatását vizsgáltuk az állatmodellben alkalmazott SCC VII daganatos sejtek kromatin kondenzálódási folyamataira. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy alacsony koncentrációban (0,1-1 μM) is megfigyelhető volt mikronukleuszok képződése, magasabb koncentrációk esetén pedig apoptotikus (1-10 μM) és nekrotikus (100 μM) elváltozásokat tapasztaltunk. Ki kell azonban emelni, hogy a mikronukleusz képződés, amely a citotoxicitás indikátora, a kromatin kondenzálódás normál intermedierjei közé tartozik, oka pedig a nukleáris membrán nyílásain átjutó kromatin struktúrák lehetnek.

Vizsgálataink harmadik részének célja az volt, hogy az újonnan szintetizált H-AG mikrorészecskék sejtekkel való biokompatibilitását megvizsgáljuk. Ezekhez a vizsgálatokhoz a hosszú távú megfigyelésre alkalmas time-lapse videómikroszkópos rendszert, illetve MTT-viabilitás tesztet alkalmaztunk. A biokompatibilitási eredmények alapján elmondható volt, hogy a H-AG mikrorészecskék serkentették a sejtek osztódását, valamint a sejtek a részecskék irányába migráltak. Ezek alapján célszerűnek tűnt egy olyan aerogél alapú rendszer létrehozása, amely tumorelles hatóanyagot tartalmaz. Az aerogél részecskéket MTX-al funkcionizáltuk (MFH-AG), és különböző kollagenáz aktivitású sejt vonalakon teszteltük a részecskék citotoxikus hatását. A közel sejtméretű MFH-AG részecskék (2 mg/ml-es koncentráció esetén) a szabad, vizes közegben lévő 0,2 mg/ml-es koncentrációjú MTX-el ekvivalens hatást mutatott, a gyógyszer felszabadulás feltétele pedig a sejtek eltérő kollagenáz enzim aktivitása volt.

8. SUMMARY

In the first part of our work we examined the development of metastasis from the abdominal cavity through the lymphatic drainage to the upper mediastinal lymph nodes in mouse model. We have shown that, similarly to the India ink colloidal particles, the mouse cancer cells (SCC VII) traversed the diaphragm and appeared in the parathymic lymph nodes after intraperitoneal injection. Hematoxylin-eosin and immunohistochemical stainings have shown that parathymic lymph nodes contained metastatic cells of abdominal tumor. In the used mouse model the parathymic lymph nodes are sentinel lymph nodes, which have a significant role in medical diagnostics. The described mouse metastatic model may be suitable for testing various antitumor agents and/or drug carriers *in vivo*, that are potentially suitable for the treatment of lymphatic metastasis.

In the second part of the research we investigated the effect of methotrexate (MTX), as a model cytostatic agent, on the chromatin condensation processes of murine SCC VII tumor cells. We found that micronucleus was formed at low (0.1-1 μM) concentrations, at higher concentrations apoptotic (1-10 μM) and necrotic (100 μM) alterations could be observed. It should be noted, however, that micronucleus formation, which is an indicator of cytotoxicity, is part of the normal intermediates of chromatin condensation and may be due to chromatin structures passing through the openings of the nuclear membrane.

The third part of our study was designed to investigate the biocompatibility of newly synthesized H-AG microparticles with cells. For these studies a time-lapse video microscope system was used, which enables a long-term observation on the cells, and MTT-assay was also used. Based on the biocompatibility results, it was visible that the H-AG microparticles stimulated cell divisions and the cells migrated towards the particles. From these results it was desirable to create an anti-tumor agent containing aerogel-based system. Aerogel particles were functionalized with MTX (MFH-AG) and the cytotoxic effect of the particles were tested on various cell lines with different collagenase activity. The cytotoxicity of the near cell-sized MFH-AG particles (at 2 mg/ml concentration) was equivalent to the effect of the free MTX (at 0.2 mg/ml concentration) in the aqueous medium, furthermore the different collagenase activity of the cells was the requirement of the drug release from the aerogel particles.

9. A KÍSÉRLETI MUNKÁBAN RÉSZTVEVŐ TÁRS-SZERZŐK MUNKÁJÁNAK ISMERTETÉSE

Az értekezés alapjául szolgáló négy közlemény elkészítése során a társszerzők az alábbi részekben működtek közre:

Szemán-Nagy G, Király G, Veres P, Lázár I, Fábián I, Bánfalvi G, Juhász I, Kalmár J. Controlled release of methotrexate from functionalized silica-gelatin aerogel microparticles applied against tumor cell growth. 2019, Int. J. Pharm. 558:396-403.

Kísérletek elvégzése: Király Gábor, Veres Péter, Kalmár József

Aerogélek szintézise, karakterizálása: Veres Péter, Kalmár József, Lázár István, Fábián István

Méreteloszlás kiszámítása: Király Gábor, Veres Péter

Digitális képanalízis: Király Gábor, Szemán-Nagy Gábor

Gyógyszer kioldódás és viabilitás vizsgálatok: Király Gábor, Veres Péter, Kalmár József

Az ábrák elkészítése: Király Gábor, Kalmár József, Veres Péter

Statisztikai analízis: Király Gábor

Kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Szemán-Nagy Gábor, Király Gábor, Kalmár József, Veres Péter, Juhász István

Kézirat revízió: Szemán-Nagy Gábor, Lázár István, Fábián István, Bánfalvi Gáspár, Juhász István

Király G, Hargitai Z, Kovács I, Szemán-Nagy G, Juhász I, Bánfalvi G. Metastatic spread from abdominal tumor cells to parathymic lymph nodes. Pathol. Oncol. Res. 2019, 25(2):625-633.

Kísérletek elvégzése: Király Gábor, Hargitai Zoltán

Tumor sejtek injektálása, egerek boncolása: Király Gábor

Szöveti, immunhisztokémiai munka: Hargitai Zoltán, Kovács Ilona, Király Gábor

Metszetek befotózása: Hargitai Zoltán, Király Gábor

Az ábrák elkészítése: Király Gábor, Bánfalvi Gáspár

Kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Szemán-Nagy Gábor, Király Gábor, Hargitai Zoltán, Bánfalvi Gáspár, Juhász István

Kézirat revízió: Szemán-Nagy Gábor, Juhász István, Bánfalvi Gáspár

Veres P, Király G, Szemán-Nagy G, Lázár I, Fábián I, Kalmár J. Biocompatible silica-gelatin hybrid aerogels covalently labeled with fluorescein. J. Non-Cryst. Solids. 2017, 473:17-25.

