

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Vizsgálatok a fluoropirimidin kemoterápia javítására
biokémiai modulátorokkal vagy biomarkerek pásztázó lézer
citometriás mérésével**

Dr. Megyeri Attila

Témavezető:

Prof. Dr. Kovács Péter

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
FARMAKOLÓGIAI ÉS FARMAKOTERÁPIAI INTÉZET

Debrecen, 2006.

1. BEVEZETÉS

A fluoropirimidin származékokat több, mint 40 éves történetük ellenére még mindig széles körben alkalmazzák a daganatkemoterápiában, elsősorban előrehaladott colorectalis daganatokban és emlőrákban. Noha a fluoropirimidinek pl. előrehaladott colorectalis daganatokban még mindig a a leghatékonyabb szerek közé tartoznak, az eredmények továbbra sem kielégítőek. Ez indokolja, hogy napjainkban is számos vizsgálat foglalkozik hatékonyságuk növelési lehetőségeivel.

Ahhoz, hogy az 5-FU kifejthesse citotoxikus hatását, aktív nukleotid analógokká kell átalakulnia. Ezen intracellulárisan zajló anabolikus folyamatok mellett azonban inaktív metabolitok is képződnek. A komplex anabolikus és katabolikus folyamatok jó lehetőséget adnak az 5-FU hatásának és toxicitásának ún. biokémiai modulátorokkal történő befolyásolására. A metabolizmusban részt vevő enzimek mennyiségének, illetve aktivitásának a tumor és normál sejtek és szövetek között megfigyelt különbségei egyrészt magyarázhatják a biokémiai modulátorok szelektivitását, másrészt viszont lehetőséget nyújthatnak a fluoropirimidin alapú kemoterápiára adott válasz előrejelzésére még a terápia megkezdése előtt, ezzel hozzájárulva a individualizált terápiához.

A különféle megközelítések közül az 5-fluoro-2'-dezoxiuridin-5'-monofoszfát (FdUMP) timidilát szintázhoz (TS) való kötődésének fokozása leukovorin (LV) kombinált alkalmazásával szignifikánsan javította a kezelésre reagálók arányát és a klinikumban széles körben alkalmazásra került a colorectalis daganatok kemoterápiájában. Normál szövetekben korrelációt figyeltek meg az 5-FU RNS-be való beépülése és a citotoxicitás között, ezért az uridint részletesen vizsgálták normál szöveteknek az 5-FU

okozta károsodástól való szelektív védelmére, de klinikai alkalmazásra nem került, a hatékony vérszint eléréséhez szükséges nagy adagok alkalmazása esetén jelentkező mellékhatások miatt. A közelmúltban zajlott preklinikai és klinikai vizsgálatok az uridin „prodrug” formában történő alkalmazásával és uridin katabolizmus gátlókkal a normál sejtek védelméhez szükséges magas uridin vérszint tartós fenntartását célozták anélkül, hogy a nagyadagú uridin kezeléskor fellépő mellékhatások megjelenjenek. Ezen vizsgálatok kedvező eredményei alátámasztják, hogy az uridin „rescue” kezelésnek fontos szerepe lehet az 5-FU dózisának növelésében és ezáltal a hatásosabb kemoterápiában. A fluoropirimidinek klinikai hatékonyságának növelésére az utóbbi időben alkalmazott egyéb módszerek két területre fókuszáltak: (i) orálisan alkalmazható 5-FU profarmakonok kifejlesztésére és (ii) az 5-FU katabolizmusában részt vevő enzimek gátlóinak alkalmazására. Ezen vizsgálatok két legsikeresebb eredménye a már klinikai felhasználásra elfogadott tegafur-uracil (UFTTM) és capecitabin (XelodaTM).

Sajnos, az új anyagokra reagáló betegek aránya még mindig nem kielégítő és az átlagos túlélés általában nem javult. A relatív hatástalanság egyik valószínű oka a tumorok jelentős molekuláris szintű heterogenitása. Az 5-FU-ra adott választ befolyásoló sok tényező kvantitatív különbségei alapvetően különböző eredményekhez vezethetnek. Ráadásul a különbségek nem feltétlenül érintenek minden tumor sejtet, így a markerek specifikus hisztológiai mintázata is befolyásolhatja a tumor választ, ami pedig a hagyományos, homogenizált szövetekkel dolgozó eljárásokkal nem detektálható. A tumorválasz és a túlélés további javulása várható a betegek – releváns molekuláris markerek objektív meghatározásán alapuló – gondos szelekciójától. A mért molekuláris paraméterek számának növelése és hisztológiai lokalizációjuk figyelembevétele várhatóan tovább javítja azon

betegpopulációk kiválasztásának pontosságát, akik reagálnak a kemoterápiára.

Remélhető, hogy az új pásztázó lézer citometriás módszer (laser-scanning cytometry = LSC) – illetve egyéb hasonló technikák, melyeket összefoglalóan gyakran „tárgylemez alapú citometria” néven emlegetnek – alkalmas lesz egynél több marker párhuzamosan történő kvantitatív mérésére a korábbi módszereknél jóval nagyobb sebességgel és pontossággal amellet, hogy megőrzi a szövetek hisztológiai struktúráját és ezzel gyakorlatilag összekapcsolja ezeket az adatokat a hagyományos hisztológiával. A fentebb említett tulajdonságok nyilvánvalóan nemcsak a fluoropirimidin metabolizmusban részt vevő enzimek vizsgálatában bizonyulhatnak hasznosnak, hanem bármilyen olyan esetben is, ahol egy jelenség jellemzéséhez több antigén kvantitatív meghatározása és szöveti lokalizációja is fontos. A pásztázó lézer citometria előnyösen alkalmazható fluoreszcens fehérjét expresszáló sejtek (pl. zöld fluoreszcens fehérje; GFP) szövetekben történő detektálására és számuk meghatározására, még akkor is ha ezek az összes sejtnek csak igen kis részét teszik ki ($<0.1\%$). Szemben a konfokális pásztázó lézer mikroszkópiával, a pásztázó lézer citometria jóval nagyobb számú sejt analízisére képes sokkal rövidebb idő alatt, így statisztikai analízisre alkalmas mennyiségű adat összegyűjtése lényegesen egyszerűbb. A fluoreszcens fehérjéket expresszáló sejtek identifikálása, összekapcsolva egyéb markerek egyidejű és kvantitatív meghatározásával ugyanazon vagy a környező sejtekben, hasznos módszernek bizonyulhat a daganatsejt „homing” korai fázisának vizsgálatára is, aminek szerepe igen jelentős a malignus sejtek terjedésében.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben részletezett okok miatt alapvető célunk a fluoropirimidin alapú kemoterápia javítási lehetőségeinek tanulmányozása volt. Érdeklődésünk elsősorban két területre irányult: (i) biokémiai modulátorok hatásainak vizsgálata az 5-fluorouracil myelotoxicitására a csontvelői progenitorsejtek szintjén, (ii) a pásztázó lézer citometria lehetőségeinek felderítése több, a tumor szenzitivitást meghatározó antigén objektív meghatározására. Ezeken kívül vizsgálni kívántuk a pásztázó lézer citometria potenciális alkalmazhatóságát a metasztázisképződés vizsgálatában.

