Doktori értekezés

Antal Otilia Tamara

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM, BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

2015, Szeged

**Telítetlen zsírsavak és sugárzás hatása humán glióma sejtekre:
morfológiai, biokémiai és génexpresszió elemzés**

Ph.D. értekezés

Szerző: Antal Otilia Tamara

Témavezető: Dr. Puskás László Géza

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM, BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT, AZ EURÓPAI ÚNIÓ KIVÁLÓSÁGI
KÖZPONTJA – GENETIKA INTÉZET – FUNKCIONÁLIS GENOMIKA
LABORATÓRIUM

SZTE TTIK, 2015, Szeged

Tartalomjegyzék

Tudományos publikációk listája.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	1
Bevezetés.....	1
Glióma.....	2
Osztályozás.....	2
Tünetek.....	3
Glióma kezelése	3
Glióma vizsgálata, jellemzése genetikai profil alapján	4
Telítetlen zsírsavak.....	5
Telítetlen zsírsavak jellemzése	5
Telítetlen zsírsavak bioszintézise	9
A zsírsavbioszintézisért felelős gének és a rák közötti összefüggés	12
Telítetlen zsírsavak által befolyásolt betegségek	13
ω -3, ω -6 és ω -9 UFA források	14
UFA-k in vivo hatása	15
PUFA-k az idegszövetben	16
UFA-k in vitro hatása	16
Telítetlen zsírsavak önmagukban, és mint adjuvánsok sugárterápia mellett glióma kezelésére	17
Sugárzás és/vagy PUFA kezelés által befolyásolt miRNS-ek gliómában.....	18
U-87 MG sejtek, mint glióma modell	20
Célkitűzések	21
Anyag és módszer	22
Sejtvonal és sejtenyésztés	22
Inkubációs idők kiválasztása	22

Sugárkezelés.....	23
Biokémiai mérések.....	23
LDH mérés	23
MTS mérés	23
xCELLigence mérés	24
Holografikus mikroszkópos vizsgálat	24
miRNS és mRNS expresszió változásának vizsgálata zsírsavak és/vagy sugárkezelést követően	25
A minták előkészítése RNS tisztításhoz.....	25
Nukleinsav izolálás	25
mRNS expresszió.....	26
miRNS expresszió	27
Konfokális mikroszkópia, lipidcseppecske akkumuláció vizsgálata	27
FACS mérések.....	28
Statisztika	29
Eredmények.....	30
Kinetikai és biokémiai végpont vizsgálatok.....	30
Morfológiai vizsgálatok	43
Apoptózis mérések 48 órával PUFA kezelést és/vagy sugárkezelést (5 Gy és 10 Gy) követően	56
Stresszválasszal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének expresszió vizsgálata PUFA vagy/és sugárkezelés (10 Gy) után	58
miRNS expresszió változás PUFA kezelés, sugárkezelés (10 Gy) valamint PUFA kezelés és sugárzás (10 Gy) együttes alkalmazása esetén	68
Zsírsavbioszintézisben részt vevő gének expressziójának változása PUFA vagy/és sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) esetén.....	71
Lipidcseppecskék (LD-k) eloszlásának mérése sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) és/vagy GLA kezelés hatására	76

Hősokkfehérjék és egy lipidcseppecske kötő fehérje, a PLIN3 génjeinek expresszió vizsgálata GLA, sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) valamint GLA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) együttes alkalmazása esetén	79
Értékelés	81
Biokémiai és kinetikai vizsgálatok.....	81
Morfológiai vizsgálatok különböző PUFA-val kezelt valamint sugárkezelt glióma sejteken	83
Apoptózis mértékének vizsgálata 48 órával PUFA-val történő kezelés és/vagy sugárkezelést követően.....	84
Stresszválasszal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének expresszió vizsgálata	85
miRNS expresszió változásának vizsgálata 48 órával sugárkezelést és/vagy PUFA kezelést követően	91
Zsírsvbioszintézisért felelős gének expresszió vizsgálata PUFA kezelést és/vagy sugárzást követően	92
GLA előnyben részesítése, a többi PUFA-hoz képest a 48 órás vizsgálatok során	93
24 és 48 órás génexpresszió vizsgálatok eredményeinek értékelése.....	93
GLA és sugárzás együttes és önálló alkalmazásának hatása lipidcseppecskék eloszlására. 96	
Hősokkfehérjék és egy lipidcseppecske kötő fehérje, a PLIN3 génjeinek expressziós vizsgálata.....	97
Következtetések, új tudományos eredmények	100
Köszönetnyilvánítás	102
Irodalomjegyzék.....	103
Összefoglaló	116
Summary	119
Függelék	122

Tudományos publikációk listája

MTMT azonosító: 10047278

Értekezés alapjául szolgáló tudományos publikációk

Otilia Antal, Mária Péter, László Hackler Jr., Imola Mán, Gábor Szebeni, Ferhan Ayaydin, Katalin Hideghéty, László Vígh, Klára Kitajka, Gábor Balogh, László G Puskás (2015): Lipidomic Analysis Reveals a Radiosensitizing Role of Gamma-Linolenic Acid in Glióma Cells. *Biochim Biophys Acta*. 1851(9):1271-1282. (IF:4.66)

Otilia Antal, László Hackler, Junhui Shen, Imola Mán, Katalin Hideghéty, Klára Kitajka, László G Puskás (2014): Combination of unsaturated fatty acids and ionizing radiation on human glióma cells: cellular, biochemical and gene expression analysis. *Lipids in Health and Disease*, 13:142. (IF:2.31).

További tudományos publikációk:

Rita Gombos, Ede Migh, **Otilia Antal**, Anindita Mukherjee, Andreas Jenny, József Mihály (2015): The Formin DAAM Functions as Molecular Effector of the Planar Cell Polarity Pathway during Axonal Development in Drosophila. *The Journal of Neuroscience*, 35(28):10154-10167. (IF:6.75).

Otilia Antal, Mariann Karisztl-Gácsi, Anna Farkas, Attila Kovács, András Ács, Norbert Törő, Gyula Kiss, Martin L. Saker, János Győri, Gáspár Bánfalvi, Ágnes Vehovszky (2011): Screening the toxic potential of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Lake Balaton, Hungary, *Toxicon*, 57(6): 831-840. (IF: 2.58)

Mariann Gácsi, **Otilia Antal**, Gábor Vasas, Csaba Mathé, György Borbély, Martin L. Saker, János Győri, Anna Farkas, Ágnes Vehovszky, Gáspár Bánfalvi (2009): Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells, *Toxicology in Vitro*, 23(4):710-718. (IF: 3.21)

Rövidítések jegyzéke

10 Gy&AA – 25 µM arachidonsav és sugárzás (10 Gy-es dózis) kombinált alkalmazása

10 Gy&DHA – 25 µM dokozahexaénsav és sugárkezelés (10 Gy-es dózis) kombinált alkalmazása

10 Gy&GLA – 50 µM gamma-linolénsav és sugárzás (10 Gy-es dózis) kombinált alkalmazása

10 Gy&PUFA - többszörösen telítetlen zsírsavak és sugárkezelés (10 Gy-es dózis) kombinált alkalmazása

36B10 – rosszindulatú patkány asztrocitóma sejtvonal

5 Gy&AA – 25 µM arachidonsav és sugárzás (5 Gy-es dózis) kombinált alkalmazása

5 Gy&DHA – 25 µM dokozahexaénsav és sugárzás (5 Gy-es dózis) kombinált alkalmazása

5 Gy&GLA – 50 µM gamma-linolénsav és sugárzás (5 Gy-es dózis) kombinált alkalmazása

acetyl-CoA – acetyl-koenzimA

AKR1C1 - aldo-keto reductase family 1, member C1

AA – arachidonic acid, arachidonsav

AnnV - Annexin V-Alexa Fluor 488

AP -1 – activating protein 1

CAT – catalase, kataláz

K- kontroll

K-0h. – kontroll kísérlet kezdetekor

K-24h.- kontroll 24 órával kísérlet kezdete után

K-48h.-kontroll 48 órával kísérlet kezdete után

C6 – ATCC CCC-107TM patkány glióma sejtvonal

CarG elemek - CC(A+T-gazdag)6GG szérumban rezponzív elemek

CDKN2A - cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

cDNA – complementary DNA, kiegészítő DNS

C-FOS - FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog

Ct –Cycle threshold, ciklus küszöbérték

C-MYC - v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

DDIT3 - DNA-damage-inducible transcript 3

DHA – docosahexaenoic acid, dokozahexaénsav

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, Dulbecco módosított „Eagle” médiumja

DNA – deoxiribonukleinsav

EGFR - epidermal growth factor receptor

EGR1 - early growth response 1
 ELOVL1 - ELOVL fatty acid elongase 1
 ELOVL2 - ELOVL fatty acid elongase 2
 ELOVL5 - ELOVL fatty acid elongase 5
 EPA – eicosapentaenoic acid, eikozapentaénsav
 ER – endoplazmatikus retikulum
 FACS – fluorescence activated cell sorting, fluoreszcencia aktivált sejtválogatás
 FADS1 – fatty acid desaturase 1, δ -5 deszaturáz
 FADS2 –fatty acid desaturase 2, δ -6 és δ -8 deszaturáz
 FADS3 - fatty acid desaturase 3
 FASN –fatty acid synthase, zsírsav szintáz
 FBS – fetal bovine serum, magzati marha szérum
 FOSL1 - FOS-like antigen 1
 Fw - forward
 GADD45A - growth arrest and DNA- damage inducible, alpha
 GCLM - glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
 GLA – gamma-linolenic acid, gamma-linolénsav
 GSR - glutathione reductase
 GSTO1 - glutathione S-transferase omega 1
 HMOX1 - heme oxygenase (decycling) 1
 HPRT1 - hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
 HSP – hő sokkfehérje
 HSP90AA1 - heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
 HSPB1 - heat shock 27 kDa protein 1 (HSP25)
 HSPB2 - heat shock 27 kDa protein 2 (HSP27)
 IDH1 - isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), oldható
 LDH – lactate dehydrogenase, laktát dehidrogenáz
 LD – lipid droplet, lipid cseppecske
 mRNS – hírvivő vagy messenger RNS
 miRNA – microRNA
 miRNS – mikroRNS
 MMP14 - matrix metalloproteinase 14

MTS – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxi-fenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazolium

MUFA – monounsaturated fatty acids, egyszeresen telítetlen zsírsav

n – biológiai mintaszám

n.d. – not determined, nincs meghatározva

NOTCH1 - notch 1

NQO1 - NAD(P)H dehydrogenase quinone (1)

OA – oleic acid, olajsav

p – p-érték, a valószínűség hogy a statisztikai tesztben felvetett hipotézis igaz

PBS – phosphate buffered saline, foszfát puffer oldat

PCR – polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció

PI – propidium-jodid

PLIN3 - perilipin 3

PPIA - peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)

PTEN - phosphatase and tensin homolog

PUFA – polyunsaturated fatty acids, többszörösen telítetlen zsírsav

QRT-PCR – Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció

RNS - ribonukleinsav

RT-CES – Real-Time Cell Electronic Sensing, ellenállásalapú valós idejű sejt elektronikus érzékelő mérés, xCELLigence RTCA (Roche és ACEA Biosciences által kifejlesztett) készülékkel mérhető

Rv - reverz

SCD – stearyl-CoA desaturase, δ -9 desaturáz

SCD1 - stearyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD)

SCD5 - stearyl-CoA desaturase 5 (SCD5)

SD - standard deviation, szórás

SFA – saturated fatty acids, telített zsírsavak

SID – source to image distance, a forrástól a képalkotó receptorig való távolság

SIRT1 - sirtuin 1

SRXN1 - sulfiredoxin 1

TC – tissue culture, szövet tenyésztés

TGFBI - transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa

TIMP3 - TIMP metalloproteinase inhibitor 3

T_m – melting temperature, olvadási hőmérséklet PCR esetén, a DNS duplex stabilitásának mutatója

TNF- α - tumor necrosis factor

TP53 – p53, tumor protein p53

TRXR1 - thioredoxin reductase 1

U-87 MG - ATCC HTB-14TM számmal rendelkező glioblasztóma sejtvonal

UFA – unsaturated fatty acids, telítetlen zsírsav

VLC-PUFA – very long chain PUFA, nagyon hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavak

WHO – World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

Bevezetés

A rák a modern társadalomban jelentős mortalitást okozó betegség, mely komplexitása és változatossága miatt nehezen meghatározható, jellemezhető. Az onkológia egy intenzíven fejlődő, nagy jelentőségű, dinamikus tudományág, mely a daganatok sokfélesége miatt rengeteg témakörrel foglalkozik, a kutatások során újabb és újabb megválaszolandó kérdéseket felvetve.

A rák jellemző tulajdonságai: genomi instabilitás, önellátás növekedési faktorokkal, proliferatív jelátvitel, a növekedés szupresszorok gátlása, a sejthalál elkerülése, korlátlan replikációs képesség, fenntartott angiogenezis, limfangiogenezis, hipoxia, szabálytalan metabolizmus, immunosuppresszió, a normális szöveti elrendeződés megváltoztatása, a tumort elősegítő gyulladás, az invázió és a metasztázis aktiválása (Blaylock, 2013; Gerdes és mtsai, 2014; Kim és Tanner, 2015; Rolle, 2015; Wang és mtsai, 2015).

Egy daganat kialakulásához több gén mutációja szükséges (Tulassay és Matolcsy, 2011). A rákos sejtek gyakori jellemzője a kromoszóma instabilitás és az aneuploidia, ami mutációk felhalmozódásához vezethet (Giam és Rancati, 2015). A génexpressziót szabályozó epigenetikai faktorok és mikroRNS-ek (miRNS-ek) gyakran rendellenesen működnek rák esetén (Fabbri és Calin, 2010).

A tumorban, a sejtek hierarchikusan szerveződnek, és a jelenleg széleskörben elfogadott elmélet szerint a rák őssejtekből erednek, melyeknek meghatározása még mindig vitatott (Crea és mtsai, 2015; Malanchi, 2013). Önmegújulásra képesek, és ezeknek a sejteknek a legnagyobb a tumorigén képessége, valamint túlélnek a kemoterápiát és a sugárzást (Malanchi, 2013).

A daganatok vérér-hálózata számos strukturális és funkcionális rendellenességgel jellemezhető (Kim és Tanner, 2015; Wang és mtsai, 2015). Ezek az anomáliák, zavart véráramlást, hatástalan oxigénszállítást, hipoxiát, hiperáteresztőképességet, és megnövekedett interszticiális nyomást okoznak számos szolid daganatban (Kim és Tanner, 2015; Wang és mtsai, 2015).

A hipoxiának köszönhetően a tumor sejtek acidózison mennek keresztül és egy savas mikrokörnyezetet hoznak létre. Ez a környező sejtek pusztulását, és az extracelluláris mátrix lebomlását idézi elő; ami lehetővé teszi a tumor inváziót és a szukcesszív metasztázist (Kim és Tanner, 2015).

A leggyakoribb módja a rákos szövet és a jóindulatú szövet elkülönítésének a hisztológiai vizsgálat. A különálló tumor altípusokat a morfológia, az egyedi molekuláris genetikai profil, és a specifikus markerek expressziója jellemzi (Gerdes és mtsai, 2014). A tumor kezelés hatékonyságát tumor válaszként határozzák meg, ami azt fejezi ki, hogy a különböző hatóanyagok mennyire képesek tumor csökkenést előidézni (Wexler és mtsai, 2000).

Glióma

Az alacsonyabb klinikai besorolású glióma esetén a túlélési idő 5-16 év, 3-as szintű asztrocitóma esetén 2-3 év, míg glioblasztóma esetén 12 hónap (Sandrone és mtsai, 2014). Elsősorban felnőttkorban fordul elő, de ritkán gyerekkorban is megjelenhet (Tulassay és Matolcsy, 2011; Olar és Aldape, 2014). Az agydaganat súlyosságát nemcsak a típusa, hanem az elhelyezkedése is befolyásolja (Tulassay és Matolcsy, 2011). A tumor jelenlétének köszönhetően megváltozik a nyomás a koponyaűrben, és elhelyezkedésétől függően létfontosságú szervekre gyakorolhat hatást (Tulassay és Matolcsy, 2011).

Osztályozás

Az agydaganatokat négy kategóriába sorolják. Az I-es kategória jóindulatú, a legkevésbé agresszívabb és a IV-es rosszindulatú, a legagresszívabb. Kategóriánként nő az agresszivitás mértéke, de a pontos besorolás a daganat típusától függ (Collins, 2004).

Az idegrendszeri daganatok az Egészségügyi Világszervezet (WHO; World Health Organization) 2007-es osztályozása szerint a gliómák a neuroepitheliális daganatoknak több különböző alkategóriáját képezik (Louis és mtsai, 2007). A 2007-es WHO osztályozás szerint az I-es szintű glióma alacsony proliferációs potenciállal rendelkezik és a gyógyulás esélye a sebészeti úton történő eltávolítás után nagy (Sandrone és mtsai, 2014). Az egyes típusú gliómáknak jól elkülöníthető anatómiai határai vannak (Huml és mtsai, 2013). A II-es szintbe tartozó daganatokat infiltratív növekedés és magas kiújulási arány jellemzi. A III-as szintű gliómák esetén a daganat rosszindulatúságának hisztológiai bizonyítékai vannak, a sejtmag atipikus és a sejtek magas mitotikus aktivitással rendelkeznek (Sandrone és mtsai, 2014). A IV-es szintű daganat, citológiaiilag malignus tumor, mitotikusan aktív és nekrosis figyelhető meg (Sandrone és mtsai, 2014). A IV-es szintű gliómák általában halálosak, a glioblasztómák tartoznak ide.

Az agydaganatok elkülönítése elsősorban hisztomorfológiai jellegeik alapján történik, ami sokszor több tumor esetén és egy tumoron belül is nehézkes és szubjektív (Huml és mtsai, 2013).

A gliómák közül a glioblasztóma a leggyakoribb, legdiffúzabb, rövid túlélési idővel, kivétel nélkül halálos kimenetellel. A glioblasztóma multiformét genetikai instabilitás és intratumorális hisztopatológiai variabilitás jellemzi, a klinikai viselkedése pedig kiszámíthatatlan (Rolle, 2015). A glioblasztóma a szövet heterogenitásának köszönhetően könnyen ellenállóvá válik sugárterápiával szemben és ki is újul rövid időn belül (Olar és Aldape, 2014). A glioblasztómák két különböző folyamat révén alakulhatnak ki, mely a molekuláris profiljukkal van összefüggésben (Sandrone és mtsai, 2014). Az elsődleges glioblasztómák kialakulhatnak *de novo*, míg a másodlagosak kialakulhatnak alacsonyabb rendű anaplasztikus asztrocitómából (Kleihues és Ohgaki, 1999).

Tünetek

Az agydaganatok a tumor elhelyezkedésétől függetlenül fejfájást, szédülést, hányingert és hányást okoznak. Általában tudatzavarral járó nyomásnövekedést okoznak a betegnél. Keringési-, légzési zavarok, látási rendellenességek következnek be.

A tüneteket a daganat elhelyezkedése is befolyásolja. Azok, amelyek az asszociációs területeken helyezkednek el, a kognitív képességeket befolyásolják, míg azok, amelyek a praefrontalis területen találhatók pszichiátriai tünetegyüttest okoznak (Tulassay és Matolcsy, 2011).

Glióma kezelése

Glióma kezelésének módja több tényezőtől függ. Jelenleg, elsősorban a szövettani vizsgálat határozza meg a kezelés módját (Hirose és mtsai, 2013). A személyre szabott génterápia korában az agydaganatban szenvedő betegek genetikai profil alapján történő osztályozása komoly előrelépést jelenthet a megfelelő kezelés kiválasztásában. A proneurális glioblasztóma és a mesenchymális glioblasztóma között is különbséget lehet tenni a molekuláris markerek alapján. Gyerekeknél a glioblasztóma ritkán jelenik meg, a rá jellemző molekuláris markerek specifikusak (Olar és Aldape, 2014).

A gliómát elsősorban sebészeti úton távolítják el. Ez növeli a túlélés esélyét és javítja a központi idegrendszer működőképességét (Das, 2004). A glióma sejtek aktívan, relatív hosszú távon keresztül vándorolhatnak az agyban, áttéteket képezve; ezért sebészeti úton

nehezen távolíthatók el (Jakubowicz-Gil és mtsai, 2013; Olar és Aldape, 2014; Tulassay és Matolcsy, 2011).

A sebészeti beavatkozást legtöbb esetben sugárterápia követi, a maximálisan alkalmazható dózis 40-60 Gy (Das, 2004; Stupp és mtsai, 2005; Tulassay és Matolcsy, 2011). A módszer hátránya, hogy a glióma sejtek kifejezetten ellenállóak az ionizáló sugárzással szemben (Vartak és mtsai, 1997). Ezért bizonyos esetekben brachyterápiát alkalmazhatnak, vagyis izotópokat juttatnak a daganatba, ami belső sugárkezelésnek felel meg (Tulassay és Matolcsy, 2011).

A glióma-iniciáló sejteknek (rák őssejt tulajdonságokkal rendelkező sejtek) köszönhetően a betegség kiújulásának aránya kiemelkedően nagy (Wang és mtsai, 2011; Hardee és mtsai, 2012; Das, 2004).

A műtétet kemoterápiás kezelés követheti kiújulás esetén, de az is előfordulhat, hogy a kemoteraputimokat adjuvánsként alkalmazzák sugárkezelés mellett. Különböző hatóanyagokat használhatnak erre a célra, például: adriamycin, BCNU, erlotonib, temozolomid, BFP (2,4-bis(4-fluorofenilacetil), bortezomib, cisplatin, celecoxib, carboplatin, paclitaxel (Taxol), etoposide (VP16), 5-FU, CPT-11 és metotrexát (Fan és mtsai, 2010; Halatsch és mtsai, 2009; Hardee és mtsai, 2012; Kardosh és mtsai, 2008; Lu és mtsai, 2012; Soni és mtsai, 2005; Pyrko és mtsai, 2007; Vartak és mtsai, 1997; Wang és mtsai, 2010). Más terápiás módszerek is vizsgálat alatt, klinikai fázisban vannak (Hardee és mtsai, 2012; Wang és mtsai, 2010).

Glióma vizsgálata, jellemzése genetikai profil alapján

A daganatok kimutatása és a műtét megtervezése céljából olyan képalkotó módszereket alkalmaznak, mint a koponya-CT (koponya számítógép tomográfia), az MR-vizsgálat (mágneses rezonancia vizsgálat), a SPECT (Single photon emission computed tomography, egyedi foton emisszió komputer tomográfia) vagy a PET (positron emission tomography, pozitron emissziós tomográfia). A sebészeti beavatkozást agyi biopszia előzi meg (Collins, 2004; Tulassay és Matolcsy, 2011). A szövet heterogén jellege és az anaplasia jelenléte miatt még a gyakorlott szakemberek is nehezen egyeznek meg a glióma típusa felől (Collins, 2004; Hirose és mtsai, 2013).

A minták csoportosítása genetikai profil alapján elősegítheti a megfelelő kezelés kiválasztását. Ezt azonban több tényező is megnehezíti, többek között az, hogy nehéz az összefüggést megtalálni a genetikai profil és a sugárterápiára vagy kemoterápiára való érzékenység között. Egy másik hátrány az, hogy a genetikai elemzésre szánt minta heterogén,

sokszor tartalmaz egészséges sejteket (Hirose és mtsai, 2013). A különböző genetikai altípusok glióma esetén még mindig vitatottak vagy ismeretlenek (Mordrek és mtsai, 2014). Zhang és mtsai (2013) három molekuláris osztályozást mutatnak be.

A molekuláris jelátviteli utak, melyek a glióma kialakulását és lefolyását befolyásolják még vizsgálat alatt állnak; pontos ismeretük nélkülözhetetlen a megfelelő és hatékony terápiás módszerek kidolgozásához (Cenci és mtsai, 2012; Lu és mtsai, 2012). Számos genetikai változásról kimutatták, hogy a gliómák kialakulásához köthető (Soni és mtsai, 2005).

A malignus gliomához kötődő biomarkerek: *IDH1* (isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), oldható) mutáció, *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) metiláció, a heterozigótaság elvesztése az 1p/19q-n (Zhang és mtsai, 2013). A *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), a növekedési faktorok és a növekedési faktor receptorok gyakran mutáción mennek keresztül (Soni és mtsai, 2005). A glioblasztóma multiforméra a *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) mutációja jellemző, és általában kapcsolt egy másik gén mutációjához a következők közül: *EGFR* (epidermal growth factor receptor), *CDK4* (cyclin-dependent kinase 4), *RB* (RB1, retinoblastoma 1), *MDM2* (MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase) és *TP53* (p53, tumor protein p53) (Soni és mtsai, 2005). Az elsődleges glioblasztómákat *EGFR* gén amplifikáció, *PTEN* deléció, *CDKN2A* veszteség, *IDH1* mutáció hiánya jellemzi (Sandrone és mtsai, 2014; Olar és Aldape 2014). A másodlagos glioblasztómákat a *TP53* mutáció, az *IDH1* mutáció és az *EGFR* amplifikáció hiánya jellemzi (Sandrone és mtsai, 2014; Olar és Aldape 2014).

A glióma patogenezise komplex, ezért egy elképzelhető megoldás lehet a több molekuláris célpontot befolyásoló terápia.

Telítetlen zsírsavak

A telítetlen zsírsavak (unsaturated fatty acid, UFA) között számos esszenciális tápelem található (Lorente-Cebrián és mtsai, 2013).

Telítetlen zsírsavak jellemzése

A zsírsavak vízben oldhatatlan, hosszú láncú szénhidrogének, egy karboxil csoporttal a lánc végén. A zsírsavak detergensszerűek az amfipatikus tulajdonságaiknak köszönhetően. Az olvadási pontjukat a lánc hossza és a telítetlenségük mértéke határozza meg. A zsírsavak három osztályba sorolhatók: telített (saturated fatty acid, SFA), egyszeresen telítetlen (monounsaturated fatty acid, MUFA) és többszörösen telítetlen zsírsavak (polyunsaturated fatty acid, PUFA).

A telített zsírsavak nem tartalmaznak kettős kötést a láncban. A rendszertani nevük megadja a szén atomok számát. A palmitinsav, például 16 szén atomot tartalmaz és a rendszertani neve hexadekánsav.

A telítetlen zsírsavak egy vagy több kettős kötést tartalmaznak. A leggyakrabban használt módszer a kettős kötések helyének megadására egy telítetlen zsírsav esetén a delta (Δ) számozási rendszer: a végső karboxil szén atomot karbon 1-el jelölik, a kettős kötés annak a szén atomnak a számát kapja mely a kettős kötés karboxil oldalán van. Például, a palmitoleinsav 16 szén atomot tartalmaz, egy kettős kötéssel a 9-es és 10-es szén atom között. A jelölése ezért $16:1:\Delta^9$ vagy $16:1:9$. A rendszertani nevük megadja a szén atomok számát, a kettős kötések számát (hacsak nincs csak egy) és az „én” toldalékot viseli. Vagyis a palmitoleinsav neve *cis*- Δ^9 -hexadecénsav; a linolsavé mely 18 szén atomos és két kettős kötést tartalmaz *cisz*- Δ^9,Δ^{12} -oktadekadiénsav.

Az előzőekben bemutatott karboxil-referencia rendszerrel ellentétben, az omega-hivatkozás rendszer élettani szempontból hasznos, az ω -3 és ω -6 zsírsavak közti fiziológiai különbségek miatt (Bagott és Dennis, 1994, 1995).

A természetesen előforduló zsírsavakban a kettős kötések mindig *cisz* konfigurációban vannak. A forrásuk szerint beszélhetünk esszenciális és nem esszenciális zsírsavakról. Az összes nem esszenciális zsírsav előállítható acetil-koenzimA (acetil-CoA)-ból, ami a glükóz oxidációjából származik.

Az esszenciális zsírsavakat, az ω -6 és ω -3 családból, a táplálékkal kell felvenni (1. ábra). Nem létezik olyan humán enzim mely a kilencedik szén atom után a szénláncba kettős kötést tudna bejuttatni, és minden bejuttatott kettős kötés között 3 szénatomnyi távolság van (Halkerston 1984). Ez a szabály és az, hogy a zsírsav elongáció csak két szén atom hozzáadással fordul elő, lehetetlenné teszi bizonyos többszörösen telítetlen zsírsavak *de novo* szintézisét.

Az 1. táblázat összefoglalja azokat a zsírsavakat, amelyeket ezen értekezésben bemutatott vizsgálatok során alkalmaztam. Szerkezetet bemutató ábrák forrása: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>.

Az öt telítetlen zsírsav kiválasztásának magyarázata

Az U251 glioblasztóma multiforme rákos sejtvonal sugárzásra való érzékenységét az EPA kezelés megnövelte, míg egy másik glioblasztóma multiforme sejtvonal, a T98G esetén, ilyen jellegű hatás nem volt kimutatható (Manda és mtsai, 2011). Leaver és mtsai (2002a) szerint,

C6 patkány glióma sejtvonal esetén, a GLA, az AA és az EPA kölcsönhat a sugárzással, elősegítve az apoptózist. A 36B10 sejtek GLA és DHA-val való kezelése megnövelte a sugárzás által előidézett sejtpusztulást (Vartak és mtsai, 1997).

A rákos sejteknek kisebb a PUFA tartalma, mint a nem rosszindulatú sejteknek, ami valószínűleg a szabad gyököktől védi őket (Vartak és mtsai, 1997). Ezekben a sejtekben a PUFA-kat az OA helyettesíti, mely nem megfelelő szubsztrátja a lipid peroxidációnak. Az agydaganatok több OA-t és kevesebb PUFA-t tartalmaznak, mint a normális agyszövet. A normális patkány asztrocitáknak 75%-al kisebb az OA tartalma, mint az ugyanolyan körülmények között fenntartott 36B10 sejteknek (Vartak és mtsai, 1997). Vartak és mtsai azt is megfigyelték, hogy az OA kezelés nem erősítette a sugárzás hatását 36B10 sejteken.

Tehát, AA-ra, DHA-ra, GLA-ra és EPA-ra vonatkozóan rendelkezünk olyan adattal, amely alapján feltételezhattük, hogy az megnövelhetik az U-87 MG sejtvonal érzékenységet sugárzásra. Figyelembe véve az agydaganatokban megfigyelhető jellegzetes OA felhalmozódást, az OA sugárzással való kölcsönhatását is érdemes tanulmányozni.

1. **táblázat.** Az értekezésben alkalmazott zsírsavak rövidítése, képletük, szerkezetük és a megfelelő bioszintetikus csoportba való besorolásuk.

Zsírsav	Rövidítés	Bioszintetikus csoport	Képlet	Szerkezet	Esszenciális?
Olajsav	OA	ω -9	18:1n-9		Nem
Arachidonsav	AA	ω -6	20:4n-6		Igen
γ -Linolénsav	GLA	ω -6	18:3n-6		Igen
Dokozahexaénsav	DHA	ω -3	22:6n-3		Igen
Eikozapentaénsav	EPA	ω -3	20:5n-3		Igen

Telítetlen zsírsavak bioszintézise

A folyamatosan osztódó rákos sejtek több lipid bioszintézisért felelős jelátviteli utat aktiválnak, amíg a β -oxidáció mértékét lecsökkentik (Igal, 2010). A lipid bioszintézis alapkövetelmény a tumor sejtek túléléséhez (Roongta és mtsai, 2011).

A zsírsavbioszintézis energiaigényes folyamat: adenzin trifoszfátot (ATP), redukált nikotinamid dinukleotid foszfátot (NADPH) és acetyl-CoA-t igényel (Hopperton és mtsai, 2014).

A telített zsírsavakat az acetyl-CoA karboxiláz, a zsírsav szintáz (fatty acid synthas, FASN) és az ELOVL fatty acid elongase 6 (ELOVL6) szintetizálja (Leonard és mtsai, 2004) (1 ábra).

A FASN egy citoplazmatikus komplex, mely hét különböző féle enzimatisz aktivitással rendelkezik (Jakobsson és mtsai, 2006). A FASN az egyetlen humán enzim, amely *de novo* zsírsavakat tud szintetizálni, ami magyarázat arra, hogy a megnövekedett FASN expresszió elősegíti a zsírsavak szintézisét (Hopperton és mtsai, 2014; Kuhajda, 2006). A végső terméke a FASN katalizált reakciónak a palmitinsav (16:0) (1. ábra). Az emberi lipogenezis végső terméke az olajsav (18:1n-9) és a vakcénsav (18:1n-7) (1. ábra) (Leonard és mtsai, 2004).

Az SFA-kat az δ -9 deszaturáz (stearoyl-CoA desaturase, SCD) valamint a δ -6 és δ -8 deszaturáz (fatty acid desaturase 2, FADS2) alakítja MUFA-kká (Leonard és mtsai, 2004) (1 ábra). A deszaturázok elnevezésében a „ δ ” utáni szám jelzi, hogy a deszaturáz melyik alosztályba tartozó zsírsavat állítja elő.

Az ω -3 és ω -6 PUFA-k α -linolénsavból (18:3n-3) és linolsavból (18:2n-6) szintetizálódnak, egymást követő deszaturációs és elongációs lépések révén (1. ábra). A δ -5 deszaturáz (fatty acid desaturase 1, FADS1), a FADS2, az ELOVL fatty acid elongase 2 (ELOVL2) és az ELOVL fatty acid elongase 5 (ELOVL5) a fő enzimek, melyek részt vesznek a PUFA-k szintézisében (Tu és mtsai, 2010). A PUFA bioszintézis kulcsenzimeit közül az ELOVL2 a leglassabb (Alhazzaa és mtsai, 2013).

1. ábra. Az egyszerűen telítetlen és többszörösen telítetlen zsírsavak bioszintézise emberben. Az ábra a következő források alapján készült el: Castro és mtsai, 2012, Gregory és mtsai, 2011, KEGG adatbázis, Lee és Park 2014, Leonard és mtsai, 2004.

SCD génekből két izoforma létezik, a stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase, SCD1) és a stearoyl-CoA desaturase 5 (SCD5) (Igal, 2010; Roongta és mtsai, 2011). Akárcsak az SCD1, az SCD5 is δ -9 deszaturáz aktivitással rendelkezik. Az SCD1-nek és SCD5-nek különböző funkciói lehetnek (Wang és mtsai, 2005). Az *SCD5* a peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) jelátviteli út eleme, amely a glükóz és lipid homeosztázist, gyulladást, proliferációt és differenciációt szabályozza (Chen és mtsai, 2012). A δ -9 deszaturáció módosulása sejthalált okoz és a SCD1 hiány apoptózist idéz elő (Igal, 2010).