Kísérletek elvégzése: Veres Péter, Király Gábor

Aerogélek szintézise, karakterizálása: Veres Péter, Kalmár József

Sejtes kísérletek elvégzése: Király Gábor

Digitális képanalízis: Király Gábor, Szemán-Nagy Gábor

Az ábrák elkészítése: Király Gábor, Kalmár József

Statisztikai analízis: Király Gábor, Veres Péter

Kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Veres Péter, Király Gábor, Szemán-Nagy Gábor, Kalmár József, Lázár István, Fábián István

Kézirat revízió: Kalmár József, Szemán-Nagy Gábor, Lázár István, Fábián István

Király G, Simonyi A, Turáni M, Juhász I, Szemán-Nagy G, Bánfalvi G. Micronucleus formation during chromatin condensation and under apoptotic conditions. Apoptosis. 2017, 22(2):207-219.

Kísérletek elvégzése: Király Gábor, Turáni Melinda, Simonyi Aténé

Sejtek kezelése, sejtmagok izolálása: Király Gábor, Turáni Melinda

Fluoreszcens mikroszkópia: Király Gábor, Turáni Melinda, Simonyi Aténé

Az ábrák elkészítése: Király Gábor, Bánfalvi Gáspár

Statisztikai analízis: Király Gábor, Bánfalvi Gáspár

Kísérletes munka tervezése, eredmények kiértékelése: Király Gábor, Bánfalvi Gáspár, Szemán-Nagy Gábor, Juhász István

Kézirat revízió: Bánfalvi Gáspár, Szemán-Nagy Gábor, Juhász István

IRODALOMJEGYZÉK

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-64.
3. Steeg PS. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer* 2016;16(4):201-18.
4. Tarin D. Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance. *Semin Cancer Biology*. 2011;21(2):72-82.
5. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563-72.
6. Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):453-8.
7. Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:221-47.
8. Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol*. 2008;214(3):283-93.
9. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006;12(8):895-904.
10. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8(2):98-101.
11. Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):705-15.
12. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1053-64.
13. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2527-35.
14. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptor in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410(6824):50-6.
15. Oonakahara K, Matsuyama W, Ikkou H, Kawabata M, Arimura K, Osame M. Stromal-derived Factor-1 α /CXCL12-CXCR 4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2004;30, 5.

16. Sako A, Kitayama J, Koyama H, Ueno H, Uchida H, Hamada H, Nagawa H. Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Res.* 2004;64(10):3624-8.
17. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res.* 2002;62(24):7203-6.
18. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res.* 2005;65(2):465-72.
19. Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 2000;157:55-81.
20. Jeremiah C Healey. Detection of peritoneal metastasis. *Cancer Imaging.* 2001; 1(2):4-12.
21. Uren RF, Hoefnagel CA. Lymphoscintigraphy. In Thompson JF, Morton DL, Kroon BB eds. *Textbook of Melanoma.* London: Martin Dunitz, 2004;339-64.
22. Rouvière H. *Anatomie des Lymphatiques de l'homme.* Paris: Masson, 1932.
23. Torabi M, Aguino SL, Harisinghani MG. Current concepts in lymph node imaging. *J Nucl Med.* 2004;45(9):1509-18.
24. Frija J, Bourrier P, Zagdanski AM, De Kerviler E. [Diagnosis of a malignant lymph node]. *J Radiol.* 2005;86(2 Pt 1):113-25.
25. Harisinghani MG, Saksena MA, Hahn PF, King B, Kim J, Torabi MT, Weissleder R. Ferumoxtran-10-enhanced MR lymphangiography: does contrast-enhanced imaging alone suffice for accurate lymph node characterization? *AJR Am J Roentgenol.* 2006;186(1):144-8.
26. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual, 6th Edn.* Springer 2002.
27. Diehl SJ, Lehmann KJ, Sadick M, Lachmann R, Georgi M. Pancreatic cancer: value of dual-phase helical CT in assessing resectability. *Radiology* 1998;206(2):373-8.
28. Murakami K, Nawano S, Moriyama N, Sekiguchi R, Satake M, Iwata R, Hayashi T, Nemoto K. [Staging of pancreatic ductal adenocarcinoma using dynamic MR imaging]. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi.* 1997;57(9):596-601.
29. Cancer facts & figures 2004 (Annual Newsletter). In: American Cancer Society.
30. Sasako M, Sano T, Yamamoto S, Kurokawa Y, Nashimoto A, Kurita A, Hiratsuka M, Tsujinaka T, Kinoshita T, Arai K, Yamamura Y, Okajima K. D2 lymphadenectomy alone

- or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer. *N Engl J Med*. 2008;31;359(5):453-62.
31. Sonneland J, Anson BJ, Beaton LE. Surgical anatomy of the arterial supply to the colon from the superior mesenteric artery based upon a study of 600 specimens. *Surg Gynecol Obstet*. 1958;106(4):385-98.
 32. Griffiths JD. Surgical anatomy of the blood of the distal colon. *Ann R Coll Surg Engl*. 1956;19(4):241–256.
 33. Yun M, Lim JS, Noh SH, Hyung WJ, Cheong JH, Bong JK, Cho A, Lee JD. Lymph node staging of gastric cancer using ¹⁸F-FDG-PET: a comparison study with CT. *J Nucl Med*. 2005;46(10):1582-8.
 34. Parungo CP, Colson YL, Kim S, Kim S, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV. Sentinel Lymph Node Mapping of the Pleural Space. *Chest*. 2005;127(5): 1799–1804.
 35. Parungo CP, Ohnishi S, De Grand AM, Laurence RG, Soltesz EG, Colson YL, Kang PM, Mihaljevic T, Cohn LH, Frangioni JV. *In vivo* optical imaging of pleural space drainage to lymph nodes of prognostic significance. *Ann Surg Oncol* 2004;11(12):1085-92.
 36. Abu-Hijleh MF, Habbal OA, Moqattash ST. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *J Anat*. 1995; 186(Pt 3):453–467.
 37. Abernethy NJ, Chin W, Hay JB, Rodela H, Oreopoulos D, Johnston MG. Lymphatic drainage of the peritoneal cavity in sheep. *Am J Physiol*. 1991;260(3 Pt 2):F353-8.
 38. Cardenas A, Kelleher T, Chopra S. Review article: hepatic hydrothorax. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;1;20(3):271-9.
 39. Fritz DL, Waag DM. Transdiaphragmatic lymphatic transport of intraperitoneally administered marker in hamsters. *Lab Anim Sci*. 1999;49(5):522-9.
 40. Parungo CP, Soybel DI, Colson YL, Kim SW, Ohnishi S, DeGrand AM, Laurence RG, Soltesz EG, Chen FY, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV. Lymphatic drainage of the peritoneal space: a pattern dependent on bowel lymphatics. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(2):286-98.
 41. Zhdanov DA. General anatomy and physiology of the lymphatic system. Leningrad Medgiz, (in russian) 1952.
 42. Olin T, Saldeen T. The lymphatic pathways from the peritoneal cavity: A lymphangiographic study in the rat. *Cancer Res*. 1964;24:1700-1711.
 43. Blau JN, Gaugas JM. Parathymic lymph nodes in rats and mice. *Immunology*. 1968;14:763–765.