Négy már elfogadott vagy potenciális modulátornak – LV, U, UDPG és EDU – az 5-FU-val kezelt egerek vérképzésére gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni. Elsősorban a következő kérdésekre szerettünk volna választ kapni: (i) Hogyan befolyásolja a LV előkezelés az 5-FU myelotoxicitását? (ii) Van-e az U-nek kedvező hatása az 5-FU csontvelőkárosító hatására ha a TS gátló hatás fokozására LV-nal együtt alkalmazzuk? Továbbá arra is kíváncsiak voltunk, hogy a vérképző sejteket védő modulátorok és, az azok regenerációját elősegítő, granulocita kolónia stimuláló faktor (G-CSF) kombinációja tovább mérsékli-e a csontvelő károsodását és a következményes neutropeniát. A hatékony „rescue”-hoz szükséges, nagy dózisú U mellékhatásai preklinikai és klinikai vizsgálatokban is jelentősnek bizonyultak. Ezért megvizsgáltuk, hogy az U profarmakonjának tekinthető UDPG rendelkezik-e az U-éhoz hasonló hatásokkal. Az UDPG ugyanis – irodalmi adatok szerint – az U-nél jobban tolerálható, sőt néhány országban gyógyszerként is használják, más indikációban. Egy másik lehetséges biokémiai modulátorról az 5-etil-2'-deoxiuridin-ről korábban kimutatták, hogy fokozza a 5-FU tumorelles hatását. Ez a hatás azonban csak akkor

kedvező, ha a citotoxicitás fokozódása szelektíven csak a malignus sejteket érinti és nem jelentkezik, vagy legalábbis nem ugyanolyan mértékben, a normál sejtmegújulási rendszerekben. Ismereteink szerint ezt a hatást korábban nem vizsgálták a csontvelői progenitorsejtek szintjén így a mi célunk az EDU és 5-FU kombináció egerek vérképzésére gyakorolt hatásának jellemzése volt.

A tárgylemez alapú citometria napjainkban kialakuló módszerei kedvező lehetőséget nyújthatnak a fluoropirimidin anyagcserében szereplő enzimek vizsgálatára a szöveti struktúra megőrzése és több paraméter egyidejű kvantitatív vizsgálata révén. Célunk a pásztázó lézer citométer (laser-scanning cytometer; LSC) lehetőségeinek és korlátainak felderítése volt a fluoropirimidin metabolizáló enzimek vizsgálatára rutin hisztológiai vizsgálatra készített, formalinban fixált és paraffinba ágyazott szöveti metszetekben. Mind klinikai, mind pedig preklinikai vizsgálatok arra utaltak, hogy a timidin foszforiláz (TP) és a dihidropirimidin dehidrogenáz (DPD) aránya igen fontos a capecitabin terápiára adott tumorválasz meghatározásában. Ennek megfelelően különösen érdekelt ezen két enzim arányának egyidejű és kvantitatív meghatározása hisztológiai metszetekben.

Az LSC speciális tulajdonságai (statisztikailag értékelhető számú sejt kvantitatív mérése a szöveti struktúra megőrzése mellett) különösen kedvezőek lehetnek a metasztázis képződés in situ viszonyainak felderítésében. A metasztázisképződés korai stádiumának vizsgálatához elengedhetetlen a ritka sejtek detektálásának képessége a különböző szövetekben. Minthogy a GFP transzfektált sejtek és GFP transzgén állatok különösen alkalmasnak ígérkező új eszközök a metasztázis folyamatának tisztázásában, első lépésként mi a pásztázó lézer citometria érzékenységét kívántuk vizsgálni a ritka GFP-pozitív sejtek detektálására egy GFP-negatív sejtekből álló sejtpopulációban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Az 5-fluorouracil myelotoxicitásának biokémiai modulátorai

3.1.1. Farmakonok

Az 5-FU myelotoxicitását moduláló különféle farmakonokat többféle adagolási séma szerint alkalmaztuk, melyek részleteiben az értekezés megfelelő fejezetében kerülnek leírásra. Az uridint (U) a Sigma-tól (St. Louis, MO, USA) illetve a Reanal-tól (Budapest, Magyarország) vásároltuk, az 5-etil-2'-deoxiuridint pedig a Magyar Tudományos Akadémia Központi Kémiai Kutató Intézetében (Budapest, Magyarország) szintetizálták. Az egyéb farmakonok – 5-fluorouracil, uridin difoszfoglükóz (UDPG), rekombináns humán granulocita kolónia-stimuláló faktor (rhG-CSF, filgrastim), leukovorin – gyári gyógyszerkészítmények voltak.

Minden gyógyszert intraperitonealisan alkalmaztunk 10 ml/kg térfogatban, kivéve a U-t és az UDPG-t, melyeket a szokatlanul nagy adagok miatt 20 ml/kg térfogatban adtunk be. A kontroll állatok a kezelt állatokkal egyidejűleg a megfelelő oldószert kapták.

3.1.2. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben mindkét nembeli, legalább 8 hetes (BALB/c x CBA)F1 vagy BDF1 egereket használtunk. Az egerek száma kezelési csoportonként és időpontonként 8-12 (rendszerint 9) volt.

3.1.3. Sejtszám meghatározás

A vérvétel az egerek retroorbitális vénás plexusából történt; a csontvelői sejteket a femurból sejttenyésztő médiummal mostuk ki aszeptikus körülmények között. A fehérvérsejteket és a magvas csontvelői sejteket Türk oldattal történő hígítás után Bürker kamrában mikroszkóp alatt számoltuk. A kvalitatív vérkép meghatározása May-Grünwald-Giemsa szerint festett keneteken történt. Általában 100 sejtet számoltunk meg, de még súlyos leukopenia esetén is minimum 50-et. A csontvelő cellularitásán az egy femurban található magvas sejtek számát értettük.