A *FADS* gének egymást szabályozzák a fiziológiai állapottól függően. A *FADS2* mindenütt kifejeződik és δ -8 deszaturázként működik, amikor a δ -6 deszaturáz aktivitása gátlás alá kerül (Stoffel és mtsai, 2008; Park és mtsai, 2011). Bár a fatty acid desaturase 3 (*FADS3*) rendeltetése még ismeretlen, feltételezik, hogy ez is egy deszaturáz, és hogy a lipid metabolizmus szabályozásában van szerepe (Blanchard és mtsai, 2011; Castro és mtsai, 2012; Wijendran és mtsai, 2013). A *FADS3*-nak szövet és PUFA specifikus szerepe lehet a hosszú láncú PUFA szintézisben (Glaser és mtsai, 2011). Reardon és mtsai (2013) feltételezik, hogy a hosszú láncú PUFA-k nem szubsztrátjai a *FADS3*-nak, vagy a *FADS3* variánsok negatív inhibitoroként kötik a hosszú láncú PUFA-kat. A *FADS3* 62-70 % homológiát mutat a *FADS1*-el és *FADS2*-vel, de a szabályozása és az expressziója eltér a *FADS1*-től és a *FADS2*-től (Blanchard és mtsai, 2011).

Az elongázok adott lánc hosszal és telítettséggel rendelkező szubsztrátokra specifikusak (Santos és Schulze, 2012). Az ELOVL6 felelős a C12-C16 SFA-k és a MUFA-k konverziójáért (Leonard és mtsai, 2004). Az ELOVL fatty acid elongase 1 (ELOVL1) hosszabbítja az C18-C26 SFA-kat és a MUFA-kat (C20:1n-9 és C22:1n-9) (Hilvo és mtsai, 2011; Jakobsson és mtsai, 2006; Kihara és mtsai, 2012; Ohno és mtsai, 2010). Az ELOVL1-nek ezen kívül még szubsztrátja a GLA (18:3n-6), az AA (20:4n-6), az α -linolénsav (18:3n-3) és az EPA (20:5n-3) (Leonard és mtsai, 2004). Az AA (20:4n-6), EPA (20:5n-3), 22:4n-6, 22:5n-3 az ELOVL2 szubsztrátjai (Jakobsson és mtsai, 2006). Az ELOVL fatty acid elongase 3 (ELOVL3) a GLA (18:3n-6)-at és az α -linolénsav (18:3n-3)-at alakítja át (Leonard és mtsai, 2004). A C18 és C20 PUFA-kat az ELOVL5 hosszabbítja (Gregory és mtsai, 2011). Az ELOVL5 nem hosszabbítja meg a 20 C atom számnál többel rendelkező PUFA-kat (Jakobsson és mtsai, 2006). A nagyon hosszú szénláncú, többszörösen telítetlen zsírsavak (very long chain - polyunsaturated fatty acids, VLC-PUFA-k), azaz a több mint 20 C atommal rendelkező PUFA-k lánchosszabbításáért az ELOVL2 és ELOVL fatty acid elongase 4 (ELOVL4) felelősek (Leonard és mtsai, 2004).

A zsírsavbioszintézisért felelős gének és a rák közötti összefüggés

Az emlős szervezetekben, a sejt növekedéshez, proliferációhoz és túléléshez új membránok kialakulása szükséges, ami intenzív zsírsavbioszintézist igényel. Ez a rákos sejtek esetében különösen érvényes, ezekre különösen intenzív sejtproliferáció jellemző. A telített és telítetlen zsírsavak aránya jelentősen befolyásolja sejtfunkciókat (Igal, 2010).

A rákos sejtek a MUFA-któl függenek, ha nincs exogén forrás, akkor az SCD aktivitás jelentős mértékben befolyásolja a működésüket (Roongta és mtsai, 2011). Az SCD1 kifejeződésének növekedése egyértelműen megnövelte a foszfolipidek MUFA tartalmát, az SCD1 fehérje az exogén és endogén telített zsírsavakat is átalakítja MUFA-vá (Igal, 2010). Az SCD1 kifejeződés megnövekedett számos rák típusban, bár prosztata rák epitéliumban csökkent *SCD1* expressziót is kimutattak (Igal, 2010). Az *SCD1* overexpresszió rákkal asszociált. A megnövekedett SCD1 aktivitás védi a rákos sejteket a telített zsírsavak citotoxikus hatásától (Igal, 2010). A Scaglia és Igal (2005) által készített tanulmány bizonyítja, hogy az SCD1 részt vesz az *in vivo* karcinogenezisben.

Az *SCD5* szerepe pontosan nem ismert, de tudjuk, hogy a rákos sejtekben kifejeződik, és másképp hat a rákos sejtekre mint az SCD1 (Igal, 2010; Roongta és mtsai, 2011; Wu és mtsai, 2013). Az *SCD5* kifejeződés jelentős mértékben csökken azoknál a mellrákban szenvedő pácienseknél, akiknél teljes patológiai választ figyeltek meg (Chen és mtsai, 2012). Az *SCD5* nagy mértékben fejeződik ki az agyban (Sinner és mtsai, 2012). Feltételezhetjük, hogy a glióma kialakulásában és lefolyásában is szerepe lehet.

A HSA 11q13 lókuszt forró pont a rák kialakulásában, FADS géneket tartalmaz és egy tumor szuppresszort is (Lee és Park, 2014). A rákos sejtekben a FADS2 aktivitás alacsony (Das és mtsai, 1995). Ha a FADS2 inaktívvá válik, nem lesz kettős kötés a PUFA-k δ -8 pozíciójában, a sejtben nem lesz elérhető szubsztrátum eikozanoid szintézishez. Az állati modellrendszerekben, a megváltozott eikozanoid szintézis tumorok kialakulását, angiogenezist és metasztázist okozhat (Park és mtsai, 2011).

A *FASN* egy onkogén, terápiás célpont, szerepe lehet a rák patogenezisében (Long és mtsai, 2014). *FASN* kifejeződés megnövekszik mell, petefészek, hasnyál, vese, prosztata és vastagbélrák esetén (Long és mtsai, 2014). Ezért a *FASN* a zsírsavbioszintézis és a rákkutatás egyik intenzíven vizsgált területe lett (Long és mtsai, 2014). *FASN* szerepe a rákos és a normális sejtekben teljesen eltér. Míg a gátlása az egészséges sejtek növekedését és fejlődését nem befolyásolja, addig a rákos sejtekben megszakítja a sejtciklust és apoptózist idéz elő

(Hopperton és mtsai, 2014; Igal, 2010). A FASN kifejeződésnek szintje korrelál a tumor fejlődésével, az agresszivitásával és a metasztázis mértékével (Little és mtsai, 2007).

Telítetlen zsírsavak által befolyásolt betegségek

A telítetlen zsírsavak köztudottan kedvező hatással vannak az emberek egészségére, de hatásukkal kapcsolatban még számos vizsgálat szükséges.

Fejlődő állatokban az α -linolénsav hiány a központi idegrendszerben csökkent DHA szintet idéz elő, amely tanulási rendellenességet okoz és a látás is károsodik (Rose és Connolly, 1999).

Az ω -6 zsírsavban gazdag és ω -3 zsírsavban szegény diéta megnöveli bizonyos ráktípusok kockázatát (Lenihan-Geels és mtsai, 2013). Kobayashi és mtsai (2006) prosztata rákon végzett *in vitro* és *in vivo* eredményei ezt alátámasztják. Azonban az epidemiológiai vizsgálatok eltérő eredményekre jutottak. Némelyek szerint fordított arány van az ω -3 PUFA bevitel és a prosztatarák előfordulása között, míg mások szerint ez nem kimutatható (Kobayashi és mtsai, 2006).

Állatmodellek igazolták, hogy a hosszú láncú PUFA-k különböző hatással lehetnek a mellrák kialakulására és patogenezisére, a kettős kötés pozíciójától függően (Murff és mtsai, 2011). Az epidemiológiai vizsgálatok eredményei ez esetben is különbözőek. Murff és mtsai (2011) nem találtak szignifikáns összefüggést a PUFA bevitel és a mellrák előfordulása között (Murff és mtsai, 2011). Yang és mtsai (2014) valamint Rose és Connolly (1999) szerint a nagyobb ω -3/ ω -6 arányú PUFA bevitel esetén, kisebb a mellrák megjelenésének valószínűsége.

Az ω -3/ ω -6 zsírsavak arányának növelése táplálékbevitel során csökkentheti bizonyos krónikus betegségek kockázatát. Ilyenek a kardiovaszkuláris betegségek, a gyulladásos bélbetegség, a reumatoid arthritisz, a túlsúly, a cukorbetegség, a rák és a mentális betegségek (Lenihan-Geels és mtsai, 2013; Lorente-Cebrián és mtsai, 2013). A Nyugati diétában az ω -6: ω -3 arány jelentősen megnőtt (15:1), míg a Japán/ Mediterrán ω -6: ω -3 diétában, a sok halnak és növényi olajnak köszönhetően, csökkent (4:1) (Lee és Park, 2014).

Az ω -6 és ω -3 PUFA metabolizmus egyensúlyának felbomlása olyan krónikus betegségekkel köthető össze, mint a reumatoid arthritisz, az autoimmun betegségek, a bélgyulladás és a rák (Leonard és mtsai, 2004).

ω-3, ω-6 és ω-9 UFA források

A leggazdagabb OA (ω-9) forrást az oliva olaj képviseli, de a pálmaolaj és a mogyoróolaj szintén gazdagok olajsavban (Ip, 1997).

A PUFA-k betegségek kezelésében és megelőzésében betöltött bizonyított szerepe felkeltették a közvélemény, a gyógyszer- és a táplálékkiegészítőket gyártó cégek figyelmét. Ennek eredményeként az új táplálékkiegészítő termékekhez hosszú láncú PUFA-t adnak. Ilyenek például a „DHA plusz” tojások, a DHA-t, AA-t és/vagy GLA-t tartalmazó újszülött tápszerek.

Hulbert és mtsai (2014) szerint az ω-6 és ω-3 PUFA bevitel a napi energia bevitel 1,5 - 2 %-át kellene képezze. Az ω-3 zsírsavak kedvező egészségügyi hatásai miatt javasolt az ω-3/ω-6 PUFA arányának növelése az étrend összeállítása során.

A növényi (napraforgó, kukorica, szója) olajak 50 % vagy még több ω-6 zsírsavat tartalmaznak. Az ω-6 PUFA-k a kerti pórsáfrány (*Carthamus tinctorius*) olajban is jelen vannak (Kobayashi és mtsai, 2006). ω-6 források még a gabonafélék és a hús.

A legjobb ω-3 forrás a hal. Erre a célra a lazacot, a tonhalat, a makrélát, a szardellát és a heringet tartják legalkalmasabbnak. Bizonyos intézmények szerint heti 2-3 alkalommal kell halat fogyasztani. Ez a mennyiség, körülbelül 500 mg/nap EPA és DHA bevitelnek felel meg (Lorente-Cebrián és mtsai, 2013). A pollen egy nagyon jó ω-3 és ω-6 forrásnak bizonyul, ezek a teljes zsírsav tartalmának 60%-át tehetik ki (Hulbert és mtsai, 2014). További ω-3 forrásnak számítanak a hús és a tejtermékek (Hulbert és mtsai, 2014, Ortega Anta és mtsai, 2013).

A növényi eredetű tápanyagok csak 18 szénatomos PUFA-kat biztosítanak. A növények fotoszintézisért felelős részeiben, mint amilyenek a levelek, elsősorban α-linolénsav (18:3n-3) található, míg linolsav (18:2n-6) van a magjaikban és a virágzó részeikben (Hulbert és mtsai, 2014).

Az ω-3 halolajat létfontosságú táplálékforrásnak tartják, ezért alternatív megoldást keresnek. Ezek lehetnek az ω-3-at tartalmazó növényi olajak (repce, szója) és az algákból (*Schizochytrium sp.*, *Thraustochytrium sp.*, *Cryptocodinium cohnii*) kivont olajak alkalmazása (Lenihan-Geels és mtsai, 2013; Rose és Connolly, 1999).

A PUFA-k iránti igény megnövekedése miatt, megnőtt az érdeklődés a fenntartható PUFA források iránt. Ilyen lehet például a genetikailag módosított repce vagy szója (Leonard és mtsai, 2004).

PUFA-k in vivo hatása

Bizonyos tumorokban a MUFA-k apoptózist és mutagenezist okoznak (Paton és Ntambi, 2009).

Az emlősök nem rendelkeznek $\Delta 12$ és $\Delta 15$ deszaturázokkal, így nem tudják az ω -6 és ω -3 PUFA-at *de novo* szintetizálni. Az ω -6 és ω -3 PUFA-k szükségesek a normális funkcióhoz, mivel némely PUFA-k (pl. DHA) szükségesek az emlősök normális neuronális működéséhez és a 20 szénatomszámú PUFA-k fontos kémiai jelátvivő anyagok prekursorai (Hulbert és mtsai, 2014). Ilyen kémiai jelátvivő anyagok például az eikozanoidok (Hulbert és mtsai, 2014). Az eikozanoidok mint amilyenek a prosztaglandinok, tromboxánok, leukotriének, mono- és polihidroxizsírsavak és lipoxinok, számos folyamatot befolyásolnak a normális homeosztázis folyamán, ezen kívül kulcsszereppel rendelkeznek a gyulladás és tumorigenezis során (Pilkington és mtsai, 2011).

A PUFA-k által megváltoztatott tumor-lipid homeosztázis rákellenes hatással rendelkezhet (Kuhn és mtsai, 2014; Puskás és mtsai, 2010). Alapos bizonyíték van arra, hogy azok a dózisok, melyek a tumor növekedést gátolják *in vitro* lényegesen eltérnek az *in vivo* tumor ellenes hatással rendelkező koncentrációktól (Leaver és mtsai, 2002a).

Leaver és mtsai (2002a; 2002b) patkány glióma infúzió modellen megfigyelték, hogy a GLA tumorba való bejuttatása hatékonyan segítheti elő a glióma visszafejlődését, miközben minimális hatással van a normális idegszövetre. Nasrollahzadeh és mtsai (2009) az általuk kiválasztott koncentrációban nem tudták kimutatni, hogy a DHA citotoxikus patkányokon előidézett gliómára.

A GLA kezelés nem okozott kimutatható változásokat a normális kutya agyban (Das és mtsai, 1995). Egy klinikai vizsgálat során 6 gliómával rendelkező személyen vizsgálták az intratumorális GLA kezelés hatását (Naidu és mtsai, 1992). A kezelésnek nem volt akut mellékhatása, az összes beteg jelentős választ mutatott a GLA kezelésre (Naidu és mtsai, 1992). 15 gliómában szenvedő beteg GLA-val való kezelése során Das és mtsai (1995) kimutatták, hogy a GLA biztonságos, nem toxikus, a daganat visszahúzódását okozza és 1.5-2 évvel meghosszabbítja a páciens életét. Kilenc kiújuló, IV-es fokozatú daganatos beteg GLA-val való kezelése után Bakshi és mtsai (2003) arra a következtetésre jutottak, hogy a GLA egy biztonságos tumor ellenes hatóanyag.

PUFA-k az idegszövetben

Az idegszövet a többi szövethez képest jelentős koncentrációban tartalmaz telítetlen zsírsavakat. A környezet hőmérséklet változásának köszönhetően az idegszövetben a DHA koncentráció nem változik, de a SFA-k és MUFA-k telítetlenségének mértéke igen (Brenna és Carlson, 2014). A hosszú szénláncú telítetlen zsírsavak jelentős szerepet töltenek be az emberben és az állat modellekben a mielinációban (Peters és mtsai, 2014).

A PUFA-k mennyisége az agyszövetben jelentősen megnő már a terhesség 25. hetében (Brenna és Diau, 2007). A nem anyatejjel etetett újszülöttek központi idegrendszerében a DHA koncentráció 10-30%-al kisebb (Brenna és Diau, 2007). Ezeket a kutatásokat azelőtt végezték el mielőtt a DHA-t adtak volna a tápszerhez. A DHA létfontosságú az idegszövet ideális fejlődéshez, amit a membrán fluiditásra való hatásával magyaráznak (Brenna és Carlson, 2014).

A DHA-nak kulcs fontosságú szerepe van a neurodegeneratív betegségek kialakulásában és az Alzheimer kórban (Lee és Park, 2014). A hosszú szénláncú PUFA hiányt számos neurodegeneratív rendellenességben kimutattak, eritrocita membránokban végeztek vizsgálatokat. Ilyen betegségek: a depresszió, a bipoláris zavar és skizofrénia (Hoen és mtsai, 2013; McNamara és mtsai, 2010; van der Kemp és mtsai, 2012).

A normális agyszövet és a glióma között jelentős különbség van a PUFA összetételt tekintve (Kyritsis és mtsai, 2012). Glióma szövetben a DHA szint jelentősen kisebb, míg a linolsav szint jelentősen nagyobb (Kyritsis és mtsai, 2012).

PUFA-k in vitro hatása

A neoplasztikus sejtek membrán fluiditása nagyobb, mivel a foszfolipidjeik több MUFA-t tartalmaznak (Scaglia és Igal, 2008). A rákos sejtek esetén a nagy membrán fluiditás nagymértékű proliferációt, inváziót és az apoptózis elkerülését okozza (Scaglia és Igal, 2005).

A DHA a gyulladásgátló hatását nagy valószínűség szerint a plazmamembrán mikrodomének befolyásolása által fejtik ki (Raza Shaikh és Brown, 2013). A DHA befolyásolja a mitokondriális lipid-fehérje csoportosulást, és az hatással van a mitokondrium működésére (Raza Shaikh és Brown, 2013).

Feltételezik, hogy a PUFA-k rákellenes hatásukat a lipid peroxidáció és a szabadgyök képződés révén fejtik ki (Vartak és mtsai, 1997). A rákos sejtek az oxidatív jelátviteli útvonalak hiányában nem tudnak megbírkózni a peroxidációs folyamatokkal (Sandrone és mtsai, 2014). Ennek köszönhetően sokkal fogékonyabbak a PUFA-k citotoxikus

hatására, mint a normális sejtek (Sandrone és mtsai, 2014). A szabadgyökök akkumulációja a sejt ciklus megszakítását idézi elő. Ezen kívül sejt zsugorodást és nukleáris fragmentációt okoz, ami az apoptózishoz köthető (Dupertuis és mtsai, 2007).

A hosszú láncú PUFA-k felgyűlése a rákos sejtekben lipid előidézett citotoxicitáshoz vagy lipopoptózishoz vezethet (Puskás és mtsai, 2010). A PUFA-k rákellenes hatására, többek között, a kulcs jelátviteli utak befolyásolása vagy a gén és miRNS expresszió megváltoztatása is elképzelhető magyarázat lehet (Cowing és Saker, 2001; Faragó és mtsai, 2011; Kitajka és mtsai, 2004; Ntambi és Bené, 2001; Sandrone és mtsai, 2014). Az exogén PUFA-k közvetlen módon gátolják a rákos sejt osztódását az eikozanoidok és lipid peroxidok termelésén keresztül. Közvetett módon is akadályozzák a tumor sejtek proliferációját azáltal, hogy megváltoztatják a membrán lipid összetételt, a membrán receptor aktivitást, a szignál transzdukciót és a gén expressziót (Ramos és Colquhoun, 2003).

Telítetlen zsírsavak önmagukban, és mint adjuvánsok sugárterápia mellett glióma kezelésére

A PUFA-k által előidézett nagyobb lipid peroxidáció és a reaktív oxigén gyökök képzése csökkenti a glióma sejtek túlélését és megnöveli azok radioszenzitivitását (Preuss és mtsai, 2000). Valószínű, hogy ez a hatás a mitokondrium funkcióképtelenné válásának köszönhető, ami apoptózishoz vezethet (Lu és mtsai, 2010). A ciklooxigenáz inhibitorok gátolják a GLA által kiváltott radioszenzitivitást asztrocitóma sejtekben, ezért valószínűsíthető, hogy a PUFA-k a prosztanoid szintézis révén idézhetik elő a sugárterápiára való érzékenységet (Vartak és mtsai, 1998). Azonban a PUFA-k citotoxicitása valószínűleg nem a prosztanoid és leukotrién szintézishez köthető (Vartak és mtsai, 1998).

A PUFA kezelés alkalmas a rákos sejtek sugárérzékenységének megnövelésére, míg védi a normális sejteket a sugárkezelés káros hatásaitól (Dupertuis és mtsai, 2007). A neoplasztikus asztrocitóma sejtek szabadgyökök elleni és/vagy lipid peroxidáció elleni védekezésre való képessége csökkent (Vartak és mtsai, 1998). A reaktív oxigén gyökök semlegesítéséhez a sejtek elsősorban az olyan antioxidáns enzimeket alkalmazzák, mint a szuperoxid diszmutáz (SOD; superoxide dismutase; Mn (mangán) és CuZn (réz-cink) azaz mitokondriális és szolubilis/citoszolikus szuperoxid diszmutáz), a kataláz (CAT, catalase) és a glutation peroxidáz. A glióma sejtek alacsony szinten vagy egyáltalán nem fejezik ki az szuperoxid diszmutázt, a glutation peroxidázt és a CAT-ot (Das, 2007).

Preuss és mtsai (2000) kimutatták, hogy a CAT aktivitás több mint kétszer nagyobb a glióma sejtekben, mint az asztrocitákban. GLA kezelést követően, a CAT aktivitásbeli

különbség a két sejt típus között megszűnik, a CAT aktivitás jelentősen megnő az asztrocitákban (Preuss és mtsai, 2000). A normális asztrocitákat nem befolyásolja a GLA kezelés, mivel megnövelik az antioxidáns enzim aktivitást, aminek köszönhetően ezek a sejtek alkalmazkodni tudnak a PUFA kezelés által előidézett oxidatív stresszhez (Vartak és mtsai, 1998). Preuss és mtsai (2000) eredményeik alapján feltételezik, hogy a PUFA kezelés citotoxikussága glióma sejtekre, legalább részben annak köszönhető, hogy ezek a sejtek nem képesek a CAT expressziót megnövelni. A PUFA-val kezelt 36B10 (rosszindulatú patkány asztrocitóma) sejtek sugárzása még jobban megnövelheti a szabadgyök képződést (Vartak és mtsai, 1998).

A C6 patkány glióma sejtek hosszú távú PUFA kezelést követően védve voltak az oxidatív stressztől (Sandrone és mtsai, 2014). Ennek ellenére a PUFA-k lecsökkentették a mitokondriális membrán potenciált, így gátolták a proliferációt és sejt migrációt (Sandrone és mtsai, 2014). A Ku80 fehérje, melynek fontos szerepe van a rákos sejtekben a DNS javításban alacsonyabb expressziója volt kimutatható (Benadiba és mtsai, 2009). Az E2F1 fehérje expresszió csökkenése arányos volt a sejt proliferáció csökkenésének mértékével (Benadiba és mtsai, 2009). A Ku80 és E2F1 expressziójának a csökkenése megmagyarázhatja ezeknek a sejteknek a nagyobb sugár- és kemoterápiára való érzékenységet (Benadiba és mtsai, 2009; Sandrone és mtsai, 2014).

A sugárkezelés alkalmazása önmagában az alacsonyrendű gliómákon megkérdőjelezhető, mert az átlag túlélési arányt nem befolyásolja (Sandrone és mtsai, 2014). A GLA kezelés megnöveli a sugárterápia hatékonyságát rákos sejteken és ugyanakkor citoprotektív a normális sejtekkel szemben (Das, 2004; Das, 2007).

Sugárzás és/vagy PUFA kezelés által befolyásolt miRNS-ek gliómában

A miRNS-ek rövid, nem kódoló RNS molekulák, melyek a génexpressziót szabályozzák. A különböző tumor típusok eltérő miRNS összetételűek (Faragó és mtsai, 2011). A miRNS-ek fontos szerepet töltenek be a tumorigenezisben, angiogenezisben, invázióban és apoptózisban. Egyaránt működhetnek onkogénként és tumor szupresszorként (Faragó és mtsai, 2011; Rolle, 2015). A miRNS-ek a diagnózisban és a prognózisban biológiai markerként alkalmazhatók. A miRNS-ek humán glioblasztóma kezelésének molekuláris célpontjai is lehetnek.

Niemoeller és mtsai (2011) megvizsgálták, hogy hogyan hat a 2 Gy-es dózis bizonyos miRNS-ek expressziójára glióma sejt vonalakon. Sasaki és mtsai (2012) 30 és 60 Gy hatását vizsgálták (naponta 2 Gy-es dózist alkalmazva) miRNS expresszióra humán glioblasztóma

sejteken. Chen és mtsai (2010) 18.8 Gy hatását vizsgálták U-87 MG (ATCC HTB-14TM kóddal ellátott glioblasztóma sejtvonal) sejteken, 6 nappal kezelést követően. Ez idáig, csak a kutatócsoportunk (Faragó és mtsai, 2011) foglalkozott azzal, hogy a PUFA kezelés, hogyan hat a miRNS-ek expressziójára glióma sejtekben. Arról egyáltalán nem volt információ, hogy a sugárzással kombinált PUFA kezelés hogyan hat a miRNS-ek expressziójára glióma sejtvonalon.

Vizsgálatainkra a következő miRNS-eket választottuk ki: miR-34a, miR-96, miR-146a, miR-181a, miR-148a, miR-148b, miR-152.

AA hatására (50 és 100 μ M) glioblasztóma sejtekben megnőtt a miR-34a expresszió (Faragó és mtsai, 2011). 100 μ M GLA a sejtvonal típusától függően (GBM5 és U373) csökkentheti vagy növelheti a miR-34a expressziót (Faragó és mtsai, 2011). Glioblasztóma sejtekben a 30 Gy lecsökkenti, míg a 60 Gy (napi 2 Gy-es kezelések esetén) megnöveli a miR-34a expressziót (Sasaki és mtsai, 2012). Más sejtvonalakban a sugárzás lecsökkenti a miR-34a expressziót (Metheetraitut és Slack, 2013).

A miR96 gliómában túlexpresszált (Yan és mtsai, 2014). A szintje fordítottan arányos a gliómában szenvedő betegek túlélésével (Yan és mtsai, 2014). A miR-96 csendesítés csökkenti az U-87 MG sejtek tumorogenitását (Yan és mtsai, 2014). Nem rendelkezünk előzetes adattal arról, hogy a miR-96 expressziójára hogyan hat a PUFA kezelés. A sugárzás eltérően hatott a miR-96 expresszióra különböző glióma sejtvonalakon (Niemoeller és mtsai, 2011).

A sejttípustól függően a miR-146a viselkedhet tumor szupresszorként vagy onkogénként (Chistiakov és Chekhonin, 2012). A DHA és GLA 100 μ M-os koncentrációban csökkenti a miR-146a expressziót glióma sejtvonalon (Faragó és mtsai, 2011).

Különböző sejtvonalakon a miR-181a expresszió csökkenését mutatták ki sugárzás hatására (Metheetraitut és Slack, 2013). Az U-87 MG sejtvonalon a miR-181a expresszió több mint felére csökkent 18.8 Gy hatására (2 Gy-es dózisokban adagolva) (Chen és mtsai, 2010). 50 és 100 μ M GLA hatására a miR-181a expresszió megnő glioblasztóma sejtvonalon (Faragó és mtsai, 2011).

Sugárzás hatására a miR-148a expressziója megnőtt (Metheetraitut és Slack, 2013).

Egyik tanulmány szerint a miR-148b expressziója több mint háromszorosára emelkedett a sugárzásnak kitett rosszindulatú sejtvonalakon (Niemoeller és mtsai, 2011).

A miR-152 expressziójának csökkenését írták le sugárzás hatására (Metheetraitut és Slack, 2013).

U-87 MG sejtek, mint glióma modell

Az U-87 MG sejtvonal epiteliális, adherens agyszövetből izolált humán sejtvonal (2014 ATCC), amelyet glioblasztóma vagy asztrocitóma modelljeként használnak, melyet 2007-ben a IV-es betegség kategóriába sorolták be, vagyis az agydaganatok legagresszívabb formáját képviseli (2014 ATCC). A sejtvonal genetikailag jól jellemzett, egy 44 éves, kaukázusi férfiből izolálták (2014 ATCC). Az általam ismert humán glióma sejtvonalak közül a „Pubmed” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), erre a sejtvonalra adott meg a legtöbb eredményt gén és miRNS expresszióval kapcsolatban (2014 ATCC; 2015 Sigma-Aldrich Co. LLC; Faragó és mtsai, 2011; Manda és mtsai, 2011; PHE 2013). Arra is lehetett a szakirodalomban információt találni, hogy az 1, 3 vagy 10 Gy-el való sugárzás hogyan hat 5 órával kezelés után, számos gén expressziójára ebben a sejtvonalban (Khodarev és mtsai, 2001).

Az a tény, hogy ez egy intenzíven vizsgált sejtvonal elősegítheti az eredmények összevetését más kutatócsoportok eredményeivel.

Célkitűzések

Az általam bemutatott kísérletek során a következő célkitűzéseink voltak:

1. Biokémiai és kinetikai módszerekkel megállapítani U-87 MG sejtvonalon, hogy az öt általunk vizsgált UFA (OA, EPA, AA, DHA, GLA) közül melyek hatnak szinergisztikusan a sugárkezeléssel (5 Gy és 10 Gy).
2. Biokémiai és kinetikai vizsgálatok során kiválasztani azokat az UFA-kat és azokat a koncentrációkat, amellyel az alkalmazott UFA-kat érdemes további kísérletek során vizsgálni.
3. Megfigyelni, hogy a kiválasztott UFA-k milyen hatással vannak az U-87 MG sejtek morfológiájára.
4. Terápiás célpontok, stresszhez köthető gének, zsírsavbioszintézishez köthető géneknek, lipidcseppecske-kötő fehérje génjének, hősokkfehérjék génjeinek expresszióját vizsgálni PUFA-kal (bizonyos esetekben csak GLA-val, szakirodalmi adatokra alapozva) való kezelést és/vagy sugárkezelést (10 Gy; bizonyos esetekben 5 Gy is) követően U-87 MG sejtvonalon.
5. Irodalmi adatok alapján kiválasztott miRNS-ek expressziójának tanulmányozása PUFA-kal való kezelést és/vagy sugárkezelést (10 Gy) követően.
6. A lipidcseppecskék (LD) akkumulációjának felmérése GLA kezelést, sugárkezelést (5 Gy és 10 Gy), vagy együttes GLA kezelés és sugárkezelést (5 Gy és 10 Gy) követően.
7. A génexpressziós mérések kiegészítése fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (fluorescence activated cell sorting, FACS) mérésekkel. Apoptózis mértékének meghatározása U-87 MG sejteken, az 5 Gy-el vagy 10 Gy-el történő sugárkezelés, és/vagy PUFA kezelés hatására.

Anyag és módszer

Sejtvonal és sejtenyésztés

Az U-87 MG glióma sejteket 37 °C-on tenyésztettük 5% CO₂ tartalmú inkubátorban, 10 % hőinaktivált magzati borjú szérum (Fetal Bovine Serum – FBS) (Gibco, Life Technologies) tartalmú DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Lonza). A tápoldatot 1% 200 mM L-glutaminnal és 6,66 mg·mL⁻¹ sztreptomycin, illetve 100 µg·mL⁻¹ penicillin (Gibco, Life Technologies) keverékével egészítettük ki. A sejteket a tervezett kísérlettől függően különböző szállító edényekben tenyésztettük: 16 lyukú e-plate (Roche, Magyarország), 96 lyukú TC (tissue culture) mikrotiter lemezek, T25 vagy T100 flaskák alkalmazásával. A sejtszámot a kísérlet típusa határozta meg. A sejteket egy órával sugárkezelés előtt kezeltük a következő telítetlen zsírsavakkal (UFA): arachidonsav (AA, Cayman Chemical Company, San Diego, Kalifornia); eikozapentaénsav (EPA, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország); dokozaheptaénsav (DHA, Cayman Chemical Company, San Diego, Kalifornia); gamma-linolénsav észter (GLA, Ubichem Research, Budapest, Magyarország); olajsav (OA, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország).

A médiumhoz hozzáadott UFA-k a teljes inkubációs idő alatt jelen voltak a médiumban, vagyis 24, 48 vagy 72 órát. Az UFA-k be tudtak épülni a sejt membránba vagy bejuthattak a sejtbe a kísérlet végéig. A sejteket 5 vagy 10 Gy-el sugaraztuk és 24, 48 vagy 72 órán keresztül inkubáltuk.

Inkubációs idők kiválasztása

Az xCELLigence rendszerrel (Roche és ACEA Biosciences által kifejlesztve) kinetikai méréseket végeztünk a kezelést követő 72 órán keresztül, hogy felmérjük a sejtszám, adherencia és sejt növekedés időben történő változását. Eredményeinket 72 órás biokémiai végpont (LDH (laktát dehidrogenáz)) és MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazolium), életképesség) vizsgálatokkal egészítettük ki. A kapott eredmények alapján választottuk ki azokat az UFA-kat és azokat a koncentrációkat melyek esetén érdemes a transzkriptomra kifejtett hatást elemezni. Mivel azokra a gén és miRNS expresszióbeli változásokra voltunk kíváncsiak, melyek az előzetes mérések során kimutatott fenotípus módosulásokat okozták, korábbi intervallumokat követően, 24 és 48 óra után izoláltunk RNS-t. Az oxidatív stresszhez köthető gének és az egyik korai stressz válaszban szereplő gén esetén; 24 óra után nem - vagy ritka esetben alig- tudtunk kimutatni

szignifikáns génexpresszióbeli változást a kontrollhoz képest, míg 48 óra után gyakran kaptunk jelentős eltéréseket. A holografikus mikroszkópos vizsgálat során, melyet 24 és 48 órával kezelés után végeztünk el; a 48 órás mérések esetén sokkal egyértelműbb volt a PUFA-k és/vagy sugárzás (10 Gy) citotoxicitása. Ezért a további miRNS expresszió elemzés és a legtöbb génexpresszió vizsgálat esetén 48 órás méréseket hajtottunk végre. Dokumentálni kívántuk, hogy a kapott transzkriptom változást, milyen mértékű lipid cseppecske akkumuláció és sejt pusztulás kíséri, ezért a fentebb említett méréseket is 48 órás mintákon végeztük el.

Sugárkezelés

A TC flaskákba vagy mikrotiter lemezbe tenyésztett U-87 MG sejteket egy $\sim 37^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékletű környezetet biztosító dobozba helyeztük és szállítottuk az Onkoterápiás Klinikára (Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar). Egy Teragam K-01 kobalt egységgel (átlag energia 1.25 MeV, SID=80 cm) sugaraztuk a mintát (5 Gy vagy 10 Gy). A mikrotiter lemezeket vagy flaskákat két 2 cm-es PMMA lemez közé helyeztük. Az izocentrum a minta középpontjára volt elhelyezve. A tér homogén volt, a dózis egyik felét egy lefele irányuló 20x20 cm-es sugár, amíg a másik felét egy felfele irányuló sugár biztosította. A biztosított dózis 0, 5 és 10 Gy volt a kísérlettől függően. A sugárkezelés idejének módosításával korrigáltunk a kobalt-60 forrás lebomlására.