44. Tilney NL. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat.* 1971;109:369–383.
45. Yamashita A, Miyasaka M, Trnka Z. Early post- thymic T cells: studies on lymphocytes in the lymph coming from thymus of the sheep. In: Morris B, Miyasaka M (eds) *Immunology of the sheep*. Editions Roche, Basel, 1985;p 162.
46. Harris PF, Templeton WR. Preliminary studies on the lymphatic drainage of the guinea-pig thymus with special reference to extrinsic vessels. *J Anat Lond* 1966;100:694–698.
47. Severeanu. Die Lymphgefäße der Thymus. *Arch Anat Entw Gesch* 93. 1909.
48. Tanegashima A, Yamashita A, Yamamoto H, Fukunaga T. Human parathymic lymph node: morphological and functional significance. *Immunology* 1999;97(2):301–308.
49. Shirai Y, Wakai T, Hatakeyama K. Radical lymph node dissection for gallbladder cancer: indications and limitations. *Surg Oncol Clin N Am.* 2007;16(1):221-32.
50. Nolan RM, Adie SG, Marjanovic M, Chaney EJ, South FA, Monroy GL, Shemonski ND, Erickson-Bhatt SJ, Shelton RL, Bower AJ, Simpson DG, Cradock KA, Liu ZG, Ray PS, Boppart SA. Intraoperative optical coherence tomography for assessing human lymph nodes for metastatic cancer. *BMC Cancer* 2016;16:144.
51. Ribeiro U, Gama-Rodrigues JJ, Safatle-Ribeiro AV, Bitelman B, Ibrahim RE, Ferreira MB, Laudanna AA, Pinotti HW. Prognostic significance of intraperitoneal free cancer cells obtained by laparoscopic peritoneal lavage in patients with gastric cancer. *J Gastrointest Surg.* 1998;2(3):244-9.
52. Moriguchi S, Maehara Y, Korenaga D, Sugimachi K, Nose Y. Risk factors which predict pattern of recurrence after curative surgery for patients with advanced gastric cancer. *Surg Oncol.* 1992;1(5):341-6.
53. Fink A. S., Longmire W. P. Carcinoma of stomach Subiston D. C. eds. . *Textbook of Surgery*, 1991;14th ed. 814-827.
54. Koder Y, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T. Peritoneal washing cytology: prognostic value of positive findings in patients with gastric carcinoma undergoing a potentially curative resection. *J Surg Oncol.* 1999;72(2):60-4; discussion 64-5.
55. Decker S, Sausville E. Perspectives on the history and evolution of tumor models. Chapter 1. In: Teicher BA (ed) *Tumor models in cancer research*. Springer, New York, 2011;pp. 3-20.
56. Gober MD, Bashir HM, Seykora JT. Reconstructing skin cancers using animal models. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32:123-128.

57. Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis *in vivo*. *Carcinogenesis* 2005;26:513-523.
58. Tan MH, Holyoke ED, Goldrosen MH. Murine colon adenocarcinoma: syngenic orthotopic transplantation and subsequent hepatic metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1977;59:1537-1544.
59. Fidler IJ, Naito S, Pathak S. Orthotopic implantation is essential for the selection, growth and metastasis of human renal cell cancer in nude mice [corrected]. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;9:149–165.
60. An Z, Wang X, Geller J, Moossa AR, Hoffman RM. Surgical orthotopic implantation allows high lung and lymph node metastatic expression of human prostate carcinoma cell line PC-3 in nude mice. *Prostate.* 1998;34:169–174.
61. Nagamachi Y, Tani M, Shimizu K, Tsuda H, Niitsu Y, Yokota J. Orthotopic growth and metastasis of human non-small cell lung carcinoma cell injected into the pleural cavity of nude mice. *Cancer Lett.* 1998;127:203–209.
62. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer.* 2004;40:852–857.
63. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;17;60(11):1278-88.
64. Siegel RA, Rathbone MJ. Overview of controlled release mechanisms. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, pp. 19-43, Springer, 2012.
65. Roberto S, Valeria B, Roberto del V, Raffaella M, Chiara FA, Leopoldo R. Analysis by high resolution ultrasound of superficial lymph nodes: anatomical, morphological and structural variations. *Clin Imaging.* 2014;38 (2):96-9.
66. Xie Y, Bagby TR, Cohen MS, Forrest ML. Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. *Expert Opin Drug Delivery.* 2009;6(8):785-92.
67. Huang C, Hsu P, Hung Y, Liao Y, Liu C, Hour C, Kao M, Tsay GJ, Hung H, Liu GY. Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production. *Apoptosis* 2005;10(4):895-907.
68. Jeffes EW, McCullough JL, Pittelkow MR, McCormick A, Almanzor J, Liu G, Dang M, Voss K, Voss J, Schlotzhauer A. Methotrexate therapy for psoriasis: differential sensitivity of proliferating lymphoid and epithelial cells to the cytotoxic and growth-inhibitory effects of methotrexate. *J Invest Dermatol.* 1995;104(2):183-8.