3.1.4. Hemopoietikus progenitorsejtek tenyésztése

A kolóniaképző képességgel rendelkező progenitorsejtek számát (CFUc = Colony Forming Unit in culture = GM-CFU = Granulocyte-Macrophage Colony Forming Unit) az in vivo kezelésre használt gyógyszereket nem tartalmazó lágyagar tenyészetekben határoztuk meg. Kolónia stimuláló faktor forrásként vagy L-sejt kondicionált médiumot, vagy WEHI-3B kondicionált médiumot alkalmaztunk. Pike és Robinson szerint (1970) aminosavakkal, vitaminokkal és Na-pyruváttal szupplementált, lósavót és 5×10^{-5} M 2-merkaptóetanolt tartalmazó McCoy's 5A tápfolyadékot használtunk. A lágy gél állapotot 0,3% agar hozzáadásával érték el. Általában egy Petri csészébe 1×10^5 sejtet oltottunk, kivéve ha a CFUc várható gyakorisága a magvas csontvelői sejtek között alacsony volt (pl. a citotoxikus inzultust követő első napokban). 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészéket használtunk és a tenyészeteket 7 napig CO₂ termosztátban inkubáltuk 5% CO₂-t és telített vízgőzt tartalmazó levegőben, 37°C hőmérsékleten.

A kolóniaszámolás az inkubációs időszak végén sztereomikroszkóp alatt történt. Kolóniának tekintettünk minden legalább 50 sejtből álló sejtcsoportot. Állatonként legalább három párhuzamos Petri csészét vizsgáltunk.

3.1.5. Statisztikai értékelés

Több kezelési csoport összehasonlítására nem-paraméteres módszereket alkalmaztunk: elsőként a Kruskal-Wallis tesztet végeztük el, majd páronként hasonlítottuk össze a csoportokat Conover vagy Dunn szerint. Ha csak két összehasonlítandó csoport volt akkor a szintén nem-paraméteres Mann-Whitney tesztet használtuk. A neutropenia incidenciákat Fisher féle exakt tesztel hasonlítottuk össze.

3.2. Pásztázó lézer citometria (LSC) vizsgálata a fluoropirimidin metabolizmusban szereplő enzimek szintjének meghatározására

3.2.1. Sejtvonalak

Kontrollként két humán emlőrák sejtvonalat (MDA-MB-231 és ZR-75-1) és egy humán hólyagráksejtvonalat választottunk, amelyekben a TP és DPD aktivitását korábban már részletesen jellemezték. Ezek a sejtvonalak az enzimaktivitás mérések szerint a legalacsonyabb (T-24 és MDA-MB-231) és a legmagasabb (ZR-75-1) TP/DPD arányt reprezentálták. A daganatsejteket aminosavakkal, vitaminokkal, penicillinnel, streptomycinnel, α -tioglicerinnel és 5% FBS-sel szupplementált „Dulbecco’s Modified Eagle Medium”-ban tenyésztettük 5% CO₂-ot és telített vízgőzt tartalmazó levegőben, 37°C hőmérsékleten. A tenyészetekből összegyűjtött sejteket

szilanizált tárgylemezre centrifugáltuk egy Hettich Universal 16 citospin centrifuga segítségével majd szárítás után a festésig -20°C-on tároltuk.

3.2.2. Szöveti metszetek

A korábban említett daganatsejtvonalakból készített „mesterséges szöveteket”, vagy standard, formalinban fixált és paraffinba ágyazott tumor szöveteket használtunk. A „mesterséges szövetek” elkészítéséhez nagy mennyiségű tumorsejtet gyűjtöttünk, amiből tömör sejt pelletet készítettünk. Formalin fixálást követően a sejt pelleteket először HistoGelTM-be (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA) ágyaztuk, majd paraffinba a standard pathológiai protokoll szerint. A paraffinba ágyazott sejtvonalakból és szöveti blokkokból 4-5 µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre helyeztünk. A tumor szövetek metszetei mellé a kontroll sejtvonalak metszetei kerültek ugyanazon tárgylemezre. Festés előtt a metszeteket xilollal deparaffinizáltuk, 95%-os etanollal rehidráltuk, előmelegített „DAKO Target Retrieval” oldatba helyeztük és 95°C-on 25 percig végeztük az antigén előhívást egy párolóedényben.

3.2.3. Az enzimek indirekt immunfluoreszcens jelölése

A párhuzamos indirekt immunfluoreszcens jelöléshez – a másodlagos antitestekkel adott keresztreakció elkerülése miatt – elengedhetetlen volt különböző fajokból származó elsődleges antitestek használata. Emiatt az elsődleges jelölésre egér eredetű anti-humán-TP (1C6-203) és patkány eredetű anti-humán-DPD (2H9-1b) monoklonális ellenanyagokat használtunk. Másodlagos antitestekként Alexa Fluor 488-cal jelzett kecske eredetű, patkány IgG ellenes antitesteket használtunk a patkány eredetű, DPD ellenes antitest jelölésére. Hasonlóan, az egér eredetű TP ellenes

antitest jelölésére Alexa Fluor 546-tal vagy Alexa Fluor 647-tel jelölt kecske eredetű, egér IgG ellenes antitesteket használtunk. A különféle fluoreszcens festékek emissziós spektrumai átfedésének elkerülésére – jól elkülönő sejtek vizsgálata esetén – TO-PRO-3 DNS festéket használtunk a sejtek detektálására. A szöveti metszeteken nem volt szükség magfesték alkalmazására és a kettős jelölés minden esetben Alexa 488 (DPD jel) és Alexa 647 (TP jel) alkalmazásával történt.

A nem specifikus kötőhelyek Superblock oldattal történő blokkolása után az elsődleges és másodlagos antitestek optimalizált koncentrációjával történő jelölés között óvatos, de gondos mosás történt. A TO-PRO-3-mal történő magfestés ezután következett, de csak a citospin centrifugával tárgylemezre helyezett, egymástól jól elkülönő sejtek vizsgálata esetén. Végül desztillált vízzel történő öblítés után a mintákat „Prolong antifade” oldat felhasználásával fedőlemezekkel takartuk le.

3.2.4. Pásztázó lézer citometria (LSC) jól elkülönülő sejteken

Festést követően a tárgylemezeket egy pásztázó lézer citométer (Laser Scanning Cytometer = LSC, CompuCyte Corp, Cambridge, MA, USA) segítségével vizsgáltuk. Az LSC egy Ar-ion és egy HeNe lézerrel volt felszerelve. Az Alexa 488 és 546 festékek gerjesztésére az Ar-ion lézert, míg a TO-PRO-3 gerjesztésére a HeNe lézert használtuk. Ezeken a jól elkülönülő sejteken a sejtek felsimerése („contouring”) a távoli vörösben (>650 nm) detektált TO-PRO-3 fluoreszcencián alapult. Alexa 488 és 546 festékek fluoreszcenciáját pedig a zöld, illetve a narancs csatornában detektáltuk.