Biokémiai mérések

LDH mérés

Az U-87 MG sejteket 2000 sejt/lyuk sűrűségben tettük ki, 24 órán keresztül inkubáltuk, UFA-val kezeltük és egy órával később sugárkezelésnek vetettük alá. 72 órával később eltávolítottuk a médiumot a sejtekről és a sejteket PBS-el (phosphate buffered saline, foszfát puffer oldat) mostuk. 70 μL 1%-os Triton X-100-al (Sigma-Aldrich) értük el a teljes sejt lízist. 70 μL laktát dehidrogenáz (LDH) reagenst (Roche) adtunk a sejtekhez. 10 perc múlva mértük az abszorbanciát 490 nm-en. Kétmintájú, egyenlőtlen varianciájú Student féle t-próbát (kétirányú eloszlás) alkalmaztunk a szignifikáns hatás kimutatására.

MTS mérés

A sejtek előkészítése, a kezelés és az inkubációs idő ugyanolyan volt, mint az LDH mérés esetén. 72 órás inkubációs időt követően 20 μL Phenazine Methosulfate: 3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (PMS:MTS; 1:20) oldatot adtunk a sejtekhez. Egy órával később mértük az abszorbanciát 490 nm-en. Kétmintájú, egyenlőtlen varianciájú Student féle t-próbát (kétirányú eloszlás) használtunk, hogy felmérjük a kezelés hatékonyságát.

xCELLigence mérés

Az ellenállásalapú valós idejű sejt elektronikus érzékelő (RT-CES, Real-Time Cell Electronic Sensing) mérést xCELLigence RTCA készülékkel hajtottuk végre (Ózsvári és mtsai, 2010). A sejteket 2000 sejt/lyuk sűrűségben tettük ki speciális, 16 lyukú E-mikrotiter lemezekbe.

Az xCELLigence rendszer (Roche és ACEA Biosciences által kifejlesztve) a sejt eseményeket monitorozza sejt jelölések használata nélkül (Ózsvári és mtsai, 2010). Az e-mikrotiter lemezek aljába mikroelektronikus sejt szenzor egységeket építettek (Ózsvári és mtsai, 2010). Amikor sejteket tartanak fenn egy lyukban, az ellenállást méri a szenzor elektródok és a kitapadt sejtek között, melyek az ellenállás növekedését okozzák (Ózsvári és mtsai, 2010). A relatív elektromos változások egy mérés során az xCELLigence szoftver által a sejt index nevű paraméterben vannak kifejezve (Ózsvári és mtsai, 2010). A sejt index, a pillanatnyi ellenállás relatív változása osztva egy előzetesen regisztrált háttér értékkel (Ózsvári és mtsai, 2010).

A sejtek szélesztését követő nap az U-87 MG sejteket UFA-kkal kezeltük, sugaraztuk majd 72 órán keresztül megfigyeltük őket az xCELLigence RTCA készülékkel. A sejt index értékeket azokhoz az értékekhez képest normalizáltuk melyek megelőzték az UFA kezelést. A sejt index a sejt számot, az adherenciát és sejt növekedést tükrözi (Ózsvári és mtsai, 2010). A kontroll és a kezelt lemezeket egyszerre hordoztuk minden sugarazás alkalmával.

Holografikus mikroszkópos vizsgálat

A holografikus fotók készítéséhez 600000 sejtet tettünk ki T25 flaskákba. 24 órával később a megfelelő sejteket 10 Gy-el sugaraztuk vagy/és 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val vagy 50 μ M GLA-val kezeltük, majd 48 órát inkubáltuk. 24 és 48 órás inkubációs idő után (kontroll sejtek esetén közvetlenül a kezelés után is) HoloMonitorTM M3 (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Svédország) készülékkel készítettünk fotókat. A legtöbb esetben a minta három-három reprezentatív részéről készítettünk fázis kontraszt és holografikus képeket. A holografikus mikroszkópos vizsgálat során nem készültek biológiai párhuzamosok. Kivételt

jelentett a 0 órás kontroll, ahol két biológiai párhuzamos volt, és két- két reprezentatív részről készítettünk holografikus és fázis kontraszt képeket.

A készülék szoftvere megszámlolja a sejteket és specifikus algoritmusokat használ, hogy meghatározza a körvonalaikat. Minden sejt esetén 43 paramétert mér meg, például konfluencia, sejt terület, sejt optikai útvonal hossz, sejt érdekesség, struktúra, térfogat, szabálytalanság, stb.

Minden reprezentatív fotó esetén a vizsgálati mezőben látható összes sejtet figyelembe vettük. Azon mérési sorozat esetén, ahol a mintaszám nem volt azonos, kétmintájú, egyenlőtlen varianciájú Student féle t-próbát (kétirányú eloszlás) alkalmaztunk. Ahol a mintaszám ugyanakkora volt és a minták varianciája sem tért el szignifikánsan egymástól kétmintájú, egyenlő varianciájú Student féle t-próbát (kétirányú eloszlás) használtunk.

miRNS és mRNS expresszió változásának vizsgálata zsírsavak és/vagy sugárkezelést követően

A minták előkészítése RNS tisztításhoz

U-87 MG sejteket T100 flaskákba vagy 6 lyukú lemezekbe (Corning Costar) szélesztettük 600.000 illetve 500.000 sejtszámmal. A sejteket 24 órán át inkubáltuk 37 °C-on 5% CO₂ tartalom mellett, majd ezután végeztük el a kezeléseket. 25 µM AA-val, 25 µM DHA-val és 50 µM GLA-val kezeltük a sejteket, majd sugárkezelésnek vetettük alá őket. 24 és 48 óra múlva izoláltunk teljes ribonukleinsavat (RNS-t).

Nukleinsav izolálás

Teljes és miRNS tisztítást a „Viral RNA extraction kit” (Bioneer, Daejon, Dél Korea) reagens készlettel hajtottuk végre. A kitben található oszlopokat, kötőpuffert és mosópuffert használtunk. Kötőpuffer 1-et (2:1 etanol: kötőpuffer) és kötőpuffer 2-t (5:1 etanol: kötőpuffer) készítettünk. Első lépésben a sejteket PBS-el mostuk, lízis pufferben (Accuzol™ Total RNA Extraction Solution Bioneer, Daejon) inkubáltuk 5 percig. A lizátumot összegyűjtöttük, diklorometánt adtunk hozzá. Ezt követően a felső vizes fázist gyűjtöttük össze. A kötőpuffer 1-et adtuk a mintához, amit aztán az oszlopokra kötöttünk. Az oszlopokon átfolyó folyadékot miRNS izoláláshoz gyűjtöttük össze. Az oszlopokat dezoxiribonukleázzal (Omega bio-tek, Norcrossm Gerogia, USA) kezeltük. Kötőpuffer 2-t adtunk az átfolyó folyadékhoz majd a keveréket egy másik oszlopra vittük fel, erre kötődött a miRNS. Ezt követően, mind a

miRNS-t, mind az RNS-t tartalmazó oszlopokat kétszer mostuk mosópufferrel. Az RNS-t és miRNS-t ribonukláz-mentes vízben eluáltuk.

Az izolált miRNS és RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop 1000 3.8.1-es készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) mértük.

mRNS expresszió

mRNS (hírvivő, messenger RNS) kifejeződés meghatározásához a tisztított, teljes RNS-t (1.5 µg-ot) „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” segítségével írtuk át a gyártó, az Applied Biosystems® (Life Technologies, Foster City, CA, USA) által előírtak szerint. A valós idejű reverz transzkripció PCR (Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR, QRT-PCR) mérésekhez a kiegészítő DNS (complementary DNS, cDNS) templátot 18-szor hígítottuk tovább. A génexpressziót Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-el (Invitrogen) vagy „FastStart SYBR Green Master” keverékkel (Roche Diagnostic, USA) mértük. 4.5 µL templát cDNS-t adtunk 5.5 µL „Mastermix”-hez. Ez utóbbi 5 µL Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-ből (Invitrogen) vagy FastStart SYBR Green Master keverékből (Roche) és 0.5 µL 10 pM primer (Fw+Rv) oldatokból állt. A QRT-PCR-t gén specifikus primerekkel hajtottuk végre RotorGene 3000 készüléken (Corbett Life Science, QIAGEN). A primer szekvenciák a függelék F-1.-es táblázatában láthatók. Ebben a táblázatban a jelen értekezésben használt gén szimbólumnak megfelelő teljes hivatalos név is megtalálható. A ciklus küszöbérték (Ct, cycle threshold) értékeket a Rotor-Gene 6.0-ás verziójával (Corbett Life Science) állapítottuk meg. Az F-1.-es táblázatban a Ct értékek is megtalálhatók. A polimeráz láncreakció (PCR) protokoll a következő volt: 1. 95 °C 2 perc; 2. 95 °C 15 másodperc; 3. 60 °C 45 másodperc (Invitrogen) illetve 1. 95 °C 10 perc; 2. 95 °C 15 másodperc; 3. 60 °C 10 másodperc; 4. 72 °C 20 másodperc (Roche). A 2.-es és 3.-as (illetve 4.) lépést 55 cikluson keresztül ismételtük.

A primerek specificitását a T_m (melting temperature, oladási hőmérséklet PCR esetén, a DNS duplex stabilitásának mutatója) értékek különböző mintákon való összehasonlításával ellenőriztük. Ugyancsak a specificitás biztosítása érdekében, azokat a primereket, melyek Ct értéke az összes mintán nagyobb volt, mint 40, kizártuk.

A génexpressziót belső kontrollokkal normalizáltuk, *HPRT1* és *PPIA*-val. A *HPRT1* és *PPIA* megfelelő referencia génként vannak validálva humán agyban (Zinzow-Kramer és mtsai, 2014).

A relatív génexpresszió megállapítására a K. Livak (PE-ABI; Sequence Detector User Bulletin 2) által leírt $\Delta\Delta CT$ módszert alkalmaztuk (Winer és mtsai, 1999). Minden mintán

kétszer mértünk mind *HPRT1*, mind *PPIA* expressziót és a mérési eredmények átlagát vontuk ki a kérdéses génekre kapott Ct értékekből, megkapva a ΔCt értékeket. A kontroll ΔCt értékből kivontuk a minta ΔCt értékét. Az így kapott $-\Delta\Delta Ct$ értéket ábráztuk, ami a génexpresszió változás kettesalapú logaritmusának felel meg.

A p-értékeket kétmintájú, egyenlőtlen varianciájú Student féle t-próbával (kétirányú eloszlás) állapítottuk meg.

miRNS expresszió

miRNS kifejeződés meghatározásához 200 ng miRNS-t írtunk át 5x TaqMan RT assay primerrel (Life Technologies) és high capacity cDNA Reverse Transcription Kit-el (Life Technologies). A következő protokollt alkalmaztuk: 16 °C 30 perc; 42 °C 30 perc; 85 °C 5 perc.

A miRNS expresszió méréséhez FastStart TaqMan Probe Mastert (Roche) és TaqMan primereket (20x, Life Technologies) használtunk. Az expressziót az Exicycler 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Bioneer) mértük. A következő reagenseket használtuk egy minta esetén: 5 μ L FastStart TaqMan Probe Master, 0.5 μ L primer és 1 μ L cDNS. Az alkalmazott PCR protokoll a következő volt: 95 °C -os hőstart 15 percig, majd 50 cikluson keresztül: 95 °C 15 másodperc; 60 °C 1 perc.

A miRNS expresszió Ct értékeit az ugyanazon a mintán mért összes miRNS középértékével normalizáltuk, megkapva a ΔCt értékeket. A kísérletek tervezése során a szakirodalom alapján az U6 snRNS-t választottuk ki normalizálásra. A legtöbb cikk ezt használja fel U-87 MG sejtek esetén (Chen és mtsai, 2010; Gwak és mtsai, 2012; Qu Y és mtsai, 2012; Shu és mtsai, 2011; Shu és mtsai, 2012). Az eredmények kiértékelése során azonban megfigyeltük, hogy a belső kontrollra kapott Ct értékek jelentősen szórnak. Ezért kénytelenek voltunk a normalizálás során az összes miRNS középértékére normalizálni. A kontroll ΔCt értékekből kivontuk a minta ΔCt értékét. Az így kapott $-\Delta\Delta Ct$ értéket ábráztuk, ami az expresszió változás kettesalapú logaritmusának felel meg.

A szignifikanciát kétmintájú, egyenlőtlen varianciájú Student féle t-próbával (kétirányú eloszlás) állapítottuk meg.

Konfokális mikroszkópia, lipidcseppecske akkumuláció vizsgálata

Az U-87 MG sejteket 2000 sejt/lyuk sűrűségben tettük ki 8 lyukú Lab-Tek II chambered fedőlemezre (Thermo Fisher Scientific). Az AC-202 szelektíven festi az élő sejtekben található lipidcseppecskéket (Kuntam és mtsai, 2015; Puskás és mtsai, 2010). A

sejteket 25 μ M AC-202-vel festettük 30 percig. Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer szkennelő (Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany) mikroszkópot használtunk, hogy az U-87 MG sejtekben a lipidcseppecskéket láthatóvá tegyük. Minden minta esetén 12 mikroszkópikus látómezőt elemeztünk 4 különböző párhuzamos lyukban. Az AC-202 fluoreszcencia kimutatására használt objektív lencsék paraméterei a következők voltak: UPLSAPO 20x (száraz, numerikus apertúra:0,75). 8-bites konverzió után, a fluoreszcencia képeken ImageJ szoftver segítségével határértéket állítottunk be. 50-255 között rögzített intenzitás tartomány és sötét háttér opciókat alkalmaztunk a határérték beállítása során. Az ImageJ „Set measurements” opciója „area measurement”-re és „limit to threshold”-ra volt állítva. A lipidcseppecskék által elfoglalt terület a következő mérések alapján készült el: az össz sejt terület (az Olympus Fluoview szoftverrel a transzmissziós képeken kézi sejt határ felvázolást hajtottunk végre) és határértékkel számolt LD terület az ImageJ „measure” funkciójával.

Az eredményekből „box” és „whisker” ábrát készítettünk egy internetes alkalmazás (<http://boxplot.tyerslab.com/>) segítségével, melyet Spitzer és mtsai (2014) hoztak létre. A szignifikancia értékeket kétmintájú, egyenlő varianciájú Student féle t-próbával (kétirányú eloszlás) határoztuk meg.

FACS mérések

A sejteket 500 μ L tápoldatba, 40000 sejt/lyuk sűrűségben tettük ki. Tripszinnel való kezelés után a sejteket összegyűjtöttük, centrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc), majd 7.4-es pH-jú Annexin V kötő pufferben (0.01 M HEPES, 0.14 M NaCl and 2.5 mM CaCl_2) oldottuk. A sejteket Annexin V-Alexa Fluor 488-al (AnnV, LifeTechnologies, 2.5:100 hígítás) festettük, hogy a sejt membrán külső rétegében található foszfatidil-szerint jelöljük. A sejteket propidium jodidnak (PI, Sigma-Aldrich, 10 μ g/ml) is kitettük, ami csak a nekrotikus sejteken tud áthatolni. Ennek alapján megkülönböztethettünk nekrotikus sejteket, korai apoptotikus sejteket és kései apoptotikus sejteket. A sejteket a propidium jodid hozzáadását követően 15 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Mosást követően minden minta esetén 10.000 sejtet elemeztünk a BD FACSCalibur Flow Cytométerrel, 488 nm-es és 633 nm-es lézerekkel. A korai apoptotikus (AnnV+/PI-) és kései apoptotikus (AnnV+/PI+) sejtek összegét ábrázoltuk. Az egészséges sejtek (AnnV-/PI-) nem festődtek sem PI-vel, sem AnnV-el. Szignifikanciát kétmintájú, egyenlő varianciájú Student féle t-próbával (kétirányú eloszlás) számoltunk.

Statisztika

A statisztikát a 2007-es Microsoft Office Excel „ttest” funkciójával hajtottuk végre (McDonald, 2014). A 48 órás holografikus mikroszkópos, a lipid cseppecske akkumuláció és az apoptózis vizsgálat esetén azonos mintaszámmal rendelkezünk és a minták varianciája között nem volt szignifikáns különbség. Ezért a kétmintájú, egyenlő varianciájú Student féle t-próbát (két irányú eloszlás) alkalmaztuk (McDonald, 2014). A 0 és 24 órás holografikus mikroszkópos vizsgálat esetén nem volt azonos a mintaszámunk. Ugyanez az eset állt fent az MTS és LDH méréseknél, valamint a gén expressziós és miRNS expressziós méréseknél. Ez esetben a két mintájú, egyenlőtlen varianciájú Student féle t-próbát használtuk. Ha a mintaszám nem egyenlő a vizsgált csoportok között, akkor az egyenlőtlen varianciájú Student féle t-próba (Welch féle t-próba) használata javasolt (McDonald, 2014; Ruxton, 2006; Zaiontz, 2013-2015). Az egyenlőtlen varianciájú t-próba nem tételezi fel, hogy a mintáknak egyenlő varianciája van (Ruxton, 2006). Az egyenlőtlen varianciájú t-próba teljesítménye hasonló az egyenlő varianciájú t-próbához amikor a populációk varianciája egyenlő (Ruxton, 2006). Mindkét t-próba esetén két-irányú eloszlást alkalmaztunk.

Lipid cseppecske akkumuláció vizsgálata során a Spitzer és mtsai (2014) által kifejlesztett internetes alkalmazással (<http://boxplot.tyerslab.com/>) a mediánt ábrázoltuk.

Eredmények

Kinetikai és biokémiai végpont vizsgálatok

Öt telítetlen zsírsavnak (AA, DHA, GLA, OA, EPA) a hatását vizsgáltuk U-87 MG glióma sejteken biofizikai és biokémiai módszerekkel. 24 órával a sejtek kitapadása után a PUFA kezelést 5 Gy és 10 Gy-es dózissal kombináltuk. Kinetikai vizsgálatokat valamint LDH és MTS méréseket végeztünk el. Az RT-CES mérések segítségével 100 órán keresztül vizsgáltuk az U-87 MG sejtek proliferációját és növekedését (2, 5, 8, 11, 14 és F-1 – F-10-es ábra). LDH (3, 6, 9, 12 és 15. ábra) és MTS (4, 7, 10, 13 és 16. ábra) aktivitás mérésével határoztuk meg az U-87 MG sejtek metabolikus aktivitását.

2. ábra: AA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat. 25µM AA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábrán minden 20. SD. van feltüntetve.

3. ábra: **AA hatása U-87 MG sejtekre – biokémiai vizsgálat.** 25, 50 és 75 µM AA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása LDH aktivitásra. Az ábra a minták átlagait (kontroll és sugározott sejtek esetén mintaszám=4; a többi minta esetén mintaszám=2) és az SD. értékeket ábrázolja. */**: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/###: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

4. ábra: **AA hatása U-87 MG sejtekre – biokémiai vizsgálat.** 25, 50 és 75 μ M AA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása életképességre. Az ábra a minták átlagait (kontroll és sugározott sejtek esetén $n=4$; a többi minta esetén $n=2$) és az SD. értékeket ábrázolja. */*: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, ###: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

75 μ M AA kezelés már önmagában lecsökkentette az U-87 MG sejtek proliferációját és növekedését (F-2. ábra). Míg 5 Gy nem, addig 10 Gy jelentősen lecsökkentette a sejtek proliferációját és növekedését (2. ábra). Ha ezekhez a dózisokhoz 25, 50 és 75 μ M AA-t adunk akkor szinergisztikus hatás volt kimutatható (2., F-1, és F-2 ábra). LDH aktivitás mérések során minden dózis (5 Gy; 10 Gy) és AA koncentráció (25 μ M; 50 μ M; 75 μ M AA) szignifikáns volt a kontrollhoz képest (3. ábra). Dózisfüggést figyelhattunk meg az LDH és MTS mérések során a kontrollok esetében (3. és 4. ábra). 75 μ M AA és 10 Gy alkalmazása során szinergisztikus hatást figyeltünk meg az MTS mérések során (4. ábra).

5. ábra: **DHA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 25 µM DHA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. Az ábra a minták átlagait (kontrollok esetén n=4; többi minta esetén n=2) tünteti fel. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

6. ábra: **DHA hatása U-87 MG sejtekre – biokémiai vizsgálat.** 25, 50 és 75 µM DHA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása LDH aktivitásra. Az ábra a minták átlagait (mintaszám=4 kontroll és sugározott minta esetén; a többi mintánál n=2) és az SD. értékeket ábrázolja. */**: szignifikáns (p < 0.05/p < 0.01) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns (p < 0.05/p < 0.01) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns (p < 0.05/p < 0.01) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

7. ábra: **DHA hatása U-87 MG sejtekre –biokémiai vizsgálat.** 25, 50 és 75 µM DHA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása életképességre. Az ábra a minták átlagait (mintaszám=4 kontroll és sugározott minta esetén; a többi mintánál n=2) és az SD. értékeket ábrázolja. */**: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, ###: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

75 µM DHA már szignifikáns hatást váltott ki U-87 MG sejteken valamint a DHA jelentősen felerősítette sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) hatását (5., F-3, F-4 ábra). LDH aktivitás mérés során, amikor a sejteket 25 µM DHA-val és 10 Gy-el vagy 50 µM DHA-val és 5 Gy-el kezeltük, akkor szinergisztikus hatást mutattunk ki (6. ábra). Életképesség mérések során szignifikáns hatást mutattunk ki minden dózis (5 Gy, 10 Gy) és minden koncentráció (25 µM, 50 µM, 75 µM DHA) valamint ezek kombinálása esetén (7. ábra).

8. ábra: **GLA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 50 µM GLA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. Az ábra a minták átlagait (kontrollok esetén mintaszám=4, a többi minta esetén n=2) tünteti fel. Minden 20. SD. érték van feltüntetve az ábrán.

9. ábra: **GLA hatása U-87 MG sejtekre – biokémiai vizsgálat.** 50, 75 és 100 µM GLA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása LDH aktivitásra. Az ábra a minták átlagait (mintaszám=4 kontroll és sugározott minta esetén, míg a

mintaszám=2 a többi minta esetén) és az SD. értékeket ábrázolja. **/: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

10. ábra: **GLA hatása U-87 MG sejtekre –biokémiai vizsgálat.** 50, 75 és 100 µM GLA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása életképességre. Az ábra a minták átlagait (kontroll, 5 Gy, 10 Gy mintaszám=4; többi minta n=2) és az SD. értékeket ábrázolja. **/: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

Akárcsak az AA és DHA kezelés esetén, a GLA is jelentősen csökkentette a sejtproliferációt és a sejtnövekedést mikor adjuvánsként volt alkalmazva 5 Gy és 10 Gy mellett (8. ábra, F-5, F-6 ábra). Minden dózisonál (5 Gy és 10 Gy) és minden GLA koncentrációnál (50 µM, 75 µM és 100 µM) valamint ezek kombinációinál szignifikáns hatás volt kimutatható a minták és a kontroll LDH aktivitása között (9. ábra). 75 µM GLA és 10 Gy kombinálása esetén szinergisztikus hatás volt kimutatható, LDH aktivitás mérések során (9. ábra). 50 és 75 µM GLA nem változtatott a sejtek életképességén (10. ábra). 5 Gy és 10 Gy önmagában

szignifikáns életképesség-csökkenést okozott (10. ábra). 50-100 μM GLA hozzáadása az 5 és 10 Gy-el sugározott sejtekhez, nem változtatott a sugározott sejtek életképességén (10. ábra).

11. ábra: **OA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 100 μM OA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. Az ábra a minták átlagait (kontrollok esetén mintaszám=4, a többi minta esetén n=2) tünteti fel. Minden 20. SD. érték van feltüntetve az ábrán.

12. ábra: **OA hatása U-87 MG sejtekre –biokémiai vizsgálat.** 100, 200 és 400 µM OA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása életképességre. Az ábra a minták átlagait (kontroll és sugározott sejtek esetén mintaszám=4; többi minta esetén n=2) és az SD. értékeket ábrázolja. */**: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott OA-val kezelt sejtek és az OA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

13. ábra: **OA hatása U-87 MG sejtekre –biokémiai vizsgálat.** 100, 200 és 400 µM OA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása életképességre. Az ábra a minták átlagait (a kontroll és sugározott sejtek esetén mintaszám=4; a többi minta esetén n=2) és az SD. értékeket ábrázolja. */**: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott OA-val kezelt sejtek és a OA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

Az OA-val való kezelés különleges hatással volt az U-87 MG sejtekre: 100-200 µM jelentősen megnövelte a sejtprolifrációt a kontrollhoz képest (11. és F-7. ábra). 400 µM OA azonban már sugárkezelés nélkül is csökkentette a proliferáció mértékét, 5 Gy vagy 10 Gy együttes alkalmazása 400 µM OA-val azonban nem változtatta meg azt (F-8. ábra). 100 µM OA-t kivéve minden kezelés (5 Gy, 10 Gy, 100 µM OA és 5 Gy, 100 µM OA és 10 Gy, 200 µM OA, 200 µM OA és 5 Gy, 200 µM OA és 10 Gy, 400 µM OA, 400 µM OA és 5 Gy, 400 µM OA és 10 Gy) szignifikánsan lecsökkentette az U-87 MG sejtek LDH aktivitását (12. ábra). LDH és MTS mérések során egyaránt dózis-függést figyelhetünk meg. 100 µM OA és 10 Gy-el való kezelés esetén szinergisztikus hatást mutattunk ki LDH aktivitás mérésekor (12. ábra). 400 µM OA 20 % alá csökkentette a sejtek LDH aktivitását (3.52%, 12. ábra). Ha OA kezelés mellett sugárkezelést (5 Gy és 10 Gy) alkalmaztunk a sejtek életképessége jelentősen

lecsökkent (13. ábra). 400 μM OA már önmagában jelentősen lecsökkentette az U-87 MG sejtek életképességét (13. ábra). Az U-87 MG sejtek életképességére 400 μM OA és 10 Gy-el való kezelés volt szinergisztikus hatással (13. ábra).

14. ábra: **EPA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 50 μM EPA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A panel a minták átlagait (kontrollok esetén mintaszám=4; a többi minta esetén n=2) ábrázolja. Minden 20. SD. van feltüntetve az ábrán.

15. ábra: **EPA hatása U-87 MG sejtekre – biokémiai vizsgálat.** 50, 75 és 100 µM EPA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása LDH aktivitásra. A panel a minták átlagait (kontroll és sugározott sejtek esetén mintaszám=4, többi minta esetén n=2) és az SD. értékeket ábrázolja. */** : szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++ : szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, ##/### : szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

Az EPA kezelés a sejtproliferációra sem önmagában sem sugárkezeléssel (5 Gy és 10 Gy) kombinálva nem hatott (14. ábra, F-9, F-10 ábra). LDH aktivitás mérése során, amikor 75 µM (5 Gy-el) és 100 µM (5 Gy-el és 10 Gy-el) EPA-t együttesen alkalmaztuk sugárkezeléssel akkor szinergisztikus hatást figyelhattunk meg (15. ábra). Mind az LDH és MTS mérések során dózis-függést figyelhetünk meg (15, 16. ábra). Életképesség mérések során szignifikáns szinergisztikus hatást 50 µM EPA és 10 Gy alkalmazásakor lehetett megfigyelni (16. ábra).

16. ábra: **EPA hatása U-87 MG sejtekre – biokémiai vizsgálat.** 50, 75 és 100 µM EPA és sugárzás (5 és 10 Gy) hatása életképességre. Az ábra a minták átlagait (kontroll és sugározott sejtek esetén mintaszám=4, a többi minta esetén n=2) és az SD. értékeket ábrázolja. */**: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

25-75 µM AA, 25-75 µM DHA, 50 µM GLA, 400 µM OA az RT-CES mérések alapján, felerősítette a sugárkezelés (5 és 10 Gy) hatását és jelentősen lecsökkentette a normalizált sejt indexet a csak sugározott sejtekhez képest. 100 µM OA és 50-100 µM EPA nem volt hatással az U-87 MG sejtek életképességére és LDH aktivitására (12, 13. ábra valamint 15, 16. ábra).

A kinetikai és a biokémiai vizsgálatok alapján választottuk ki az AA-t, DHA-t és GLA-t mint a legalkalmasabb zsírsavakat a további vizsgálatokhoz. Az AA-t és DHA-t 25 µM-os koncentrációban, míg a GLA-t 50 µM-os koncentrációban alkalmaztuk.

Morfológiai vizsgálatok

HolomonitorTM (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Sweden) mikroszkóppal készítettünk holografikus és fázis kontraszt fotókat 24 és 48 órás időintervallum után.

17. ábra: U-87 MG sejtek vizsgálata a kísérlet kezdetének időpontjában (K-0h.) és 24 órával (K-24h.)
később. Minden kezelés esetén legalább három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízszintes
lépték: 246,7 μm . Függőleges lépték K-0h.: 6,52 μm ; K-24h.: 8,09 μm .

18. ábra: U-87 MG sejtek vizsgálata a kísérlet kezdetének időpontjában (K-0h.) és 48 órával (K-48h.) később. Minden kezelés esetén legalább három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízszintes lépték: 246,7 µm. Függőleges lépték K-0h.: 6,52 µm; K-48h.: 9,38 µm.

19. ábra: Sejtszám, konfluencia, átlag sejt vastagság és átlag sejtszabálytalanság változása 24 (kontroll 24 h) és 48 óra (kontroll 48 h) elteltével U-87 MG sejteken. A panelek a minták átlagait (kontroll 0 h esetén mintaszám=4, a többi esetben mintaszám=3) és az SD. értékeket ábrázolják. */**: szignifikáns különbség ($p < 0.05/p < 0.01$) a kísérlet kezdetekor vizsgált sejtekhez képest (kontroll 0 h).

A HolomonitorTM M3 készülék segítségével 3-3 keretet fotóztunk le. Az egyedülálló sejteken a szoftver 43 paramétert mér meg, például: konfluencia, sejt terület, sejt optikai útvonal hossz, sejt érdesség, szerkezet, térfogat, szabálytalanság, stb. A konfluencia, az átlag sejtvastagság és átlag sejtszabálytalanság nem változott 24 és 48 órával a kezelés után kontroll sejteken (19. ábra). A vizsgált fotók közül mintánként egy-egy példány a 17. és 18. ábrán tekinthető meg.

20. ábra: U-87 MG sejtek morfológiája 24 órával sugárkezelés (10 Gy) és/vagy AA kezelés után. A sejtek 25 μM AA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. Minden kezelés esetén három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízszintes lépték: 246,7 μm . Függőleges lépték K. (kontroll): 8,09 μm ; AA.: 6,55 μm ; 10 Gy.: 9,54 μm ; 10 Gy+AA.: 8,18 μm .

21. ábra: U-87 MG sejtek morfológiája 24 órával sugárkezelés (10 Gy) és/vagy DHA kezelés után. A sejtek 25 μM DHA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. Minden kezelés esetén három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízszintes lépték: 246,7 μm. Függőleges lépték K.: 8,09 μm; DHA.: 7,56 μm; 10 Gy: 9,54 μm; 10 Gy+DHA.: 10,27 μm.

22. ábra: U-87 MG sejtek morfológiája 24 órával sugárkezelés (10 Gy) és/vagy GLA kezelés után. A sejtek 50 μm GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. Minden kezelés esetén három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízszintes lépték: 246,7 μm; Függőleges lépték K.: 8,09 μm; GLA.: 10,38 μm; 10 Gy.: 9,54 μm; 10 Gy+GLA.: 8,22 μm.

A 20, 21. és 22. ábrán megfigyelhető, hogy 24 órán belül a 10 Gy dózis nem hat szignifikánsan és a 25 μ M DHA-val és 50 μ M GLA-val való kezelés sem. Ezt a 23. ábrán bemutatott paraméterek is alátámasztják. A PUFA kezelés 24 órán belül nem okozott szignifikáns változást sem a sejtszámban, sem konfluenciában, sem az átlag sejtvastagságban, sem a sejtszabálytalanságban (23. ábra). 10 Gy és AA szignifikánsan lecsökkentette a sejtszámot a kontrollhoz képest (23. ábra). A sugárkezeléssel (10 Gy) kombinált PUFA kezelés már 24 órán belül szignifikánsan megnövelte az átlag sejtvastagságot. A 10 Gy és GLA kezelés az átlag sejt szabálytalanságra szinergisztikusan hatott (23. ábra).

A 24, 25 és 26. ábrán található fáziskontraszt és holografikus ábrákon figyelhető meg az U-87 MG sejtek morfológiája 48 órával sugárkezelés (10 Gy) és PUFA kezelés után. Ezek értékelése konkrét paraméterek alapján a 27. ábrán található meg. Az AA szignifikánsan megváltoztatta a sejtszámot, a konfluenciát, az átlag sejtvastagságot és az átlag sejtszabálytalanságot a kontrollhoz képest (27. ábra). A kombinált 10 Gy és PUFA kezelés szignifikánsan megváltoztatta mind a négy paramétert, ez alól kivétel a 10 Gy és DHA együttes alkalmazása volt az átlag sejtszabálytalanság esetén.

23. ábra: Sejtszám, konfluencia, átlag sejtvastagság és átlag sejtszabálytalanság változása 24 órával kezelés után. A panelek a minták átlagait (mintaszám=3) és az SD. értékeket ábrázolják. A sejtek 25 μM AA-val, 25 μM DHA-val és 50 μM GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. **/: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, ###: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

24. ábra: U-87 MG sejtek morfológiája 48 órával sugárkezelés (10 Gy) és/vagy AA kezelés után. A sejtek 25 μM AA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. Minden kezelés esetén három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízszintes lépték: 246,7 μm. Függőleges lépték K.: 13,49 μm; AA.: 15,45 μm; 10 Gy.:12,65 μm; 10 Gy+AA.: 11,98 μm.

25. ábra: U-87 MG sejtek morfológiája 48 órával sugárkezelés (10 Gy) és/vagy DHA kezelés után. A sejtek 25 μ M DHA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. Minden kezelés esetén három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízzintes lépték: 246,7 μ m. Függőleges lépték K.:13,49 μ m; DHA.: 11,03 μ m; 10 Gy.: 12,65 μ m; 10 Gy+DHA.:12,88 μ m.

26. ábra: U-87 MG sejtek morfológiája 48 órával sugárkezelés (10 Gy) és/vagy GLA kezelés után. A sejtek 50 μM GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. Minden kezelés esetén három felületet vizsgáltunk, ezekből egy van feltüntetve. Vízszintes lépték: 246,7 μm. Függőleges lépték K.: 13,49 μm; GLA.: 12,55 μm; 10 Gy.: 12,65 μm; 10 Gy+GLA.: 13,99 μm.