69. Wright JE, Pardo M, Tretyakov A, Alperin WL, Trites D, Rosowsky A. Pharmacokinetics, antifolate activity and tissue distribution of PT523 in SCC VII tumor-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;42(4):300-6.
70. Bremnes RM, Slørdal L, Wist E, Aarbakke J. Dose-dependent pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in the rat *in vivo*. *Cancer Res.* 1989 15;49(22):6359-64.
71. Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer* 1978;41(1):36-51.
72. Creaven PJ, Hansen HH, Alford DA, Allen LM. Methotrexate in liver and bile after intravenous dosage in man. *Br J Cancer* 1973;28(6):589-91.
73. Iqbal MP. Accumulation of methotrexate in human tissues following high-dose methotrexate therapy. *J Pak Med Assoc.* 1998;48(11):341-3.
74. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol.* 2009;146(5):489-503.
75. Bonetti A, Chatelut E, Kim S. An extended-release formulation of methotrexate for subcutaneous administration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;33(4):303-6.
76. Fuksa L, Brackova E, Kolouchova G, Hirsova P, Hroch M, Cermanova J, Staud F, Micuda S. Dexamethasone reduces methotrexate biliary elimination and potentiates its hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 2010;12;267(1-3):165-71.
77. Devineni D, Blanton CD, Gallo JM. Preparation and *in vitro* evaluation of magnetic microsphere-methotrexate conjugate drug delivery systems. *Bioconjug Chem.* 1995; 6(2):203-10.
78. Singh UV, Udupa N. *In vitro* characterization of methotrexate loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma-180 mice bearing tumor. *Pharm Acta Helv.* 1997;72(3):165-73.
79. Paliwal R, Paliwal SR, Mishra N, Mehta A, Vyas SP. Engineered chylomicron mimicking carrier emulsome for lymph targeted oral delivery of methotrexate. *Int J Pharm.* 2009; 1;380(1-2):181-8.
80. Affleck K, Embleton MJ. Monoclonal antibody targeting of methotrexate (MTX) against MTX-resistant tumour cell lines. *Br J Cancer.* 1992;65(6):838-44.
81. Boratyński J, Opolski A, Wietrzyk J, Górski A, Radzikowski C. Cytotoxic and antitumor effect of fibrinogen-methotrexate conjugate. *Cancer Lett.* 2000;148(2):189-95.

82. Endo N, Kato Y, Takeda Y, Saito M, Umemoto N, Kishida K, Hara T. *In vitro* cytotoxicity of a human serum albumin-mediated conjugate of methotrexate with anti-MM46 monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1987;47(4):1076-80.
83. Hudecz F, Clegg JA, Kajtár J, Embleton MJ, Pimm MV, Szekerke M, Baldwin RW. Influence of carrier on biodistribution and *in vitro* cytotoxicity of methotrexate-branched polypeptide conjugates. *Bioconjug Chem.* 1993;4(1):25-33.
84. Wu Z, Shah A, Patel N, Yuan X. Development of methotrexate proline prodrug to overcome resistance by MDA-MB-231 cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(17):5108-12.
85. Narayani R, Rao KP. Biodegradable microspheres using two different gelatin drug conjugates for the controlled delivery of methotrexate. *Int J Pharm.* 1996;128(1-2):261-268.
86. Kosasih A, Bowman BJ, Wigent RJ, Ofner CM. Characterization and *in vitro* release of methotrexate from gelatin/methotrexate conjugates formed using different preparation variables. *Int J Pharm.* 2000;204(1-2):81-9.
87. Ofner III, C.M., Pica, K., Bowman, B.J., Chen, C.S. Growth inhibition, drug load, and degradation studies of gelatin/methotrexate conjugates. *Int. J. Pharm.* 2006;308:90-99.
88. Pica, K., Tchao, R., Ofner, C.M. Gelatin-methotrexate conjugate microspheres as a potential drug delivery system. *J. Pharm. Sci.* 2006;95:1896-1908.
89. Arruebo M. Drug delivery from structured porous inorganic materials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2012;4(1):16-30.
90. Sher P, Ingavle G, Ponrathnam S, Pawar AP. Low density porous carrier drug adsorption and release study by response surface methodology using different solvents. *Int J Pharm.* 2007;22;331(1):72-83.
91. Song SW, Hidajat K, Kawi S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix–drug interactions. *Langmuir.* 2005;11;21(21):9568-75.
92. Andersson J, Rosenholm J, Areva S, Lindén M. Influences of material characteristics on Ibuprofen drug loading and release profiles from ordered micro-and mesoporous silica matrices. *Chem Mater.* 2004;16(21):4160–4167.
93. Smirnova I, Mamic J, Arlt W. Adsorption of drugs on silica aerogels, *Langmuir.* 2003;19,20:8521–8525.
94. Alnaief M, Smirnova I. Effect of surface functionalization of silica aerogel on their adsorptive and release properties. *J Non-Crystalline Solids.* 2010; 15:1644-1649.