3.2.5. *Pásztázó lézer citometria (LSC) szöveti metszeteken*

Szöveti metszeteken a fluoreszcencia intenzitás detektálására az LSC „phantom contouring” funkcióját választottuk. A mikroszkóp 10x objektívjét használtuk, a „phantom contour”-ok sugarát 10 μm -re állítottuk be és az átfedést elkerülendő, a phantom központok közötti minimális távolságot pedig 20 μm -re. Az Alexa 488 festék gerjesztése és detektálása az individuális sejteknél leírtaknak megfelelően történt, míg az Alexa 647 gerjesztésére a HeNe lézert alkalmaztuk és emisszióját a távoli vörösben detektáltuk.

3.2.6. *Adatfeldolgozás*

A magfesték fluoreszcenciája által azonosított különálló sejtek esetén az enzimszintek jellemzésére a megfelelő színű contour-on belüli fluoreszcencia összintenzitás (integral fluoreszcencia) és a contour-on belüli terület hányadosát használtuk az eltérő sejtnagyságokból eredő különbségek korrekciójára. Metszetekben csak a fluoreszcencia integrált használtuk, mivel a „phantom contour”-ok területe állandó.

Az összehasonlításokhoz a mért fluoreszcencia intenzitásokat a ZR-75-1 sejtekre normalizáltuk, amelyik irodalmi adatok szerint számos daganat sejtvonak között a TP/DPD enzimaktivitásra nézve a legnagyobb hányadost mutatta.

3.2.7. *Enzimszintek, illetve azok arányának térképezése tumor metszetekben*

Az LSC standard szoftvere (WinCyte 3.4) képes a detektált sejtek, illetve „phantom”-ok X-Y koordinátáinak megfelelően scatter diagramok ábrázolására, illetve az ábrázolt pontok különböző színekben történő megjelenítésére, pl. az integrál fluoreszcencia hisztogramon kijelölt

régióknak megfelelően. A WinCyte 3.4 ábrái azonban gyenge minőségűek. Jobb minőségű ábrák készítéséhez a „list mode” adatokat exportáltuk és a SigmaPlot szoftver segítségével contour térképeket készítettünk.

3.2.8. Tumorsejtvonalak 5'-DFUR érzékenységeinek meghatározása

A tumor sejtek 5'-DFUR érzékenységét a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) assay segítségével határoztuk meg. A tumorsejteket egy 96 lyukú sejtenyésztőedénybe oltottuk, minden sejt- és gyógyszer-koncentrációból legalább három párhuzamost készítve. Mindegyik sejtvonalból két különböző sejtkoncentrációt oltottunk le és 24 órás, 5% CO₂-t és telített vízgőzt tartalmazó levegőben, 37°C hőmérsékleten történő inkubálás után az 5'-DFUR növekvő koncentrációit adtuk hozzá. Ezt követő további 72 órás inkubáció után 50 µl MTT (3 mg/ml) hozzáadása következett, majd ismét 4,5 órás inkubáció előtt 50 µl 25% SDS (pH 2.0) hozzáadásával leállítottuk az MTT további átalakulását a kék formazán származékává. A tenyésztőedényeket ezután még egy éjszakán át inkubáltuk, majd az abszorbancia leolvasása egy Tecan Ultra ELISA leolvasóval történt 595 nm-es hullámhosszon.

3.3. Pásztázó lézer citometria (LSC) szenzitivitásának vizsgálata zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló sejtek detektálására

GFP heterozigóta (GFP+/-) és vad típusú C57BL6/J (GFP-/-) egerek véréből mononukleáris sejteket szeparáltunk Nycoprep 1.077A sűrűség gradiens média alkalmazásával. Az LSC-vel végzett mérésekhez a szeparált sejteket fixálás után tárgylemezre centrifugáltuk. A ritka sejtek

detektálásához GFP+/- mononukleáris sejteket kevertünk GFP-/- sejtekkel 1:1000 arányban.

A fluoreszcencia mérésekhez az LSC 488 nm hullámhosszú Ar-ion lézert használtuk gerjesztésre és az emissziót a zöld csatornában detektáltuk. A fenotípus meghatározásoknál a sejteket az előreszórás, mint „contouring” paraméter alapján detektáltuk, és a fluoreszcencia intenzitást a legintenzívebb zöld pixellel („max pixel”) jellemeztük, ami a legfényesebb pixel intenzitása egy detektált sejtben belül. A ritka sejtek felismerési érzékenységének vizsgálatakor a zöld fluoreszcenciát használtuk „contouring” paraméterként és a specificitás biztosítása végett a detektálási küszöböt olyan értékre állítottuk, amivel a negatív kontroll mintában nem volt sejt detektálható. Ezt a küszöböt alkalmaztuk a kevert GFP pozitív és GFP negatív sejteket tartalmazó tárgylemezek vizsgálatakor.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. Biokémiai modulátorok hatása az 5-FU myelotoxicitására

Az 5-FU, illetve annak modulátorokkal és/vagy G-CSF-sel való kombinációinak myelopoiesisre gyakorolt hatásait négy paraméterrel jellemeztük. Az alábbiak közül az első három a csontvelőre vonatkozik, míg a negyedik a neutrofil granulociták száma a perifériás vérben.

- (i) cellularitás, a magvas csontvelői sejtek száma egy femurban;
- (ii) CFUc frekvencia: 10^5 magvas csontvelői sejtől képződő kolóniák száma;
- (iii) egy femur CFUc tartalma, valójában az előző két változó szorzata;

- (iv) Abszolút neutrofil szám (ANC) a perifériás vérben.

4.1.1. LV, U vagy UDPG, és G-CSF hatása az 5-FU hematotoxicitására

Amint az várható volt, az 5-FU súlyos myelotoxicitása mind a négy paraméter esetén kimutatható volt; ez egyben nyilván előfeltétele is volt annak, hogy az 5-FU myelotoxicitását csökkentő hatásokat vizsgálhassuk. LV előkezelés, ami a TS gátlás tartamának megnyújtásával feltételezhetően szelektíven növeli az 5-FU tumorsejt ellenes toxicitását, kísérleteinkben az 5-FU myelotoxicitásának enyhe fokozódását eredményezte. Bár a naponkénti összehasonlítás statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutatott, az 5-FU előtt LV-t kapó csoport medián értékei többnyire kisebbek voltak, mint a csak 5-FU-t kapó csoportéi. Annak ellenére, hogy eredményeink azt sugallják, hogy a LV tumorsejt szelektivitása nem abszolút, ez nem szól a kombináció klinikai használata ellen, hiszen annak értékét a klinikai tapasztalat már bizonyította.