27. ábra: **Sejtszám, konfluencia, átlag sejtvastagság és átlag sejtszabálytalanság változása 48 órával kezelés után.** A sejtek 25 μM AA-val, 25 μM DHA-val és 50 μM GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. A panelek a minták átlagait (mintaszám=3) és az SD. értékeket ábrázolják. */**:
szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$)
különbség a sugározott sejtekhez képest, #/###: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a PUFA-al kezelt sejtek
és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

Apoptózis mérések 48 órával PUFA kezelést és/vagy sugárkezelést (5 Gy és 10 Gy) követően

Kinetikai és biokémiai méréseinket FACS mérésekkel egészítettük ki. Annexin V-Alexa Fluor 488-al jelöltük az apoptotikus sejtek külső membrán rétegében megjelenő foszfatidil-szerint. A sejteket propidium-jodiddal is inkubáltuk, amely nem tud behatolni az csak a nekrotikus sejtekbe. Ezáltal nekrotikus, korai apoptotikus és kései apoptotikus sejteket tudtunk megkülönböztetni. Minden minta esetén 10.000 sejtet vizsgáltunk.

A 28. ábra A paneljén az összes apoptotikus sejt százalékos aránya látható; ebbe a kategóriába a korai apoptotikus és a kései apoptotikus sejtek is beletartoznak (AnnV+/PI+ + AnnV+/PI-). A 28. ábra B paneljén az egészséges sejtek mennyisége látható (AnnV-/PI-).

5 Gy és 25 μ M AA valamint 5 Gy és 25 μ M DHA –val történő kezelés esetén szinergista hatás volt kimutatható egyaránt az összes apoptotikus sejt és az egészséges sejtek (sem nekrotikus, sem apoptotikus sejtek) mérése során (28. ábra A és B panel). A 25 μ M DHA és 25 μ M AA-val való kezelt mintákat kivéve, a kezelés minden esetben szignifikánsan lecsökkentette az egészséges sejtek arányát (28. ábra B panel). Az egészséges sejtek vizsgálata során a sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) hatása dózis függőnek bizonyult ($p=0.02$). Amikor a sejtek egyszerre voltak kitéve 50 μ M GLA-nak és sugárkezelésnek (5 Gy és 10 Gy), szintén dózis-függés volt kimutatható az egészséges sejtek esetén ($p=0.01$). Az 5 Gy és GLA kezelést kivéve, a sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) minden esetben jelentősen lecsökkentette az egészséges sejtek arányát, ha a PUFA kezelést sugárkezeléssel (5 Gy és 10 Gy) együtt alkalmaztuk (28. ábra B panel).

5 Gy-el ellentétben, a 10 Gy-es dózis szignifikánsan megnövelte az összes apoptotikus sejt arányát (28. ábra A panel). Míg 25 μ M AA és 25 μ M DHA önmagában nem, addig 50 μ M GLA szignifikánsan megnövelte az összes apoptotikus sejt számát a kontroll sejtekhez képest. Az összes apoptotikus sejt aránya szignifikánsan megnőtt, ha 25 μ M AA-t és 25 μ M DHA-t 5 Gy-el együtt alkalmaztuk. Ugyanez volt igaz, amikor 25 μ M AA-t 10 Gy-el kombináltunk (28. ábra A panel).

A. Összes apoptotikus sejt (%)

B. Egészséges sejtek (%)

28. ábra: FACS mérések PUFA-al kezelt és/vagy sugarazott U-87 MG sejteken. Az U-87 MG sejtek 25 μ M AA-al, 25 μ M DHA-al, 50 μ M GLA-al, 5 Gy és 10 Gy-el voltak kezelve. Az A. panel az összes apoptotikus sejt arányát (AnnV+/PI+ + AnnV+/PI-) jelöli, a B. az összes egészséges sejtet (AnnV-/PI-). Minden minta esetén 10000 sejtet vizsgáltunk. Minden kezelés esetén három mintát vizsgáltunk, az ábrákon a kapott eredmények átlaga és az SD. értékek láthatók. ***/****/*****: szignifikáns ($p < 0.05$ / $p < 0.01$ / $p < 0.001$ / $p < 0.0001$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05$ / $p < 0.01$) különbség a sugarazott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns ($p < 0.05$ / $p < 0.01$) különbség az adott PUFA-val kezelt sejtek és a PUFA és 10 Gy-el kezelt sejtek között.

Stresszválasszal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének expresszió vizsgálata PUFA vagy/és sugárkezelés (10 Gy) után

Az előzetes mérések alapján (2-16. ábra) a sejteket minden esetben 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val vagy 50 μ M GLA-val kezeltük. A sejteket sugaraztuk (10 Gy) vagy a fentebb említett PUFA-kal kezeltük, vagy egyszerre tettük ki sugárzásnak (10 Gy) és PUFA kezelésnek.

Az oxidatív stresszhez köthető gének esetén (*TRXR1*, *GCLM*, *SRXN1*, *GSR*, *GSTO1*, *HMOX1*, *AKR1C1*, *NQO1*) 24 órás inkubációs időt követően, csak a *HMOX1*-nél a 10 Gy és 25 μ M DHA kezelésnél figyelhattunk szignifikáns génexpresszióbeli változást a kontroll mintához képest (29. és 30. ábra). 25 μ M AA hozzáadása 10 Gy-hez szignifikáns változást okozott a csak sugarazott mintához viszonyítva *TRXR1* esetén (29. ábra A panel). A PUFA-k alkalmazása, mint adjuváns jelentősen lecsökkentette a csak sugarazott mintához képest a *GCLM* expressziót (29. ábra B panel). A 10 Gy és DHA-val valamint a csak DHA-val kezelt sejtek között szignifikáns különbség volt *GCLM* expressziót tekintve (29. ábra B panel). 10 Gy és GLA együttes alkalmazása esetén a *GSTO1* expresszió jelentősen kisebb volt, mint a csak 10 Gy-el kezelt mintánál (29. ábra E panel).

29. ábra: Génexpresszió változása oxidatív stresszhez köthető géneken 24 órás PUFA-val és/vagy 10 Gy-el történő kezelést követően. *TRXR1* (A.), *GCLM* (B.), *SRXN1* (C.), *GSR* (D.) és *GSTO1* (E.) expressziójának

változása 25 μ M AA, 25 μ M DHA, 50 μ M GLA és/vagy 10 Gy hatására. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; többi minta esetén n=2. Ahol szükségesnek találtuk technikai replikákat is készítettünk, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. +/+ : szignifikáns ($p<0.05/p<0.01$) különbség a 10 Gy-el kezelt sejtekhez képest. . # : szignifikáns ($p<0.05$) különbség az ugyanazon zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

24 órával kezelést követően, *AKR1C1* és *NQO1* gének esetén a 10 Gy és GLA kezelt mintán az expresszió szignifikánsan kisebb volt mint a csak GLA-val kezelt minta esetén (30. ábra B és C panel). DHA kezelés szignifikánsan megnövelte a *DDIT3* expressziót 24 óra után (30. ábra D panel).

30. ábra: Endoplazmatikus retikulum és oxidatív stresszben szerepet játszó gének expressziója 24 órával kezelés után. *HMOX1* (A.), *AKR1C1* (B.), *NQO1* (C.) és *DDIT3* (D.) expressziója miután a sejteket 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val, 50 μ M GLA-val és/vagy 10 Gy-el kezeltük. Az ábrák a különböző minták átlagait

(kontroll és 10 Gy esetén n=3; többi minta esetén n=2. Ahol szükségesnek tartottuk ott technikai replikákat is készítettünk, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazza. *: szignifikáns ($p < 0.05$) különbség a kontroll sejtekhez képest. ### : szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség az ugyanazon zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

48 órás kezelést követően AA és DHA hatására az *SRXN1* expresszió szignifikánsan megnőtt (31. ábra A panel). Érdekes módon, ha AA és DHA kezelést sugárkezeléssel (10 Gy) együtt alkalmaztuk ez nem volt megfigyelhető. Sőt, a csak DHA-val kezelt valamint 10 Gy és DHA-val kezelt minta között szignifikáns különbség volt (31. ábra A panel). A DHA szignifikánsan megnövelte a *GCLM* expressziót 48 órás kezelést követően (31. ábra B panel). A *GSR* és *GSTO1* gének esetén egyik kezelés sem okozott szignifikáns hatást 48 óra után (31. ábra C és D panel).

48 óra után a *HMOX1* expressziója szignifikánsan megnőtt 10 Gy-es dózis hatására, míg az *AKR1C1*-é és az *NQO1*-é nem (32. ábra A panel). AA és DHA kezelés szignifikánsan megnövelte a *HMOX1* expressziót, *AKR1C1*-re nem hatott egyik PUFA sem, míg *NQO1*-re csak a DHA hatott (32. ábra A, B és C panel). Ennek a három génnek az expresszióját a PUFA és 10 Gy együttes alkalmazása megnövelte ahhoz az esethez képest mikor csak 10 Gy-el voltak kezelve a sejtek.

48 órás kezelés esetén, a sugárkezelés (10 Gy) a *DDIT3* over-expresszióját idézte elő (32. ábra D panel). A *DDIT3* expresszió szignifikánsan nőtt DHA valamint 10 Gy és GLA-val történő kezelés hatására (32. ábra D panel). A GLA kezelés önmagában nem befolyásolta a *DDIT3* expressziót, míg a sugárkezelés (10 Gy) és GLA kezelés együttes alkalmazása ehhez képest szignifikáns *DDIT3* expresszió növekedést okozott (32. ábra D panel).

A következő általunk vizsgált csoport a korai stressz válaszban szereplő gének (early response genes) voltak, pontosabban az *EGR1*, a *TNF- α* , a *FOSL1* és a *C-FOS*. 24 órás kezeléseket esetén egy esetben sem mutattunk ki jelentős változást *EGR1* expressziójában (33. ábra A panel). Ezzel ellentétben a 48 órás kezelés minden esetben szignifikánsan megnövelte az *EGR1* expresszióját (33. ábra B panel). Az *EGR1* expressziója szignifikánsan megnőtt mind a három PUFA hatására (33. ábra B panel). AA alkalmazása szignifikánsan lecsökkentette az expresszió növekedésének mértékét a csak sugarazott sejtekhez képest, míg a GLA szignifikánsan megnövelte. Mindhárom PUFA esetén, a sugárkezelés (10 Gy) és PUFA együttes alkalmazása szignifikánsan nagyobb expressziót idézett elő, mint az önálló PUFA kezelés (33. ábra B panel).

31. ábra: **Oxidatív stresszben szerepet játszó gének expressziója 48 órával kezelés után.** *SRXN1* (A.), *GCLM* (B.), *GSR* (C.) és *GSTO1* (D.) expressziója miután a sejteket 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val, 50 μ M GLA-val és/vagy 10 Gy-el kezeltük. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; többi minta esetén n=2, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. *: szignifikáns ($p < 0.05$) különbség a kontroll sejtekhez képest. #: szignifikáns ($p < 0.05$) különbség az ugyanazon zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

32. ábra: Endoplazmatikus retikulum és oxidatív stresszben szerepet játszó gének expressziója 48 órával kezelés után. *HMOX1* (A.), *AKR1C1* (B.), *NQO1* (C.) és *DDIT3* (D.) expressziója miután a sejteket 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val, 50 μ M GLA-val és/vagy 10 Gy-el kezeltük. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; míg a többi minta esetén n=2. Ahol szükségesnek ítéltük meg, ott technikai replikákat hajtottunk végre, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. */**: szignifikáns (p < 0.05/0.01) különbség a kontroll sejtekhez képest. # : szignifikáns (p < 0.05) különbség az ugyanazon zsírsavval kezelt sejtekhez képest, +/++: szignifikáns (p < 0.05/0.01) különbség a 10 Gy-nek kitett sejtekhez viszonyítva.

33. ábra: Korai stressz válaszban szereplő gének expressziójának változása a sejtek 25 μM AA-val, 25 μM DHA-val és 50 μM GLA-val és/vagy 10 Gy-es sugárzással történő kezelését követően. A. és B. panelek:

EGFR expressziójának a változása 24 és 48 órával kezelés után. C. D. és E panelek: *TNF- α* , *FOSL1* és *C-FOS* expressziójának változása 48 órával kezelést követően. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; többi minta esetén n=2. Ahol szükségesnek ítéltük meg ott technikai replikákat hajtottunk végre, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az S. értékeket tartalmazták. */**/***/*****: szignifikáns ($p<0.05/p<0.01/p<0.001/p<0.0001$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p<0.05/p<0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##: szignifikáns ($p<0.05/p<0.01$) különbség az ugyanazzal a zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

A fentebb bemutatott eredmények alapján a 48 órával kezelés után elkészített templát alkalmasabbnak tűnt további vizsgálatokra, mint a 24 órával. Ez esetben a sugárkezelés (10 Gy) mind a négy korai választ adó gén expresszióját megnövelte (33. ábra).

A PUFA-k önmagukban nem idéznek elő szignifikáns változást a *TNF- α* és a *C-FOS* expressziójában (33. ábra C és E panel). Ha a sejteket egyszerre kezeljük PUFA-kkal és 10 Gy-el, akkor a *TNF- α* és a *C-FOS* expresszió szignifikánsan megnő (33. ábra C és E panel). A *TNF- α* és *C-FOS* expressziója szignifikánsan csökken a sugározott sejtekhez képest ha AA-val párosítják a 10 Gy-es dózist (33. ábra C és E panel).

A PUFA-k és 10 Gy együttes alkalmazásának hatására a *FOSL1* szint szignifikánsan megemelkedett a kontroll sejtekhez képest (33. ábra D panel). AA és GLA szignifikánsan megnövelte a *FOSL1* expressziót, de a PUFA-k adjuvánsként nem növelték meg szignifikánsan ennek a génnek az expresszióját a 10 Gy-el kezelt sejtekhez képest (33. ábra D panel). A 10 Gy és DHA együtt szignifikánsan nagyobb *FOSL1* mRNS szintet idéz elő, mint a DHA (33. ábra D panel).

A *NOTCH1* expresszió szignifikánsan megnőtt GLA-val, 10 Gy-el történő kezelés során, valamint a 10 Gy és AA vagy DHA kombinációja során (34. ábra A panel). Az AA és DHA kezelés hatását a 10 Gy hozzáadása jelentősen megnövelte (34. ábra A panel). A GLA addíciója 10 Gy-hez szignifikánsan lecsökkentette a *NOTCH1* expressziót a csak sugározott sejtekhez képest (34. ábra A panel).

AA és 10 Gy szignifikánsan megnövelte a *GADD45A* expressziót (34. ábra B panel). Az AA vagy DHA 10 Gy-el való alkalmazása szintén jelentős *GADD45A* mRNS szintemelkedést idézett elő (34. ábra B panel).

Egyedül a 10 Gy-el való sugárkezelés növelte meg jelentősen a *TP53* expressziót (34. ábra C panel). Az AA hozzáadása 10 Gy-hez szignifikánsan lecsökkentette a sugárkezelés (10 Gy) által előidézett mRNS szintemelkedést (34. ábra A panel).

AA és 10 Gy szignifikánsan megnövelte a *C-MYC* expressziót (34. ábra D panel). Mindhárom PUFA esetén a sugárkezeléssel (10 Gy) való kombinálás szintén jelentős *C-MYC* expresszió növekedést okozott (34. ábra D panel).

34. ábra: *NOTCH1* (A.), *GADD45A* (B.), *TP53* (C.) és *C-MYC* (D.) gének expressziója 48 órával kezelés után. A sejtek 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val és 50 μ M GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárzásnak kitéve. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; a többi minta esetén n=2. Ahol

szükségesnek ítéltük meg, technikai replikákat hajtottunk végre, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. ***/***: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01/p < 0.001$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugarazott sejtekhez képest, ###: szignifikáns különbség az ugyanazon zsírsavval kezelt sejtekhez képest ($p < 0.05/p < 0.01$).

35. ábra: *MMP14* (A.), *SIRT1* (B.), *TGFB1* (C.) és *TIMP3* (D.) expressziójának változása. A sejteket 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val, 50 μ M GLA-val és/vagy 10 Gy-el kezeltük. Az ábrák a különböző minták

átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; többi minta esetén n=2, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák.

48 óra után a PUFA kezelés, 10 Gy vagy a kombinált sugár- (10 Gy) és PUFA kezelés nem okozott változást az *MMP14*, *SIRT1*, *TGFBI*, *TIMP3* expressziójában (35. ábra).

miRNS expresszió változás PUFA kezelés, sugárkezelés (10 Gy) valamint PUFA kezelés és sugárzás (10 Gy) együttes alkalmazása esetén

A következő miRNS-ek expresszióját vizsgáltuk 48 órás inkubációs idő után: miR-34a, miR-96, miR-146a, miR-181a, miR-148a, miR-148b és miR-152 (36. és 37. ábra). A kezelés hatására a miR-146a és miR-181a expressziója változott meg (36. ábra C és D panel). A miR-146a expressziója megnőtt DHA valamint 10 Gy és GLA együttes alkalmazásának hatására, GLA hatására pedig csökkent (36. ábra C panel). Érdekes, hogy ameddig a DHA kezelés önmagában megváltoztatta a miR-146a expressziót, addig sugárkezeléssel (10 Gy) együtt már nem volt a miR-146a szintre hatással (36. ábra C panel).

A miR-181a expressziója DHA hatására megnőtt (36. ábra D panel). Azonban, ha a DHA-t 10 Gy-el együtt alkalmaztuk, a miR-181a expresszió csökkent, a különbség a csak DHA kezelt mintához képest volt szignifikáns (36. ábra D panel).

36. ábra: **miRNS expresszió vizsgálat U-87 MG sejteken.** A sejtek 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val és 50 μ M GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárzásnak kitéve. A miRNS-expressziót 48 órával később vizsgáltuk. A: miR-34a, B: miR-96, C: miR-146a, D: miR-181a expressziójának változása. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; a többi minta esetén n=2. Ahol szükségesnek ítéltük meg technikai replikákat hajtottunk végre, a technikai replikák száma minden minta és miRNS esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. */**/**: szignifikáns ($p < 0.05$ / $p < 0.01$ / $p < 0.001$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +: szignifikáns ($p < 0.05$) különbség a sugározott

sejtekhez képest, ####: szignifikáns ($p<0.05$ / $p<0.01$ / $p<0.001$) különbség az ugyanazzal a zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

37. ábra: **miRNS expresszió vizsgálat U-87 MG sejteken.** A sejtek 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val és 50 μ M GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárzásnak kitéve. A miRNS-expressziót 48 órával később

vizsgáltuk. A: miR-148a, B: miR-148b, C: miR-152 expressziójának változása. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; többi minta esetén n=2, a technikai replikák száma minden minta és miRNS esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák.

Zsírsavbioszintézisben részt vevő gének expressziójának változása PUFA vagy/és sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) esetén

Öt zsírsavbioszintézishez kapcsolódó gén expresszióját vizsgáltuk (*SCD1*, *SCD5*, *FADS1*, *FADS2*, *FASN*) 24 órás inkubációs időt követően (38. ábra). Ez esetben a mintákat 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val, 50 μ M GLA-val, 10 Gy-el, vagy 10 Gy-t kombinálva az előbb említett PUFA-kkal kezeltük.

Az *SCD1* expressziójában nem következett be szignifikáns változás a kontrollhoz képest (38. ábra A panel). 10 Gy és DHA együttes alkalmazása esetén az *SCD1* mRNS szint szignifikánsan kisebb volt, mint a csak 10 Gy-el kezelt mintában (38. ábra A panel). 10 Gy kombinálása GLA-val jelentősen lecsökkentette az *SCD1* expressziót a csak GLA-val és csak 10 Gy-el kezelt sejtekhez képest (38. ábra A panel).

Az U-87 MG sejtek 24 órán keresztül történő kezelése 10 Gy-el és GLA-val szignifikánsan lecsökkentette az *SCD5* expressziót, valamint a két kezelés együttes alkalmazása esetén szinergisztikus hatás is kimutatható volt (38. ábra B panel).

Az általunk alkalmazott kezelések közül csak a 10 Gy és GLA változtatta meg szignifikánsan – pontosabban növelte – a *FADS1* gén kifejeződését (38. ábra C panel).

A 24 órás DHA, GLA, 10 Gy, DHA és 10 Gy valamint GLA és 10 Gy kezelés szignifikánsan lecsökkentette a *FADS2* gén expresszióját (38. ábra D panel).

Amikor 24 órán keresztül kezeltük az U-87 MG sejteket GLA-val valamint a 10 Gy-t kombinálva a különböző PUFA-kkal a *FASN* expresszió jelentősen lecsökkent (38. ábra E panel). A DHA és GLA együttes alkalmazása 10 Gy-el szignifikánsan kisebb *FASN* expressziót okozott, mint az önálló 10 Gy-el való kezelés (38. ábra E panel).

A zsírsavbioszintézisért felelős gének vizsgálata során, a 48 órán keresztül kezelt mintát 5 vagy 10 Gy-el sugarazzuk, 50 μ M GLA-val kezeltük, vagy egyszerre tettük ki sugárkezelésnek (5 vagy 10 Gy-es dózis) és 50 μ M GLA-nak.

A 10 Gy-es dózis szignifikánsan megnövelte, míg a GLA kezelés jelentősen lecsökkentette a *FASN* expressziót (39. ábra A panel). A kombinált 10 Gy és GLA kezelés hatására a *FASN* mRNS szint szignifikánsan nagyobb volt, mint a csak GLA-val kezelt sejtek esetén (39. ábra A panel).

38. ábra: Fontosabb zsírsavbioszintézisben részt vevő gének expressziójának változása 24 órával kezelést követően. A sejtek 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val és 50 μ M GLA-val voltak kezelve és/vagy 10 Gy-es

sugárkezelésnek kitéve. Az ábrán a deszaturázok (A: *SCD1*, B: *SCD5*, C: *FADS1*, D: *FADS2*) és az egyetlen *de novo* zsírsavbioszintézisre képes enzim, a *FASN* (E.) génjének az expressziója látható. Az ábrák a különböző minták átlagait (kontroll és 10 Gy esetén n=3; a többi mintánál n=2. Ahol szükségesnek találtuk technikai replikákat készítettünk, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. */**/***/**** : szignifikáns ($p<0.05/p<0.01/p<0.001/p<0.0001$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++ : szignifikáns ($p<0.05/p<0.01$) különbség a sugarazott sejtekhez képest, #/### : szignifikáns ($p<0.05/p<0.01$) különbség az ugyanazzal a zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

39. ábra: Az elongázok és *FASN* expressziójának változása 48 órás kezelést követően. Az U-87 MG sejtvonal 50 μ M GLA-val volt kezelve és/vagy 10 Gy-es sugárkezelésnek kitéve. A: *FASN*, B: *ELOVL1*, C: *ELOVL2*, D: *ELOVL5* expressziójának változása. Az ábrák a különböző minták átlagait (n=3. Ahol szükségesnek találtuk technikai replikákat készítettünk, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. */** : szignifikáns ($p<0.05/p<0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, #/### : szignifikáns ($p<0.05/p<0.01$) különbség az ugyanazzal a zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

A kontrollhoz képest egyik kezelés sem változtatta meg szignifikánsan az *ELOVL1*, *ELOVL2* és *ELOVL5* expressziót (39. ábra B, C és D panel). Ha 5 vagy 10 Gy-es dózissal kezeljük ki a már GLA-val kezelt sejteket, az *ELOVL5* expresszió szignifikánsan nagyobb lett, mint a csak GLA-val kezelt sejtek esetén (39. ábra D panel).

A GLA kezelés 48 órát követően szignifikánsan lecsökkentette az *SCD1*, *SCD5*, *FADS1* és *FADS2* expresszióját (40. ábra A-D panel). Ugyanez nem volt megfigyelhető, amikor a GLA kezelést 5 vagy 10 Gy dózissal együtt alkalmaztuk (40. ábra A-D panel). A *FADS3* esetén egyik kezelés sem okozott szignifikáns változást 48 óra után (40. ábra E panel).

40. ábra: **A deszaturázok expressziójának változása 48 órával kezelés után.** Az U-87 MG sejtvonalt 50 μ M GLA-val és/vagy 10 Gy-el volt kezelve. A: *SCD1*, B: *SCD5*, C: *FADS1*, D: *FADS2*, E: *FADS3* expressziójának változása. Az ábrák a különböző minták átlagait (n=3). Ahol szükségesnek találtuk technikai replikákat

készítettünk, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. */*: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/++: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01$) különbség a sugározott sejtekhez képest, #/##/###: szignifikáns ($p < 0.05/p < 0.01/p < 0.001$) különbség az ugyanazzal a zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

Lipidcseppecskék (LD-k) eloszlásának mérése sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) és/vagy GLA kezelés hatására

A lipidcseppecskéket AC-202-es festékkel tettük láthatóvá (42. ábra). A sejtekben a lipidcseppecskék által elfoglalt területet mértük.

Az 5 Gy és 10 Gy sugárkezelés egyaránt, szignifikánsan lecsökkentette a LD-k által elfoglalt területet ($p < 0.001$) (41. ábra A panel). A GLA kezelés önmagában nem okozott szignifikáns változást a lipidcseppecskék által elfoglalt területen a kontroll sejtekhez képest. Sugárkezelés esetén, 5 Gy és 10 Gy-el való kezelés esetében egyaránt, a GLA kezelés szignifikánsan megnövelte ($p < 0.001$) a lipidcseppecskék mennyiségét (41. ábra A panel).

Hasonló tendencia volt megfigyelhető, amikor az AC-202-vel festett lipidcseppecskék által elfoglalt terület mediánját ábrázoltuk (41. ábra B panel). A „box” és „whisker” ábra a Spitzer és mtsai (2014) által készített internetes alkalmazás segítségével készült (<http://boxplot.tyerslab.com/>). A csomók úgy vannak meghatározva, mint $\pm 1,58 \cdot IQR/\sqrt{n}$ (mintaszám), amely a 95%-os konfidencia intervallumot képviseli. Nem átfedő csomók esetén 95%-os biztonsággal lehet kijelenteni, vagyis 19 esetben 20 mediánból, hogy a két medián különbözik. A csak sugározott (5 Gy és 10 Gy) sejtek mediánja alacsonyabb, mint a kontroll sejteké (41. ábra B panel). A csak GLA-val kezelt sejtek és a GLA-val valamint sugárzással (5 Gy és 10 Gy) kezelt sejtek mediánja megközelítőleg átfed a kontroll sejtekével. Ha a sugározott (5 Gy és 10 Gy) sejteket GLA kezelésnek vetjük alá, akkor, a medián magasabb értékű, mint a csak sugározott (5 Gy és 10 Gy) sejteké (41. ábra B panel).

41 ábra: A lipidcseppecskék (LD) mennyiségének felmérése 48 órával GLA kezelést és/vagy sugárkezelést (5 Gy vagy 10 Gy) követően. A. A sejtekben LD-k által takart területek átlagai és az SD. értékek vannak feltüntetve. Minden esetben 12 optikai mezőt értékeltünk ki. **/***: szignifikáns ($p < 0.01/p < 0.001$) különbség a kontroll sejtekhez képest, ++/+++ : szignifikáns ($p < 0.01/p < 0.001$) különbség a sugarazott sejtekhez képest. B. az ábra a Spitzer és mtsai (2014) által létrehozott internetes alkalmazással (<http://boxplot.tyerslab.com/>) készült. A pontok között található központi vonal a mediánt képviseli, a dobozok szélei a 25 és 75 százalékot jelölik, az ezek közötti távolság az interkvartil rész (IQR). A szélső vonalak 1.5-ször IQR távolságra találhatók, a kívülálló pontok ezeken túl helyezkednek el. A mintaszám a kezelés paraméterei fölött található.

42 ábra: **Reprezentatív fotók a lipidcseppecskék jelölésére használt AC-202-es festésről.** Az U-87 MG sejtvonalat 10 Gy-el sugaraztuk és 50 μ M GLA-val kezeltük, majd 48 óra múlva fotóztuk. A. és B. 10 Gy-nek kitett sejtek, C. és D. sugarazott és 50 μ M GLA-val kezelt sejtek. B. és D. transzmissziós képek. Lépték: 10 μ M.

A sugarazott és GLA kezelt mintákról reprezentatív fotók láthatók a 42. ábrán. Látható, hogy az AC-202 által adott kék jel intenzitása nagyobb a GLA-val is kezelt mintán.

Hősokkfehérjék és egy lipidcseppecske kötő fehérje, a PLIN3 génjeinek expresszió vizsgálata GLA, sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) valamint GLA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) együttes alkalmazása esetén

Hősokkfehérjék és egy LD kötő fehérje (PLIN3) expressziójának vizsgálata során a sejteket 5 Gy-el, 10 Gy-el, 50 μ M GLA-val kezeltük. Az önálló kezelések mellett vizsgáltuk a GLA adjuvánsként kifejtett hatását is, 5 Gy-el és 10 Gy-el egyaránt kombináltuk.

A *PLIN3* expresszióját a sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) szignifikánsan megnövelte (43. ábra A panel). Azonban, ha GLA-t adtunk a sugárkezelt (5 Gy és 10 Gy) mintákhoz ez a hatás már nem volt kimutatható. A GLA adjuvánsként való alkalmazása 5 Gy mellett szignifikánsan lecsökkentette a *PLIN3* expressziót a csak 5 Gy-el sugarazott sejtekhez képest. A *PLIN3* mRNS szint szignifikánsan nagyobb volt, amikor az 5 Gy-t GLA-val együtt alkalmaztuk, ahhoz a mintához képest, amikor a sejteket csak GLA-val kezeltük (43. ábra A panel).

Az önálló GLA kezelés szignifikánsan megnövelte a *HSP90AA1* expressziót (43. ábra B panel). 10 Gy, GLA, 5 Gy és GLA, valamint 10 Gy és GLA jelentősen megemelte a *HSPB1* mRNS szintet (43. ábra C panel). Az általunk vizsgált dózisok és koncentráció sem együtt, sem külön-külön nem voltak hatással a *HSPB2* szintre (43. ábra D panel)

43 ábra: Hő sokkfehérjéket kódoló gének és *PLIN3* expressziójának változása 48 órás kezelés után. Az U-87 MG sejtvonal 50 μ M GLA-val és/vagy 5, 10 Gy-el volt kezelve. A: *PLIN3*, B: *HSP90AA1*, C: *HSPB1*, D: *HSPB2* expressziójának változása. Az ábrák a különböző minták átlagait (n=3. Ahol szükségesnek ítéltük meg technikai replikákat készítettünk, a technikai replikák száma minden minta és gén esetén kikereshető az F-3. táblázatból) és az SD. értékeket tartalmazzák. */*: szignifikáns (p < 0.05/p < 0.01) különbség a kontroll sejtekhez képest, +/+: szignifikáns (p < 0.05/p < 0.01) különbség a sugarazott sejtekhez képest, #/##/###: szignifikáns (p < 0.05/p < 0.01/p < 0.001) különbség az ugyanazzal a zsírsavval kezelt sejtekhez képest.

Értékelés

A glioblasztóma sebészeti eltávolítását követően a sugárkezelés a leggyakrabban alkalmazott kezelési mód. Ha kiegészítésképpen PUFA-kat alkalmaznak, azok megnövelhetik a glióma sejtek elpusztításának mértékét. Számos *in vitro* és *in vivo* kísérlet kimutatta, hogy a PUFA-k felerősítik a sugárterápia rákellenes hatását (Colas és mtsai, 2004, Germain és mtsai, 1998, Vartak és mtsai, 1997). A PUFA-knak a normális sejtekre kifejtett citotoxikus hatása minimális vagy egyáltalán nincs. Egyúttal a PUFA-k a sugárkezelés káros hatásait normális sejteken csökkenthetik (Vartak és mtsai, 1997).

Biokémiai és kinetikai vizsgálatok

Ezen tanulmány során az U-87 MG sejteket különböző koncentrációjú UFA-val (AA, DHA, GLA, OA, EPA) kezeltük. A klasszikus biokémiai végpontmérések (LDH és MTS mérések) mellett kinetikai vizsgálatokat is végeztünk a kezelt sejteken RT-CES rendszerrel. Ez utóbbi egy jelölés nélküli és nem invazív módszer, amely ellenállást mér, és a sejt indexet határozza meg, amely a sejtszám, proliferáció, életképesség, kitapadás és sejtnövekedés egy mutatója (Kürti és mtsai, 2012, Ózsvári és mtsai, 2010).

Bebizonyítottuk, hogy az AA, DHA, GLA és OA kezelés lecsökkentette az U-87 MG sejtek proliferációját és az LDH aktivitást is (2-12. ábra és F-1 – F-8-as ábra). Az EPA esetében kivételt tapasztaltunk: a vizsgált koncentrációtartományban nem csökkentette le a proliferáció mértékét és az LDH aktivitást (14-16. ábra és F-9 – F-10-es ábra).

Az AA kezelés 72 óra után szignifikánsan lecsökkentette a sejtek életképességét és az LDH aktivitást (3. és 4. ábra). Az AA hasonló hatásai miatt alkalmazhatóvá válhat, mint terápiás szer (Das, 1990). Amikor a sejteket egyszerre tettük ki sugárzásnak és AA kezelésnek, az LDH és mitokondriális dehidrogenáz aktivitás szignifikánsan lecsökkent (3. és 4. ábra). A sejtproliferáció egy mutatója, a normalizált sejt index szintén lecsökkent, főleg mikor a sugárzást és az AA kezelést együttesen alkalmaztuk. Ezen eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az AA hatásos adjuváns lehet radioterápia során.

Előzetes tanulmányok alapján 20-50 μM DHA-t citotoxikusnak találták Neuro2a sejtekre, míg 10 μM alatti koncentráció bármilyen kimutatható toxikus hatás nélkül gátolta az apoptózist (Wu és mtsai, 2007). Eredményeink hasonló következtetésekhez vezettek: 25-75 μM DHA csökkentette a proliferációt és megváltoztatta az U-87 MG sejtek metabolizmusát (6. és 7. ábra). DHA kezelés különböző hatással volt medulloblasztóma sejtekre és glióma

sejtekre: nem befolyásolta a glióma sejteket és gátolta a medulloblasztóma sejteket (Wang és mtsai, 2011).