95. Smirnova I, Suttiruengwong S, Seiler M, Arlt W. Improvement of the solubility of poor soluble drugs by adsorption on silica aerogels, *Pharm Dev Techn.* 2004;9(4):443–452.
96. Kistler SS. Coherent expanded aerogels and jellies. *Nature* 1931 127:741
97. Berg A, Droege MW, Fellmann JD, Klaveness J, Rongved P. Medical use of organic aerogels and biodegradable organic aerogels. 1995;WO 95/01165.
98. Smirnova, I, Suttiruengwong, S, & Arlt, W. Feasibility study of hydrophilic and hydrophobic silica aerogels as drug delivery systems. *J Non-Cryst Solids* 2004;350:54–60.
99. Maleki H, Duraes L, Portugal A. An overview on silica aerogels synthesis and different mechanical reinforcing strategies. *J Non-Cryst Solids* 2014;385:55-74.
100. Rosenholm JM, Lindén M. Towards establishing structure-activity relationships for mesoporous silica in drug delivery applications. *J Control Release* 2008;128(2):157-64.
101. Smirnova I, Suttiruengwong S, Seiler M, Arlt W. Dissolution rate enhancement by adsorption of poorly soluble drugs on hydrophilic silica aerogels. *Pharm Dev Technol.* 2004 9(4):443-52.
102. Schwertfeger F, Zimmermann A, Krempel H. Use of inorganic aerogels in pharmacy. US Patent 2001; 6, 280, 744.
103. Maver U, Godec A, Bele M, Planinsek O, Gaberscek M, Srcic S, Jamnik J. Novel hybrid silica xerogels for stabilization and controlled release of drug. *Int J Pharm.* 2007;330(1-2):164-74.
104. Godec A, Maver U, Bele M, Planinsek O, Srcic S, Gaberscek M, Jamnik J. Vittrification from solution in restricted space: formation and stabilization of amorphous nifedipine in a nanoporous silica xerogel carrier. *Int J Pharm.* 2007;343(1-2):131-40.
105. Guenther U, Smirnova I, Neubert RH. Hydrophilic silica aerogels as dermal drug delivery systems – dithranol as a model drug. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;69(3):935-42.
106. Lee K, Gould G. Aerogel powder therapeutic agents. WO 02/051389 A2. 2001.
107. Mehling T, Smirnova I, Guenther U, Neubert RHH. Polysaccharide-based aerogels as drug carriers. *J Non-Cryst. Solids* 2009;355(50–51):2472–2479.
108. García-González CA, Jin M, Gerth J, Alvarez-Lorenzo C, Smirnova I. Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery. *Carbohydr Polym* 2015;117:797–806.
109. Chiang C-Y, Chu C-C. Synthesis of photoresponsive hybrid alginate hydrogel with photo-controlled release behavior. *Carbohydr Polym.* 2015;119:18–25.
110. Abd El-Ghaffar MA, Hashem MS, El-Awady MK, Rabie AM (2012) pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. *Carbohydr Polym.* 2012;89(2):667–675.

- 111.Holland SJ, Tighe BJ, Gould PL. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J Control Release* 1986;4(3):155–180.
- 112.Venkatraman S, Boey F, Lao LL. Implanted cardiovascular polymers: natural, synthetic and bio-inspired. *Prog Polym Sci* 2008;33(9):853–874.
- 113.Claiborne TE, Slepian MJ, Hossainy S, Bluestein D. Polymeric trileaflet prosthetic heart valves: evolution and path to clinical reality. *Expert Rev Med Dev.* 2012; 9(6):577–594.
- 114.Yang WW, Pierstorff E. Reservoir-based polymer drug delivery systems. *J Lab Autom* 2012;17(1):50–58.
- 115.Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009; 1(2):226–236
- 116.Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int J Polym. Sci* 2011:19
- 117.Mogosan GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm* 2014;463(2):127–136
- 118.Agrawal P, Soni S, Mittal G, Bhatnagar A. Role of polymeric biomaterials as wound healing agents. *Int J Lower Extrem Wounds* 2014;13(3):180–190
- 119.Yin W, Rubenstein D. Biomedical applications of aerogels. In: Aegerter MA, Leventis N, Koebel MM (eds) *Aerogels handbook. Advances in sol–gel derived materials and technologies.* 2011;Springer, New York, pp 683–694.
- 120.Jones JR. Sol–gel materials for biomedical applications. In: Levy D, Zayat M (eds) *The sol–gel handbook: synthesis, characterization and applications, 3-volume set.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015; pp 1345–1370.
- 121.Lee H, Homma A, Tatsumi E, Taenaka Y. Observation of cavitation pits on mechanical heart valve surfaces in an artificial heart used in *in vitro* testing. *J Artif Organs* 2010;13(1):17–23.
- 122.Claiborne TE, Bluestein D, Schoephoerster RT. Development and evaluation of a novel artificial catheter-deliverable prosthetic heart valve and method for *in vitro* testing. *Int J Artif Organs* 2009;32(5):262–271.
- 123.Yin W, Venkitachalam SM, Jarrett E, Staggs S, Leventis N, Lu H, Rubenstein DA. Biocompatibility of surfactant-templated polyurea-nanoencapsulated macroporous silica aerogels with plasma platelets and endothelial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(4):1431–1439.

124. Ayers MR, Hunt AJ. Synthesis and properties of chitosan/silica hybrid aerogels. *J Non-Cryst Solids* 2001;285(1–3):123–127.
125. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59(4–5):207–233.
126. Cardea S, Pisanti P, Reverchon E. Generation of chitosan nanoporous structures for tissue engineering applications using a supercritical fluid assisted process. *J Supercrit Fluids*. 2010;54(3):290–295.
127. Aimé C, Coradin T, Fernandes FM. Biomimetic sol–gel materials. In: Levy D, Zayat M (eds) *The sol–gel handbook: synthesis, characterization and applications*, 3-volume set. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015;605–650.
128. Nakanishi K. Properties and applications of sol–gel materials: functionalized porous amorphous solids (monoliths). In: Levy D, Zayat M (eds) *The sol–gel handbook: synthesis, characterization and applications*, 3-volume set. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015; pp 745–766.
129. Quraishi S, Martins M, Barros AA, Gurikov P, Raman SP, Smirnova I, Duarte ARC, Reis RL. Novel non-cytotoxic alginate–lignin hybrid aerogels as scaffolds for tissue engineering. *J Supercrit Fluids*. 2015; 105:1–8.
130. Ge J, Li M, Zhang Q, Yang CZ, Wooley PH, Chen X, Yang S-Y. Silica aerogel improves the biocompatibility in a polycaprolactone composite used as a tissue engineering scaffold. *Int J Polym Sci*. 2013;7.
131. Jagur-Grodzinski J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. *Polym Adv Technol* 2010;21(1):27–47.
132. Martins M, Barros AA, Quraishi S, Gurikov P, Raman SP, Smirnova I, Duarte ARC, Reis RL. Preparation of macroporous alginate-based aerogels for biomedical applications. *J Supercrit Fluids* 2015;106:152–159.
133. Raman SP, Gurikov P, Smirnova I. Hybrid alginate based aerogels by carbon dioxide induced gelation: novel technique for multiple applications. *J Supercrit Fluids* 2015;106:23–33.
134. Rocco P, Viggiano I, Schiraldi DA. Fabrication and mechanical characterization of lignin-based aerogels. *Green Mater* 2014;2(3):153–158.
135. Yu H, Wooley PH, Yang S-Y. Biocompatibility of polyε-caprolactone–hydroxyapatite composite on mouse bone marrow-derived osteoblasts and endothelial cells. *J Orthop Surg Res*. 2009;4(1):1–9.

136. Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S. Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules* 2005;6(5):2583–2589.
137. Wu KJ, Wu CS, Chang JS. Biodegradability and mechanical properties of polycaprolactone composites encapsulating phosphate-solubilizing bacterium *Bacillus* sp PG01. *Process Biochem* 2007;42(4):669–675.
138. Abdelrahman T, Newton H. Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)* 2011;29(10):491–495.
139. Benbow M. Managing wound pain: Is there an ‘ideal dressing’? *Br J Nurs* 2010;19(20):1273–1274.
140. Maver T, Maver U, Mostegel F, Grieser T, Spirk S, Smrke D, Stana Kleinschek K. Cellulose based thin films as a platform for drug release studies to mimick wound dressing materials. *Cellulose*. 2015;22:749–761.
141. Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv.* 2011;29(3):322–337.
142. Moritz S, Wiegand C, Wesarg F, Hessler N, Müller FA, Kralisch D, Hipler U-C, Fischer D. Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *Int J Pharm.* 2014;471(1–2):45–55.
143. Lin WC, Lien CC, Yeh HJ, Yu CM, Hsu SH. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydr Polym.* 2013;94 (1):603–611.
144. Lu TH, Li Q, Chen WS, Yu HP. Composite aerogels based on dialdehyde nanocellulose and collagen for potential applications as wound dressing and tissue engineering scaffold. *Compos Sci Technol.* 2014;94:132–138.
145. Giray S, Bal T, Kartal AM, Kizilel S, Erkey C. Controlled drug delivery through a novel PEG hydrogel encapsulated silica aerogel system. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(5):1307–15.
146. Alnaief M, Antonyuk S, Hentzschel CM, Leopold CS, Heinrich S, Smirnova I. A novel process for coating of silica aerogel microspheres for controlled drug release applications. *Microporous and mesoporous materials.* 2012;160:167–173.
147. Follmann HDM, Oliveira ON, Lazarin-Bidóia D, Nakamura CV, Huang X, Asefa T, Silva R. Multifunctional hybrid aerogels: hyperbranched polymer-trapped mesoporous silica nanoparticles for sustained and prolonged drug release. *Nanoscale.* 2018;10(4):1704–1715.

148. Veres P, López-Periago AM, Lázár I, Saurina J, Domingo C. Hybrid aerogel preparations as drug delivery matrices for low water-solubility drugs. *Int J Pharm.* 2015;496(2):360-70.
149. Veres P, Kéri M, Bányai I, Lázár I, Fábián I, Domingo C, Kalmár J. Mechanism of drug release from silica-gelatin aerogel-Relationship between matrix structure and release kinetics. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;152:229-237.
150. Liu R, Liao P, Liu J, Feng P. Responsive polymer-coated mesoporous silica as a pH-sensitive nanocarrier for controlled release. *Langmuir.* 2011;27(6):3095-9.
151. Guillet-Nicolas R, Popat A, Bridot JL, Monteith G, Qiao SZ, Kleitz F. pH-responsive nutraceutical-mesoporous silica nanoconjugates with enhanced colloidal stability. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52 (8):2318-22.
152. Xue M, Findenegg GH. Lysozyme as a pH-responsive valve for the controlled release of guest molecules from mesoporous silica. *Langmuir.* 2012;28(50):17578-84.
153. Chen YP, Chen CT, Hung Y, Chou CM, Liu TP, Liang MR, Chen CT, Mou CY. A new strategy for intracellular delivery of enzyme using mesoporous silica nanoparticles: superoxide dismutase. *J Am Chem Soc.* 2013;135(4):1516-23.
154. Agostini A, Mondragón L, Pascual L, Aznar E, Coll C, Martínez-Manez R, Sancenón F, Soto J, Marcos MD, Amorós P, Costero AM, Parra M, Gil S. Design of enzyme-mediated controlled release systems based on silica mesoporous supports capped with ester-glycol groups. *Langmuir.* 2012;28(41):14766-76.
155. Popat A, Ross BP, Liu J, Jambhrunkar S, Kleitz F, Qiao SZ. Enzyme-responsive controlled release of covalently bound prodrug from functional mesoporous silica nanospheres. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51(50):12486-9.
156. Yuan L, Chen W, Hu J, Zhang JZ, Yang D. Mechanistic study of the covalent loading of paclitaxel via disulfide linkers for controlled drug release. *Langmuir.* 2013;29(2):734-43.
157. Zhang Q, Liu F, Nguyen KT, Ma X, Wang X, Xing B, Zhao Y. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for cancer-targeted and controlled drug delivery. *Adv Funct Materials.* 2012;(24):5144-5156.
158. Luo Z, Cai K, Hu Y, Zhao L, Liu P, Duan L, Yang W. Mesoporous silica nanoparticles end-capped with collagen: redox-responsive nanoreservoirs for targeted drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(3):640-3.
159. He D, He X, Wang K, Chen M, Cao J, Zhao Y. Reversible stimuli-responsive controlled release using mesoporous silica nanoparticles functionalized with a smart DNA molecule-gated switch. *J Mat Chem.* 2012;22:14715-14721.

160. Liao YT, Lee CH, Chen ST, Lai JY, Wu KC-W. Gelatin-functionalized mesoporous silica nanoparticles with sustained release properties for intracameral pharmacotherapy of glaucoma. *J Mater Chem B*. 2017; 5,7008-7013.
161. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
162. Liu Y, Ding X, Li J, Luo Z, Hu Y, Liu J, Dai L, Zhou J, Hou C, Cai K. Enzyme responsive drug delivery system based on mesoporous silica nanoparticles for tumor therapy *in vivo*. *Nanotechnology*. 2015;26 (14):145102.
163. Xu JH, Gao FP, Li LL, Ma HL, Fan YS, Liu W, Guo SS, Zhao XZ, Wang H. Gelatin–mesoporous silica nanoparticles as matrix metalloproteinases-degradable drug delivery systems *in vivo*. *Microporous and mesoporous materials*. 2013;182:165-172.
164. Kanazawa H, Rapacchietta D, Kallman RF. Schedule-dependent therapeutic gain from the combination of fractionated irradiation and cis-diamminedichloroplatinum (II) in C3H/Km mouse model systems. *Cancer Res*. 1988;1;48(11):3158-64.
165. Banfalvi G. Fluorescent analysis of replication and intermediates of chromatin folding in nuclei of mammalian cells. In: Bach PH, Reynolds CH, Clark JM, Mottley J, Poole PL (eds) *Biotechnology applications of microinjection, microscopic imaging, and fluorescence*. Plenum Press, New York, 1993; pp. 111–119.
166. Banfalvi G., Sooki-Toth A., Sarkar N., Csuzi S., Antoni F. Nascent DNA chains synthesized in reversibly permeable cells of mouse thymocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1984;139,553-559.
167. Lesh RE, Somlyo AP, Owens GK, Somlyo AV. Reversible permeabilization: a novel technique for the intracellular introduction of antisense oligodeoxynucleotides into intact smooth muscle. *Circ Res* 1995;77:220–230.
168. Lazar, I., Fabian, I. A continuous extraction and pumpless supercritical CO₂ drying system for laboratory-scale aerogel production. *Gels*. 2016;2,26.
169. Nagy G, Hennig GW, Petrenyi K, Kovacs L, Pocsí I, Dombradi V, Banfalvi G. Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98:5185-5194.
170. 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. *Histol Histopathol*. 2009;24:1367–1379.
171. Yamamoto K, Kikuchi Y. Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei. *Mutation Res*. 1981;90:163–173.

172. Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M. A pilot experiment for the micronucleus test, the multi-sampling at multi-dose levels method. *Mutation Res.* 1984;141:165–169.
173. Kasahara Y, Nakai Y, Miura D, Yagi K, Hirabayashi K, Makita T. Mechanism of induction of micronuclei and chromosome aberrations in mouse bone marrow by multiple treatments of methotrexate. *Mutat Res.* 1992;280:117–128.
174. Yamamoto KI, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res.* 1980;71:127–31.
175. Sekeroğlu ZA, Sekeroğlu V. Effects of *Viscum album* L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. *Mutat Res.* 2012;746:56–9.
176. Trencsenyi G, Bako F, Nagy G, Kertai P, Banfalvi G. Methotrexate induced apoptotic and necrotic chromatin changes in rat myeloid leukemia cells. *Inflamm Res.* 2015;64:193–203.
177. Cui ZY, Ahn JS, Lee JY, Kim WS, Lim HY, Jeon HJ, Suh SW, Kim JH, Kong WH, Kang JM, Nam DH, Park K. Mouse orthotopic lung cancer model induced by PC14PE6. *Cancer Res Treat.* 2006;38:234–239.
178. Paget S. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet.* 1989;1:571–573.
179. Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Investig New Drugs.* 1999;17:343–359.
180. Marco AJ, Domingo M, Ruberte J, Carretero A, Briones V, Dominguez L. Lymphatic drainage of *Listeria innocuosa* and Indian ink inoculated in the peritoneal cavity of the mouse. *Lab Anim.* 1992;26:200–205.
181. Rafferty P, Egenolf D, Brosnan K, Makropoulos D, Jordan J, Meshaw K, Walker M, Volk A, Bugelski PJ. Immunotoxicologic effects of cyclosporine on tumor progression in models of squamous cell carcinoma and B-cell lymphoma in C3H mice. *J Immunotoxicol.* 2012;9:43–55.
182. Dunn TB. Normal and pathologic anatomy of the reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. *J Natl Cancer Inst.* 1954;14(6):1281–1433.
183. MacCallum WG. On the mechanism of absorption of granular materials from the peritoneum. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1903;14:105–115.
184. Pitt ML, Anderson AO. Direct transdiaphragmatic traffic of peritoneal macrophages to the lung. *Adv Exp Med Biol* 1988;237:627–632.
185. Tsilibary EC, Wissig SL. Lymphatic absorption from the peritoneal cavity: regulation of patency of mesothelial stomata. *Microvascular research* 1983;25:22-39.

186. Moore A, Sergeyev N, Bredow S, Weissleder R. A model system to quantitate tumor burden in locoregional lymph nodes during cancer spread. *Invasion Metastasis*. 1998; 18:192–197.
187. Speyer JL, Myers CE. The use of peritoneal dialysis for delivery of chemotherapy to intraperitoneal malignancies. *Recent Results Cancer Res*. 1980;74:264-9.
188. Raftery AT, Nicholas DS, Cope GH. Clinical anatomy of the peritoneal mesothelium: a review. *Clinical Anatomy*. 1989;2:69-85.
189. Dunn DL, Barke RA, Knight NB, Humphrey EW, Simmons RL. Role of resident macrophages, peripheral neutrophils, and translymphatic absorption in bacterial clearance from the peritoneal cavity. *Infect Immun*. 1985;49:257-264.
190. Mahedero G, Morán JM, Salas J, Blanco M. Absorption of intralipid and interferences from nutrients infused into the peritoneal cavity of the rat. *The American Journal of Surgery* 1992;164:45-50.
191. Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer*. 1993;72:37-41.
192. Scheithauer W, Funovics J, Mueller C, Ludwig H. Sequential high-dose methotrexate, 5-fluorouracil, and doxorubicin for treatment of advanced pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1990;116:132-3.
193. Tahara M, Ohtsu A, Boku N, Nagashima F, Muto M, Sano Y, Yoshida M, Mera K, Hironaka S, Tajiri H, Yoshida S. Sequential methotrexate and 5-fluorouracil therapy for gastric cancer patients with peritoneal dissemination: a retrospective study. *Gastric Cancer*. 2001;4:212-8.
194. Banfalvi G, Sarvari A, Nagy G. Chromatin changes induced by Pb and Cd in human cells. *Toxicol In Vitro*. 2012;26:1064–1071.
195. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*. 2000;47:247-57.
196. Koga S, Izumi A, Maeta M, Shimizu N, Osaki Y, Kanayama H. The effects of total-body hyperthermia combined with anticancer drugs on immunity in advanced cancer patients. *Cancer*. 1983;52(7):1173-1177.
197. Nakajima T. Tabular analysis of 10,000 cases of gastric cancer in Cancer Institute Hospital. *Jpn J Cancer Chemother*. 1994;21:1813-1897.
198. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:653-64.