Az U 5-FU myelotoxicitást csökkentő kedvező hatását eredményeinek egyértelműen igazolták. U „rescue” hatására a csontvelő medián cellularitásának minimuma korábban jelentkezett és kevésbé alacsony volt, a regeneráció pedig hamarabb indult meg. Az az időtartam pedig, amíg a medián ANC a neutropenia szintje alatt ($<0.3 \times 10^9/\text{liter}$) volt, négy nappal csökkent. Azonban az uridin legnyilvánvalóbb hatása a CFUc frekvencia és a CFUc tartalom legalább egy nagyságrenddel való növekedésében jelentkezett az LV+5-FU adása után már az első vizsgált időponttól kezdődően. A regenerációs görbék meredeksége alapján arra lehetett következtetni, hogy a csontvelői CFUc populáció regenerációjának sebessége az U „rescue” hatására nem növekedett. Ezen eredményeink legvalószínűbb magyarázata az, hogy az U-rescue növelte a CFUc-k

túlélését, és a nagyobb számú életképes CFUc tette lehetővé a csontvelő cellularitásának és a perifériás vér ANC-ának korábbi regenerációját.

Az LV+5-FU után naponként adott G-CSF a csontvelőben nem okozott jelentős változást a csak LV+5-FU-t kapó csoporthoz képest. Az ANC tekintetében viszont megmutatkozott a G-CSF kedvező hatása: korábbi és kevésbé alacsony minimum, valamint korábbi visszatérés a kontroll tartományba. A neutropenia tartama (azon napok száma, amelyeken a medián ANC kisebb, mint a neutropenia határa) egy nappal csökkent (4-ről 3 napra). Ezen eredményeink azt mutatták, hogy – amint az várható volt – a G-CSF elősegítette a neutropeniából való felépülést. Az ANC-re gyakorolt nyilvánvaló hatás és a csontvelő cellularitására és CFUc tartalmára gyakorolt minor hatás közötti különbség egy lehetséges magyarázata az lehet, hogy a csontvelői CFUc-k egy osztódó tranzit-populáció részei, amelyben a sejtek fokozott termelődését fokozott kiáramlás ellensúlyozhatja. Egy másik lehetőség, hogy a G-CSF hatása elsősorban a lépben jelentkezett, amit az alábbi megfigyelések is támogatnak: (i) ismert, hogy rágcsálókban a lép fontos helye a megnövekedett szükséglet által indukált fokozott hematopoiesisnek; (ii) egerekben a G-CSF az ős- és a progenitorsejtek csontvelőből a lépbe történő migrációját indukálja.

A progenitor sejtek túlélését javító U, és a granulocytopoiesist elősegítő G-CSF kombinációja tovább javította az eredményeket. A kettős kombináció felülmúlta mindkét önmagában alkalmazott szert; a csontvelő restitúciójában megfigyelt javulással együtt járt a neutropenia mérséklődése, aminek mértéke meghaladta bármelyik szer kedvező hatásának mértékét.

A LV+5-FU utáni U kezelés helyettesítésére az UDPG-t is vizsgáltuk, melynek biztonságossági profilját az U-nél kedvezőbbnek írták le. Az LV+5-FU után adott UDPG kedvező hatásai az uridinéhez hasonlóak voltak,

ideértve a G-CSF-fel megfigyelt szinergizmust is, alátámasztva azt a reményünket, hogy az UDPG és a G-CSF kombinációja hasznos lehet a klinikai onkológiában is az 5-FU vagy a LV+5-FU alkalmazás utáni neutropenia mérséklésére.

4.1.2. 5-etil-2'-dezoxiuridin (EDU) hatása az 5-FU csontvelőtoxicitására

Az EDU-nak, mint az 5-FU modulátorának egér vérképzésre gyakorolt hatását azért vizsgáltuk, mert in vivo humán tumor xenograftokkal végzett vizsgálatokban ez a kombináció ígéretes tumor ellenes hatást mutatott. Ezekben a kísérletekben az 5-FU-t vagy egyszeri adagban (100 mg/kg) vagy 24 óránként adott öt egyenlő részben adtuk be (5x20 mg/kg) és az EDU-t (200, vagy egyszeri adag esetén, 400 mg/kg is) mindig az 5-FU beadása előtt 1 órával alkalmaztuk.

Az 5-FU ugyanazon adagjának frakcionált alkalmazása jelentősen csökkentette a myelotoxicitást, míg az önmagában alkalmazott EDU nem mutatott számottevő myelotoxicitást, de fokozta az 5-FU myelotoxicitását mind a három vizsgált kombinációs séma esetén. Noha az EDU toxicitást növelő hatása az egyszeri adagolás esetén is megfigyelhető volt, különösen súlyosnak a frakcionált séma alkalmazása esetén bizonyult. A femorális CFUc tartalmat jellemző mindkét paraméter több nagyságrenddel alacsonyabb volt az 5x[EDU+5-FU] csoportban mint a csak 5-FU-t kapó csoportban. Az EDU kedvezőtlen hatását az abszolút neutrofil szám (ANC) és a – klinikai szempontból különösen releváns – neutropenia prevalenciája is alátámasztotta. A medián ANC végig alacsonyabb volt, mint a csak 5-FU-t kapó csoporté és folyamatosan csökkent anélkül, hogy a nadír elérésének egyértelmű jele látható lett volna az 5 napos megfigyelési időtartam végéig. A neutropenia prevalenciája ehhez hasonlóan a teljes megfigyelési

időszakban nagyobb volt az 5×[EDU+5-FU] csoportban mint azokban az egerekben amelyek csak 5-FU-t kaptak és ez a különbség jelentősen szignifikáns volt az 1., a 4. és az 5. napon. Valójában minden vizsgált hematológiai paraméter azt mutatta, hogy a frakcionálás kedvező hatását az EDU megszüntette.

Kralovánszky és munkatársai, akik ugyanezeket az adagolási sémákat alkalmazták, szintén megfigyelték, hogy az 5-FU toxicitásának EDU által okozott fokozódása súlyosabb volt az ismételt adagolás esetén. Ugyanezen szerzők leírták azt is, hogy a tumorgátló hatás növekedése sokkal nagyobb volt, ha az EDU-t a frakcionált adagolási sémával kombinálták, mint akkor ha az egyszeri adagolási sémának megfelelően adták. Eredményeink arra utalnak, hogy az EDU-nak az 5-FU toxicitását növelő hatása nem korlátozódik a tumor sejtekre, hanem a nem malignus hemopoietikus sejteken is megfigyelhető.