A 100 μM GLA nemcsak az U-87 MG sejtek proliferációját gátolta (F-6. ábra), hanem, ahogyan azt egy korábbi cikkben leírták, patkány C6 glióma sejtét is (Ramos és Colquhoun, 2003). Ramos és Colquhoun (2003) valamint Lu és mtsai (2010) megfigyelték, hogy a GLA-val és EPA-val kezelt tumorokban a mitokondriális membránpotenciál, ami az apoptózis egy mutatója lehet, jelentősen lecsökkent. A mi vizsgálatunk során a GLA lecsökkentette az életképességet és az LDH aktivitást, valamint megnövelte az U-87 MG sejtvonal sugárkezeléssel szembeni érzékenységét. Korábbi tanulmányok szerint a GLA a 36B10 sejtvonalon is citotoxikusnak bizonyult (Vartak és mtsai, 1998). Bell és mtsai (1999) leírták, hogy 10-50 μM GLA jelentősen megnövelte a glióma szferoidok külső rétegében a sejt proliferációt, ami elősegíti a sejtinváziót. Ezzel ellentétben mi úgy találtuk, hogy 50-75 μM GLA nem változtatta meg az U-87 MG sejtek proliferációjának mértékét (8. és F-5. ábra). Bell és mtsai (1999) szerint a GLA a szferoidokban apoptózist idézett elő, és a 100 μM -nál nagyobb koncentrációk gátolták a sejtproliferációt. 100 μM GLA a mi eredményeink szerint is proliferáció csökkentő hatással bír U-87 MG sejteken. Amikor 50-75 μM GLA-t adjuvánsként alkalmaztunk sugárkezelés mellett, akkor az U-87 MG sejtek proliferációja és LDH aktivitása tovább csökkent (8.,9. és F-5. ábra). A GLA szelektíven hat tumor sejtekre, alacsony a neurotoxicitása valamint megvédheti a normális sejteket a kemoterápia és sugárkezelés citotoxikus hatásától (Das, 2004; Das, 2007).

Érdekes módon, 100-200 μM OA hatására a normalizált sejt index megnövekedett (11. és F-7. ábra). A megnövekedett normalizált sejt index nagyobb mértékű sejtproliferációra utal, annak ellenére, hogy a végpontmérések ezt nem támasztották alá. Az RT-CES méréseknek megfelelően, magasabb koncentrációnál 400 μM OA röviddel a kezelést követően lecsökkentette a sejt proliferációt (F-8. ábra). Hasonló OA koncentráció (500 μM OA) a sejt típustól függően befolyásolta a proliferációt: gátolta a sejtnövekedést prosztata sejteken, elősegítette a sejtproliferációt a mellrák sejteken és nem volt hatással a nem tumoros, epiteliális sejtekre (Liu és mtsai, 2009; Soto-Guzman és mtsai, 2008). Eredményeink alapján az 100-200 μM OA nem erősíti fel a sugárkezelés hatását U-87 MG sejtek életképességére (13. ábra).

Az általunk alkalmazott körülmények között az EPA (50-100 μM) kezelés nem befolyásolta az LDH aktivitást és a sejt életképességet (15. és 16. ábra). Amikor adjuvánsként alkalmaztuk 5 és 10 Gy-el a sejt metabolizmusban egy szignifikáns, de kismértékű változás volt kimutatható (15. és 16. ábra). Az EPA kezelés nem volt hatással a normalizált sejt

indexre, még akkor sem, amikor 5 és 10 Gy-el együtt alkalmaztuk (14. és F-9., F-10. ábra). Ezen eredmények alapján az EPA nem megfelelő jelölt, mint adjuváns a glióma terápia során.

A sejtproliferációs vizsgálatok és az előzetesen megjelent tudományos eredmények alapján úgy döntöttünk, hogy a vizsgált telítetlen zsírsavak közül az AA-n, DHA-n és GLA-n érdemes további vizsgálatokat végezni: ezek ideális jelöltek lehetnek, mint adjuvánsok sugárterápia alkalmazása során (az eredmények összegzése a függelék F-2. táblázatban látható).

Morfológiai vizsgálatok különböző PUFA-val kezelt valamint sugárkezelt glióma sejteken

A Holografikus mikroszkóp alkalmazása az élő sejtek egy jelölés nélküli és nem invazív vizsgálatát teszi lehetővé. Ezen felül a sejtszámot és a konfluenciát is meg lehet vele határozni. Egy integrált képelemző szoftver lehetővé teszi, hogy több mint 40 paramétert (sejttérfogat, sejtvastagság, sejthalak konvexitás, sejtkerület, -hossz, sejt optikai hossz, stb.) mérjünk meg minden egyes sejtről a holografikus képen, ezáltal a sejtek állapotáról is információt szerzünk (Madácsi és mtsai, 2013). Apoptózis során a sejtmembrán permeabilitása megnő, a sejtek optikai sűrűsége csökken, ez megváltoztatja a szerkezetüket, a kontraszt kisebb lesz (<http://www.phiab.se/products/holomonitor>).

Az U-87 MG sejteket 25 μ M AA-val, 25 μ M DHA-val vagy 50 μ M GLA-val kezeltük sugárzással (10 Gy) kombinálva és sugarazás nélkül. 24 és 48 óra múlva holografikus és fázis kontraszt képeket készítettünk (20., 21., 22., 24., 25. és 26. ábra).

A kontroll sejteken a sejtszámot kivéve egy vizsgált paraméter esetén sem volt kimutatható szignifikáns változás (19. ábra). A 48 órás kezelések esetén sokkal intenzívebb változások voltak kimutathatók, mint a 24 órás vizsgálatok során (23. és 27. ábra).

Az eredményeink alapján, ha PUFA-kat alkalmazunk adjuvánsként 10 Gy mellett, 48 órát követően, szignifikánsan lecsökken a sejtszám, a konfluencia és az átlag sejtszabálytalanság, ameddig az átlag sejtvastagság szignifikánsan megnő (27. ábra). Az utóbbi két paraméter a sejtek lekerekedésére és a letapadás erősségének csökkenésére utalnak, vagyis az eredményeink azt sugallják, hogy a kezelés citotoxikus volt az U-87 MG sejteken.

A sejtszámra, sejtszabálytalanságra, konfluenciára és sejtvastagságra vonatkozó eredményeink arra utalnak, hogy a glióma sejtek együttes kezelése sugárzással és 25 μ M AA-val, vagy 25 μ M DHA-val vagy 50 μ M GLA-val, gátolhatja az inváziót és a metasztázist.

Apoptózis mértékének vizsgálata 48 órával PUFA-val történő kezelés és/vagy sugárkezelést követően

A PUFA kezelés adjuvánsként való alkalmazása jelentősen megnövelte három oxidatív stresszhez köthető gén, a *HMOX1*, az *AKR1C1* és a *NQO1* expresszióját a csak 10 Gy-el kezelt sejtekhez képest (32. ábra). A sejtek érzékelik a stresszt, és amikor nem áll rendelkezésükre elegendő forrás, hogy a sejt funkciókat helyreállítsák, apoptózison mennek keresztül (Balogh és mtsai, 2013).

Irodalmi adatok alapján leukociták kezelése EPA-val vagy OA-val lipidcseppecskék kialakulását és EPA esetén apoptózist okozott (Finstad és mtsai, 1998). Lecchi és mtsai (2013) kimutatták, hogy az ω -3 PUFA-k megnövelték az apoptózis mértékét kecske monocitákban. Vizsgálatainkban a 25 μ M DHA alkalmazása során ezt nem figyeltük meg U-87 MG sejtvonalon (28. ábra). 48 órás kezelést követően 50 μ M GLA apoptózist idézett elő U-87 MG sejteken (28. ábra). Ezzel ellentétben, Ramos és Colquhoun (2003) C6 glióma sejteken úgy találta, hogy 150 μ M GLA 24 óra alatt és 90 μ M GLA 96 óra alatt nem változtatta meg szignifikánsan az apoptotikus indexet.

Humán ADF asztrocitóma sejtvonalon, a frakcionált sugárzás (5 Gy egymást követő 4 nap alatt) apoptózist okozott, amíg 12.5 Gy dózis nekrozist idézett elő (Bucci és mtsai, 2006). Amíg az 5 és 10 Gy alkalmazása nem volt toxikus humán asztrocitóma sejtekre, addig a 12.5 Gy, 15 Gy és 20 Gy dózisok annak bizonyultak (Bucci és mtsai, 2006). A mi esetünkben az U-87 MG sejteken 5 Gy nem idézett elő apoptózist, míg 10 Gy dózis igen (28. ábra). Lee és mtsai (2005), szerint a *HSPB1* gátolta a sugárkezelés által előidézett apoptózist. Ennek ellenére mi azt tapasztaltuk, hogy 5 Gy esetén az apoptózis mértéke nem volt szignifikáns és a *HSPB1* expresszió sem nőtt, de 10 Gy esetén mind az apoptózis mértéke, mind a *HSPB1* expresszió emelkedett (28. ábra A panel és 43. ábra C panel).

A FASN gátlása leállítja az endogén zsírsavbioszintézist, gátolja a sejt ciklust és apoptózist okoz (Menendez és Lupu, 2007). Kísérleteinkben a 24 órás kezelés a GLA valamint a kombinált PUFA 10 Gy kezelés szignifikáns FASN expresszió csökkenést okozott (38. ábra E panel). 48 órás kezelés esetén a GLA kezelés lecsökkentette a FASN expressziót, míg a 10 Gy és GLA kezelés nem (39. ábra A panel). 48 órás kezelést követően mind a GLA, mind a 10 Gy és GLA kezelés esetén szignifikáns mértékű apoptózist mutattunk ki (28. ábra). Kimutatták, hogy a FASN csendesítése a reaktív oxigén gyökök révén okoz apoptózist (Little és mtsai, 2007).

A vastagbélrák sejtek esetén az AA egy jel az apoptózisra (Accioly és mtsai, 2008). AA és DHA esetén sikerült kimutatnunk szinergizmust a sugárkezelés (5 Gy) és a PUFA kezelés között (28. ábra). GLA esetén ez nem volt tapasztalható. LDH és MTS aktivitás méréseink során sem sikerült kimutatni a szinergizmust (9. és 10. ábra). Az RT-CES mérés azonban egyértelműen kimutatta, hogy 50 μ M GLA érzékenyebbé tette az 5 Gy sugárzásnak kitett sejteket. Lehetséges, hogy egy nagyobb dózis, vagy nagyobb GLA koncentráció esetén ki tudnánk mutatni a szinergizmust, akárcsak az LDH aktivitás méréseink során, ahol 75 μ M GLA és 10 Gy hatása 72 óra után szinergista volt (9. ábra).

Stresszválasszal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének expresszió vizsgálata

A normális sejtekre a PUFA-k nem vagy csupán kis mértékben citotoxikusak, a PUFA kezelés csökkenti a sugárkezelés káros hatását (Vartak és mtsai, 1997). A PUFA-k kedvező hatásának egyik magyarázata, hogy megnövelhetik az antioxidáns enzimek aktivitását (Vartak és mtsai, 1998). Mivel a PUFA-k magasabb koncentrációban oxidatív stresszt okoznak (Vartak és mtsai, 1997), oxidatív stresszhez köthető gének kifejeződését tanulmányoztuk. 24 órás inkubációs idő után nyolcat (*TRXR1*, *GCLM*, *SRXN1*, *GSR*, *GSTO1*, *HMOX1*, *AKR1C1*, *NQO1*; 29. és 30. ábra), míg hetet 48 órás inkubációs időt követően (*GCLM*, *SRXN1*, *GSR*, *GSTO1*, *HMOX1*, *AKR1C1*, *NQO1*; 31 és 32 ábra).

24 órás inkubációs időt követően a PUFA kezelés nem okozott szignifikáns mRNS szintemelkedést az oxidatív stresszhez köthető génekben (29. és 30. ábra). Sandrone és mtsai (2014) szerint hosszú időtartamú PUFA kezelés esetén a C6 glióma sejtek az oxidatív stressztől védve voltak, míg az exogén AA és GLA kezelés megnövelte a reaktív oxigén gyökök mennyiségét elsődleges glióma kultúrákban. A mi vizsgálatunkban 48 óra után már tapasztaltunk génaktivitásváltozást. Az AA és DHA kezelés szignifikánsan megnövelte az *SRXN1* és *HMOX1* expressziót (31.A és 32.A ábra). A DHA kezelés jelentősen megemelte a *GCLM* és *NQO1* mRNS szintet (31.B és 32.C ábra).

A *TRXR1* (thioredoxin reduktáz 1) gátlása oxidatív stresszt okoz (Truitt és mtsai, 2014). Casañas-Sánchez és mtsai (2014), kimutatták, hogy 6-tól 30 óráig tartó időintervallumban történő DHA kezelés nem változtatta meg a *TRXR1* expressziót eger hippocampusz HT22 sejtekben, míg 48 órás kezelés szignifikánsan megemelte a *TRXR1* mRNS szintet. A mi vizsgálatunkban 24 órás DHA kezelés nem változtatta meg szignifikánsan a *TRXR1* expressziót az U-87 MG sejtekben (29. ábra A panel).

Az *SRXN1* egy redox aktivitású fehérje, mely az oxidált cisztein oldalláncának redukálásában vesz részt (Bowers és mtsai, 2012). Úgy tűnik, hogy az *SRXN1*-nek kritikus

szerepe van a rák kialakulásában (Wei és mtsai, 2013). Vizsgálatainkban 24 óra után egyik kezelés sem változtatta meg az *SRXNI* expressziót (29.C. ábra). Az *SRXNI* fokozott expressziót mutató sejtek motilitása nagyobb volt (Bowers és mtsai, 2012). AA és DHA hatására, 48 órás kezelés esetén az *SRXNI* expresszió szignifikánsan megnőtt (31.A. ábra). A *HMOX1*, *GCLM* és *SRXNI* expressziójának a növekedése az oxidatív stressz jele (Koto és mtsai, 2011). Az általunk vizsgált körülmények között PUFA kezelés megnövelte ezeknek a géneknek az expresszióját (31. és 32. ábra).

A *GCLM* a glutamát cisztein ligáz moduláló alegysége (Li M és mtsai, 2014). A glutation függő detoxifikáló reakciók megvédik a sejteket az oxidatív károsodástól, amit a sugárzás is okozhat (Li M és mtsai, 2014). A glutation szintézis mértékét elsősorban a glutamát cisztein ligáz határozza meg (Li M és mtsai, 2014). A vese sejt karcinómában a *GCLM* fehérje expresszió nagyobb (Li M és mtsai, 2014). Vizsgálatainkban a PUFA-k adjuvánsként való alkalmazása 24 órás kezelést követően szignifikánsan lecsökkentette a *GCLM* expressziót a csak 10 Gy-el sugározott sejtekhez képest (29. ábra B panel). A 48 órán keresztül tartó DHA kezelés szignifikánsan megnövelte az U-87 MG sejtekben a *GCLM* expressziót (31. ábra B panel).

A glutation S transzferázok a fázis II detoxifikáló enzimek közé tartoznak, a glutation konjugálását katalizálják különböző endogén és exogén elektrofil vegyületekhez (Xu és mtsai, 2014). A *GSTO1* a glutation S transzferázok „szupercsaládjába” tartozik (Xu és mtsai, 2014). Azt tapasztaltuk, hogy a GLA adjuvánsként való alkalmazása 24 óra alatt szignifikánsan lecsökkentette a *GSTO1* expressziót a csak sugárzásnak alávetett sejtekhez képest (29. ábra E panel). 48 órás kezelés esetén nem tapasztaltunk változást egyik kezelés esetén sem (31. ábra D panel).

A *GSR* egy antioxidáns gén (Su és mtsai, 2009). Megfigyeléseink szerint sem a 24 órás, sem a 48 órás kezelések nem változtatták meg a *GSR* expressziót U-87 MG sejteken (29. ábra D panel és 31. ábra C panel).

A *HMOX1* egy hősokkfehérje amely a hemet biliverdinre, szén-monoxidra és vasra bontja (Maines, 1988). A biliverdin a biliverdin reduktáz által bilirubinra bomlik. Mivel a bilirubinnak és a szén-monoxidnak antioxidáns aktivitása van, a *HMOX1*-et citoprotektív antioxidáns enzimnek tartják (Wang és mtsai, 2014). A *HMOX1* gátolja az apoptózist és a gyulladást, csökkenti az oxidatív stresszt, növeli a proliferáció mértékét (Berberat és mtsai, 2005; Zhang és mtsai, 2011). A *HMOX1* egy potenciális terápiás célpont, a gliómában fokozott expressziója elősegíti az angiogenezist, ezen kívül befolyásolhatja a betegség kimenetelét (Berberat és mtsai, 2005; Gandini és mtsai, 2014). A sugárkezelés indukálja a

HMOX1 expressziót a hasnyálmirigy rák sejtekben (Berberat és mtsai, 2005). A *HMOX1* túl-expresszió megemeli a tüdő karcinóma sejtvonal rezisztenciáját sugárkezelésre és kemoterápiára, ameddig a gátlása érzékenyvé teszi azt (Zhang és mtsai, 2011). Az AA-val, DHA-val vagy a kombinált AA és 10 Gy-el való kezelés szintén megnövelte a *HMOX1* expressziót 48 órás kezelés esetén (32. ábra A panel). 24 óra után 10 Gy-el történő sugarazásnál ez a hatás nem volt észlelhető. A DHA és 10 Gy-el való kezelés 24 órás inkubációs idő esetén növelte meg a *HMOX1* expressziót (30. ábra A panel).

Az *AKR1C1* egy gyógyszermetabolizáló enzimet kódol, az expressziós szintje befolyásolhatja a különböző rákok esetén a prognózist vagy a kemoterápiás szerekekkel szembeni rezisztenciát (Le Calvé és mtsai, 2010). Le Calvé és mtsai (2010), azt találták, hogy a temozolomid kezelés szignifikánsan megnövelte az *AKR1C1* expresszióját glioblasztóma sejtekben. Ugyanezt észleltük, ha a sejteket 10 Gy-el sugarastuk és 48 órán keresztül AA-val kezeltük (32. ábra B panel). A 24 órás PUFA kezelés önmagában vagy sugárkezeléssel kombinálva nem volt jelentős hatással az *AKR1C1* expresszióra (30. ábra B panel).

Amikor az AA, DHA és GLA kezelést adjuvánsként alkalmaztuk, az *NQO1* expresszió szignifikánsan megnőtt a 10 Gy-el kezelt mintához képest 48 órás inkubációs időt követően. A DHA kezelés önmagában szignifikánsan megemelte az *NQO1* mRNS szintet a kontroll sejtekhez képest 48 óra után (32. ábra C panel). Ezzel ellentétben, 24 órás kezelés esetén nem tapasztaltunk szignifikáns változást az *NQO1* expressziójában a kontroll sejtekhez képest (30. ábra C panel). Az *NQO1* szerepe a rák kialakulásában nincs pontosan meghatározva, de közismert, hogy az TP53-at aktiválja és, hogy a glioblastoma kemoterápiában elsődleges célpont (Lin és mtsai, 2013; Okamura és mtsai, 2000).

A sugárterápia legnagyobb hátránya a rák őssejtek rezisztenciája, amely többek között a Notch jelátviteli útnak köszönhető (Hardee és mtsai, 2012; Wang és mtsai, 2010). Ez az útvonal a parakrin jelátviteli utat, az önmegújulást és a differenciációt befolyásolja (Fan és mtsai, 2010; Wang és mtsai, 2010). A rákos őssejteket szabályozza és az aktivitása magasabb a glioblasztóma sejtekben és a glióma iniciáló sejtekben (Fan és mtsai, 2010).

A Notch négy receptorról rendelkezik, ezek közül az egyik a NOTCH1 (Wang és mtsai, 2010). A NOTCH1 a glioblasztóma önmegújulását szabályozza (Fan és mtsai, 2010; Hardee és mtsai, 2012). A *NOTCH1* over-expresszió szignifikánsan lecsökkent, amikor a sejteket 10 Gy-es sugarastuk és 50 μ M GLA-val kezeltük egyszerre, ahhoz az esethez képest, amikor a sejtek csak sugárkezelésnek voltak kitéve (34. ábra A panel).

A *NOTCH1* expresszió befolyásolja a glióma sugárkezelésre adott válaszát. *NOTCH* over-expresszió elősegíti a tumor növekedését. A NOTCH gátlása felerősíti a sugárkezelés

glióma sejtekre kifejtett káros hatását, lecsökkenti a glióma sejtvonalak és a rák őssejtek túlélésének idejét és a proliferációjának mértékét, de az idegi őssejteket is befolyásolja (Fan és mtsai, 2010; Wang és mtsai, 2010). A Notch gátlása egy ígéretes módszer a glioblastoma multiforme kezelésére, de sajnos nem csökkenti a rák őssejtek számát (Fan és mtsai, 2010). A fentiek és az eredményeink (34. ábra A panel) alapján a GLA alkalmazása, mint adjuváns sugárzás mellett előnyös lehet a glióma kezelése során.

Az egyik mutatója a glióma kezelés hatékonyságának az endoplazmatikus retikulum (ER) stresszválasz lehet (Kardosh és mtsai, 2008; Lin és mtsai, 2012; Lu és mtsai, 2012). Az ER stresszválasz proapoptotikus ágát vizsgáltuk, amely olyankor válik aktívvá, amikor az ER intenzív stressznek van kitéve, vagyis a túlélési ág (UPR, unfolded protein response) jelátviteli út túl van terhelve (Pyrko és mtsai, 2007). A DDIT3 képviseli az ER stressz proapoptotikus ágát (Pyrko és mtsai, 2007).

A DDIT3 elősegíti az autofágiát (Lin és mtsai, 2012). A DDIT3 egy transzkripciósfaktor, ami elősegíti az apoptózist, csökkenti a *B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL-2)* expresszióját, aktiválja a Gadd34-et (PPP1PR15A, protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A) és egy ER oxidázt (ER01 α) (Pyrko és mtsai, 2007). 48 órás kezelés esetén a DHA kezelés, a 10 Gy-el való sugárkezelés, GLA és 10 Gy együttes alkalmazása szignifikánsan megnövelte a *DDIT3* expresszióját (32. ábra D panel). 24 órás kezelés alkalmával csak a DHA kezelés növelte meg szignifikánsan a *DDIT3* mRNS szintet (30. ábra D panel).

A korai stresszválaszban szereplő gének közül (early-response genes), melyeknek az expressziója megnő az ionizáló sugárzásnak köszönhetően, négy gént vizsgáltunk: EGR1, TNF- α , C-FOS és FOSL1 (Datta és mtsai, 1992; Marples és mtsai, 2000). A C-FOS, EGR1 és FOSL1 CC(A+T-gazdag)6GG szérumszponzív (CArG) elemeket tartalmaz promoterként (Datta és mtsai, 1992; Meyer és mtsai, 2002; Young és Colburn, 2006). Ezek felelősek ezeknek a géneknek a sugárzásra való érzékenységeért.

Az ionizáló sugárzás reaktív oxigén gyököket szabadít fel és az EGR1 fehérjét indukálja (Datta és mtsai, 1992; Marples és mtsai, 2000; Meyer és mtsai, 2002). Tanulmányunkban a 10 Gy-el való sugárkezelés 24 óra után nem idézett elő változást az *EGR1* expressziójában, míg 48 óra után szignifikánsan megnövelte azt (33. ábra A és B panel). Az EGR1 egy zink-új fehérje hat CArG elemmel. A nukleuszban található foszfoprotein, egy sejt-differenciációt, valamint növekedést szabályozó transzkripciósfaktor (Cao és mtsai, 1990; Meyer és mtsai, 2002). A 490 bázis pár hosszú promotert génterápia céljából alkalmazzák, amit már 4 Gy aktivál (Meyer és mtsai, 2002). A PUFA kezelés valamint a sugárzással kombinált PUFA kezelés önmagában nem növelte meg az *EGR1*

expressziót 24 óra után, azonban 48 órát követően minden esetben szignifikánsan megemelkedett az *EGR1* mRNS szintje (33. ábra A és B panel).

A TNF- α egy növekedést serkentő citokin, amely meghatározza a glióma kimenetelét (Blaylock, 2013). Alacsony TNF- α koncentrációnál a glióma sejtek túlélése jóval magasabb (Blaylock, 2013). Liu és mtsai (2005) sugározott tüdő rák sejtvonalakon vizsgálták a *TNF- α* mRNS expressziót, 1-72 órás időintervallumban. Sejtvonaltól függően a TNF- α expresszió 1 vagy 6 óra után volt maximális (Liu és mtsai, 2005). Ez alapján, elképzelhető, hogy ha 48 óra előtti mintákból vizsgálnánk *TNF- α* expressziót, akkor eltérő expressziót találnánk. Az is elképzelhető, hogy a hatás, amit 48 óra után mértünk, másodlagos hatás. Mivel a TNF- α idegsejt halált okoz, és az őssejt proliferációt is serkenti (Blaylock, 2013), a PUFA-k és sugárzás (10 Gy) kölcsönhatásának vizsgálata során, a másodlagos hatások is mutatói lehetnek azoknak a molekuláris mechanizmusoknak, amely révén a PUFA-k szelektíven citotoxikusak a glióma sejtekre és felerősítik azok radioszenzitivitását. A sugárkezelés (10 Gy) és a 10 Gy-el egyszerre alkalmazott 48 órás PUFA kezelés szignifikánsan megemelte a *TNF- α* expressziót (33. ábra C panel). Az AA alkalmazása 10 Gy mellett jelentősen lecsökkentette a *TNF- α* expressziót a csak sugározott U-87 MG sejtekhez képest (33. ábra C panel). Ebből a szempontból az AA alkalmazása, mint adjuváns előnyös lehet a glióma terápia során.

FOSL1 a glióma kezelésben egy lehetséges célpont lehet, és szintén tartalmaz CARG elemeket a promoterében (Kesari és Bota 2011; Young és Colburn, 2006). A FOSL1 befolyásolja a sejt formáját, mozgását és kitapadását, és heterodimereket képez az AP-1 (activating protein-1) család tagjaival (Debinski és Gibo, 2005; Kesari és Bota, 2011). Az AP-1 a karcinogenezis egyik meghajtója, az aktivitása az asztrocitoma patogenezist befolyásolja (Shirsat és Shaikh, 2003; Young és Colburn, 2006). A FOSL1 olyan jelátviteli utakat szabályoz, amelyek C-FOS függőek (Debinski és Gibo, 2005). A FOSL1 over-expresszió differenciációt idéz elő, gátolja a proliferációt, növekedést és csökkenti a tumorképző hatást C6 glióma sejtvonalon, és a glióma terápia egy esetleges célpontja lehet (Shirsat és Shaikh, 2003). Mindegyik általunk alkalmazott kezelés *FOSL1* overexpressziót okozott, a DHA kezelés kivételével ez a hatás minden esetben szignifikáns volt (33. ábra D panel). Más szerzők szerint azonban a glióma tipikus jellemzője a FOSL1 overexpresszió és karcinogenezist okoz nem tumorigenikus glióma sejt vonalakon (Kesari és Bota, 2011), sőt a FOSL1 csendesítés csökkenti számos daganat invazív képességét (Young és Colburn, 2006). Ennek ellenére a FOSL1 szerepe gliomagenézisben nem állapítható meg (Shirsat és Shaikh, 2003).

A C-FOS egy onkogén, amely szintén CArG elemeket tartalmaz a promoterében (Datta és mtsai, 1992). A C-FOS, akárcsak a FOSL1 a heterodimerikus AP-1 transzkripció faktorok eleme, de a FOSL1-el ellentétben egy transzaktivációs domént tartalmaz, amely negatívan szabályozza az AP-1 aktivitást (Shirsat és Shaikh, 2003). Az AP-1 aktivitás befolyásolja az asztrocitoma fejlődését, elősegíti a karcinogenezist (Shirsat és Shaikh, 2003; Young és Colburn, 2006). A sejttípus és a környezet meghatározza, hogy a C-FOS aktiválja vagy gátolja-e a transzkripciót (Koul és mtsai, 2007). Akárcsak a *TNF- α* esetén, a PUFA kezelés nem befolyásolta a *C-FOS* expressziót (33. ábra C és E panelek). Azonban a sugárkezelés és a 10 Gy-el kombinált PUFA kezelés szignifikánsan megnövelte a *C-FOS* expressziót (33. ábra E panel). Itt is, akár a *TNF- α* esetén, amikor az AA-t adjuvánsként alkalmaztuk 10 Gy mellett, a *C-FOS* expresszió szignifikánsan lecsökkent a csak sugarazott mintához képest (33. ábra E panel).

A 48 órán keresztül tartó AA kezelés szignifikánsan megnövelte a *C-MYC* expressziót, akárcsak a 10 Gy-es dózis és a sugárzással kombinált PUFA kezelés (34. ábra D panel). A *C-MYC* expressziójának meghatározása fontos lehet a glioblasztóma kimenetele szempontjából (Cenci és mtsai, 2012). Ennek az onkogénnek - amely egy kulcs fontosságú molekula az apoptózisban és sejtnövekedésben - a glioblasztómák 70%-ánál megnő az expressziója (Cenci és mtsai, 2012). A *C-MYC* expressziójának a változása befolyásolja az apoptózist, a sejt ciklus előrehaladását, a genomi instabilitást és a tumorigenezist (Negi és mtsai, 2013). Annak ellenére, hogy a *C-MYC* egy onkogén, a fokozott expressziója a nagyobb túlélési valószínűséggel asszociált ($p < 0.0001$), melynek egyik oka lehet, hogy a *C-MYC* overexpresszió elősegíti a pro-apoptotikus jelátviteli utak aktiválását (Cenci és mtsai, 2012).

A GADD45A-t terápiás célpontként írták le a rák kezelése során, stabilizálja a TP53-at a DNS (dezoxiribonukleinsav) sérülés után (Asuthkar és mtsai, 2011). Az AA kezelés, a 10 Gy-es dózis valamint az AA-val és DHA-val kombinált sugárzás szignifikánsan megemelte a *GADD45A* mRNS szintjét U-87 MG sejtekben (34. ábra B panel).

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az AA és DHA nem változtatta meg az teljes TP53 szintet humán endoteliális sejtekben (Kim és mtsai, 2005), de GLA kezelés a tumor sejtekben megnövelte a TP53 aktivitást (Das, 2007). A GLA kezelés U-87 MG sejtekben azonban nem okozott változást a *TP53* expressziós szintjében 48 óra után (34. ábra C panel). Vizsgálataink során a 10 Gy-es dózis jelentősen megnövelte a *TP53* expresszióját U-87 MG sejteken (34. ábra C panel). Ha AA-at adtunk adjuvánsként a sugárkezeléshez, akkor a *TP53* expresszió szignifikánsan alacsonyabb lett. 25 μ M AA, 25 μ M DHA és 50 μ M GLA nem változtatta meg a *TP53*-nak az expresszióját U-87 MG sejteken 48 órás inkubációs idő után

(34. ábra C panel). Egy másik tanulmány során kimutatták, hogy két-háromszor nagyobb AA, DHA és GLA koncentráció 24 órán keresztüli alkalmazása megváltoztatta a *TP53* expressziót (Faragó és mtsai, 2011). Az expresszió változásának mértéke és iránya változott a PUFA-tól és a sejttípustól függően (Faragó és mtsai, 2011). A jelenlegi és a régebbi eredményeink közötti különbségre többféle elképzelhető magyarázat létezik. Az általam bemutatott méréseket U-87 MG glióma sejteken végeztük, míg a korábbiakat másik három különböző glioblasztóma (GBM2, GBM5 és U373) sejtvonalon (Faragó és mtsai, 2011). A különböző sejtvonalakon megfigyelt eltérő eredményeket az alkalmazott inkubációs idő és a koncentrációk közötti különbséggel is lehet magyarázni. A *TP53* változó aktivációs állapota, az össz *TP53* expresszió változékonysága valamint a különböző izoformák is magyarázzák ezt az eltérést, ezek a különbségek glioblasztóma esetén jól dokumentáltak (Takahashi és mtsai, 2013).

A glióma sejtek sugárzással való kezelése megnövekedett *MMP14* expressziót okoz (Ulasov és mtsai, 2013). Ennek ellenére, mi 48 órával 10 Gy-el való sugárkezelés után nem észleltünk változást az *MMP14* expressziójában (35. ábra A panel). Elképzelhető, hogy másik időpontban végzett mérés során detektálni lehetett volna a megnövekedett *MMP14* expressziót.

A *SIRT1* génjét azért választottuk ki a vizsgált gének közé, mert gliómában elősegítheti a tumorigenezist a PTEN/PI3K/AKT jelátviteli útvonalon keresztül, így felvetették, hogy a *SIRT1* glióma terápiás célpontja lehet (Qu Y és mtsai, 2012). Egyik általunk alkalmazott kezelés sem befolyásolta a *SIRT1* expressziót (35. ábra B panel).

A glioblasztómák 40-80%-ában a *TIMP3* epigenetikai úton csendesített, valamint a *TIMP3* expressziójának helyreállítása gátolja a tumornövekedést (Zerrouqi és mtsai, 2012). Magasabb *TGFBI* expressziót találtak glioblasztóma multiforme mintákban, mint a normális szövetekben (Lin és mtsai, 2010). Sem a *TIMP3*, sem a *TGFBI* esetén nem észleltünk szignifikáns változást mRNS szintben egyik 48 órás kezelés után sem (35. ábra).

miRNS expresszió változásának vizsgálata 48 órával sugárkezelést és/vagy PUFA kezelést követően

A miRNS-ek szabályozzák a glióma proliferációt, az apoptózist, az inváziót és a migrációt; ezen kívül hozzájárulnak a terápia elleni rezisztenciához (Li és mtsai, 2013). A miRNS-ek glióma patogenezisében betöltött szerepének jobb megértése elősegítheti a pontosabb diagnózis és a jobb terápiás módszerek kidolgozását.

Vizsgálatainkban az összes mintán 48 órás inkubációs időt követően hét mikroRNS-t vizsgáltunk, melyből kettő esetén kaptunk szignifikáns eredményt: a miR-146a és a miR-181a esetében.

A miR-146a gátolja az asztrocita-közvetített gyulladást (Iyer és mtsai, 2012). Jelenleg azt is kimutatták, hogy a miR-146a gátolja a hasnyálmirigy-rák inváziót és metasztázist *in vivo* és *in vitro* (Hou és mtsai, 2012). Érdekes módon a DHA és GLA hatása ellentétes volt a miR-146a esetén: a DHA szignifikánsan megemelte az expresszióját, míg a GLA szignifikánsan lecsökkentette azt. A kombinált GLA és 10 Gy-el való kezelés 48 óra után szignifikánsan megemelte a miR-146a expressziót (36. ábra C panel).

A miR-181a expressziós szintje diagnosztikai értékkel bír kolorektális daganat, akut leukémia és akut mieloid leukémia esetén (Nishimura és mtsai, 2012; Zhu és mtsai, 2012). Kimutattuk, hogy DHA kezelés hatására megnőtt a miR-181a szintje (36. ábra D panel).