199. Adair JH, Parette MP, Altinoğlu EI, Kester M. ACS Nano. 2010;4:4967-70.
200. Lammers T, Hennink WE, Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and medicine. Br J Cancer. 2008;99:392-397.
201. Shvedova AA, Kagan VE, Fadeel B. Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010;50:63-88.
202. Hu YL, Gao JQ. Potential neurotoxicity of nanoparticles. Int J Pharm. 2010;394:115-21.
203. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. Small. 2008;4:26-49.
204. Barnard AS. Nanohazards: knowledge is our first defence. Nat Mater. 2006;5(4):245-8.
205. Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. J Leukoc Biol. 1996;59:100-15.
206. Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. J Cell Biol. 1997;137:1445-57.

TÁRGYSZAVAK-KEYWORDS

paratimikális nyirokcsomó, metasztázis, kromatin kondenzálódás, biokompatibilitás, time-lapse képalkotás, hibrid aerogél, metotrexát, kollagenáz enzim

parathymic lymph node, metastasis, chromatin condensation, biocompatibility, time-lapse imaging, hybrid aerogel, methotrexate, collagenase enzyme

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Juhász Istvánnak és Dr. Szemán-Nagy Gábornak, akikhez bármikor fordulhattam a kutatómunkával kapcsolatos problémáimmal, illetve a segítségükért, türelmükért és iránymutatásukért a kutatás évei alatt.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Márton Ildikónak, a Fogorvostudományi Doktori Iskola vezetőjének, hogy lehetőséget adott a doktori iskola keretein belül a munkám elvégzéséhez.

Külön szeretném megköszönni Prof. Dr. Bánfalvi Gáspárnak az állatkísérletek megtervezésében, a kromatin kondenzációs vizsgálatokban és az eredmények kiértékelésében nyújtott segítségét, és hasznos tanácsait.

Köszönet illeti Dr. Kalmár Józsefet és Dr. Veres Pétert az aerogélek szintézisével, karakterizálásával és a hatóanyag kioldódási vizsgálatokban nyújtott elméleti és gyakorlati segítségükért és közreműködésükért.

Köszönöm Dr. Hargitai Zoltánnak a szövettani minták feldolgozásában és kiértékelésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pócsi Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken végezzem el a munkámhoz szükséges kísérleteket.

Köszönöm továbbá minden jelenlegi és volt kollégámnak a közlemények, illetve az értekezés elkészítésében nyújtott segítségüket.

Végül pedig szeretném megköszönni Szüleimnek és Testvéremnek a végtelen támogatásukat, biztatásukat és szeretetüket, akik nélkül a jelen értekezés nem készülhetett volna el.

A dolgozat a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 sz. pályázat, és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA: T042762, OTKA: NK-105156, OTKA: FK-124571) támogatásával készült.



Nyilvántartási szám: DEENK/147/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Király Gábor
Neptun kód: E7QICV
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szemán-Nagy, G., **Király, G.**, Veres, P., Lázár, I., Fábián, I., Bánfalvi, G., Juhász, I., Kalmár, J.:
Controlled release of methotrexate from functionalized silica-gelatin aerogel microparticles
applied against tumor cell growth.
Int. J. Pharm. 558, 396-403, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.024>
IF: 3.862 (2017)
2. **Király, G.**, Hargitai, Z., Kovács, I., Szemán-Nagy, G., Juhász, I., Bánfalvi, G.: Metastatic Spread
from Abdominal Tumor Cells to Parathymic Lymph Nodes.
Pathol. Oncol. Res. 25 (2), 625-633, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-018-0492-7>
IF: 1.935 (2017)
3. Veres, P., **Király, G.**, Szemán-Nagy, G., Lázár, I., Fábián, I., Kalmár, J.: Biocompatible silica-
gelatin hybrid aerogels covalently labeled with fluorescein.
J. Non-Cryst. Solids. 473, 17-25, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.07.016>
IF: 2.488
4. **Király, G.**, Simonyi, A. S., Turáni, M., Juhász, I., Szemán-Nagy, G., Bánfalvi, G.: Micronucleus
formation during chromatin condensation and under apoptotic conditions.
Apoptosis. 22 (2), 207-219, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-016-1316-4>
IF: 3.967





További közlemények

5. Pócsi, I., **Király, G.**, Bánfalvi, G.: Antineoplastic potential of mycotoxins.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 65 (3), 267-307, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.65.2018.015>
IF: 1.107 (2017)
6. Nagy, E., Erdei, I., Farkas, M., Péter, Z., Várvolgyi, T., **Király, G.**, Juhász, I.: A sejterápia
lehetőségei az égés kezelésében: debreceni tapasztalatok.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 93 (3), 114-118, 2017.
7. Turáni, M., Bánfalvi, G., Péter, Á., Kukoricza, K., **Király, G.**, Tálás, L., Tánczos, B., Dezső, B.,
Nagy, G., Kemény-Beke, Á.: Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth.
Toxicol. Vitro. 29 (2), 370-379, 2015.
IF: 3.338
8. Szemán-Nagy, G., Benkő, I., **Király, G.**, Vörös, O., Tánczos, B., Sztrik, A., Takács, T., Pócsi, I.,
Prokisch, J., Bánfalvi, G.: Cellular and nephrotoxicity of selenium species.
J. Trace Elem. Med. Biol. 30, 160-170, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.12.011>
IF: 2.55
9. Bányai, E., Balogh, E., Fagyas, M., Arosio, P., Hendrik, Z., **Király, G.**, Szemán-Nagy, G., Tánczos,
B., Pócsi, I., Balla, G., Balla, J., Bánfalvi, G., Jeney, V.: Novel functional changes during
podocyte differentiation: increase of oxidative resistance and H-ferritin expression.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 1-10, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/976394>
IF: 3.516
10. Scharfenberger, L., Hennerici, T., **Király, G.**, Kitzmüller, S., Vernooij, M., Zielinski, J. G.:
Transgenic mouse technology in skin biology: generation of complete or tissue-specific
knockout mice.
J. Invest. Dermatol. 134 (1), 1-5, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.457>
IF: 7.216
11. **Király, G.**, Szemán-Nagy, G., Turáni, M., Bánfalvi, G.: Tumor Cell Fusion and Multipolar
Trivision.
J. Cancer Res. Therap. Oncol. 2 (102), 1-5, 2014.





12. Szemán-Nagy, G., **Király, G.**, Turáni, M., Bánfalvi, G.: Cell Trivision of Hyperploid Cells.

DNA Cell Biol. 32 (12), 676-684, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2013.2147>

IF: 1.991

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,97

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
12,252**

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

Debrecen, 2019.05.29.