Az egyszeri és a frakcionált adagolás között az EDU hatásában megfigyelt jelentős különbségeket több tényező is magyarázhatja. Az EDU összdózisa nagyobb volt és az ismételten károsított, folyamatosan regenerálódó csontvelőben az EDU tovább volt jelen. Sejtkinetikai faktorok is fontosak lehetnek minthogy az 5-FU-ról – egy sejtciklus specifikus antimetabolitról – ismert, hogy a gyorsan proliferáló, regenerálódó csontvelőt fokozottan károsítja. Ráadásul az ismételt 5-FU adagolás után bekövetkező változások az összejt állományban együtt járhatnak a moduláló anyagokkal, mint pl. az EDU-val, szembeni érzékenység növekedésével.

Bármilyen is volt az oka, hogy frakcionált adás esetén az EDU jelentősen fokozta az 5-FU myelotoxicitását, megfigyeléseink alapján az EDU-t vagy hozzá hasonló modulátorokat ismételten alkalmazó esetleges klinikai vizsgálatokat különösen gondosan kell tervezni és végrehajtani.

4.2. Fluoropirimidin metabolizáló enzimek szintjének mérése pásztázó lézer citometriával (LSC)

Eleinte, a kettős jelölés alkalmazhatóságának vizsgálatára, a TP méréseket hasonlítottuk össze egyszeresen, illetve kettősen jelölt, egymástól jól elkülönülő sejtekben, normál „contouring”-ot alkalmazva. A relatív TP szintek a mért sejtvonalakban hasonlóak voltak függetlenül attól, hogy csak TP ellenes antitesttel vagy mindkét (TP és DPD) antitesttel történt a jelölés. A három daganatos sejtvonal közül a T-24-ben mértük a legalacsonyabb TP szintet a ZR-75-1-ben pedig a legmagasabbat.

Előzetes vizsgálatainkban szöveti metszetekben a „contouring” sejtmagokra történő optimális beállítását igen nehézkesnek és megbízhatatlannak találtuk, ezért az LSC ún. „phantom contouring” képességét használtuk arra, hogy a metszetről torzításmentes véletlen mintavétellel gyűjtsünk információt a fluoreszcencia intenzitás eloszlásáról. Ugyanazon fluorokrómok alkalmazásával, ugyanazon három sejtvonalból készített „mesterséges” szövetekben hasonló relatív különbségeket kaptunk az egyes sejtvonalak között. A jel-zaj viszony javítása miatt a metszeteken előnyös volt, hogy a „phantom contouring” nélkülözhetővé tette a magfestést, így a TP jelölésére Alexa 647-et használhattunk, aminek az excitációs-emissziós jellemzői hasonlóak a TO-PRO-3-hoz. Ez a változtatás szintén nem okozott eltérést a sejtvonalak közötti relatív fluoreszcenciaintenzitások különbségében.

A DPD és TP/DPD hányados mérések jól elkülönülő sejtekben és „mesterséges” metszetekben is konzisztensen azonos sorrendet adtak a három vizsgált sejtvonalban. A legalacsonyabb DPD szintet a T-24

sejtekben mértük, a legmagasabbat pedig az MDA-MB-231 sejtekben. A TP/DPD hányados legnagyobbak a ZR-75-1 sejtekben adódott, míg a T-24 és az MDA-MB-231 sejtekben jóval alacsonyabb értékeket mértünk. A három sejtvonalon végzett több mérés alapján a T-24 és a ZR-75-1 sejtvonalakban mért fluoreszcenciaintenzitás értékek jól reprodukálhatóak voltak és egymástól jól elkülönültek, így ez a két sejtvonal alkalmasnak tűnt standard viszonyítási alapnak a tumor metszetekben mért TP és DPD szintek összehasonlításához.

Annak vizsgálatára, hogy az immunfluoreszcens mérések összefüggésben állnak a biológiai aktivitással, az eredményeket összehasonlítottuk az MTT assay-vel végzett 5'-DFUR citotoxicitás eredményekkel. Az 5'-DFUR-ra az ZR-75-1 sejtek voltak a legérzékenyebbek (50% gátló koncentráció $[IC_{50}] = 38 \mu M$), a legkevésbé érzékenyek pedig a T-24 sejtek ($[IC_{50}] = 200 \mu M$). Az MDA-MB-231 sejtvonal az előző kettő közötti érzékenységet mutatott ($[IC_{50}] = 120 \mu M$). Jó korrelációt találtunk az LSC-vel mért TP/DPD hányados és a sejtvonalak 5'-DFUR érzékenysége között.

Ezen eredményeink arra utalnak, hogy ez az LSC alapú módszer alkalmas lehet szöveti metszeteken kettős festés után a TP/DPD hányados direkt meghatározására. Szöveti metszeteken az individuális sejtek felismerésében a normál „contouring”-gal tapasztalt problémák megoldására az LSC „phantom contouring” képességét vizsgáltuk. A „phantom contouring” egy torzításmentes véletlen mintavételi protokoll, mely – szemben a normál sejtmagokon alapuló „contouring”-gal – nem feltételezi az individuális sejtek szabályos eloszlását, ami tumorszövetekben nem általános, így a metszeten belül a fluoreszcenciaintenzitás eloszlását pontosabban képes jellemezni. Azonban fontos kiemelni, hogy a „phantom

contouring” nem individuális sejteket mér, hanem a különféle mikroanatómiai régiók (pl. tumorszövet, stróma, nekrotikus szövet, gyulladásos sejtekkel infiltrált területek) fluoreszcencia intenzitásbeli különbségeit jellemzi.

Egy tumormetszetben bemutattuk módszerünk alkalmazhatóságát a TP, DPD és a TP/DPD hányados metszeten belüli eloszlásának jellemzésére. A megbízhatóbb jelölés és az ebből eredő pontosabb mérés miatt a három standard sejtvonalból készített metszetet ugyanarra a tárgylemezre helyeztük, amelyen a tumorminta is volt. A távoli vörös és a zöld fluoreszcencia hányadosának hisztogramjai (mely megfelel a TP/DPD hányadosnak) a vártnak megfelelően azt mutatták, hogy a TP/DPD hányados a ZR-75-1 sejtekben nagyobb volt, mint a két másik sejtvonalban és a tumormetszetben lényegesen nagyobb heterogenitás volt megfigyelhető. Noha az LSC standard szoftvere is képes a TP/DPD hányados eloszlását különböző színekkel térképszerűen bemutatni, azonban az így kapott képek minősége és a mért kvantitatív információ bemutatása nem megfelelő. Ennek javítására kifejlesztettünk egy módszert, ami lényegesebb jobb minőségű képeken mutatja az enzimszintek, illetve azok hányadosainak eloszlását a metszetben a számszerű mért értékek pontosabb figyelembevételével.