A miR-34a tumor szupresszor, a egyértelműen befolyásolja a sugárterápiára adott választ (Freeman és Espinosa, 2013; Metheetairut és Slack, 2013). DNS károsodás esetén a TP53 aktiválja a miR-34a-t (Freeman és Espinosa, 2013; Chen és mtsai, 2010; De Antonellis és mtsai, 2011; Gogna és mtsai, 2012). A miR-96 hasnyálmirigy rákban tumor szupresszorként működik (Huang és mtsai, 2014). A miR-148a terapeutikus célpont lehet glióma esetén (Li S és mtsai, 2014). A miR-148b a mellrák előrehaladásának fő szabályozója (Cimino és mtsai, 2013). A miR-152-nek szerepe van a neuroblaszt differenciációban és apoptózisban (Ragusa és mtsai, 2010).

Vizsgálatainkban a miR-34a, miR-96, miR-148a, miR-148b, miR-152 esetén nem észleltünk változást egyik kezelés esetén sem 48 óra után.

Zsírsavbioszintézisért felelős gének expresszió vizsgálata PUFA kezelést és/vagy sugárzást követően

A normális sejtekhez viszonyítva, a *de novo* zsírsavszintézis aktiválódik karcinogenezis során (Chajès és mtsai, 2006; Hatzivassiliou és mtsai, 2005). A folyamatos osztódásuknak köszönhetően a rákos sejtek zsírsavbioszintézise megnövekszik, hogy fenn tudja tartani a membránbiogenezist (Igal, 2010). A Chajès és mtsai (2006) által készített tanulmány kimutatta, hogy a zsírsavszintézis nélkülözhetővé válik a sejtprolifерáció szempontjából, amikor a zsírsavak jelen vannak a médiumban. A normális sejtekben a zsírsavszintézist, az exogén zsírsavak gátolják, míg a rákos sejtekben továbbra is intenzív aktivitást mutat (Igal, 2010). A lipidmetabolizmus és a rák fejlődése közti korreláció részletesen még nincs meghatározva.

A célkitűzéseink között szerepelt, hogy megállapítsuk, hogy a PUFA kezelés és/vagy sugárkezelés hogyan befolyásolja a zsírsavbioszintézist.

24 órás kezelések esetén vizsgáltuk az AA, DHA, GLA, 10 Gy hatását, valamint az előbb említett PUFA-k 10 Gy-el való kombinálásának hatását. 48 órás kezelést követően, a továbbiakban bemutatott kísérletek során, a GLA kezelést, valamint annak adjuvánsként való hatását vizsgáltuk 5 Gy-el és 10 Gy-el kombinálva.

GLA előnyben részesítése, a többi PUFA-hoz képest a 48 órás vizsgálatok során

Az összes PUFA közül a GLA-t tanulmányozták legalaposabban az *in vitro* és *in vivo* glióma sejtekre kifejtett, citotoxikus hatása miatt (Das, 2004).

Utánanéztünk a szakirodalomban, hogy volt-e már klinikai vizsgálat a három kiválasztott PUFA-val glióma esetén. AA-ra és DHA-ra nem találtunk erre vonatkozó információt. Das (2007) három klinikai vizsgálatot mutatott be gliómán GLA-val.

Egyik PUFA-nak se vizsgálták klinikai vizsgálatban a sugárzással kombinált hatását. Kyritsis és mtsai (2011) által bemutatott áttekintésben a zsírsavak úgy vannak bemutatva, mint glióma kockázatot és előrehaladást csökkentő tényezők. Ezek közül a linolsavat és a GLA-t említik, mint potenciális terápiás hatóanyagokat. A GLA-val kapcsolatban ugyanazt a három klinikai vizsgálatot említik, mint Das (2007). Sandrone és mtsai (2014) a legújabb előrelépéseket mutatták be a gliómák PUFA-val való kezelésével kapcsolatban. A tanulmány a klinikai kutatások leírása során csak a GLA-ra vonatkozó adatokat közölt.

Az eddigi kísérletes eredmények alapján a GLA használatát érdemes megfontolni, mint kiegészítő terápia glióma kezelés során, vagy mint a glióma kiújulását megakadályozó hatóanyag a remisszióban levő betegeknél (Kyritsis és mtsai, 2011). A GLA egyik ilyen irányú alkalmazása sem volt még tesztelve (Kyritsis és mtsai, 2011). Mivel a GLA vizsgálata már klinikai fázisban volt, és még számos kérdés megválaszolatlan a GLA hatásmechanizmusával kapcsolatban, úgy döntöttünk, hogy a további 48 órás gén expressziós vizsgálatokban a GLA hatására fektetjük a hangsúlyt.

24 és 48 órás génexpresszió vizsgálatok eredményeinek értékelése

A FASN a *de novo* zsírsavszintézisért felel. Kimutattuk, hogy GLA kezelés szignifikánsan lecsökkentette a FASN expressziót az U-87 MG sejtekben 24 és 48 óra után (38. ábra E panel; 39. ábra A panel). 24 óra után a kombinált PUFA és 10 Gy kezelés is jelentős FASN mRNS szint csökkenést okozott (38. ábra E panel). A FASN gátlása csökkentette a sejt proliferációt, az életképességet és a tumor sejtek növekedését *in vivo*

(Nomura és mtsai, 2010). Menendez és Lupu (2007) kimutatta, hogy a *FASN* gátlása megállította az endogén zsírsavbioszintézist, leállította a sejtciklust és apoptózist okozott.

24 óra alatt a 10 Gy-el való sugárkezelés nem okozott szignifikáns változást a *FASN* expresszióban, míg 48 óra után szignifikánsan megnövelte a *FASN* mRNS szintet (38. ábra E panel és 39. ábra A panel). A *FASN* számos rák esetén overexpresszált vagy hiperaktív (Menendez és mtsai, 2005). GLA hozzáadása a sugárkezeléshez enyhítheti a sugárzás következményét, mivel kísérleteinkben a 10 Gy és GLA együttes alkalmazása nem emelte meg szignifikánsan a *FASN* expressziót 48 óra után sem (39. ábra A panel).

10 Gy és GLA együttes alkalmazása esetén 24 óra elteltével *SCD1* és *SCD5* expresszió esetén egyaránt szinergista hatás volt kimutatható (38. ábra A és B panel). Tumor sejtekben az *SCD1* gátlása elősegíti az apoptózist és gátolja a növekedést, az *SCD5* gátlása esetén ez a hatás nem volt észlelhető (Roongta és mtsai, 2011). Az *SCD1* és/vagy *SCD5* farmakológiai célpont lehet a rák kezelése során. Vizsgálatainkban 48 órát követően a GLA kezelés és/vagy sugárzás az *SCD1* és *SCD5* expressziót ugyanolyan mértékben változtatta meg (40. ábra A és B panel). Az *SCD1* gyorsabban bomlik le, mint az *SCD5* (Lengi és Corl, 2008). Az *SCD5*-ből hiányzik egy exon, amely az *SCD1* esetén a lebontásért felelős (Wu és mtsai, 2013). Az *SCD1*-nek és *SCD5*-nek különböző lehet a szubsztrát specificitásuk, vagyis különböző funkcióik lehetnek (Lengi és Corl, 2008). Az *SCD1* és *SCD5* szabályozása között jelentős különbséget találtak (Castro és mtsai, 2011).

A 10 Gy és GLA kezelés 24 óra után szignifikánsan lecsökkentette az *SCD5* expressziót (38. ábra B panel). 48 óra után ez nem volt megfigyelhető (40. ábra B panel). Ha az *SCD1* expresszió alacsonyabb, a MUFA koncentráció lecsökken, míg az SFA koncentráció nő (Scaglia és Igal, 2008). 48 óra után a GLA kezelés csökkentette le jelentősen mind az *SCD1*, mind az *SCD5* expressziót ($p < 0.001$) (40. ábra A és B panel). Mivel az SCD szint és aktivitás befolyásolja a membrán fluiditást, hatással van a lipid doménekre, megváltoztatva a plazma membrán fehérjék aktivitását (Scaglia és Igal, 2005).

Mathers és Bailey (1975) szerint némely transzformált sejtvonalból hiányzik a *FADS2*. Az U-87 MG sejtvonal kifejezi a *FADS2*-t. Azt tapasztaltuk, hogy 24 óra elteltével a *FADS1* expresszió szignifikánsan megnőtt 10 Gy és GLA hatására (38. ábra C panel). 48 óra múlva ez a hatás már nem volt kimutatható, nem volt különbség a kontroll sejtekhez képest (40. ábra C panel). DHA, GLA, 10 Gy, 10 Gy és DHA valamint 10 Gy és GLA egyaránt szignifikáns expresszió csökkenést okozott 24 órát követően *FADS2* gén esetén (38. ábra D panel). 48 óra múlva a 10 Gy, a 10 Gy és GLA nem okozott változást a *FADS2* mRNS szintjében, de a GLA kezelés szignifikánsan lecsökkentette azt (40. ábra D panel). Portolesi és mtsai (2008)

valamint Nara és mtsai (2002) szintén megfigyelték, hogy a *FADS2* expressziója szignifikánsan lecsökkent a PUFA kezelés (linolsav, α -linolénsav, EPA, DHA és AA) hatására májkarcinóma sejtekben. Az alacsonyabb *FADS2* expressziónak köszönhetően a rákos sejtek védve vannak a szabad gyököktől, melyek a PUFA metabolizmus termékei (Sandrone és mtsai, 2014).

Vizsgálataink során a *FADS1* és *FADS2* expresszió egyaránt lecsökkent 48 órás GLA kezelés hatására U-87 MG sejtekben (40. Ábra C és D panel). Többen kimutatták, hogy *in vivo*, a *FADS1* és *FADS2* expressziót a PUFA-k csökkentették (Nara és mtsai, 2002; Reardon és mtsai, 2013).

A *FADS1*-el és *FADS2*-vel ellentétben a *FADS3* expresszióját nem befolyásolta a GLA kezelés (40. ábra E panel). Reardon és mtsai (2013), szerint a HepG2 sejtekben a PUFA kezelés – különböző GLA-tól, AA és DHA – a *FADS3* expressziójának szignifikáns emelkedését okozta, vagyis a *FADS3* expresszióban bekövetkező változások PUFA és szövetspecifikusak lehetnek.

A vizsgált elongázok (*ELOVL1*, *ELOVL2*, *ELOVL5*) expressziója nem változott meg az alkalmazott kezelések hatására. Egyedül az *ELOVL1* expressziója nőtt meg 5 Gy hatására, nem szignifikáns mértékben (39. ábra B panel).

Míg 48 óra után 10 Gy megnövelte a *FASN* expressziót, addig a GLA kezelés csökkentette azt (39. ábra A panel). A *FASN* farmakológiai gátlószerei csökkentették a tumor növekedését a xenograft modellekben (Menendez és Lupu, 2007). Amíg a *FASN* gátlása nem befolyásolja a normális sejtek növekedését és fejlődését, addig a rákos sejtekben leállítja a sejtciklust és programozott sejthalált indít be (Hopperton és mtsai, 2014). 48 órás kezelés esetén a GLA és sugárkezelés együttes alkalmazása nem változtatta meg a *FASN* expressziót a kontroll sejtekhez képest, és az szignifikánsan nagyobb volt, mint a csak GLA kezelt sejteké (39. ábra A panel). Ha csak a *FASN* esetén kapott eredményeket vesszük figyelembe, úgy tűnik, mintha az önálló GLA kezelés előnyösebb lenne, mint a GLA kezelés adjuvánsként való alkalmazása 10 Gy mellett.

GLA kezelés hatására 24 óra után az *SCD1* és *SCD5* expresszió nem változott, míg a *FASN* expresszió szignifikánsan csökkent (38. ábra). GLA hatására, 48 óra után a *FASN*-en kívül az *SCD1* és *SCD5* expresszió is szignifikánsan csökkent (39. ábra A panel és 40. ábra A és B panel). A PUFA-k a *FASN*-t és az *SCD*-t közvetett módon gátolják a *SREBP1* (SREBF1, sterol regulatory element binding transcription factor 1) expressziójának csökkentése révén (Pucer és mtsai, 2013).

Kimutattuk, hogy a 24 órás GLA kezelés hatására a *FADS2* expresszió szignifikánsan lecsökkent, míg a *FADS1* nem változott (38. ábra C és D panel). A *FASN*-en és *SCD*-n kívül, a *FADS1* és *FADS2* expresszió szintén szignifikánsan lecsökkent 48 órás GLA kezelést követően (39. és 40. ábrák). Vessby és mtsai (2002) szintén azt találták, hogy a PUFA kezelés csökkenti az *SCD* és *FADS2* aktivitást.

U-87 MG sejteken a 24 órás AA és DHA kezelés nem befolyásolta a *FADS1* mRNS szintet (38. ábra C panel). 24 órát követően az AA-val történő inkubáció nem befolyásolta a *FADS2* expressziót a DHA pedig szignifikánsan lecsökkentette azt U-87 MG sejteken (38. ábra D panel). Reardon és mtsai (2013), hasonló megfigyelést tettek máj karcinóma sejteken: az AA és DHA kezelés hatására a *FADS1* és *FADS2* expresszió szignifikánsan lecsökkent.

Egerekben a *FADS1*, *FADS2* és *SCD* expresszió csökkenést tapasztaltak PUFA kezelés hatására (Ntambi, 1999; Matsuzaka és mtsai, 2002). Egy elongáz expressziója sem változott meg szignifikánsan sugárzás, GLA kezelés vagy kombinált sugárzás és GLA kezelés hatására. 48 óra elteltével a GLA kezelés és sugárzás együttes alkalmazásának nem volt hatása a zsírsavszintézisre.

GLA és sugárzás együttes és önálló alkalmazásának hatása lipidcseppecskék eloszlására

A lipidmetabolizmus megváltozása és a lipidek akkumulációja lipidcseppecskékben (LD-k, lipid droplet-ek) hatással van a karcinogenezisre (Pucer és mtsai, 2013). A LD-k szabályozzák az energiaháztartást, a zsírsavak raktározását, befolyással vannak a lipotoxicitásra és az olyan molekulákra, melyeknek szerepük van a lipid metabolizmusban (Boren és Brindle, 2012). Kimutatták, hogy az LD akkumulációja a rákos szövet prenekrotikus régiójában jelenik meg, ezek alapján az LD-k *in vivo* markerei lehetnek a ráknak (Bilheimer és mtsai, 1978). Azok a kismolekulák, melyek az LD-ket célozzák endoplazmatikus retikulum és oxidatív stresszt idéznek elő, valamint citotoxikus hatással rendelkeznek különböző sejt vonalakon (Puskás és mtsai, 2010), ugyanakkor gátolják a hepatocelluláris karcinóma növekedését *in vivo* (Nagy és mtsai, 2013).

Az LD-k dinamikus struktúrák, melyek fontos funkciókat töltenek be, mint amilyen a jelátvitel, a membrántranszport, valamint a fehérjék és lipidek szállítása és elosztása (Puskás és mtsai, 2010). Az LD-k egy lipid magból állnak, melyet egy foszfolipid réteg vesz körül. Olyan fehérjéket tartalmaznak melyeknek a lipolízisben és lipogenezisben van szerepe. Az LD-k a rák fontos szabályozói (Greenberg és mtsai, 2011). Amikor a sejteket zsírsavakkal látják el, az LD-k száma megnő (Puskás és mtsai, 2010). Az *in vivo* körülményekkel ellentétben, *in vitro* az LD kialakulás reverzibilis (Opstad és mtsai, 2008). A lipidcseppecske-

kötő perilipineknek, melyek a felszínükkel asszociáltak szerepük lehet a biogenezisükben (Lecchi és mtsai, 2013). Az LD kötő fehérjék stabilizálják az LD-ket; az LD fúziót gátolja, ha számos LD kötő fehérje van az LD-k felszínén (Goodman, 2008).

Az LD-k élettana és metabolizmusa nagyon dinamikus (Greenberg és mtsai, 2011). Az LD-k mikrotubulushoz kapcsolódóan, aktív transzport révén mozognak. Az apróbb LD-k mérete fúzió révén megnőhet. A perilipin nevű lipidcseppecske kötő fehérjék foszforilációja az LD-k fragmentációját és szétszóródását idézi elő (Quintero és mtsai, 2007). Ezért, úgy tűnt, hogy valósabb képet kapunk az LD akkumulációról, ha az átlag lipidcseppecskék által elfoglalt területet mérjük a lipidcseppecske szám és méret helyett.

Az LD-k túlélési előnyt jelentenek a sejt számára, és védik a sejteket a lipotoxicitástól (Boren és Brindle, 2012). A GLA LD akkumulációt okozott, amennyiben 5 Gy-el vagy 10 Gy-el sugarazott sejteken alkalmaztuk (41. ábra A panel). Bebizonyították, hogy az U-87 MG sejtvonaltól eltérő sejt kultúrák lipidcseppecskéket akkumulálnak OA, EPA vagy GLA jelenlétében (Rémy és mtsai, 1997; Ramos és Colquhoun, 2003). A mi esetünkben, a GLA kezelés nem okozott LD akkumulációt az U-87 MG sejtekben (41. ábra).

A 10 Gy-es kezelés kivételével mindegyik 24 órás kezelés csökkentette a *FASN* expresszióját (38. ábra E panel). A 48 órás GLA kezelés csökkentette a *FASN* mRNS szintet (39. ábra A panel). A *FASN* gátlása megakadályozta a lipidcseppecskék kialakulását (Accioly és mtsai, 2008). A mi esetünkben a *FASN* expressziós szint és a LD-k mennyisége között nem lehetett hasonló összefüggést kimutatni (41. ábra).

Az egér limfóma sejtekben az apoptózist lipidcseppecske kialakulás kísérte és a *FASN* expresszió lecsökkent (Boren és Brindle, 2012). A sejtekben és tumorokban az apoptózist lipidcseppecske akkumuláció kíséri (Quintero és mtsai, 2007). Kísérleteinkben a 10 Gy-el, GLA-val, valamint GLA és 10 Gy-el kezelt sejtek esetén szignifikánsan megnőtt az apoptózis mértéke, mégis csak a sugarazott sejtek esetén figyelhattunk meg lipidcseppecske akkumulációt GLA kezelés után (28. ábra és 41. ábra).

Hősokkfehérjék és egy lipidcseppecske kötő fehérje, a PLIN3 génjeinek expressziós vizsgálata

A PUFA kezelés megváltoztatja a membránok összetételét és fluiditását, valamint a módot, ahogyan a mikrodomének szerveződnek (Péter és mtsai, 2012). Ez hőszokk jelek beindulását okozza, ami hőszokkfehérje (HSP) expresszióhoz vezet (Péter és mtsai, 2012). Az emlős sejtekben a membránfluiditás és a hőszokk válasz között összefüggés van (Balogh és mtsai, 2013). A HSP-k helyreállítják a sejt membrán stabilitását és fluiditását, és jelátvitelt

is közvetíthetnek különböző sejtek között (Horváth és mtsai, 2008). A Hsp70 promoter aktivitása egyenesen arányos a sejtek AA tartalmával (Péter és mtsai, 2012). A hősokkfehérjék részt vehetnek az onkogenézisben (Jakubowicz-Gil és mtsai, 2013). A HSP fehérjék egyes formáinak megemelkedett expressziója segítheti a rák fejlődését és növekedését (Ciocca és mtsai, 2013). A HSPB2 egy anti-apoptotikus fehérje, a hő nem aktiválja (Oshita és mtsai, 2010).

Az alkalmazott kezelések során a *HSPB2* expresszió nem emelkedett meg szignifikánsan, és a *HSP90AA1* expresszióját csak a GLA kezelés emelte meg (43. ábra B és D panel).

A sugárkezelés, a GLA kezelés és a kettő kombinációja szignifikáns, de alacsonyabb, mint kétszeres expressziónövekedést okozott a *HSPB1* esetén (43. ábra C panel). A HSPB1 egy terápiás célpont, a gátlása csökkenti a glióma sejt túlélését és invázióját (Schultz és mtsai, 2012). A HSPB1 befolyásolhatja a gyógyszerekre való érzékenységet, és elősegíti a metasztázist (Ciocca és mtsai, 2013). Bucci és mtsai (2006) megfigyelték, hogy az 5 Gy-es dózis nem befolyásolta a *HSPB1* expressziót ADF humán asztrocitóma sejtvonalban. Mi is hasonló eredményeket kaptunk U-87 MG glióma sejtvonalon (43. ábra C panel). Ezzel ellentétben egy 10 Gy-es dózis elegendőnek bizonyult, hogy a *HSPB1* expresszióját megnövelje (43. ábra C panel). Bucci és mtsai (2006) szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a 12.5 Gy-es dózis megnöveli a *HSPB1* expressziót. Egy másik tanulmányban a HSPB1 gátolta a sugárkezelés által előidézett apoptózist (Lee és mtsai, 2005).

Egy sejt összfehérje tartalmának akár a 2%-át is a HSP90AA1 képviseli (Hartmann és mtsai, 2013). A HSP90AA1 egy terápiás célpont a glioblasztómában, a gátlása számos jelátviteli utat helyreállíthat (Fu és mtsai, 2013). Több mint 100 célpontja van, melyek a sejt ciklust, a proliferációt és az apoptózist szabályozzák (Fu és mtsai, 2013). A HSP90AA1 onkoproteineket stabilizál (Milanović és mtsai, 2013). A *HSP90AA1*-et a stressz indukálja (Di és mtsai, 2014). Kísérleteinkben a sugárkezelésnek és a kombinált GLA kezelésnek és sugárzásnak nem volt hatása a *HSP90AA1* expresszióra, míg a GLA kezelés önmagában megnövelte azt (43. ábra B panel).

A HSP-k egyes tagjai védenek az apoptózistól, expressziójuk megnő, ha az apoptózis nem megy végbe (Bucci és mtsai, 2006). Az apoptózis mértékének növekedését figyelhettük meg mind a GLA, a 10 Gy, az 5 Gy és GLA valamint a 10 Gy és GLA kezelt minta esetén (28. ábra A panel). A három vizsgált HSP közül a *HSPB1* mRNS szintje emelkedett meg szignifikánsan, a *HSPB2* esetén nem volt változás, még a *HSP90AA1* szintje csak GLA kezelés esetén mutatott fokozott expressziót (43. ábra).

Mivel a sugárzás és/vagy GLA kezelés jelentősen befolyásolta a lipidcseppecskék mennyiségét (41. ábra) az U-87 MG glióma sejtekben, ezért egy lipidcseppecske kötő fehérjét, a PLIN3-at is megvizsgáltuk. Az LD-k biogenezisét, morfológiáját, fejlődését, szállítását, a lipid raktározást és a lipolízist az LD kötő fehérjék határozzák meg (Song és mtsai, 2013). A *PLIN3* expressziójának változása nem követte a lipidcseppecskék által elfoglalt területnek a változását (41. és 43. ábra). Míg a *PLIN3* expressziója nőtt sugárkezelés hatására, addig a lipidcseppecskék mennyisége szignifikánsan csökkent.

Az U-87 MG sejtekben a PLIN3 fehérje expressziója 40-60%-al csökkent 2 Gy-el történő sugárkezelés hatására (Trog és mtsai, 2006). Ezzel ellentétben az 5 Gy és a 10 Gy szignifikánsan megnövelte a *PLIN3* expressziót U-87 MG sejtekben 48 órás inkubációs időt követően (43. ábra A panel). Kecske monocitákban a *PLIN3* mRNS szintje EPA kezelés hatására megnövekedett, míg a DHA-val történő inkubáció nem befolyásolta a *PLIN3* expressziót (Lecchi és mtsai, 2013). Ehhez hasonlóan a GLA kezelés nem befolyásolta az U-87 MG sejtekben a *PLIN3* expressziós szintet (43. ábra A panel). A zsírsavak hozzáadása a tápoldathoz a PLIN3 gyors újraeloszlását okozta a citoszoltól az LD-khez (Wolins és mtsai, 2001). A PLIN3 mennyiségének csökkenése gátolta a lizoszomális fehérjék és receptorok szállítását (Trog és mtsai, 2006). Vizsgálatainkban, amikor a GLA adjuvánsként volt alkalmazva 5 Gy mellett, a *PLIN3* expresszió szignifikánsan alacsonyabb lett (43. ábra A panel).

Következtetések, új tudományos eredmények

1. Glióma sejteken még nem végeztek LDH és MTS mérést, kinetikai módszerrel kombinálva; az UFA-k és/vagy sugárzás (5 és 10 Gy) hatásának felmérése céljából. Mind az öt általunk vizsgált UFA (AA, DHA, GLA, OA és EPA) esetén sikerült 10 Gy-el szinergisztikus hatást kimutatnunk LDH vagy MTS mérésekkel.
2. LDH, MTS és kinetikai méréseink alapján 25 μ M AA, 25 μ M DHA, 50 μ M GLA bizonyult alkalmasnak további vizsgálatokra.
3. A sugárzás és a PUFA-k együttes hatását U-87 MG sejtek morfológiájára ezidáig még nem vizsgálták. A sugárzással (10 Gy) kombinált PUFA kezelés jelentősen befolyásolta a sejtek morfológiáját 48 órás kezelést követően.
4. Az eredmények alapján a génexpresszióban bekövetkező változások PUFA és sugárzás specifikusak. Az eredmények és szakirodalom alapján, a mért hatások szövetspecifikusak. A sugárzást követő PUFA kezelés hatását glióma sejtek génexpressziójára még nem tanulmányozták. Az inkubációs idő fontos befolyásoló tényező génexpresszió vizsgálatok esetén. AA, DHA és GLA specifikusan befolyásolta bizonyos gének expresszióját. A PUFA-k a sugárzás (10 Gy) hatását sok tekintetben felerősítették vagy kedvező módon módosították.
5. A tudományra nézve új megfigyelések a sugárzást követő PUFA kezelés által előidézett miRNS expresszió változás mérések glióma sejtvonalon. Csak a miR146a esetén tapasztaltunk kismértékű változást. miR181a esetén csak az önálló DHA kezelés volt hatásos. A miR34a, miR96, miR148a, miR148b és miR152 esetén az általunk alkalmazott kezelések okoztak kimutatható expresszióbeli változást.
6. A GLA kezelés nem idézett elő LD akkumulációt. Ez új megállapítás, a szakirodalomban nem találtuk ezirányú adatot. U-87 MG sejteken még nem vizsgálták a GLA kezelés hatását a lipid cseppecskék akkumulációjára. A sugárzás (5 és 10 Gy) a LD-k mennyiségének csökkenését idézte elő, U-87 MG sejteken, amit eddig még nem írtak le. Az LD-k akkumulációját még nem vizsgálták GLA kezelt és sugarazott glioma sejteken. Ha GLA-t alkalmaztunk sugárkezelés (5 és 10 Gy) mellett, a LD mennyiség szignifikánsan nagyobb volt, mint a csak sugarazott sejtekben.
7. A szakirodalomban részletes leírás található a PUFA-k és/vagy sugárzás citotoxicitásáról rákos sejteken. Ennek ellenére, a gén- és miRNS expresszió méréseket ajánlatos volt kiegészíteni az apoptotikus hatásról szóló információval ugyanazon a modell rendszeren, ugyanolyan körülmények között, mint ahogyan a génexpressziós változás meghatározása

történt. A PUFA-k önmagukban is hatásosak lehetnek, mint rákellenes hatóanyagok. 25 μ M AA és 25 μ M DHA nem növelte meg az apoptotikus indexet, míg 50 μ M GLA igen. Az AA vagy DHA és a sugárzás (5 Gy) között szinergisztikus hatást mutattunk ki az apoptózis mértékét tekintve.

A PUFA-k önálló vagy sugárkezeléssel való alkalmazásának pontos sejten belüli hatásának megértéséhez további vizsgálatokra lesz szükség.

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Dr. Puskás Lászlónak, amiért lehetővé tette, hogy az SZBK Funkcionális Genomika Laboratóriumában és az Avidin Kft-nél szerezzek szakmai tapasztalatot, és hogy elvégezhessem a doktori disszertációmhoz szükséges kísérleteket.

Szeretném megköszönni a segítséget és a tanácsokat témavezetőmnek, Dr. Puskás Lászlónak, valamint Dr. Hackler Lászlónak, Dr. Zvara Ágnesnek és Dr. Faragó Nórának, melyet a kísérletes munkában és a cikk megírásában nyújtottak. A sejteket a kísérletekhez Mán Imola és Lehőcz Istvánné készítette elő, köszönöm nekik a munkában való részvételt. A sejtek sugárkezelését az Onkoterápiás Klinikán (Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar), Dr. Hideghegyi Katalin segítségével hajtottuk végre. A kinetikai és biokémiai mérések az Avidin Kft-nél történtek. A többi mérést az SZBK Funkcionális Genomikai Laboratóriumában végeztük el. A FACS méréseket Dr. Szabó Gáborral együtt hajtottuk végre, míg a lipidcseppecske festést követően a konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokat Dr. Ayaydin Ferhannal végeztük el. A jelenleg bemutatott munkát részben a GOP-1.1.1-11-2011-0003 pályázattal finanszírozták.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném köszönetemet kifejezni a szüleimnek a támogatásért és biztatásért.

Irodalomjegyzék

2014 ATCC: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo_country=hu. Hozzáférés: 2015 augusztus 29.

2015 Sigma-Aldrich Co. LLC.:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/09063001?lang=hu®ion=HU>. Internetes hozzáférés: 2015 szeptember 13.

Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliviera SS, Kaufman C, Morgado-Diaz JA, Bozza PT, Viola JP (2008): Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 68(6):1732-40.

Alhazzaa R, Sinclair AJ, Turchini GM (2013): Bioconversion of α -linolenic acid into n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid in hepatocytes and ad hoc cell culture optimisation. *PLOS One.* 8(9):e73719.

Asuthkar S, Nalla AK, Gondi CS, Dinh DH, Gujrati M, Mohanam S, Rao JS (2011): Gadd45a sensitizes medulloblastoma cells to irradiation and suppresses MMP-9-mediated EMT. *Neuro-Oncology.* 13(10):1059-73.

Bagott J, Dennis SE (1994, 1995): *NetBiochem. Fatty Acids.*

<http://library.med.utah.edu/NetBiochem/FattyAcids/index.html>. Hozzáférés: 2015 szeptember 13.

Bakshi A, Mukherjee D, Bakshi A, Banerji AK, Das UN (2003): Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. 19(4):305-9.

Balogh G, Péter M, Glatz A, Gombos I, Török Z, Horváth I, Harwood JL, Vigh L (2013): Key role of lipids in heat stress management. *FEBS Lett.* 587(13):1970-80.

Bell HS, Wharton SB, Leaver HA, Whittle IR (1999): Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth: experimental studies with glioma spheroids in collagen gels. *J Neurosurg.* 91:6.

Benadiba M, Miyake JA, Colquhoun A (2009): Gamma-linolenic acid alters Ku80, E2F1, and bax expression and induces micronucleus formation in C6 glioma cells in vitro. *IUBMB Life.* 61(3):244-51.

Berberat PO, Dambrauskas Z, Gulbinas A, Giese T, Giese N, Künzli B, Autschbach F, Meuer S, Büchler MW, Friess H (2005): Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res.* 11(10):3790-8.

Bilheimer DW, Buja LM, Parkey RW, Bonte FJ, Willerson JT (1978): Fatty acid accumulation and abnormal lipid deposition in peripheral and border zones of experimental myocardial infarcts. *J Nucl Med.* 19(3):276-83.

Blanchard H, Legrand P, Pédrone F (2011): Fatty Acid Desaturase 3 (Fads3) is a singular member of the Fads cluster. *Biochimie.* 2011, 93(1):87-90.

Blaylock RL (2013): Immunoexcitatory mechanisms in glioma proliferation, invasion and occasional metastasis. *Surg. Neurol Int.* 4 (15).

Boren J, Brindle KM (2012): Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ.* 19(9):1561-70.

Bowers RR, Manevich Y, Townsend DM, Tew KD (2012): Sulfiredoxin redox-sensitive interaction with S100A4 and nonmuscle myosin IIA regulates cancer cell motility. *Biochemistry.* 51(39):7740-54.

Brenna JT, Carlson SE. (2014): Docosahexaenoic acid and human brain development: Evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *J Hum Evol.* S0047-2484(14)00083-9.

Brenna JT, Diau GY (2007): The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77(5-6):247-50.

Bucci B, Misiti S, Cannizzaro A, Marchese R, Raza GH, Miceli R, Stigliano A, Amendola D, Monti O, Biancolella M, Amati F, Novelli G, Vecchione A, Brunetti E, De Paula U (2006): Fractionated ionizing radiation exposure induces apoptosis through caspase-3 activation and reactive oxygen species generation. *Anticancer Res.* 26(6B):4549-57.

Cao XM, Koski RA, Gashler A, McKiernan M, Morris CF, Gaffney R, Hay RV, Sukhatme VP (1990): Identification and Characterization of the Egr-1 Gene Product, a DNA-Binding Zinc Finger Protein Induced by Differentiation and Growth Signals. *Mol Cell Biol.* 10 (5):1931-9.

- Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Fabelo N, Herrera-Herrera AV, Fernández C, Marín R, González-Montelongo MC, Díaz M (2014): Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection. *J Neurochem.* 131(4):470-83.
- Castro LF, Wilson JM, Gonçalves O, Galanta-Oliveira S, Rocha E, Cunha I (2011): The evolutionary history of the stearoyl-CoA desaturase gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol.* 11:132.
- Castro LF, Monroig Ó, Leaver MJ, Wilson J, Cunha I, Tocher DR (2012): Functional desaturase Fads1 (D5) and Fads2 (D6) orthologues evolved before the origin of jawed vertebrates. *PLOS One.* 7(2):e31950.
- Cenci T, Martini M, Montano N, D'Alessandris QG, Falchetti ML, Annibali D, Savino M, Bianci F, Perconti F, Nasi S, Pallini R, Larocca LM (2012): Prognostic relevance of c-Myc and BMI1 expression in patients with glioblastoma. *Am J Clin Pathol.* 138(3):390-6.
- Chajès V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V (2006): Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res.* 66(10):5287-94.
- Chen G, Zhu W, Shi D, Lv L, Zhang C, Liu P, Hu W (2010): MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol Rep.* 23(4):997-1003.
- Chen YZ, Xue JY, Chen CM, Yang BL, Xu QH, Wu F, Liu F, Ye X, Meng X, Liu GY, Shen ZZ, Shao ZM, Wu J (2012): PPAR signaling pathway may be an important predictor of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 70(5):637-44.
- Chistiakov DA, Chekhonin VP (2012): Contribution of microRNAs to radio- and chemoresistance of brain tumors and their therapeutic potential. *Eur J Pharmacol.* 684(1-3):8-18.
- Cimino D, De Pittà C, Orso F, Zampini M, Casara S, Penna E, Quaglini E, Forni M, Damasco C, Pinatel E, Ponzone R, Romualdi C, Brisken C, De Bortoli M, Biglia N, Provero P, Lanfranchi G, Taverna D (2013): miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J.* 27 (3):1223-35.
- Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK (2013): Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol.* 87(1):19-48.
- Colas S, Paon L, Denis F, Prat M, Louisot P, Hoinard C, Le Floch O, Ogilvie G, Bougnoux P (2004): Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer.* 109:3.
- Collins VP (2004): Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75(2):ii2-11.
- Cowing BE, Saker KE (2001): Polyunsaturated fatty acids and epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling in mammary cancer. *J. Nutr.* 131(4):1125-8.
- Crea F, Nur Saidy NR, Collins CC, Wang Y (2015): The epigenetic/noncoding origin of tumor dormancy. *Trends Mol Med.* 21(4):206-11.
- Das UN (1990): Gamma-linolenic acid, arachidonic acid, and eicosapentaenoic acid as potential anticancer drugs. *Nutrition.* 6(6):429-34.
- Das UN, Prasad W, Reddy DR (1995): Local application of gamma-linolenic acid in the treatment of human gliomas. *Cancer Lett.* 94(2):147-55.
- Das UN (2004): From bench to the clinic: gamma-linolenic acid therapy of human gliomas. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70(6):539-52.
- Das UN (2007): Gamma-linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro, in vivo, and clinical studies. *Med Sci Monit.* 13:7.
- Das UN, Prasad W, Reddy DR (1995): Local application of gamma-linolenic acid in the treatment of human gliomas. *Cancer Lett.* 94(2):147-55.
- Datta R, Rubin E, Sukhatme V, Qureshi S, Hallahan D, Weichselbaum RR, Kufe DW (1992): Ionizing radiation activates transcription of the EGRI gene via CarG elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (21):10149-53.
- de Antonellis P, Medaglia C, Cusanelli E, Andolfo I, Liquori L, De Vita G, Carotuneto M, Bello A, Formiggini F, Galeone A., De Rosa G, Virgilio A, Scoqnamiqlo I, Sciro M, Basso G, Schulte JH, Cinalli G, Iolascon A, Zollo M:(2011): MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15+/CD133+ tumor-propagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma. *PLOS One.* 6(9):e24584.

- Debinski W, Gibo DM (2005): Fos-related antigen 1 modulates malignant features of glioma cells. *Mol Cancer Res.* 3(4):237-49.
- Di K, Keir ST, Alexandru-Abrams D, Gong X, Nguyen H, Friedman HS, Bota DA (2014): Profiling Hsp90 differential expression and the molecular effects of the Hsp90 inhibitor IPI-504 in high-grade glioma models. *J Neurooncol.* 120(3):473-81.
- Dupertuis YM, Mequid MM, Pichard C (2007): Colon cancer therapy: new perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 10(4):427-32.
- Fabbri M, Calin GA (2010): Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Adv Genet.* 70:87-99.
- Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Kuoh C, Zhang J, Li YM, Maiaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AI, Eberhart CG (2010): NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells.* 28(1):5-16.
- Faragó N, Fehér LZ, Kitajka K., Das UN, Puskás LG (2011): MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes. *Lipids Health Dis.* 10:173.
- Finstad HS, Drevon CA, Kulseth MA, Synstad AV, Knudsen E, Kolset SO (1998): Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem. J* 336(Pt 2): 451-9.
- Freeman JA, Espinosa JM (2013): The impact of post-transcriptional regulation in the p53 network. *Brief Funct Genomics.* 12(1):46-57.
- Fu J, Koul D, Yao J, Wang S, Yuan Y, Colman H, Sulman EP, Lang FF, Yung WK (2013): Novel HSP90 inhibitor NVP-HSP990 targets cell cycle regulators to ablate Olig2-positive glioma tumor initiating cells. *Cancer Res.* 73(10):3062-74.
- Gandini NA, Fermento ME, Salomón DG, Obiol DJ, Andrés NC, Zenklusen JC, Arevalo J, Blasco J, López Romero A, Facchinetti MM, Curino AC (2014): Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis in patients with astrocytoma. *Tumour Biol.* 35(3):2803-15.
- Gerdes MJ, Sood A, Sevinsky C, Pris AD, Zavodszky MI, Ginty F (2014): Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. *Front Oncol.* 4:366.
- Germain E, Chajès V, Cognault S, Lhuillery C, Bougnoux P (1998): Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer.* 75:4.
- Giam M, Rancati G (2013): Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Div.* 10:3.
- Glaser C, Lattka E, Rzehak P, Steer C, Koletzko B (2011): Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern Child Nutr.* 2011, 2:27-40.
- Gogna R, Madan E, Keppler B, Pati U (2011): Gallium compound GaQ3-induced Ca²⁺ signalling triggers p53-dependent and-independent apoptosis in cancer cells. *Br J Pharmacol.* 166(2):617-36.
- Goodman JM (2008): The Gregarious Lipid Droplet. *J Biol Chem.* 283(42):28005-9.
- Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, Yan QW, Myoshi H, Mashek DG (2011): The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest.* 121(6): 2102-10.
- Gregory MK, Gibson RA, Cook-Johnson RJ, Cleland LG, James MJ (2011): Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis. *PLOS One.* 6(12): e29662.
- Gwak HS, Kim TH, Jo GH, Kim YJ, Kwak HJ, Kim JH, Yin J, Yoo H, Lee SH, Park JB (2012): Silencing of microRNA-21 confers radio-sensitivity through inhibition of the PI3K/AKT pathway and enhancing autophagy in malignant glioma cell lines. *PLOS One.* 7(10): e47449.

Halatsch ME, Löw S, Mursch K, Hielscher T, Schmidt U, Unterberg A, Vougioukas VI, Feuerhake F (2009): Candidate genes for sensitivity and resistance of human glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 111(2):211-8.

Halkerston IDK (1984): *Biochemistry (National Medical Series for Independent Study)* Harvard Pub Co.

Hardee ME, Marciscano AE, Medina-Ramirez CM, Zaqzaq D, Narayana A, Lonning SM, Barcellos-Hoff MH (2012): Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor- β . *Cancer Res.* 72(16):4119-29.

Hartmann S, Günther N, Biehl M, Katzer A, Kuger S, Worschech E, Sukhurov VL, Krohne G, Zimmermann H, Flentje M, Djuzenova CS (2013): Hsp90 inhibition by NVP-AUY922 and NVP-BEP800 decreases migration and invasion of irradiated normoxic and hypoxic tumor cell lines. *Cancer Lett.* 331(2):200-10.

Hatzivassiliou G1, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, Hingorani SR, Tuveson DA, Thompson CB (2005): ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell.* 8(4):311-21.

Hilvo M, Denkert C, Lehtinen L, Müller B, Brockmöller S, Seppänen-Laakso T, Budczies J, Bucher E, Yetukuri L, Castillo S, Berg E, Nygren H, Sysi-Aho M, Griffin JL, Fiehn O, Loibl S, Richter-Ehrenstein C, Radke C, Hyötyläinen T, Kallioniemi O, Iljin K, Oresic M (2011): Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res.* 71(9):3236-45.

Hirose Y, Sasaki H, Abe M, Hattori N, Adachi K, Nishiyama Y, Nagahisa S, Hayashi T, Hasegawa M, Yoshida K (2013): Subgrouping of gliomas on the basis of genetic profiles. *Brain Tumor Pathol.* 30(4):203-8.

Hoehn WP, Lijmer JG, Duran M, Wanders RJ, van Beveren NJ, de Haan L (2013): Red blood cell polyunsaturated fatty acids measured in red blood cells and schizophrenia: a meta-analysis. *Psychiatry Res.* 207(1-2):1-12.

Hopperton KE, Duncan RE, Bazinet RP, Archer MC (2014): Fatty acid synthase plays a role in cancer metabolism beyond providing fatty acids for phospholipid synthesis or sustaining elevations in glycolytic activity. *Exp Cell Res.* 320(2):302-10.

Horváth I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vigh L (2008): Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta.* 1778(7-8):1653-64.

Hou Z, Yin H, Chen C, Dai X, Li X, Liu B, Fang X (2012): microRNA-146a targets the L1 cell adhesion molecule and suppresses the metastatic potential of gastric cancer. *Mol Med Rep.* 6(3):501-6.

Huang X, Lv W, Zhang JH, Lu DL (2014): miR-96 functions as a tumor suppressor gene by targeting NUA1 in pancreatic cancer. *Int J Mol Med* 34(6):1599-605.

Hulbert AJ, Kelly MA, Abbott SK (2014): Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *J Comp Physiol B.* 184(2):149-66.

Huml M, Silye R, Zauner G, Hutterer S, Schilcher K: Brain tumor classification using AFM with data mining techniques. *Biomed Res Int.* 2013:176519.

Igal RA (2010): Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer. *Carcinogenesis.* 31(9):1509-15.

Ip C (1997): Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr.* 66(6):1523S-1529S.

Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA, Aronica E (2012): MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PLOS One.* 7(9):e44789.

Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A (2006): Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res.* 45(3):237-49.

Jakubowicz-Gil J, Langner E, Badziul D, Wertel I, Rzeski W: Silencing of Hsp27 and Hsp72 in glioma cells as a tool for programmed cell death induction upon temozolomide and quercetin treatment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013, 273(3):580-9.

Kardosh A, Golden EB, Pyrko P, Uddin J, Hofman FM, Chen TC, Louie SG, Petasis NA, Schönthal AH (2008): Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib. *Cancer Res.* 68(3):843-51.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <http://www.genome.jp/kegg/>

Kesari S, Bota DA (2011): Fos-related antigen-1 (Fra-1) is a regulator of glioma cell malignant phenotype. *Cancer Biol Ther.* 11(3):307-10.

Khodarev NN, Park JO, Yu J, Gupta N, Nodzenski E, Roizman B, Weichselbaum RR (2001): Dose- dependent and independent temporal patterns of gene responses to ionizing radiation in normal and tumor cells and tumor xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA.*

Kihara A (2012): Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem.* 152(5):387-95

Kim HJ, Vosseler CA, Weber PC, Erl W (2005): Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 204(3):881-8.

Kim J, Tanner K: Recapitulating the Tumor Ecosystem Along Metastatic Cascade Using 3D Culture Models. *Front Oncol.* 5:170.

Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Weisinger HS, Mathai M, Jayasooriya AP, Halver JE, Puskás LG (2004): Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, 101(30):10931-6.

Kleihues P, Ohgaki H (1999): Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1(1):44-51.

Kobayashi N, Barnard RJ, Henning SM, Elashoff D, Reddy ST, Cohen P, Leung P, Hong-Gonzalez J, Freedland SJ, Said J, Gui D, Seeram NP, Popoviciu LM, Bagga D, Heber D, Glaspy JA, Aronson WJ (2006): Effect of altering dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. *Clin Cancer Res.* 12(15):4662-70.

Koto KS, Lescault P, Brard L, Kim K, Singh RK, Bond J, Illenye S, Slavik MA, Ashikaga T, Saulnier Sholler GL (2011): Antitumor activity of nifurtimox is enhanced with tetrathiomolybdate in medulloblastoma. *Int J Oncol.* 38(5):1329-41.

Koul D, Shen R, Shishodia S, Takada Y, Bhat KP, Reddy SA, Aggraval BB, Yung WK (2007): PTEN down regulates AP-1 and targets c-fos in human glioma cells via PI3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biochem.* 300 (1-2):77-87.

Kuhajda FP (2006): Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res.* 66(12):5977-80.

Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K (2014): Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1851(4):308-30.

Kuntam S, Puskás LG, Ayaydin F (2015): Characterization of a new class of blue-fluorescent lipid droplet markers for live-cell imaging in plants. *Plant Cell Rep.* 34(4):655-65.

Kürti L, Veszeka S, Bocsik A, Dung NT, Ozsvári B, Puskás LG, Kittel A, Szabó-Révész P, Deli MA (2012): The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier. *Toxicol In Vitro.* 26(3):445-54.

Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA (2011): Modulation of glioma risk and progression by dietary nutrients and antiinflammatory agents. *Nutr Cancer.* 63(2):174-84.

- Le Calvé B, Rynkowski M, Le Mercier M, Bruyère C, Lonez C, Gras T, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Ruysschaert JM, Kiss R, Lefranc F (2010): Long-term in vitro treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance in vivo through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression. *Neoplasia*. 12(9):727-39.
- Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB, Whittle IR (2002a): Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 66(1):19-29.
- Leaver HA, Wharton SB, Bell HS, Leaver-Yap IM, Whittle IR (2002b): Highly unsaturated fatty acid induced tumour regression in glioma pharmacodynamics and bioavailability of gamma linolenic acid in an implantation glioma model: effects on tumour biomass, apoptosis and neuronal tissue histology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 67(5):283-92.
- Lecchi C, Invernizzi G, Agazzi A, Modina S, Sartorelli P, Savoini G, Ceciliani F (2013): Effects of EPA and DHA on lipid droplet accumulation and mRNA abundance of PAT proteins in caprine monocytes. *Res Vet Sci*. 94(2):246-51.
- Lee YJ, Lee DH, Cho CK, Chung HY, Bae S, Jhon GJ, Soh JW, Jeoung DI, Lee SJ, Lee YS (2005): HSP25 inhibits radiation-induced apoptosis through reduction of PKCdelta-mediated ROS production. *Oncogene*. 24(23):3715-25.
- Lee H, Park WJ (2014): Unsaturated fatty acids, desaturases, and human health. *J Med Food*. 17(2):189-97.
- Lengi AJ, Corl BA (2008): Comparison of pig, sheep and chicken SCD5 homologs: Evidence for an early gene duplication event. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150(4):440-6.
- Lenihan-Geels G, Bishop KS, Ferguson LR (2013): Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients*. 5(4):1301-15.
- Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS (2004): Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*. 43(1):36-54.
- Li M, Li J, Liu L, Li W, Yang Y, Yuan J (2013): MicroRNA in Human Glioma. *Cancers (Basel)*. 5(4):1306-31.
- Li M, Zhang Z, Yuan J, Zhang Y, Jin X (2014): Altered glutamate cysteine ligase expression and activity in renal cell carcinoma. *Biomed Rep*. 2(6):831-834.
- Li S, Chowdhury R, Liu F, Chou AP, Li T, Mody RR, Lou JJ, Chen W, Reiss J, Soto H, Prins R, Liao LM, Mischel PS, Nghiemphu PL, Yong WH, Cloughesy TF, Lai A (2014): Tumor-Suppressive miR148a is Silenced by CpG Island Hypermethylation in IDH1-Mutant Gliomas. *Clin Cancer Res*. 20(22):5808-22.
- Lin B, Madan A, Yoon JG, Fang X, Yan X, Kim TK, Hwang D, Hood L, Foltz G (2010): Massively parallel signature sequencing and bioinformatics analysis identifies up-regulation of TGFBI and SOX4 in human glioblastoma. *PLOS One*. 5(4):e10210.
- Lin CJ, Lee CC, Shih YL, Lin CH, Wang SH, Chen TH, Shih CM (2012): Inhibition of mitochondria- and endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy augments temozolomide-induced apoptosis in glioma cells. *PLOS One*. 7(6):e38706.
- Lin L, Qin Y, Jin T, Liu S, Zhang S, Shen X, Lin Z (2013): Significance of NQO1 overexpression for prognostic evaluation of gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2013, 96(2):200-5.
- Little JL, Wheeler FB, Fels DR, Koumenis C, Kridel SJ (2007): Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res*. 2007 67(3):1262-9.
- Liu J, Shimizu K, Kondo R (2009): Anti-androgenic activity of fatty acids. *Chem Biodivers*. 6.
- Liu L, Lu H, Ruebe CE, Ruebe CH (2005): TNF-alpha mRNA expression in lung cancer cell lines induced by ionizing radiation. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 27(6):347-9.

- Long QQ, Yi YX, Qiu J, Xu CJ, Huang PL (2014): Fatty acid synthase (FASN) levels in serum of colorectal cancer patients: correlation with clinical outcomes. *Tumour Biol.* 35(4):3855-9.
- Lorente-Cebrián S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ (2013): Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem.* 69(3):633-51.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114(2):97-109.
- Lu X, Yu H, Ma Q, Shen S, Das UN (2010): Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids Health Dis.* 9:106.
- Lu DY, Chang CS, Yeh WL, Tang CH, Cheung CW, Leung YM, Liu JF, Wong KL (2012): The novel phloroglucinol derivative BFP induces apoptosis of glioma cancer through reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress pathways. *Phytomedicine.* 19(12):1093-100.
- Madácsi R, Kanizsai I, Fehér LZ, Gyuris M, Ozsvári B, Erdélyi A, Wölfling J, Puskás LG (2013): Aromatic sulfonamides containing a condensed piperidine moiety as potential oxidative stress-inducing anticancer agents. *Med Chem.* 9:7.
- Maines MD (1988): Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2(10):2557-68.
- Malanchi I (2013): Tumour cells coerce host tissue to cancer spread. *Bonekey Rep.* 2:371.
- Manda K, Kriesen S, Hildebrandt G, Fietkau R, Klautke G (2011): Omega-3 fatty acid supplementation in cancer therapy: does eicosapetanoic acid influence the radiosensitivity of tumor cells? *Strahlenther Onkol.* 187(2):127-34.
- Marples B, Scott SD, Hendry JH, Embleton MJ, Lashford LS, Margison GP (2000): Development of synthetic promoters for radiation-mediated gene therapy. *Gene Therapy.* 7(6):511-7.
- Mathers L, Bailey MJ (1975): Enzyme deletions essential fatty acid metabolism in cultured cells. *J Biol Chem.* 250(3):1152-3.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hastay AH, Tamura Y, Osuga J, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N (2002): Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res.* 43(1):107-14.
- McDonald JH (2014): Handbook of Biological Statistics (3. kiadás). Sparky House Kiadó, Baltimore, Maryland. Student's t-test for two samples. A web oldal a 126-130 nyomtatott oldalakat tartalmazza. <http://www.biostathandbook.com/twosampltest.html>. Internetes hozzáférés időpontja: 2015. szeptember 19.
- McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Dwivedi Y, Pandey GN (2010): Selective deficits in erythrocyte docosahexaenoic acid composition in adult patients with bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord.* 126(1-2):303-11.
- Metherttrairut C, Slack FJ (2013): MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy. *Curr Opin Genet Dev.* 23(1):12-9.
- Menendez JA, Colomer R, Lupu R (2005): Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Med Hypotheses.* 64(2):342-9.
- Menendez JA, Lupu R (2007): Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 7(10): 763-77.
- Meyer RG, Küpper J-H, Kandolf R, Rodemann HP (2002): Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U-87 MG malignant glioma cells in vitro. *Eur J Biochem.* 269(1):337-46.

- Milanović D, Firat E, Grosu AL, Niederman G (2013): Increased radiosensitivity and radiothermosensitivity of human pancreatic MIA PaCa-2 and U251 glioblastoma cell lines treated with the novel Hsp90 inhibitor NVP-HSP990. *Radiat Oncol.* 8:42.
- Mordek AS, Bayin NS, Placantonakis DG (2014): Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells.* 6(1):43-52.
- Murff HJ, Shu XO, Li H, Yang G, Wu X, Cai H, Wen W, Gao YT, Zheng W (2011): Dietary polyunsaturated fatty acids and breast cancer risk in Chinese women: a prospective cohort study. *Int J Cancer.* 128(6):1434-41.
- Nagy LI, Molnár E, Kanizsi I, Madácsi R, Ózsvári B, Fehér LZ, Fábián G, Marton A, Vizler C, Ayaydin F, Kitajka K, Hackler L Jr, Mátés L, Deák F, Kiss I, Puskás LG (2013): Lipid droplet binding thalidomide analogs activate endoplasmic reticulum stress and suppress hepatocellular carcinoma in a chemically induced transgenic mice model. *Lipids Health Dis.* 12:175.
- Naidu MR, Das UN, Kishan A (1992): Intratumoral gamma-linoleic acid therapy of human gliomas. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 45(3):181-4.
- Nara TY, He WS, Tang C, Clarke SD, Nakamura MT (2002): The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human D-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 296(1):111-7.
- Nasrollahzadeh J, Siassi F, Doosti M, Eshraqhian MR (2009): Study of in vitro and in vivo effect of docosahexaenoic acid on rat C6 glioma. *J Exp Ther Oncol.* 8(2):95-103.
- Negi AK, Kansal S, Bhatnagar A, Agnihotri N (2013): Alteration in apoptosis and cell cycle by celecoxib and/or fish oil in 7,12-dimethyl benzene (α) anthracene-induced mammary carcinogenesis. *Tumor Biol.* 34(6):3753-64.
- Niemoeller OM, Niyazi M, Corradini S, Zehentmayr F, Li M, Lauber K, Belka C (2011): MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation. *Radiat Oncol.* 6: 29.
- Nishimura J, Handa R, Yamamoto H, Tanaka F, Shibata K, Mimori K, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Masaki M (2012): microRNA-181a is associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 28(6):2221-6.
- Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF (2010): Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell.* 140(1):49-61.
- Ntambi JM (1999): Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res.* 40(9):1549-58.
- Ntambi JM, Bené H (2001): Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Mol Neurosci.* 16(2-3):273-8.
- Ohno Y, Suto S, Yamanaka M, Mizutani Y, Mitsutake S, Igarashi Y, Sassa T, Kihara A (2010): ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(43):18439-44.
- Okamura T, Kurisu K, Yamamoto W, Takano H, Nishiyama M (2000): NADPH/quinone oxidoreductase is a priority target of glioblastoma chemotherapy. *Int J Oncol.* 16(2):295-303.
- Olar A, Aldape KD (2014): Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. *J Pathol.* 232(2):165-77.
- Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA (2008): An investigation of human brain tumour lipids by high-resolution magic angle spinning 1H MRS and histological analysis. *NMR Biomed.* 21(7):677-85.
- Ortega Anta RM, González Rodríguez LG, Villalobos Cruz TK, Perea Sánchez JM, Aparicio Vizuete A, López Sobaler AM (2013): Food sources and adequacy of intake of omega 3 and omega-6 fatty acids in a representative sample of Spanish adults. *Nutr Hosp.* 28(6):2236-45.

Oshita SE, Chen F, Kwan T, Yehiely F, Cryns VL (2010): The small heat shock protein HspB2 is a novel anti-apoptotic protein that inhibits apical caspase activation in the extrinsic apoptotic pathway. *Breast Cancer Res Treat.* 124(2):307-15

Ózsvári B, Puskás LG, Nagy LI, Kanizsai I, Gyuris M, Madácsi R, Fehér LZ, Gerö D, Szabó C (2010): A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds. *Int J Mol Med.* 25:4.

Park WJ, Kothpalli KS, Lawrence P, Brenna JT (2011): FADS2 function loss at the cancer hotspot 11q13 locus diverts lipid signaling precursor synthesis to unusual eicosanoid fatty acids. *PLOS One.* 6(11):e28186.

Paton CM, Ntambi JM (2009): Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(1):E28-37.

Peters BD, Voineskos AN, Szeszko PR, Lett TA, Derosse P, Guha S, Karlsgodt KH, Ikuta T, Felsky D, John M, Rotenberg DJ, Kennedy JL, Lencz T, Malhotra AK (2014): Brain white matter development is associated with a human-specific haplotype increasing the synthesis of long chain fatty acids. *J Neurosci.* 34(18):6367-76.

Péter M, Balogh G, Gombos I, Liebisch G, Horváth I, Török Z, Nagy E, Maslyanko A, Benkő S, Schmitz G, Harwood JL, Vígh L (2012): Nutritional lipid supply can control the heat shock response of B16 melanoma cells in culture. *Mol Membr Biol.* 29(7):274-89.

PHE (2013): Public Health England Culture Collections. http://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86022703&collection=ecacc_gc. Internetes hozzáférés: 2015. szeptember 13.

Pilkingtion SM, Watson RE, Nicolaou A, Rhodes LE (2011): Omega-3 polyunsaturated fatty acids: photoprotective macronutrients. *Exp Dermatol.* 20(7):537-43.

Portolesi R, Powel BC, Gibson RA (2008): Delta6 desaturase mRNA abundance in HepG2 cells is suppressed by unsaturated fatty acids. *Lipids.* 43(1):91-5.

Preuss M, Girnun GD, Darby CJ, Khoo N, Spector AA, Robbins ME (2000): Role of antioxidant enzyme expression in the selective cytotoxic response of glioma cells to gamma-linolenic acid supplementation. *Free Radic Biol Med.* 2000, 28(7):1143-56.

Pucer A, Brglez V, Payré C, Pungerčar J, Lameau G, Petan T (2013): Group X secreted phospholipase A2 induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival. *Mol Cancer.* 12(1):111

Puskás LG, Fehér LZ, Vizler C, Ayaydin F, Rásó E, Molnár E, Magyary I, Kanizsai I, Gyuris M, Madácsi R, Fábián G, Farkas K, Hegyi P, Baska F, Ozsvári B, Kitajka K (2010): Polyunsaturated fatty acids synergize with lipid droplet binding thalidomide analogs to induce oxidative stress in cancer cells. *Lipids Health Dis.* 9:56.

Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007): The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res.* 67(20):9809-16.

Qu S, Yao Y, Shang C, Xue Y, Ma J, Li Z, Liu Y (2012): MicroRNA-330 is an oncogenic factor in glioblastoma cells by regulating SH3GL2 gene. *PLOS One.* 7(9): e46010.

Qu Y, Zhang J, Wu S, Li B, Liu S, Cheng J (2012): SIRT1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of human malignant glioma cell lines. *Neurosci Lett.* 525(2):168-72.

Quintero M, Cabañas ME, Arús C (2007): A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Bichem Biophys Acta.* 1771(1):31-44.

Ragusa M, Majorana A, Banelli B, Barbagallo D, Statello L, Casciano I, Guglielmino MR, Duro LR, Scalia M, Magro G, Di Pietro C, Romani M, Purello M (2010): MIR152, MIR200B, and MIR338, human positional and functional neuroblastoma candidates, are involved in neuroblast differentiation and apoptosis. *J Mol Med (Berl).* 88(10):1041-53.

- Ramos KL, Colquhoun A (2003): Protective role of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the metabolic response of C6 rat glioma cells to polyunsaturated fatty acid exposure. *Glia* 43:2.
- Raza Shaikh S, Brown DA (2013): Models of plasma membrane organization can be applied to mitochondrial membranes to target human health and disease with polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 88(1):21-5.
- Reardon HT, Hsieh AT, Park WJ, Kothapalli KS, Anthony JC, Nathanielsz PW, Brenna JT (2013): Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate expression of FADS3 transcripts. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 88(1):15-9.
- Rémy C, Fouilhé N, Barba I, Sam-Lai E, Lahrech H, Cucurella MG, Izguierdo M, Moreno A, Ziegler A, Massarelli R, Décorps M, Arús C (1997): Evidence that mobile lipids detected in rat brain glioma by 1H nuclear magnetic resonance correspond to lipid droplets. *Cancer Res*. 57(3):407-14.
- Rolle K (2015): miRNA Multiplayers in glioma. From bench to bedside. *Acta Biochim Pol*. 62.
- Roongta UV, Pabalan JG, Wang X, Ryseck RP, Fargnoli J, Henley BJ, Yang WP, Zhu J, Madrieddi MT, Lawrence RM, Wong TW, Rupnow BA (2011): Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol Cancer Res*. 9(11):1551-61.
- Rose DP, Connolly JM (1999): Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther*. 83(3):2017-44.
- Ruxton GD (2006): Forum. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney *U* test. *International Society for Behavioral Ecology*. Oxford University Press. 688-90. doi:10.1093/beheco/ark016.
- Sandrone SS, Repossi G, Candolfi M, Eynard AR (2014): Polyunsaturated fatty acids and gliomas: A critical review of experimental, clinical, and epidemiologic data. *Nutrition*. S0899-9007:00075-00076.
- Santos CR, Schulze A (2012): Lipid metabolism in cancer. *FEBS J*. 279(15):2610-23.
- Sasaki A, Uda Y, Tsunoda Y, Yamamoto G, Tsuji M, Oyamada H, Ouchi K, Mizutani T (2012): Analysis of p53 and miRNA expression after irradiation of glioblastoma cell lines. *Anticancer Res*. 32(11):4709-13.
- Scaglia N, Igal RA (2005): Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. *J Biol Chem*. 280(27):25339-49.
- Scaglia N, Igal RA (2008): Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol*. 33(4):839-50.
- Schultz CR, Golembieski WA, King DA, Brown SL, Brodie C, Rempel SA (2012): Inhibition of HSP27 alone or in combination with pAKT inhibition as therapeutic approaches to target SPARC-induced glioma cell survival. *Mol Cancer*. 11:20.
- Shirsat NV, Shaikh SA (2003): Overexpression of the immediate early gene fra-1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and reduces tumorigenicity of c6 glioma cells. *Exp Cell Res*. 291(1):91-100.
- Shu M, Zheng X, Wu S, Lu H, Leng T, Zhu W, Zhou Y, Ou Y, Lin X, Lin Y, Xu D, Zhou Y, Yan G (2011): Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells. *Mol Cancer*. 10: 59.
- Shu M, Zhou Y, Zhu W, Zhang H, Wu S, Chen J, Yan G (2012): MicroRNA 335 is required for differentiation of malignant glioma cells induced by activation of cAMP/protein kinase A pathway. *Mol Pharmacol*. 81(3): 292-8.
- Sinner DI, Kim GJ, Henderson GC, Igal RA (2012): StearoylCoA desaturase-5: a novel regulator of neuronal cell proliferation and differentiation. *PLOS One*. 7(6):e39787.

Song Y, Zhang LJ, Li H, Gu Y, Li FF, Jiang LN, Liu F, Ye J, Li Q (2013): Polyunsaturated fatty acid relatively decreases cholesterol content in THP-1 macrophage-derived foam cell: partly correlates with expression profile of CIDE and PAT members. *Lipids Health Dis.* 12:111.

Soni D, King JA, Kaye AH, Hovens CM (2005): Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge. *J Clin Neurosci.* 12(1):1-5.

Soto-Guzman A, Robledo T, Lopez-Perez M, Salazar EP (2008): Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 294:1-2.

Spitzer M, Wildenhain J, Rappsilber J, Tyers M (2014): BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. *Nat Methods.* 11(2):121-2.

Stoffel W, Holz B, Jenke B, Binczek E, Günter RH, Kiss C, Karakesioglu I, Thevis M, Weber AA, Arnhold S, Addicks K (2008): Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *Embo J.* 27(17):2281-92.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352(10):987-96.

Su DM, Zhang Q, Wang X, He P, Zhu YJ, Zhao J, Rennert OM, Su Ya (2009): Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. *Mol Cancer Ther.* 8(5):1292-304.

Takahashi R, Giannini C, Sarkaria JN, Schroeder M, Rogers J, Mastroeni D, Scrable H (2013): p53 isoform profiling in glioblastoma and injured brain. *Oncogene.* 32(26):3165-74.

Trog D, Fountoulakis M, Friedlein A, Golubnitschaja O (2006): Is current therapy of malignant gliomas beneficial for patients? Proteomics evidence of shifts in glioma cells expression patterns under clinically relevant treatment conditions. *Proteomics.* 6(9):2924-30.

Truitt L, Hutchinson C, DeCoteau JF, Geyer CR (2014): Chaetocin antileukemia activity against chronic myelogenous leukemia cells is potentiated by bone marrow stromal factors and overcomes innate imatinib resistance. *Oncogenesis.* 3:e122.

Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA (2010): Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 83(2):61-8.

Tulassay Zsolt, Matolcsy András (szerkesztők): Az Onkológia tankönyve, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011. Fejezet: Ilniczky Sándor, Kovács Tibor, Fedorcsák Imre: A központi idegrendszer daganatai (3.13). (470-490 oldal). és Garami Miklós: Gyermekkori daganatok (3.17.) – a központi idegrendszer daganatai (3.17.2). (550-553 oldal). A könyvet írták: Bánhidi Ferenc, Bánsághi Zoltán, Bérczi Viktor, Csóka Mónika, Dank Magdolna, Demeter Judit, Döbrössy Lajos, Fedorcsák Imre, Fehérvári Imre, Gál János, Garami Miklós, Gyergyay Fruzsina, Harsányi László, Hegedűs Katalin, Herszényi László, Hideghéty Katalin, Holló Péter, Horkay Ferenc, Igaz Péter, Ilniczky Sándor, Jeney Sándor, Kapocsi Judit, Karlinger Kinga, Kárpáti Sarolta, Kellermayer Miklós, Keszthelyi Attila, Kocsis Judit, Kovács Gábor, Kovács Tibor, Kovalszky Ilona, Kralovánszky Judit, Kulka Janina, Kupcsulik Péter, Langmár Zoltán, Lengyel Gabriella, Losonczy György, Madách Krisztina, Marschalkó Márta, Masát Péter, Masszi Tamás, Matolcsy András, Merkely Béla, Micsik Tamás, Moldvay Judit, Müller Veronika, Múzes Györgyi, Nagy Károly, Nagy Zoltán Zsolt, Németh Miklós, Nyirády Péter, Pápai Zsuzsa, Pytel József, Rác Károly, Rényi Imre, Répássy Gábor, Riesz Péter, Romics Imre, Sápi Zoltán, Schaff Zsuzsa, Somlai Beáta, Sréter Lília, Szabó György, Szakonyi József, Szánthó András, Szendrői Attila, Szendrői Miklós, Szentmártoni Gyöngyvér, Szilvási István, Szűcs Miklós, Timár József, Torgyik László, Tóth Andrea, Tóth Miklós, Tulassay Zsolt, Wikonkál Norbert, Zalatnai Attila. A könyvet lektorálta: Eckhardt Sándor, Lapis Károly, Bucsiky Péter.

Ulasov I, Thaci B, Sarvaiya P, Yi R, Guo D, Auffinger B, Pytel P, Zhang L, Kim CK, Borovjagin A, Dey M, Han Y, Baryshnikov AY, Lesniak MS (2013): Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas. *Cancer Med.* 2(4):457-67.

van der Kemp WJ, Klomp DW, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE (2012): A meta-analysis of the polyunsaturated fatty acid composition of erythrocyte membranes in schizophrenia. *Schizophr Res.* 141 (2-3):153-61.

Vartak S, McCaw R, Davis CS, Robbins ME, Spector AA (1998): Gamma-linolenic acid (GLA) is cytotoxic to 36B10 malignant rat astrocytoma cells but not to 'normal' rat astrocytes. *Br J Cancer.* 77(10):1612-20.

Vartak S, Robbins ME, Spector AA (1997): Polyunsaturated fatty acids increase the sensitivity of 36B10 rat astrocytoma cells to radiation-induced cell kill. *Lipids.* 32(3):283-92.

Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A (2002): Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci.* 967:183-95.

Wang F, Bhat K, Doucette M, Zhou S, Gu Y, Law B, Liu X, Wong ET, Kang JX, Hsieh TC, Qian SY, Wu E (2011): Docosahexaenoic acid (DHA) sensitizes brain tumor cells to etoposide-induced apoptosis. *Curr Mol Med.* 11:6.

Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, Rich JN, Sullenger BA (2010): Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells.* 28(1):17-28.

Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, Gould K, Cao G (2005): Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun.* 332(3):735-42.

Wang S, Hannafon BN, Wolf RF, Zhou J, Avery JE, Wu J, Lind SE, Ding WQ (2014): Characterization of docosahexaenoic acid (DHA) – induced heme oxygenase-1 (HO-1) expression in human cancer cells: the importance of enhanced BTB and CNC homology 1 (Bach1) degradation. *J Nutr Biochem.* 25(5):515-25.

Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK, Generali D, Naqaraju GP, El-Rajes B, Ribatti D, Chen YC, Honoki K, Fuji H, Georgakilas AG, Nowsheen S, Amedei A, Niccolai E, Amin A, Ashraf SS, Helferich B, Yang X, Guha G, Bhakta D, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Halicka D, Mohammed SI, Azmi AS, Bilsland A, Keith WN, Jensen LD (2015): Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. pii: S1044-579X(15)00002-4.

Wei Q, Jiang H, Baker A, Dodge LK, Gerard M, Young MR, Toledano MB, Colburn NH (2013): Loss of sulfiredoxin renders mice resistant to azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 34(6):1403-10.

Wexler EJ, Gravalles EM, Czerniak PM, Devenny JJ, Longtine J, Wong MK, Slee AM, Kerr JS (2000): Tumor biology: use of tiled images in conjunction with measurements of cellular proliferation and death in response to drug treatments. *Clin Cancer Res.* 6(8): 3361-70.

Wijendran V, Downs I, Srigley CT, Kothpalli K, Sm Park WJ, Blank BS, Zimmer JP, Butt CM, Salem N Jr, Brenna JT (2013): Dietary arachidonic acid and docosahexaenoic acid regulate liver fatty acid desaturase (FADS) alternative transcript expression in suckling piglets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 89(5):345-50.

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM (1999): Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 270(1): 41-9.

Wolins NE, Rubin B, Basaemle DL (2001): TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem.* 276(7):5101-8.

Wu X, Zou X, Chang Q, Zhang Y, Li Y, Zhang L, Huang J, Liang B (2013): The evolutionary pattern and the regulation of stearyl-CoA desaturase genes. *Biomed Res Int.* 2013:856521.

- Wu Y, Tada M, Takahta K, Tomizawa K, Matsui H (2007): Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on apoptosis induced by etoposide, okadaic acid and AraC in Neuro2a cells. *Acta Med Okayama*. 61(3):147-52.
- Wu X, Zou X, Chang Q, Zhang Y, Li Y, Zhang L, Huang J, Liang B (2013): The evolutionary pattern and the regulation of stearoyl-CoA desaturase genes. *Biomed Res Int*. 2013:856521.
- Xu YT, Wang J, Yin R, Qiu MT, Xu L, Wang J, Xu L (2014): Genetic polymorphisms in Glutathione S-transferase Omega (GSTO) and cancer risk: a meta-analysis of 20 studies. *Sci Rep*. 4:6578.
- Yan Z, Wang J, Wang C, Jiao Y, Qi W, Che S (2014): miR-96/HBP1/Wnt/ β -catenin regulatory circuitry promotes glioma growth. *FEBS Lett*. 588(17):3038-46.
- Yang B, Ren XL, Fu YQ, Gao JL, Li D (2014): Ratio of n-3/n-6 PUFAs and risk of breast cancer: a meta-analysis of 274135 adult females from 11 independent prospective studies. *BMC Cancer*. 14:105.
- Young MR, Colburn HN (2006): Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene*. 379:1-11.
- Zaiontz C (2013-2015): Real Statistics Using Excel. Two Sample t Test: unequal variances. <http://www.real-statistics.com/students-t-distribution/two-sample-t-test-unequal-variances/> Internetes hozzáférés: 2015. Szeptember 19.
- Zerrouqi A, Pyrzynska B, Febbraio M, Brat DJ, Van Meir EG (2012): P14ARF inhibits human glioblastoma-induced angiogenesis by upregulating the expression of TIMP3. *J Clin Invest*. 122(4):1283-95.
- Zhang C, Bao Z, Zhang W, Jiang T (2013): Progress on molecular biomarkers and classification of malignant gliomas. *Front Med*. 7(2):150-6.
- Zhang W, Qiao T, Zha L (2011): Inhibition of heme oxygenase-1 enhances the radiosensitivity in human nonsmall cell lung cancer a549 cells. *Cancer Biother Radiopharm*. 26(5):639-45.
- Zhu YD, Wang L, Sun C, Fan L, Zhu DX, Fang C, Wang YH, Zou ZJ, Zhang SJ, Li JY, Xu W (2012): Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Med Oncol*. 29(4):2323-31.
- Zinzow-Kramer WM, Horton BM, Maney DL (2014): Evaluation of reference genes of quantitative real-time PCR in the brain, pituitary, and gonads of songbirds. *Horm Behav*. 66(2): 267-75.

Összefoglaló

A glióma egy halálos betegség, melyet kemoterápiával vagy sugárterápiával kezelnek.

Kimutatták, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA-k) a rákos sejtek sugárkezelésre való érzékenységét is megváltoztatják, és védik a normális sejteket a sugárzás káros hatásaitól (Dupertuis és mtsai, 2007).

A rákos sejtek számára a zsírsavszintézis konstitutív aktiválása szelektív előnyt jelent. Számos génnek, mely zsírsavszintézisért felelős fehérjéket kódol, köze van a karcinogenezishez. A zsírsavszintézis gátlása a rákos sejtek apoptózisát idézi elő (Igal, 2010). PUFA-k lecsökkentik a kulcs lipid bioszintetikus gének aktivitását (Pucer és mtsai, 2013; Vessby és mtsai, 2002).

A gamma-linolénsavat (GLA) már klinikai fázisban is tesztelték, és hatásosnak bizonyult a glióma kezelésére (Das, 2004; Das, 2007). A sugárkezelés önmagában nem hatásos az alacsonyabb rangú gliómák ellen, sajnos nem befolyásolja az átlag túlélési arányt (Sandrone és mtsai, 2014). Ezért a tanulmányaink során a telítetlen zsírsavak (UFA)-k hatását vizsgáltuk, mint sugárkezelés mellett alkalmazott adjuvánsokat, különböző morfológiai, biokémiai és génexpressziós vizsgálatok során.

Célunk volt, hogy a UFA-k hatását meghatározzuk önmagukban és különböző dózisu (5 Gy és 10 Gy) sugárkezeléssel együtt glióma sejteken. Kíváncsiak voltunk, hogy ki tudunk-e mutatni szinergizmust a UFA-k és sugárzás között. Sejtszinten terveztük kimutatni a hatást. Ehhez ellenállásalapú valós idejű sejt elektronikus érzékelő mérést (RT-CES-t), apoptózis és sejt morfológiai vizsgálatokat, biokémiai és génexpressziós elemzést hajtottunk végre. Speciális hangsúlyt fektettünk azokra a génekre, melyeknek a zsírsavbioszintézisben és a stressz válaszbán van szerepe.

Az RT-CES készülékkel történő méréseknek megfelelően 25-75 μ M arachidonsav (AA), 25-75 μ M dokozaheksaénsav (DHA), 50 μ M GLA, 400 μ M olajsav (OA) megnövelte a sugárkezelés (5 Gy és 10 Gy) hatását és szignifikánsan csökkentette a normalizált sejt indexet azokhoz a sejtekhez képest melyek csak sugárkezelést (5 Gy és 10 Gy) kaptak. A normalizált sejt index a sejt proliferáció egyik mutatója. Az OA-val való kezelés érdekes hatással volt az U-87 MG sejtekre: 100-200 μ M megnövelte a sejt proliferációt a kontroll sejtekhez képest.

AA, DHA és GLA önmagában és sugarazással (5 Gy és 10 Gy) kombinálva egyaránt szignifikánsan lecsökkentette az U-87 MG sejtek LDH aktivitását. Az AA, DHA és GLA sugarazással (5 Gy és 10 Gy) való kombinálása szintén szignifikánsan lecsökkentette a sejtek

életképességét. 100 μ M OA és 50-100 μ M eikozapentaénsav (EPA) nem befolyásolta a sejtek életképességét és az U-87 MG sejtek LDH aktivitását.

A biokémiai méréseink (LDH és MTS mérések) alapján az AA, DHA és GLA volt a leghatásosabb zsírsav, ezért a további morfológiai és génexpressziós vizsgálataink során ezeket alkalmaztuk. Az AA-t és DHA-t 25 μ M-os, míg a GLA-t 50 μ M-os koncentrációban alkalmaztuk.

A PUFA kezelés nem változtatta meg a sejtszámot, konfluenciát, az átlag sejtvastagságot és átlag sejtek alakjára vonatkozó szabálytalanságot 24 órás kezelést követően.

Az AA és sugárkezelés együttes alkalmazása megváltoztatta a sejtszámot, a konfluenciát, az átlag sejtvastagságot és átlag sejtszabálytalanságot a kontroll sejtekhez képest, 48 órás kezelés után. A PUFA-k és 10 Gy 48 óra után szignifikánsan megváltoztatta mind a négy paramétert, kivéve az átlag sejtszabálytalanságot, amikor a DHA a 10 Gy-el kezelt sejteken volt alkalmazva.

Az 5 Gy-el ellentétben; egy 10 Gy-es dózis szignifikánsan megnövelte az apoptotikus sejtek arányát. Egyedül a GLA idézett elő apoptózist. A PUFA-k kombinálva sugarazással apoptózist okoztak.

Ritkán és kismértékű génexpresszióbeli változást kaptunk a 24 órás kezelések esetén a stresszhez köthető gének esetén. Ezért a 48 órás kezelésekre fektetjük a hangsúlyt.

Az oxidatív stresszhez köthető gének közül a PUFA és 10 Gy-el való kezelés szignifikánsan megnövelte a *HMOX1*, *AKR1C1* és *NQO1* expressziót. Az ER proapoptotikus ágát képviselő gén, a *DDIT3* expressziója is szignifikánsan megnőtt a PUFA és 10 Gy kezelés hatására.

A NOTCH1 gátlása felerősíti a glióma sejtekre kifejtett káros hatást. Igéretes, hogy a *NOTCH1* expressziós szint szignifikánsan alacsonyabb GLA és sugarazás esetén, mint csak sugarazás esetén. Az AA, 10 Gy, 10 Gy és AA valamint 10 Gy és DHA szignifikánsan megnövelte a *GADD45A* expressziót.

Az összes korai stresszválaszban résztvevő gén (*EGR1*, *TNF- α* , *c-FOS*, *FOSL1*) expresszióját megnövelte a sugarazás, valamint a sugarazással kombinált PUFA kezelés.

Míg a PUFA kezelés nem volt hatással a *TP53* expresszióra, addig a 10 Gy-es dózis megnövelte azt.

10 Gy, valamint a 10 Gy és PUFA kezelés szignifikánsan megemelte a *C-MYC* expressziót.

MMP14, *TGFBI*, *SIRT1*, *HSPB2* és *TIMP3* esetén nem észleltünk változást sem sugárzás, sem PUFA kezelés, sem a kettő kombinálása esetén.

A zsírsavbioszintézishez köthető gének esetén a 24 órás és 48 órás eredmények jelentősen eltérnek egymástól. A továbbiakban a 48 órás eredményeket tárgyalom. 10 Gy megnövelte a *FASN* expressziót, míg a GLA kezelés lecsökkentette azt. A GLA kezelés lecsökkentette az *SCD1*, *SCD5*, *FADS1*, *FADS2* gének expresszióját, míg a *FADS3* expressziójára nem volt hatással. Az *ELOVL1*, *ELOVL2* és *ELOVL5* expressziót sem a sugárzás, sem a GLA kezelés nem befolyásolta.

A miR-146a expressziót a DHA megnövelte, míg a GLA lecsökkentette. 10 Gy és GLA együttesen szignifikánsan megemelte a miR-146a expressziót. A DHA kezelés szignifikánsan megemelte a miR-181a expressziót. A többi vizsgált miRNS-re (miR-34a, miR-96, miR-148a, miR-148b, miR-152) sem a PUFA kezelés, sem a sugárzás hatására nem kaptunk expresszióbeli változást.

GLA hatására megnőtt a *HSP90AA1* expresszió. A sugárzás és a GLA kezelés, valamint a kettő kombinációja megnövelte a *HSPB1* expressziót.

Sugarazott sejtek esetén a GLA kezelés megemelte a lipidcseppecskék akkumulációjának mértékét.

Következtetések

A tudományos irodalomnak és az eredményeinknek megfelelően az AA, DHA és GLA kezelés és/vagy sugárkezelés a rákos sejtekre nézve specifikus hatású. A PUFA-k önmagukban hatékony rákellenes hatóanyagok lehetnek. Az általam alkalmazott UFA-k (AA, DHA, GLA, OA, EPA) hatását mostanáig nem vizsgálták U-87 MG sejtvonalon egyszerre több szempontból; morfológiai, biokémiai, kinetikai és QRT-PCR módszereket kombinálva. A PUFA-k és sugárzás közötti kölcsönhatást pedig még egyáltalán nem vizsgálták glióma sejteken a transzkriptom szintjén. Morfológiai, biokémiai és génexpressziós elemzésünk alapján a PUFA-k kedvező módon erősítik fel vagy módosítják a sugárzás glióma sejtekre kifejtett hatását.

Summary

Glioma is a lethal disease, which, besides chemotherapy, is usually treated with radiotherapy. On many occasions, irradiation is not an effective therapy.

It was found that PUFAs change the radio sensitivity of cancerous cells, and protect normal cells from the harmful effects of radiation (Dupertuis et al., 2007). The radio sensitivity induced by PUFAs may be related to their involvement in prostanoid synthesis; however the underlying mechanism is still unclear (Vartak et al., 1998).

For cancerous cells, the constitutive activation of fatty acid synthesis represents selective advantage. Numerous genes that are related to fatty acid synthesis can be responsible for cancerogenesis. Inhibition of fatty acid synthesis causes apoptosis of cancerous cells (Igal, 2010). It was shown that PUFAs decrease the activity of key lipid biosynthetic genes (Pucer et al., 2013; Vessby et al., 2002).

Gamma-linolenic acid (GLA) has been already tested in clinical phase, and found to be effective in glioma treatment (Das, 2004; Das, 2007). Radiation alone seems to be non-effective on lower grade gliomas, unfortunately it does not influence the average survival rate (Sandrone et al., 2014). Therefore, in our studies we investigated the effects of PUFAs as adjuvants to irradiation by using different cellular, biochemical and gene expression analysis methods.

Our aim was to investigate the effects of unsaturated fatty acids (UFAs) alone and in combination with different doses of irradiation (5 Gy and 10 Gy) on glioma cells. We were interested in whether we could detect synergism between PUFAs and irradiation to inhibit growth of cancer cells and to induce apoptosis. We intended to describe the effects at the cellular level by using real-time cell electronic sensing (RT-CES), cell viability, membrane permeability, apoptosis, and cell morphology measurements, and gene expression analysis. We put special emphasis on investigation of the expression of genes that are related to fatty acid biosynthesis and stress response.

According to RT-CES measurements 25-75 μ M arachidonic acid (AA), 25-75 μ M docosahexaenoic acid (DHA), 50 μ M GLA, 400 μ M oleic acid (OA) enhanced the effect of irradiation (5 Gy and 10 Gy) and diminished in a significant manner the normalized cell index compared to the cells that were only irradiated (5 Gy and 10 Gy). The normalized cell index is an indicator of cell proliferation. Treatment with OA had an interesting effect on U-87 MG cells: 100-200 μ M increased the cell proliferation compared to the control cells.

AA, DHA and GLA alone and combined with irradiation (5 Gy and 10 Gy) significantly diminished the LDH activity of U-87 MG cells. The combination of AA, DHA and GLA with irradiation (5 Gy and 10 Gy) also diminished significantly the cell viability. 100 μ M OA and 50-100 μ M eicosapentaenoic acid (EPA) did not affect the cell viability and LDH activity of U-87 MG cells.

According to our biochemical assays (MTS and LDH measurements) we found that AA, DHA and GLA were the most effective unsaturated fatty acids, therefore we selected them for further cellular and gene expression analysis. We applied AA and DHA in 25 μ M concentration, while GLA was used at 50 μ M concentration.

PUFA treatment did not alter cell number, confluence, average cell thickness, and average cell irregularity after 24 hour treatment. Co-application of AA and irradiation changed cell number, confluence, average cell thickness and average cell irregularity compared to control cells after 48 hour exposure. After 48 hours the combination of PUFAs and 10 Gy changed all four parameters significantly compared to the cells that were only irradiated, except in case of average cell irregularity parameter, when DHA was applied on 10 Gy irradiated cells.

In opposition with 5 Gy; a 10 Gy dose increased the rate of apoptotic cells significantly. Only GLA caused apoptosis. PUFAs combined with irradiation induced apoptosis of U-87 MG cells.

In case of stress-related genes seldom and a low amount of change in gene expression could be detected after 24 hour treatment. Thus, we put emphasis on 48 hour treatment.

Out of genes related to oxidative stress, treatment with PUFA and 10 Gy significantly enhanced the expression of *HMOX1*, *AKR1C1* and *NQO1*. The representative gene of the ER's proapoptotic arm, *DDIT3* is significantly induced by PUFA and 10 Gy.

The inhibition of *NOTCH1* enhances the detrimental effect on glioma cells. It is promising that, the expression level of *NOTCH1* is significantly lower in case of irradiation and GLA treatment than in case of irradiation alone. AA, 10 Gy, 10 Gy and AA, 10 Gy and DHA increased *GADD45A* expression significantly.

In case of all early- stress response genes (*EGR1*, *TNF- α* , *c-FOS*, *FOSL1*) irradiation and irradiation combined with PUFA treatment the gene expression increased.

While PUFA treatment had no effect on *TP53* expression, 10 Gy enhanced it.

10 Gy and 10 Gy combined with PUFA enhanced *C-MYC* expression significantly.

In case of *MMP14*, *TGFBI*, *SIRT1*, *HSPB2* and *TIMP3* we did not notice any alteration in gene expression, neither when cells were irradiated, and nor when cells were treated with PUFA; nor when cells were co-exposed to PUFA and 10 Gy.

In case of fatty acid synthesis related genes the 24 hour and 48 hour results differ in a great manner. Hereafter I present the 48 hour results. 10 Gy increased *FASN* expression, while GLA treatment diminished it. GLA treatment decreased the expression of *SCD1*, *SCD5*, *FADS1*, *FADS2* genes, while did not affect *FADS3* gene expression. The expression of *ELOVL1*, *ELOVL2* and *ELOVL5* was unaffected by irradiation or GLA treatment.

The miR-146a expression was increased by DHA while GLA diminished it. The combination of 10 Gy and GLA significantly enhanced miR-146a expression. DHA treatment increased miR-181a expression. In case of the other investigated miRNAs (miR-34a, miR-96, miR-148a, miR-148b, miR-152) we did not detect any change in expression neither after PUFA treatment, nor after irradiation.

GLA induced the expression of *HSP90AA1*. Irradiation and GLA treatment and the combination of both increased *HSPB1* expression.

In case of irradiated cells GLA treatment enhanced lipid droplet accumulation.

Conclusions

According to the scientific literature and our results the AA, DHA and GLA treatment and/or irradiation has specific effect on cancerous cells. PUFAs alone can be effective anticancer agents. Until now, the effect of UFAs (AA, DHA, GLA, OA and EPA) investigated in the present thesis, has not been investigated on U-87 MG cell line from more perspectives at the same time; combining morphological, biochemical, kinetic and QRT-PCR methods. Also, the interaction between PUFAs and irradiation has not yet been evaluated on glioma cells at transcriptomic level. According to cellular, biochemical and gene expression analysis we could conclude that PUFAs enhance or modulate the effects of radiation on glioma cells in a favorable way.

Függelék

F-1. táblázat: Az értekezésben használt primerek szekvenciája

Szimbólum	Teljes hivatalos név	Ct		Primerek szekvenciája
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1	23.13-25.68	Fw	CCTGTGAGGGAGGAAGAAAG
			Rv	AGGACAGGCATGAAGTGACC
C-FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	23.11-25.23	Fw	AGGACCTTATCTGTGCGTGAAAC
			Rv	CCACACATGGATGCTTTCAAGT
C-MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	21.35-24.76	Fw	CTGGATCGGGGTAAAGTGAC
			Rv	AAAAACCATTCCCGTTTTCC
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	16.93-20.09	Fw	CAGAGCTGGAACCTGAGGAG
			Rv	TGGATCAGTCTGGAAAAGCA
EGR1	early growth response 1	18.84-23.66	Fw	AGCCCTACGAGCACCTGAC
			Rv	GGTTTGGCTGGGGTAACTG
ELOVL1	ELOVL fatty acid elongase 1 <i>a primereink 1,3, 4-es transzkripteket amplifikálják</i>	36.4-45.06	Fw	CCCCTCTGGTGACAGAAAGT
			Rv	AGCAGGGCCAGAGAGAAGT
ELOVL2	ELOVL fatty acid elongase 2	29.69-37.19	Fw	GATAGTCTCTAGGGTGATGCACTG
			Rv	TCACACAGGAGACATCTGTTCA
ELOVL5	ELOVL fatty acid elongase 5	20.02-25.65	Fw	CCGGTGTCTCCTTCTACATCC
			Rv	CAGCAGCTTTGAGCAGCA
FADS1	fatty acid desaturase 1	23.19-29.5	Fw	CACCAGCCTGTTTAGCCAAG
			Rv	CCTCACTGGTGTTTGCTCAG
FADS2	fatty acid desaturase 2	28.16-38.9	Fw	CCTGTCTGAACCTGCCCTTA
			Rv	GCCCCCTCCTATCAGAATG
FADS3	fatty acid desaturase 3	31.01-45.07	Fw	TCCTACAGCCCCTGTTGATT
			Rv	CTCGGAAGTCCTCGACCAG
FASN	fatty acid synthase	24.42-31.53	Fw	CAGGCACACACGATGGAC
			Rv	CGGAGTGAATCTGGGTTGAT
FOSL1	FOS-like antigen 1	18.38-22.92	Fw	AACCGGAGGAAGGAAGTAC
			Rv	CTGCAGCCCAGATTTCTCA
GADD45A	growth arrest and DNA-damage inducible, alpha	27.6-33.06	Fw	TTTGCAATATGACTTTGGAGGA
			Rv	CATCCCCACCTTATCCAT
GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	9.77-12.44	Fw	CAGCTACTTGGGAGGCTGA
			Rv	GATGTGATCTCGGCTCACTG
GSR	glutathione reductase	19.18-21.77	Fw	CAATGATCAGCACCAACTGC
			Rv	GTCTTTTAACTCCTTGACCTG
GSTO1	glutathione S-transferase omega 1	18.87-21.35	Fw	TACCTCATCTGGCCCTGGT
			Rv	TTTCAGTTTTGGAGTGTGGTCT
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	17.58-21.11	Fw	GGCAGAGGGTGATAGAAGAGG
			Rv	AGCTCCTGCAACTCCTCAAA
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	14.27-16.67	Fw	TGACCTTGATTTATTTGCATACC
			Rv	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	23.04-35.62	Fw	GATGATGAGCAGTACGCTTGG
			Rv	CTTTTGTTCACGACCCATAG
HSPB1	heat shock 27 kDa protein 1 (HSP25)	21.02-26.04	Fw	TCCCTGGATGTCAACCACTT
			Rv	GATGTAGCCATGCTCGTCCT
HSPB2	heat shock 27 kDa protein 2 (HSP27)	36.88-48.88	Fw	CGAGTACGAATTTGCCAACC
			Rv	TAGAGTGTGGGGGTCAGGAT
MMP14	matrix metalloproteinase 14	21.3-24.82	Fw	TCCAAGGAAGGAGCCTGAG

			Rv	CCCATCCAAGGCTAACATTC
<i>NOTCH1</i>	notch 1	26.72-30.07	Fw	ACGCACAAGGTGTCTTCCA
			Rv	AGGATCAGTGGCGTCGTG
<i>NQO1</i>	NAD(P)H dehydrogenase quinone (1)	15.12-18.83	Fw	AGGACCCTTCCGGAGTAAGA
			Rv	TCCCTTGACAGAGAGTACATGG
<i>PLIN3</i>	perilipin 3	24.43-32.84	Fw	CTTCGAGCCACCAAGCAG
			Rv	AACGCCTTGCTTGACAGTTT
<i>PPIA</i>	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	8.87-11.27	Fw	ATGCTGGACCCAACACAAAT
			Rv	TCTTTCACCTTGCCAAACACC
<i>SCD1</i>	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD)	16.13-30.82	Fw	GAAGGGGAGTACGCTAGACTTGT
			Rv	ACATCATCAGCAAGCCAGGT
<i>SCD5</i>	stearoyl-CoA desaturase 5 (SCD5), 1-es transzkript variáns	18.15-23.96	Fw	GGTCCGGATCCAGAGAAAGT
			Rv	CACAGACTCTCTCCCCAGATG
<i>SIRT1</i>	sirtuin 1	29.51-32.26	Fw	TGGCTTAGAAGATGAGCCTGA
			Rv	TCCATCAGTCCCAAATCCAG
<i>SRXN1</i>	sulfiredoxin 1	19-21.15	Fw	CAGGGTCTAGGGGAAGAGGT
			Rv	CACTCCTACTACAGTGGGTCCAG
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa	14.27-16.4	Fw	CGAGTGCTGTCCTGGATATG
			Rv	CCCAGGGTCTCGTAAAGGTT
<i>TIMP3</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	37.05-40.29	Fw	CACCCCTCACCTGTGGAA
			Rv	TGACCCAAACCAGAACCAAC
<i>TNF-α</i>	tumor necrosis factor	24.58-30.85	Fw	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGA
			Rv	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
<i>TP53</i>	tumor protein p53	20.43-22.95	Fw	TGTTCTTGACAGTTAAGGGTTAGTTT
			Rv	TGAAGTGGGCCCCTACCTA
<i>TRXR1</i>	thioredoxin reductase 1	8.65-11.08	Fw	GGCGATATATTGGAGGATAAGG
			Rv	ATAGAGCCTCTGAGCCAGCA

F-2. táblázat: **RT-CES, LDH és MTS mérések alapján kapott UFA kezelés és sugárzás hatását összegző eredmények.** Rövidítések jelentése: ↑: a proliferáció megnőtt a kontroll sejtekhez képest (0 μM UFA, 0 Gy); ↓: a proliferáció csökkent a kontroll sejtekhez képest (0 μM UFA, 0 Gy); ~: nem tudunk szignifikáns különbséget kimutatni a kontroll sejtek (0 μM UFA, 0 Gy) és az adott kezelés között. *: szinergizmus volt kimutatható az UFA kezelés és a sugárkezelés között. Az LDH aktivitás és sejt viabilitás százalékban van kifejezve a kontroll sejtekhez képest.

UFA típus, koncentráció és sugárkezelés dózisa	RT-CES	LDH (%)	MTS (%)
0 Gy 25 μM AA	~	51.53	76.90
5 Gy 25 μM AA	↓	44.05	61.42
10 Gy 25 μM AA	↓	49.36	61.84
0 Gy 50 μM AA	~	31.65	43.87
5 Gy 50 μM AA	↓	23.41	41.44
10 Gy 50 μM AA	↓	28.43	48.67
0 Gy 75 μM AA	↓	13.3	27.48

5 Gy 75 μ M AA	↓	11.86	26.22
10 Gy 75 μ M AA	↓	13.74	29.49 *
0 Gy 25 μ M DHA	~	58.49	59.83
5 Gy 25 μ M DHA	↓	36.27	57.29
10 Gy 25 μ M DHA	↓	38.85 *	62.05
0 Gy 50 μ M DHA	~	21.5	37.58
5 Gy 50 μ M DHA	↓	15.52 *	32.29
10 Gy 50 μ M DHA	↓	22.4	36.36
0 Gy 75 μ M DHA	↓	19.64	30.6
5 Gy 75 μ M DHA	↓	11.75	28.75
10 Gy 75 μ M DHA	↓	20.44	31.24
0 Gy 50 μ M GLA	~	80.31	105.41
5 Gy 50 μ M GLA	↓	70.72	80.31
10 Gy 50 μ M GLA	↓	50.33	56.65
0 Gy 75 μ M GLA	~	66.14	104.64
5 Gy 75 μ M GLA	↓	59.66	73.51
10 Gy 75 μ M GLA	↓	40.13 *	50.61
0 Gy 100 μ M GLA	↓	33.68	66.61
5 Gy 100 μ M GLA	↓	36.29	62.78
10 Gy 100 μ M GLA	↓	29.6	43.72
0 Gy 50 μ M EPA	~	99.67	110.56
5 Gy 50 μ M EPA	~	74.06	92.78
10 Gy 50 μ M EPA	~	56.41	62.8
0 Gy 75 μ M EPA	~	95	109.06
5 Gy 75 μ M EPA	~	68.67*	93.7
10 Gy 75 μ M EPA	~	52.33	62.57
0 Gy 100 μ M EPA	~	91.22	102.16
5 Gy 100 μ M EPA	~	65.71*	87.31
10 Gy 100 μ M EPA	~	49.7*	60.32
0 Gy 100 μ M OA	↑	101.71	104.34
5 Gy 100 μ M OA	~	69.36	82.88
10 Gy 100 μ M OA	~	50.07 *	60.44

0 Gy 200 μ M OA	↑	84.88	98.07
5 Gy 200 μ M OA	~	55.46	79.49
10 Gy 200 μ M OA	~	43.85	57.79
0 Gy 400 μ M OA	↓	3.52	12.68
5 Gy 400 μ M OA	↓	3.85	12.28
10 Gy 400 μ M OA	↓	3.81	10.66*

F-3. táblázat: **Technikai replikák száma gén és miRNS expresszió mérések esetén**
(technikai replika= az adott mintán mért összes mérés, függetlenül attól, hogy ugyanazt a cDNS-t használtuk-e fel, vagy egy másik ugyanúgy kezelt biológiai mintából kapott cDNS-t).
Az inkubációs idő a gén/ miRNS neve után, a kötőjelt követően van feltüntetve. n.d. jelentése = not determined, nincs meghatározva.

	kontroll	AA	DHA	GLA	5Gy	10Gy	10Gy &AA	10Gy &DHA	5Gy& GLA	10Gy &GLA
AKR1C1-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
AKR1C1-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
C-FOS-48	4	2	2	2	n.d.	5	2	2	n.d.	2
C-MYC-48	6	2	2	2	n.d.	6	2	2	n.d.	2
DDIT3-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
DDIT3-48	6	2	2	2	n.d.	6	2	2	n.d.	2
EGR1-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
EGR1-48	9	2	3	4	n.d.	9	2	2	n.d.	2
ELOVL1-48	3	n.d.	n.d.	3	3	3	n.d.	n.d.	3	3
ELOVL2-48	3	n.d.	n.d.	3	3	3	n.d.	n.d.	3	3
ELOVL5-48	3	n.d.	n.d.	3	3	3	n.d.	n.d.	3	3
FADS1-24	5	3	4	4	n.d.	5	3	4	n.d.	4
FADS1-48	3	n.d.	n.d.	3	3	3	n.d.	n.d.	3	3
FADS2-24	4	4	4	4	n.d.	6	6	4	n.d.	4
FADS2-48	5	n.d.	n.d.	6	6	6	n.d.	n.d.	6	6
FADS3-48	3	n.d.	n.d.	3	3	3	n.d.	n.d.	3	3
FASN-24	5	4	4	4	n.d.	4	4	3	n.d.	3
FASN-48	6	n.d.	n.d.	6	6	6	n.d.	n.d.	6	9
FOSL1-48	6	2	2	2		6	2	2	n.d.	2
GADD45A-48	9	4	4	4	n.d.	9	4	4	n.d.	3
GCLM-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
GCLM-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
GSR-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
GSR-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
GSTO1-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
GSTO1-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2

HMOX1-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
HMOX1-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
HSP90AA1-48	6	n.d.	n.d.	6	6	6	n.d.	n.d.	6	6
HSPB1-48	6	n.d.	n.d.	5	6	6	n.d.	n.d.	6	6
HSPB2-48	4	n.d.	n.d.	5	4	4	n.d.	n.d.	6	3
miR-146a-48	6	6	6	6	n.d.	6	6	6	n.d.	6
miR-148a-48	4	4	4	4	n.d.	4	4	4	n.d.	4
miR-148b-48	4	4	4	4	n.d.	4	4	4	n.d.	4
miR-152-48	4	4	4	4	n.d.	4	4	4	n.d.	4
miR-181a-48	8	6	6	6	n.d.	8	6	6	n.d.	6
miR-34a-48	5	4	4	4	n.d.	6	4	4	n.d.	3
miR-96-48	4	4	4	4	n.d.	4	4	4	n.d.	4
MMP14-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
NOTCH1-48	6	4	2	2	n.d.	6	2	2	n.d.	2
NQO1-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
NQO1-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
PLIN3-48	6	n.d.	n.d.	6	6	6	n.d.	n.d.	6	6
SCD1-24	6	3	4	4	n.d.	4	4	4	n.d.	4
SCD1-48	3	n.d.	n.d.	3	3	3	n.d.	n.d.	3	3
SCD5-24	6	4	4	4	n.d.	6	4	3	n.d.	4
SCD5-48	3	n.d.	n.d.	3	3	3	n.d.	n.d.	3	3
SIRT1-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
SRXN1-24	3	2	2	2	n.d.	3	1	2	n.d.	2
SRXN1-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
TGFBI-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
TIMP3-48	6	2	4	4	n.d.	4	2	2	n.d.	3
TNF-α-48	9	4	4	2	n.d.	12	4	4	n.d.	4
TP53-48	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2
TRXR1-24	3	2	2	2	n.d.	3	2	2	n.d.	2

F-1. ábra: **AA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 50μM AA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-2. ábra: **AA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 75 μM AA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-3. ábra: **DHA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 50 μM DHA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-4. ábra: **DHA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 75 μM DHA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-5. ábra: **GLA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 75 μM GLA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-6. ábra: **GLA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 100 μM GLA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-7. ábra: **OA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 200 μM OA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-8. ábra: **OA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 400 μM OA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-9. ábra: **EPA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 75 µM EPA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.

F-10. ábra: **EPA hatása U-87 MG sejtekre – kinetikai vizsgálat.** 100 µM EPA és sugárzás (5 Gy és 10 Gy) hatása normalizált sejt indexre. A kontrollok esetén 4 biológiai minta átlaga, a kezelések esetén 2 biológiai minta átlaga van ábrázolva. Az ábra minden 20. SD. értéket tüntet fel.