Noha kísérleteink a TP és DPD mérésére összpontosítottak, melyek szerepe a fluoropirimidinek és különösen a capecitabin metabolizmusában jelentős, a leírt módszer elvben alkalmas lehet minden olyan rendszer vizsgálatára, ahol a folyamatokat feltételezhetően befolyásoló fehérjék ismertek és ellenük alkalmas antitestek elérhetők.

4.3. Pásztázó lézer citometria (LSC) érzékenységének vizsgálata ritka GFP pozitív sejtek detektálására

Annak vizsgálatára, hogy az LSC milyen érzékenységgel képes a GFP pozitív sejteket detektálni először GFP transzgen egerek fenotípusának minimális mennyiségű perifériás vérből történő megállapítására dolgoztunk ki módszert. Ha a detektálási limitet úgy választottuk ki, hogy a negatív kontroll perifériás vérből izolált mononukleáris sejteknek csak kb. 3-4% volt a limit fölött, akkor a GFP+/- és GFP-/- egerek teljes biztonsággal elkülöníthetőek voltak. Az átlagos fluoreszcenciaintenzitás a pozitív kontrollban legalább 4.4-szer nagyobb volt, mint a negatív kontrollban, ami elegendőnek bizonyult a két fenotípus egyértelmű elkülönítéséhez.

Az érzékenységi vizsgálatokhoz GFP+/- és GFP-/- egerek perifériás vérből izolált mononukleáris sejteket kevertünk össze 1:1000 arányban. A sejtdetektálást a zöld fluoreszcencia mérés alapján végeztük az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően. A tárgylemezekre 5×10^5 sejtet helyeztünk, hogy a sejtek közötti átfedést minimalizáljuk. Tárgylemezenként kb. 35-50 erősen zöld fluoreszcens sejtet sikerült azonosítanunk, ami az elméletileg lehetséges sejtszám mintegy 5-10%-a. Figyelembe véve ezt az 5-10%-os találati valószínűséget, valamint azt, hogy egy citospin területre lényeges átfedés nélkül maximum kb. 1×10^6 sejt helyezhető el, így ha 100 GFP+/- sejt található egy 1 millió sejtben akkor legalább 5-10 sejtet képesek leszünk megtalálni, ami minimálisan kb. $1:10^4$ érzékenységnek fog megfelelni.

Ez a viszonylag alacsony érzékenység esetleg tovább növelhető, pl. a GFP jel erősítésével vagy az autofluoreszcencia csökkentésével, de enélkül is alkalmas lehet pl. a csontvelőben vagy más szövetekben megjelenő

mikrometasztatikus tumorsejtek detektálására és ezzel egyidejűleg egyéb molekulák megjelölésével a környezet és a metasztatikus sejtek kölcsönhatásainak in situ kvantitatív vizsgálatára.

5. ÚJ EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA

5.1. Néhány biokémiai modulátor hatását vizsgáltuk a myelopoiesis 5-FU által okozott károsodására egerekben. A csontvelő károsodásának és restitúciójának jellemzésére meghatároztuk a femorális csontvelő cellularitását és CFU-GM tartalmát, valamint a vérben található neutrofil granulociták számát. Az 5-FU-t LV-nal kombinálva alkalmaztuk, mely a klinikai gyakorlatban alkalmazott szer az 5-FU tumorsejt ellenes toxicitásának növelésére.

5.1.1. Az LV+5-FU után adott uridin (U) jelentősen mérészkelte ezen kombináció súlyos myelotoxicitását minden fentebb említett paraméter vonatkozásában. A plazma U szintjét szintén növelő és emberekben biztonságosabban alkalmazható uridin difoszfoglükóz (UDPG) hasonló kedvező hatásokat mutatott; ennek jelentőségét tovább növeli, hogy az UDPG elérhető humán felhasználásra – más indikációban – elfogadott gyógyszerként is.

5.1.2. LV+5-FU után naponta adott filgrastim, egy G-CSF készítmény, javította a neutropeniából való felépülést. U és filgrastim kombinációja hatásosabb volt az erősen myelotoxikus LV+5-FU kombináció nem kívánt hatásainak kivédésében, mint U vagy filgrastim önmagában, igen jelentősen mérsékelve az LV+5-FU által indukált neutropeniát; az U-t helyettesítő UDPG hasonló eredményt mutatott. Magyarázat: az U azáltal potenciálta a filgrastim kedvező hatását, hogy növelte az LV+5-FU kezelést túlélő és erre a citokinre

reagáló progenitorsejtek számát. Ez a jelenség további vizsgálatokat indokol és hozzájárulhat az LV+5-FU kombináció hatékonyabb klinikai alkalmazásához.

5.1.3. Irodalmi adatok szerint az 5-etil-2'-dezoxiuridin egerekben fokozta az 5-FU tumorellenes hatását. Mi egerekben az 5-FU myelotoxicitásának fokozódását figyeltük meg, különösen a frakcionált 5-FU adagolás esetén, ami arra utal, hogy főként a myeloid progenitor sejtek késleltetett regenerációja állhat a háttérben.

5.2. Kifejlesztettünk egy pásztázó-lézer citometrián (LSC) alapuló új módszert a fluoropirimidinekkel szembeni érzékenység meghatározásban feltehetően szerepet játszó két enzim, a TP és a DPD hányadosának direkt és kvantitatív meghatározására szöveti metszetekben. Az LSC-t eredetileg tárgylemezen elhelyezkedő, egymástól jól elkülönülő sejteken történő kvantitatív fluoreszcencia mérésekre fejlesztették ki, de a nagy sejtsűrűség és a sejteknek a vágási síkhoz viszonyított változatos elhelyezkedése, szöveti metszetekben az egyes sejtek detektálását és mérését nagyon nehezéssé és pontatlanná teszi. Ezért mi szöveti metszetek vizsgálatára egy torzításmentes sztereológiai megközelítést – az LSC „phantom contouring” funkcióját – alkalmaztunk, ami a metszetek különböző régióinak fluoreszcencia intenzitását pontosabban képes jellemezni. Ez a módszer új távlatokat nyithat annak az elgondolásnak a tanulmányozásához, hogy különféle marker enzimek vagy egyéb proteinek parallel mérése humán tumorok hisztológiai

mintáin hozzájárulhat általában daganatellenes szerek, illetve különösen a fluoropirimidinek individualizált használatához.

5.3. Az LSC fentebb említett tulajdonságai kiterjeszthetők a tumor metasztázis képződés egy korai eseményének, a tumorsejtek megtapadásának vizsgálatára, feltéve, hogy minimális számú tumorsejt könnyedén azonosítható nagyszámú normál sejt között. A zöld fluoreszcens fehérje („green fluorescent protein” = GFP) különböző eredetű tumorsejtek hasznos markere lehet, ezért mi egy GFP-pozitív sejteket detektáló LSC alapú módszert dolgoztunk ki, melynek szenzitivitása $1:10^4$. Ezt a szenzitivitást egy olyan metódus alkalmazásával értük el, amelyben a detektálási küszöböt a GFP negatív sejtpopulációban detektált legmagasabb fluoreszcencia szint fölé állítottuk be, ezzel nagyon specifikusan elkülönítve a GFP pozitív sejteket a GFP negatívoktól, amelyek szintén relatíve nagy autofluoreszcenciát mutattak a detektálás hullámhosszán. Ez a szenzitivitás is alkalmas lehet GFP-vel jelölt sejtek detektálására és ezzel egyidejűleg több különféle marker mérésére megtartott anatómiai struktúrák mellett, ami más jelenleg elérhető módszerrel nem lehetséges. A ritka tumor sejtek identifikálásnak és az LSC azon képességének kombinációja, hogy alkalmas a tumorsejtekben vagy a környező sejtekben levő egyéb jelölt markerek kvantitatív vizsgálatára, ígéretesnek látszik a sejtek megtapadásnak vizsgálatára.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Szilvássy Zoltánnak a Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet Igazgatójának, hogy munkámat lehetővé tette és támogatta.

Külön köszönet illeti témavezetőmet Prof. Dr. Kovács Pétert (Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) akinek az irányítása és segítsége nélkül ez az értekezés nem születhetett volna meg.

Hálás vagyok Dr. James F. Eliasonnak (Karmanos Cancer Institute, Detroit, MI, USA) aki lehetővé tette számomra, hogy megismerkedjek a pásztázó lézer citometriával.

Köszönöm Prof. Dr. Jeney Andrásnak (Semmelweis Egyetem I. Patológiai Intézet, Budapest) és Dr. Kralovánszky Juditnak (Országos Onkológia Intézet, Budapest) a munka során nyújtott értékes tanácsaikat és segítségüket.

Meg kell említenem még Dr. Bacsó Zsoltot (Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) akinek szakértelme és baráti segítsége jelentősen hozzájárult a citometriával kapcsolatos ismereteim bővítéséhez, valamint Dr. Benkő Ilonát (Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) aki sokat segített a biokémiai modulátorok vizsgálatával kapcsolatos kísérletekben.

Külön köszönet illeti mindazon munkatársaimat akiknek a munkája nélkülözhetetlen volt a leírt eredmények eléréséhez, valamint közvetlen családomat akik toleranciájukkal és támogatásukkal nagyban hozzájárultak a munkám sikeréhez.

RÖVIDÍTÉSEK

5'-DFUR	5'-dezoxi-5-fluorouridin, doxifluridine, Furtulon®
5-FU	5-fluorouracil
ANC	abszolút neutrofil granulocitaszám
CFUc	Colony Forming Unit in culture
DPD	dihidropirimidin dehidrogenáz
EDU	5-etil-2'-dezoxiuridin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	fetalis borjú savó (fetal bovine serum)
FdUMP	5-fluoro-2'-dezoxiuridin-5'-monofoszfát
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor, filgrastim
GFP	green fluorescent protein
GM-CFU	Granulocyte-Macrophage Colony Forming Unit
LSC	Pásztázó lézer citométer (Laser Scanning Cytometer) vagy Pásztázó lézer citometria (Laser Scanning Cytometry)
LV	leucovorin, 5'-formyltetrahidrofolát
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,3-difeniltetrazolium bromid
RNA	ribonukleinsav
TP	timidin foszforiláz
TS	timidilát szintáz
UDPG	uridin difoszfoglükóz

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

Megyeri, A., Bacso, Z., Shields, A. & Eliason, J. F. (2005) Development of a stereological method to measure levels of fluoropyrimidine metabolizing enzymes in tumor sections using laser scanning cytometry. *Cytometry Part A*, 64A, 62-71.

IF: 1.061

Megyeri, A., Kaplan, J. & Eliason, J. F. (2004) Laser Scanning Cytometry for selection of green fluorescent protein transgenic mice using small number of blood cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61, 183-187.

IF: 1.302

Eliason, J. F. & **Megyeri, A.** (2004) Potential for predicting toxicity and response of fluoropyrimidines in patients. *Current Drug Targets*, 5, 383-388.

IF: 4.104

Megyeri, A., Benko, I., Jeney, A., Kralovanszky, J. & Kovacs, P. (1996) Effect of ethyldeoxyuridine on 5-fluorouracil-induced neutropenia. *Acta Physiologica Hungarica*, 84, 217-218.

Kovacs, P., Benko, I., **Megyeri, A.,** Hernadi, F., Jeney, A. & Kralovanszky, J. (1994) Effect of uridine rescue on 5-fluorouracil-induced neutropenia. IN Einhorn, J., Nord, C. E. & Norrby, S. R. (Eds.) *Recent Advances in Chemotherapy*. Washington, American Soc. Microbiol. 952-952.

Egyéb közlemények

Gidali, J., Feher, I., **Megyeri, A.** & Kovacs, P. (2001) Leukaemogenic potency of WEHI-3B cells grown in vitro or in leukaemic mice. *Bone Marrow Transplantation*, 28, 699-704.

IF: 2.554

Benko, I., Kovacs, P., Szegedi, I., **Megyeri, A.**, Kiss, A., Balogh, E., Olah, E., Kappelmayer, J. & Kiss, C. (2001) Effect of myelopoietic and pleiotropic cytokines on colony formation by blast cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 363, 499-508.

IF: 2.472

Benko, I., Hernadi, F., **Megyeri, A.**, Kiss, A., Somogyi, G., Tegyei, Z., Kraicsovits, F. & Kovacs, P. (1999) Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43, 675-681.

IF: 3.296

Benko, I., Marodi, L., **Megyeri, A.**, Kaposzta, R. & Kovacs, P. (1996) Effect of granulocyte colony-stimulating factor on granulopoiesis of congenital neutropenic children. *Acta Physiologica Hungarica*, 84, 169-170.

Benko, I., **Megyeri, A.**, Hernadi, F. & Kovacs, P. (1996) Antifungális hatású imidazol-származékok hatása egér csontvelősejtek in vitro kolóniaképzésére. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 66, 241-245.